

Aus dem
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurochirurgie mit Arbeitsbereich Pädiatrische Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy

Habilitationsschrift

Untersuchungen zum Einfluss von Komorbiditäten und Langzeitveränderungen im experimentellen Schlaganfall-Modell

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurochirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Vincent Matthias Prinz
aus Herdecke

Eingereicht: Januar 2021
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christopher Nimsky

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Der Schlaganfall	6
1.1	Epidemiologie und sozioökonomische Relevanz	6
1.2	Pathophysiologie	7
1.3	Diagnostik und Therapie	8
1.4	Translatationaler „Roadblock“	11
1.5	Zielstellung	13
2	Eigene Arbeiten	14
2.1	Teil A: Untersuchungen zum Einfluss von chronischem Stress auf die Endothelfunktion und Schlaganfallsuszeptibilität sowie zu neuropsychiatrischen Folgen im experimentellen Schlaganfall-Modell der Maus	14
2.1.1	Der Einfluss von chronischem Stress auf die Endothelfunktion und die Schlaganfallsuszeptibilität nach experimentellem Schlaganfall	14
2.1.2	Exofokale dopaminerge Degeneration als Ziel einer Antidepressiva-Therapie im Mausmodell der Post-Schlaganfall-Depression	23
2.1.3	Frühe Detektion einer sekundären Läsion in der Substantia nigra nach fokaler zerebraler Ischämie im Mausmodell: ein sekundäres Zeitfenster für die Neuroprotektion	34
2.2	Teil B: Intravitalmikroskopie zur longitudinalen Untersuchung der vaskulären Funktionalität und Morphologie nach kortikaler Ischämie sowie der topischen Applikation von Nicardipin	43
2.2.1	In-Vivo-Videomikroskopie über ein laterales Schädelfenster nach kortikaler Ischämie im Mausmodell	43
2.2.2	In-vitro- und In-vivo-Testung einer neuartigen Nicardipin-Applikationsform zur intrakraniellen Anwendung nach Aneurysmatischer Subarachnoidalblutung	53
3	Diskussion	63
4	Zusammenfassung	68

Anhang

Literatur

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

ACM	Arteria cerebri media
SAB	Subarachnoidalblutung
aSAB	aneurysmatische Subarachnoidalblutung
CBF	zerebraler Blutfluss
CT	Computertomographie
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
dMCAo	distal Middle Cerebral Artery Occlusion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPND	exofokale postischämische neuronale Degeneration
FLAIR	Fluid-attenuated inversion Recovery
GC	Glucocorticoid
ICB	intrazerebrale Blutung
MCAo	Middle Cerebral Artery Occlusion
MRT	Magnetresonanztomographie
PSD	post stroke Depression
rt-PA	rekombinanter Gewebeplasminogen-Aktivator
SAB	Subarachnoidalblutung
SN	Substantia nigra
SO	Superoxid

Für die Lesbarkeit des Textes wurden in dieser Arbeit die feminine und maskuline Form teils wechselnd verwendet. Die Angaben beziehen sich jedoch stets auf alle Geschlechter in gleicher Weise.

1 Der Schlaganfall

1.1 Epidemiologie und sozioökonomische Relevanz des Schlaganfalls

Der Schlaganfall ist weltweit nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache und gilt als eine der Hauptursachen für lebenslange Behinderung und Pflegebedürftigkeit im Erwachsenenalter(1–4). Allein 2016 verstarben laut Global Burden of Disease weltweit 5.5 Millionen Menschen an einem Schlaganfall; das entspricht mehr als 10% der weltweiten Todesfälle(3). Auch in der Bundesrepublik Deutschland stellt der Schlaganfall nach der koronaren Herzerkrankung die zweithäufigste Todesursache dar (statistisches Bundesamt: <http://www.destatis.de>).

Nach einem Schlaganfall sind häufig längerfristige Krankenhausaufenthalte notwendig, gefolgt von Rehabilitationsmaßnahmen und im Verlauf die lebenslange Betreuung durch eine Pflegeeinrichtung oder die Familie. In der Bundesrepublik Deutschland ergeben sich mit einer Inzidenz von mehr als 250.000 pro Jahr Kosten von ca. 7,1 Milliarden Euro pro Jahr für die Akutbehandlung bei zusätzlichen etwa 3 Milliarden Euro pro Jahr an Ausgaben für die Langzeitbehandlung(5,6). Diese Zahlen belegen eindrücklich auch die hohe sozioökonomische Relevanz des Schlaganfalls.

Zu den Hauptrisikofaktoren, einen ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfall zu erleiden, zählen arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, erhöhter Taille-Hüft-Quotient, psychosozialer Stress, Depression, erhöhter Alkoholkonsum, kardiale Vorerkrankungen, fehlende physische Aktivität sowie ein hohes Verhältnis von Apolipoprotein B zu A1 und eine unausgewogene Ernährung(7,8).

Aufgrund des demographischen Wandels in den westlichen Industrienationen und der zunehmenden Lebenserwartung in Entwicklungsländern stellen die Prävention und Therapie des Schlaganfalls epidemiologisch eine der größten medizinischen Herausforderungen dar und unterstreichen die Notwendigkeit intensiver Forschung in diesem Bereich(3,5,9,10).

1.2 Pathophysiologie

Mit einem Anteil von etwa 85% ist der ischämische Schlaganfall pathophysiologisch führend, wohingegen nur ca. 15% aller Schlaganfälle, sogenannte hämorrhagische Schlaganfälle, durch eine Subarachnoidalblutung (SAB) oder eine intrazerebrale Blutung (ICB) verursacht werden(11).

Am häufigsten treten ischämische Schlaganfälle im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media (ACM) auf(11–13). Durch thromboembolische oder thrombotische Okklusion einer zerebralen Arterie kommt es zu einer kritischen Reduktion des zerebralen Blutflusses (CBF) in dem entsprechenden Versorgungsgebiet und konsekutiv zu einer akuten Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels. Über komplexe Schadenskaskaden führt die akute Störung des Energiestoffwechsels schließlich zum Gewebsuntergang(14,15). Glutamat-vermittelte Exitotoxizität, Periinfarkt-Depolarisation, programmierter Zelltod und Inflammation stellen pathophysiologisch die wesentlichen Schadensmechanismen beim ischämischen Schlaganfall dar(14,15). Der Begriff „*tissue at risk*“ oder auch *Penumbra* (griechisch – *Halbschatten*) bezeichnet das den Infarktkern umgebende Hirnparenchym. Hier ist der CBF relevant reduziert, was zwar zu einer funktionellen Einschränkung führt, jedoch ist noch keine irreversible Zellschädigung eingetreten (daher auch der Ausdruck: „*funktionell still, aber strukturell intakt*“). Die Penumbra kann bei rechtzeitiger Revaskularisierung somit erhalten und damit die weitere Ausdehnung des Infarktkerns begrenzt werden(14,16,17).

Das Ausmaß der zerebralen Ischämie und die Dynamik sind abhängig von einer Reihe verschiedener Faktoren: der Lokalisation des Gefäßverschlusses, dem Vorhandensein und der Ausprägung eines Kollateralkreislaufs, der individuellen vaskulären Anatomie sowie von systemischen Faktoren.

1.3 Diagnostik und Therapie

Der Schlaganfall ist stets ein medizinischer Notfall und bedarf, auch bei nur leicht ausgeprägter Symptomatik, immer einer erweiterten Diagnostik und Therapie ohne zeitliche Verzögerung („*Time is brain*“). Bei klinischem Verdacht auf einen Schlaganfall ist daher ein schnellstmöglicher strukturierter Ablauf von Diagnostik und therapeutischen Maßnahmen einzuleiten.

Die Sicherung und Überwachung der Vitalparameter des Patienten, Diagnosestellung sowie die Einleitung therapeutischer Maßnahmen sollten innerhalb der ersten 60 Minuten nach Ankunft des Patienten erfolgen(18,19). Da das therapeutische Zeitfenster für revascularisierende Interventionen sehr begrenzt ist, halten Schlaganfallzentren spezifische Abläufe inklusive der Verfügbarkeit von notfallmäßiger Schnittbildgebung rund um die Uhr bereit. Auch innerhalb des engen Zeitfensters von 6 Stunden ab Symptombeginn sollte eine frühestmögliche Intervention erfolgen(19–21).

Die optimale Versorgung bei Schlaganfall erfordert ein interdisziplinäres Vorgehen von Neurologie, Neuroradiologie, Neurochirurgie sowie der Intensivmedizin. Neben der Anamnese und klinischen Untersuchung ist die Schnittbildgebung zur Darstellung des Gehirnparenchyms sowie der hirnversorgenden Gefäße das wichtigste diagnostische Mittel bei Verdacht auf einen Schlaganfall. Dabei galt die Anwendung der zerebralen Computertomographie (CT) lange Zeit als Methode der Wahl, um einen ischämischen von einem hämorrhagischen Infarkt zu differenzieren. Aufgrund der hohen Verfügbarkeit, Schnelligkeit der Datenaquisition und geringen Kosten wird die CT auch weiterhin häufiger verwendet als die Magnetresonanztomographie (MRT), obwohl die MRT in der Diagnostik von Schlaganfällen der CT gegenüber klare Vorteile bietet(20,22,23).

Moderne MRT Sequenzen ermöglichen die eindeutige Differenzierung zwischen einem hämorrhagischen- und einem ischämischen Schlaganfall. Im Gegensatz zur CT kann mittels MRT sowohl das Ausmaß als auch die Lokalisation einer zerebralen Ischämie hochauflösend dargestellt werden, insbesondere auch im Bereich des Kleinhirns, des Hirnstamms sowie

kortikal(20,23,24). Vor allem aber ermöglicht die MRT mittels diffusionsgewichteten, perfusionsgewichteten und FLAIR-Sequenzen bereits frühzeitig die Differenzierung zwischen irreversibel geschädigtem Gewebe, dem sogenannten Infarktkern, und der Penumbra, die bei rechtzeitiger Reperfusion erhalten werden und somit eine weitere Ausdehnung des Infarktkerns begrenzt werden kann(25,26). Durch die Entwicklung neuerer MRT-Geräte sowie der Optimierung von Software und den entsprechenden Sequenzen konnte die Dauer der Bildanfertigung im Rahmen eines Schlaganfallprotokolls auf etwa 10 Minuten reduziert werden.

Nach Sicherung der Vitalfunktionen und Diagnostik ist die Wiederherstellung der Perfusion durch mechanische Thrombektomie bei Patienten mit klinisch relevantem neurologischem Defizit bei einem proximalen arteriellen Gefäßverschluss im vorderen Kreislauf bis zu 6 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome die Therapie der Wahl(27). In Abhängigkeit der Ergebnisse der Schnittbildgebung kann bei bestimmten Patienten eine mechanische Thrombektomie auch jenseits des Zeitfensters von 6 Stunden sinnvoll sein(28). Innerhalb eines Zeitfensters von 4,5 Stunden sollten Patienten auch eine systemische Lysetherapie mit rekombinantem Gewebsplasminogen-Aktivator (rt-PA) erhalten soweit keine Kontraindikationen dahingehend bestehen (laut aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie(29)). Da systemische Faktoren, die zu einer Reduktion des Substratangebots in der Penumbra führen (Hypotonie, Hypoxie und Hypoglykämie) oder Faktoren, die den zellulären Metabolismus steigern (Fieber, Hyperglykämie oder epileptische Anfälle), die Ausbreitung des Infarktkerns beschleunigen können und sekundäre Hirnschäden verstärken, ist die engmaschige Überwachung auf einer Stroke Unit integraler Bestandteil der Therapie von Schlaganfallpatienten(21,30).

Ein neurochirurgisches, operatives Vorgehen im Sinne einer Dekompression kommt bei Patienten mit einem großen, raumfordernden, sogenannten malignen Schlaganfall zum Einsatz, wie auch bei ausgedehnten zerebellären Ischämien. Beide Pathologien können letztlich zu einer konservativ nicht beherrschbaren Steigerung des intrakraniellen Drucks führen(31,32).

Weiterhin kann eine neurochirurgische Intervention auch bei hämorrhagischen Infarkten in Abhängigkeit der Lokalisation indiziert sein(33–36).

Neben neurochirurgischen Interventionen im Rahmen von primär ischämischen Schlaganfällen oder intraparenchymatösen Blutungen spielt die zerebrale Ischämie durch Vasospasmus nach aneurysmatischer SAB (aSAB) wie auch Schädelhirntrauma in der Neurochirurgie und neurologischen Intensivmedizin eine wichtige Rolle und ist Gegenstand intensiver interdisziplinärer Forschungsanstrengungen(37–39).

1.3 Translatationaler „Roadblock“

Innerhalb der letzten 30 Jahre wurden in der Grundlagenforschung bemerkenswerte Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls erzielt(14,15,40). Trotz intensiver Forschungsanstrengungen und experimentell neuroprotektiv wirksamer Ansätze und Substanzen mangelt es jedoch weiterhin an klinisch wirksamen therapeutischen Optionen.

Im Bereich der Schlaganfallforschung wird diese bisher leider wenig erfolgreiche Translation experimenteller Daten in die Klinik als „*Translational Roadblock*“ bezeichnet und hat zu einer kritischen Diskussion über die zugrundeliegenden Ursachen geführt(41).

Systematische Übersichtsarbeiten zur experimentellen Schlaganfallforschung konnten zeigen, dass nahezu alle klinisch getesteten Behandlungen nicht in vergleichbaren Populationen präklinisch untersucht wurden. Dagegen zeigen vereinzelte Studien zum Einfluss von Komorbiditäten wie Diabetes, Arteriosklerose, arterielle Hypertonie, Adipositas, aber auch Alter, dass diese nicht nur die Pathophysiologie des Schlaganfalls, sondern auch den potenziellen Nutzen der therapeutischen Intervention relevant beeinflussen(42–44).

Neben diesen traditionellen, gut belegten vaskulären Risikofaktoren und Komorbiditäten haben epidemiologische Daten gezeigt, dass auch akuter und chronischer psychosozialer Stress zu den relevanten Komorbiditäten und darüber hinaus potentiell modifizierbaren Risikofaktoren des Schlaganfalls zählen. Die pathophysiologischen Zusammenhänge sind bisher jedoch nur unzureichend geklärt(8,45–48).

Auch Patienten mit depressiven Syndromen weisen ein erhöhtes Schlaganfallrisiko auf(49). Auf der anderen Seite können neuropsychiatrische Auffälligkeiten wie Depressionen oder Angststörungen sich wiederum auch in Folge eines zerebrovaskulären Ereignisses entwickeln(50–53). Depressionen nach Schlaganfall (PSD) gehören dabei zu den häufigsten neuropsychiatrischen Auffälligkeiten und haben einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Erholung des Patienten. PSD ist assoziiert mit einem schlechteren kognitiven

und funktionellen Ergebnis nach Schlaganfall, einem verlängerten Krankenhausaufenthalt sowie letztlich auch einer deutlich erhöhten Mortalität(44,53). Obwohl die PSD zu den häufigsten neuropsychiatrischen Auffälligkeiten mit folgenschweren negativen Auswirkungen auf den Patienten und das Gesundheitswesen gehört, ist die PSD bisher nicht gut erforscht. Neben mangelnden Untersuchungen zum Einfluss von Risikofaktoren und von Komorbiditäten auf die Schlaganfallpathophysiologie und das Ergebnis nach Schlaganfall wurden als weitere relevante Ursachen für die translationale Blockade das Ausbleiben der Evaluation von Langzeiteffekten sowie von funktionellen Ergebnissen in präklinischen Studien erkannt(54,55).

In den meisten experimentellen Untersuchungen wurde als Outcomeparameter lediglich das morphologische Läsionsvolumen zu einem frühen Zeitpunkt (meist 24 Stunden) nach dem ischämischen Insult bestimmt. Dadurch wurden weder das Langzeitergebnis, noch regenerative Prozesse, noch der Verlauf spezifischer histologischer Veränderungen berücksichtigt. Auch Untersuchungen im Hinblick auf das funktionelle Ergebnis fanden bis dato nur wenig Beachtung in der experimentellen Schlaganfallforschung und wurden dementsprechend auch in der präklinischen Evaluation therapeutischer Interventionen oft nicht berücksichtigt(54,55).

1.4 Zielstellung

Der Schlaganfall ist epidemiologisch und sozioökonomisch ein hoch relevantes Krankheitsbild. Trotz intensiver Forschungsanstrengungen und vielversprechender präklinischer Ansätze sind die frühe Rekanalisation durch mechanische Thrombektomie und/oder systemische Lyse die derzeit einzige therapeutische Intervention mit nachgewiesener Wirksamkeit.

Ursächlich für den sogenannten "*translationalen Roadblock*" sind unter anderem fehlende Untersuchungen zum Einfluss von Komorbiditäten auf die Pathophysiologie und das Schlaganfallergebnis sowie die mangelnde Evaluation von Langzeiteffekten und funktionellen Ergebnissen in präklinischen Studien(54,55).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es im ersten Teil den Einfluss von chronischem Stress auf die Schlaganfallsuszeptibilität und das Schlaganfallergebnis zu untersuchen. Weiterhin sollen Langzeitveränderungen und neuropsychiatrische Auffälligkeiten nach milder fokaler zerebraler Ischämie mittels Kleintier-MRT, Immunhistochemie, molekularbiologischer Methoden und Verhaltenstests charakterisiert und untersucht werden.

Um auch die Funktionalität und Morphologie der Gefäße zu untersuchen, war es im zweiten Teil das Ziel, ein Mausmodell zu entwickeln, welches ein gut etabliertes kortikales Schlaganfall-Modell mit einem chronischen Schädelfenster kombiniert und so die longitudinale Intravitalmikroskopie sowie die topische Applikation von Medikamenten ermöglicht.

2 Eigene Arbeiten

2.1 Teil A: Untersuchungen zum Einfluss von chronischem Stress auf die Endothelfunktion und Schlaganfallsuszeptibilität sowie zu neuropsychiatrischen Folgen im experimentellen Schlaganfall-Modell der Maus

2.1.1 Der Einfluss von chronischem Stress auf die Endothelfunktion und die Schlaganfallsuszeptibilität nach experimentellem Schlaganfall

Prinz V*, Balkaya M*, Custodis F, Gertz K, Kronenberg G, Kroeber J, Fink K, Plehm R, Gass P, Laufs U, Endres M (2011) Stress worsens endothelial function and ischemic stroke via glucocorticoids. *Stroke*. 2011;42:3258–3264. *equal contribution. DOI: [10.1161/STROKEAHA.110.607705](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.607705)

In epidemiologischen Studien wurden psychosoziale Belastung und chronischer Stress als wichtige und unabhängige Risikofaktoren für Schlaganfälle identifiziert(8,56,57). Darüber hinaus deuten experimentelle Studien darauf hin, dass sowohl chronischer sozialer Stress als auch erhöhte Glucocorticoid(GC)-Spiegel das Ergebnis nach Schlaganfall negativ beeinflussen können(58). Klinische Daten weisen darauf hin, dass Stress die Endothelfunktion beeinträchtigen kann. Eine eingeschränkte Endothelfunktion wiederum gilt als einer der Hauptrisikofaktoren ein zerebrovaskuläres Ereignis zu erleiden und ist darüber hinaus mit einem schlechteren Ergebnis bei zerebrovaskulären Erkrankungen assoziiert(59,60). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden.

Vor diesem Hintergrund haben wir in der vorliegenden experimentellen Arbeit untersucht, ob chronischer Stress eine endotheliale Dysfunktion auslöst und die Anfälligkeit für Schlaganfälle bei gesunden Mäusen erhöht. Mifepristone, ein gut etablierter und in in-vivo-

Modellen weit verbreiteter GC-Rezeptor-Antagonist, wurde verwendet, um zu testen, ob die Effekte von Stress durch GC-Rezeptor-Signale vermittelt werden.

Für diese Fragestellung wurden männliche Mäuse vom Stamm 129SV mit dem GC-Rezeptor-Antagonisten Mifepristone oder Vehikel behandelt und 28 Tage einem chronischen Stress-Paradigma ausgesetzt. Blutdruck und Herzfrequenz wurden kontinuierlich telemetrisch erfasst und entsprechend analysiert. Die mRNA- und Proteinexpression der endothelialen Stickoxidsynthase sowie die Superoxidproduktion wurden quantifiziert. An Aortenringen wurde die endothelabhängige Vasoreaktivität bestimmt. Eine transiente, fokale zerebrale Ischämie wurde mittels 30-minütigem proximalen Verschluss der ACM induziert und das Schlaganfallvolumen an histologischen Schnitten quantifiziert. Wir konnten zeigen, dass chronische Stressexposition zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz, einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasorelaxation, verringerten Stickstoffoxidsynthespiegeln in Gehirn und Aorta sowie zu einer erhöhten Superoxidproduktion führt. Mäuse, die chronischem Stress ausgesetzt waren, zeigten darüber hinaus ein signifikant größeres Schlaganfallvolumen zum Zeitpunkt 72 Stunden nach zerebraler Ischämie. Diese schwerwiegenden Effekte von chronischer Stress Exposition wurden durch die Behandlung mit dem GC-Rezeptor-Antagonisten vollständig aufgehoben. Zusammenfassend demonstrieren unsere Ergebnisse eindrücklich, dass chronischer Stress zu einer erhöhten Vulnerabilität bei Schlaganfall führt, die wahrscheinlich durch eine GC-Rezeptor-vermittelt endotheliale Dysfunktion verursacht wird.

2.1.2 Exofokale dopaminerge Degeneration als Ziel einer Antidepressiva-Therapie im Mausmodell der Post-Schlaganfall-Depression

Kronenberg G, Balkaya M, Prinz V, Gertz K, Ji S, Kirste I, Heuser I, Kampmann B, Hellmann-Regen J, Gass P, Sohr R, Hellweg R, Waeber C, Juckel G, Hörtnagl H, Stumm R, Endres M (2012) Exofocal Dopaminergic Degeneration as Antidepressant Target in Mouse Model of Poststroke Depression. *BPS*.1–9. □ DOI: [10.1016/j.biopsych.2012.02.026](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.02.026)

Die Depression nach Schlaganfall, auch post stroke Depression (PSD) genannt, gehört zu den häufigen chronischen Langzeitfolgen eines Schlaganfalls und ist von hoher Relevanz im Hinblick auf die neurologische Erholung sowie das Überleben nach Schlaganfall(44,49,52). Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind bisher jedoch nur unzureichend ergründet(53).

In unserer experimentellen Arbeit konnten wir zeigen, dass eine transiente Ischämie im Medialstromgebiet zu Anhedonie sowie einem ängstlichen Phänotyp im Mausmodell führt. Diese neuropsychiatrischen Auffälligkeiten gingen einher mit Veränderungen im mesolimbischen Belohnungssystem. Die fokale zerebrale Ischämie im Medialstromgebiet führte zu einer verzögerten sekundären Degeneration dopaminerger Neuronen in der ipsilateralen Substantia nigra (SN), die von verringerten Dopaminkonzentrationen und einer verringerten Dopamintransporterdichte begleitet wurde. Weiterhin fanden wir eine erhöhte Expression von Dynorphin-Boten-RNA im Nucleus accumbens sowie erhöhte Spiegel neurotropher Faktorproteine im ischämischen Striatum. Die Langzeitbehandlung mit Citalopram, einem etablierten Antidepressivum, die erst 7 Tage nach dem ischämischen Ereignis begonnen wurde, kehrte den Verhaltensphänotyp um und verhinderte die sekundäre neuronale Degeneration im Mittelhirn. Weiterhin führte die Antidepressiva-Behandlung zu einer reduzierten Atrophie des Striatums.

Unsere Ergebnisse charakterisieren ein depressionsähnliches Syndrom nach transienter Ischämie im Mausmodell und unterstreichen die Bedeutung des dopaminergen Systems für die Entwicklung der PSD. Weiterhin könnte die Prävention der sekundären

Neurodegeneration durch Antidepressiva ein neues Ziel für die Schlaganfalltherapie darstellen.

2.1.3 Frühe Detektion einer sekundären Läsion in der Substantia nigra nach fokaler zerebraler Ischämie im Mausmodell

Prinz V*, Hetzer A*, Kronenberg G, Mueller S, Balkaya M, Gertz K, Leithner C, Hoertnagl H, Endres M, (2015) MRI heralds secondary nigral lesion following middle cerebral artery occlusion in mice: a secondary time window for neuroprotection; J Cereb Blood Flow Metab, 35(12):1903-9. *equal contribution. DOI: [10.1038/jcbfm.2015.153](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.153)

Die fokale zerebrale Ischämie im Mediastromgebiet kann in der ipsilateralen Substantia nigra (SN), obwohl diese von der primären ischämischen Läsion entfernt liegt, einen verzögerten neuronalen Zelluntergang auslösen(61,62). Es wird davon ausgegangen, dass diese sogenannte exofokale postischämische neuronale Degeneration (EPND) den klinischen Verlauf nach Schlaganfall negativ beeinflussen kann(62,63). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen, sowie insbesondere der zeitliche Verlauf der EPND sind bisher jedoch nur unzureichend charakterisiert. Darüber hinaus existieren bisher keine Daten zur EPND aus einem Mausmodell.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher den zeitlichen Verlauf der EPND mittels sequentieller 7 Tesla Kleintier-MRT und immunhistologischer Untersuchungen für bis zu 28 Tage nach 30-minütigem Verschluss der proximalen MCA (MCAo) in einem gut etablierten Mausmodell. Weiterhin wurden die Auswirkungen einer verzögert begonnenen Behandlung mit MK-801 und FK506 auf die Entwicklung der EPND untersucht. Beide Substanzen gelten als etablierte Neuroprotektiva in der experimentellen Schlaganfallforschung.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die sekundäre neuronale Degeneration in der SN innerhalb der ersten Woche nach MCAo auftritt und immunhistologisch durch einen ausgeprägten Verlust neuronaler Zellen gekennzeichnet ist. Sequentielle MRT Untersuchungen ergaben transiente MRT-Veränderungen, die bereits am 4. Tag nach MCAo detektierbar waren und somit dem histologischen Nachweis der Neurodegeneration vorausgingen. Die Behandlung mit MK-801, einer etablierten anti-exzitotoxischen Substanz, bot Schutz gegen EPND, selbst wenn diese erst mehrere Tage nach dem initialen ischämischen Ereignis

appliziert wurde, was mit FK506, einer potenten antiinflammatorischen Substanz, nicht der Fall war.

Unsere Ergebnisse charakterisieren erstmalig MR morphologisch sowie immunhistologisch den Verlauf der EPND im experimentellen Schlaganfallmodell der Maus. Einhergehend mit dem Effekt von MK801 konnten wir im experimentellen Schlaganfallmodell ein sekundäres Zeitfenster für die verzögerte Neuroprotektion nach Schlaganfall definieren. Das könnte ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien sein.

2.2 Teil B: Intravitalmikroskopie zur longitudinalen Untersuchung der vaskulären Funktionalität und Morphologie nach kortikaler Ischämie sowie der topischen Applikation von Nicardipin

2.2.1 In-Vivo-Videomikroskopie über ein laterales Schädelfenster nach kortikaler Ischämie im Mausmodell

Bayerl SH, Nieminen-Kelhä M, Brogini T, Vajkoczy P, Prinz V (2016) Lateral Chronic Cranial Window Preparation Enables In Vivo Observation Following Distal Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. Video Link. J Vis Exp: 547013791–547054701. DOI: [10.3791/54701](https://doi.org/10.3791/54701)

Nachdem jenseits rekanalisierender Maßnahmen jegliche Ansätze, mit dem Ziel in der Akutphase des Schlaganfalls medikamentös zu intervenieren, gescheitert sind, konzentriert sich die Schlaganfallforschung vor allem auf die subakute sowie chronische Phase nach Schlaganfall(41). Insbesondere die Schädigung der vaskulären Einheit stellt nach Schlaganfall einen entscheidenden Faktor dar. Neuroprotektion und Regeneration durch Protektion und Wiederherstellung der vaskulären Integrität sind daher sicherlich die vielversprechendsten Ansätze. Um die Funktionalität und Morphologie der Gefäße zu untersuchen, haben wir ein Mausmodell entwickelt, welches ein gut etabliertes kortikales Schlaganfallmodell mit einem chronischen Schädelfenster kombiniert und so die longitudinale Intravitalmikroskopie ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir das neue Modell, das den permanenten distalen MCA Verschluss mit einem lateralen Schädelfenster kombiniert und so die Möglichkeit der longitudinalen intravitalen Mikroskopie bei Mäusen ermöglicht. In diesem kortikalen Schlaganfallmodell können die Blutgefäße im Schlaganfallgebiet und in der Peri-Infarkt-Region über das chronische Schädelfenster dargestellt werden. Mit Hilfe eines Multi-Fluoreszenz-Epifluoreszenz-Videomikroskopiesystems können die Dynamik des Blutflusses und die dynamische Rekrutierung zirkulierender Zellen visualisiert werden. Blutgefäße werden durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Makromolekülen, wie Dextranen oder Albumin, sichtbar ge-

macht. Die MRT Untersuchungen, die 24 Stunden nach der Ischämie durchgeführt wurden, zeigen deutlich die ischämische Läsion, die sich unterhalb des chronischen CW befindet, während nach der SHAM Operation kein verletztes kortikales Gewebe zur Darstellung kommt. Die MRT nach 24 und 96 Stunden nach permanenter distaler MCAo zeigte keine signifikante Progression der T2-Hyperintensitäten im Sinne eines Ödems. Unsere Ergebnisse zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit der Läsionsvolumina sowie sehr niedrige Mortalitätsraten, was insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung von Langzeitergebnissen hoch relevant ist.

2.2.2 In-vitro- und In-vivo-Testung einer neuartigen Nicardipin-Applikationsform zur intrakraniellen Anwendung nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung

Bayerl SH, Ghori, A, Nieminen-Kelhä M, Adage T, Breitenbach J, Vajkoczy P, Prinz V (2019) In vitro and in vivo testing of a novel local Nicardipine delivery system to the brain, a preclinical study, J Neurosurg, Jan 25:1-8. DOI: [10.3171/2018.9.JNS173085](https://doi.org/10.3171/2018.9.JNS173085)

Die Behandlung von Patienten mit aSAB stellt trotz des medizinischen Fortschritts und immenser Forschungsanstrengungen weiterhin eine große Herausforderung in der neurologischen Intensivmedizin dar(39,64,65). Bislang ist der Calciumkanal-Antagonist Nimodipin das einzige Medikament, das zur Verbesserung der klinischen Ergebnisse nach aSAB zugelassen ist. In seiner derzeitigen systemischen Darreichungsform ist Nimodipin jedoch nur eingeschränkt wirksam und verursacht bei einer relevanten Anzahl von Patienten eine dosislimitierende Hypotonie(66).

Hier testeten wir *in vitro* die Freisetzungsdynamik einer neuartigen lokalen Applikationsform des Kalziumkanalblockers Nicardipin (NicaPlant®). Die lokale Gewebereaktion *in vivo* wurde unter Verwendung eines chronischen Schädelfenstermodells untersucht. Hierfür wurde ein gut etabliertes chronisches Schädelfenster in C57BL/6-Mäusen präpariert. NicaPlant®-Stücke wurden in der Nähe der exponierten Gehirngefäße platziert und das Schädelfenster mit einem Glas verschlossen. Die Epifluoreszenz-Videomikroskopie wurde direkt nach der Implantation sowie an den Tagen 3 und 7 nach dem Eingriff durchgeführt. Die Auswertung der *in vitro* Untersuchungen ergab im Nicardipin-Freisetzungsprofil eine nahezu lineare Kurve mit einer Freisetzung von etwa 80% an Tag 15 und einer vollständigen Freisetzung an Tag 21. Die Epifluoreszenz-*in-vivo*-Videomikroskopie zeigte einen signifikant erhöhten Durchmesser der arteriellen Gefäße durch NicaPlant®. Ein Einfluss auf die Gefäßpermeabilität zeigte sich nicht. Eine erhöhte Leukozyten-Endothel-Zell-Wechselwirkung durch NicaPlant® konnte nicht nachgewiesen werden. Die histologische Auswertung zeigte keine strukturellen neuronalen Veränderungen. Ebenfalls wurde keine Akkumulation oder Aktivierung mikroglialer Zellen beobachtet.

Zusammenfassend liefert die neuartige Nicardipinformulierung *in vitro* eine kontinuierliche, nahezu lineare Freisetzung von Nicardipin über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen. Die Ergebnisse der *in-vivo* Untersuchungen bestätigten die Vasoaktivität und fehlende Toxizität der lokalen Nicardipin-Applikationsform im Mausmodell. Die lokale Anwendung dieser neuartigen Nicardipinformulierung im Rahmen einer chirurgischen Aneurysmaausschaltung ist ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Patientenergebnisse und Vermeidung systemischer Nebenwirkungen.

3 Diskussion

Der Schlaganfall ist weltweit nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Die Prävention und Therapie des Schlaganfalls stellt epidemiologisch und sozioökonomisch eine der größten medizinischen Herausforderungen dar(3,5,9,10). Trotz vielversprechender präklinischer Ansätze ist die frühe Reperfusion durch mechanische Thrombektomie und/oder systemische Lyse die derzeit einzige therapeutische Intervention mit nachgewiesener Wirksamkeit.

Die Wahrnehmung der frustranen Translation präklinisch wirksamer Therapieansätze in klinische Therapiekonzepte hat zu einer intensiven Diskussion in der experimentellen Schlaganfallforschung über die zugrundeliegenden Ursachen geführt(41). Allgemein wird kritisiert, dass die meisten Arbeiten, die in experimentellen Schadensmodellen durchgeführt wurden, weder klinisch relevante Endpunkte noch den Einfluss von Komorbiditäten auf die Pathophysiologie des Schlaganfalls berücksichtigt haben(41,67,68).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von chronischem Stress auf die Schlaganfallsuszeptibilität und das Schlaganfallergebnis untersucht(69). Darüber hinaus wurden Langzeitveränderungen und neuropsychiatrische Auffälligkeiten nach milder fokaler, zerebraler Ischämie multimodal charakterisiert und der Einfluss einer antidepressiven Medikation evaluiert(63,70).

Es konnte gezeigt werden, dass chronische Stressexposition zu einer eingeschränkten Endothelfunktion führt und die Schlaganfallsuszeptibilität signifikant erhöht(69,71,72). In dem angewandten Mausmodell induzierte die chronische Stressexposition eine robuste sympathomimetische Reaktion, die sich in einer signifikanten Erhöhung der Herzfrequenz wie auch einer erhöhten Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse widerspiegelte. Das Vorhandensein einer erhöhten SO-Produktion, einhergehend mit einer Reduktion der eNOS als auch einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasorelaxation, belegen eindeutig das Vorliegen einer stressinduzierten Endothelpathologie. Die Umkehr der

endothelialen Dysfunktion durch die Gabe von Mifepriston zeigt, dass die unerwünschten Effekte von chronischem Stress durch GC-Rezeptor Signale vermittelt werden. Die Ergebnisse unserer Studie bringen chronische Stressexposition und die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse mit einer stressinduzierten endothelialen Dysfunktion in Verbindung, was bei fokaler zerebraler Ischämie zu einer erhöhten Vulnerabilität führt(59,73). Mit unseren Ergebnissen konnten wir somit zur Klärung wichtiger pathophysiologischer Zusammenhänge über den chronischer Stress zu einer erhöhten zerebrovaskulären Vulnerabilität führt, beitragen. Obwohl chronischer Stress bisher nicht zu den traditionellen vaskulären Risikofaktoren zählt, wird dieser zunehmend als ein klinisch relevanter kardio- und zerebrovaskulärer Risikofaktor erkannt und auch im Rahmen von Präventionsmaßnahmen thematisiert(56,74). Das ist insofern hoch relevant, als sowohl chronischer Stress, wie auch die endotheliale Dysfunktion beeinflussbare Faktoren sind(40,75–77).

Weiterhin fanden wir in unserer Studie bei den gestressten Mäusen einen robusten, reproduzierbaren vaskulären Phänotyp, gekennzeichnet durch eine signifikant erhöhte Herzfrequenz, beeinträchtigte endothelabhängige Vasoreaktivität, reduzierte eNOS mRNA- und Proteinspiegel in der Aorta und im Gehirn sowie einen übermäßigen Anstieg der SO-Produktion in der Aorta und der Lipidhydroperoxide im Gehirngewebe. Damit stellen wir hier ein gut charakterisiertes und zuverlässiges Modell zur Verfügung, um den Einfluss von chronischem Stress beim Schlaganfall weiter zu untersuchen(56,71,72).

Stress wie auch Depression stellen unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten von Schlaganfällen dar und sind darüber hinaus mit einem schlechteren Ergebnis nach Schlaganfall assoziiert(7,56,76). Andererseits können sich neuropsychiatrische Veränderungen wie Angststörungen oder Depressionen auch in Folge eines Schlaganfalls entwickeln(50–53). Obwohl die PSD eine häufige chronische Komplikation des Schlaganfalls mit hoher Relevanz für das Ergebnis und die Mortalität ist, sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen bis-

her nicht verstanden. Das könnte daran liegen, dass geeignete Modelle weitestgehend fehlen beziehungsweise bestehende Modelle dahingehend nur schlecht charakterisiert sind(44,53). Anhand der durchgeführten experimentellen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine transiente fokale Ischämie im linken Medialstromgebiet zu einem depressionsähnlichen Syndrom führt, gekennzeichnet durch Ängstlichkeit und Anhedonie der Mäuse. Einhergehend mit diesem Phänotyp fanden wir Veränderungen im mesolimbischen Belohnungssystem im Sinne einer sekundären Neurodegeneration im ipsilateralen Mittelhirn, die von verringerten Dopaminkonzentrationen und einer verringerten Dopamintransporterdichte begleitet wurde. Die verzögert initiierte Behandlung mit einem etablierten Antidepressivum zeigte einen positiven Einfluss auf den Verhaltensphänotyp und verhinderte außerdem die Degeneration dopaminerger Neuronen im Mittelhirn. Dabei ist hervorzuheben, dass hier ein Zeitraum von bis zu 4 Monaten nach dem Schlaganfallereignis untersucht wurde(63). Unsere Ergebnisse charakterisieren ein depressionsähnliches Syndrom nach Schlaganfall im Mausmodell und betonen die Bedeutung des dopaminergen Systems für die Entwicklung der PSD.

Angetrieben von den Ergebnissen unserer Untersuchungen zur PSD im Mausmodell, insbesondere der verzögert auftretenden neuronalen Degeneration in der SN, haben wir in einer Folgestudie den Zeitverlauf der EPND mittels sequenzieller MRT und histologischer Untersuchungen für bis zu 28 Tage nach transientser zerebraler Ischämie in der Maus untersucht. MRT Veränderungen im Mittelhirn konnten bereits an Tag 4 nach transientser Ischämie nachgewiesen werden und gingen signifikanten histologischen Veränderungen voraus(70). Die Therapie mit einem etablierten anti-exzitotoxischen Wirkstoff führte zu einem Schutz vor EPND, selbst wenn diese erst Tage nach dem initialen ischämischen Ereignis begonnen wurde. Mit unseren Arbeiten zu neuropsychiatrischen Veränderungen im experimentellen Schlaganfallmodell konnten wir einerseits ein depressionsähnliches Syndrom im langfristigen Verlauf charakterisieren. Weiterhin beschreiben wir erstmalig ein zuverlässiges Modell von EPND in der Maus unter Verwendung eines multimodalen Ansatzes, i.e. Neuroimaging als

auch Immunhistologie. Das Ansprechen der exofokalen sekundären Neurodegeneration auf die medikamentösen Interventionen könnte ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Ansätze für eine subakute Schlaganfalltherapie darstellen. Thematisch und zeitlich angelehnt an unsere experimentellen Arbeiten zu PSD und EPND konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Endres auch im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie den zeitlichen Verlauf der EPND charakterisieren. Bei Schlaganfallpatienten war die sekundäre nigrale Neurodegeneration im MRT zwischen Tag 6 und 10 nach Schlaganfall nachweisbar(62).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein experimentelles Schlaganfallmodell entwickelt, das ein etabliertes kortikales Schlaganfall-Modell um ein chronisches Schädelfenster erweitert und so die longitudinale Intravitalmikroskopie als auch die lokale Applikation von Medikamenten ermöglicht(78,79). Die intravenöse Applikation von fluoreszenzmarkierten Makromolekülen ermöglicht hierbei die Visualisierung von Blutgefäßen. Die Gefäßdichte, Dynamik des Blutflusses als auch die dynamische Rekrutierung zirkulierender Zellen kann mit Hilfe eines Multi-Fluoreszenz-Epifluoreszenz-Videomikroskopiesystems dargestellt werden(80). Darüber hinaus können Zell-zu-Zell-Interaktionen mit Hilfe eines konfokalen Dual-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops bis zu 250µm unter der Kortikalisoberfläche untersucht werden.

Unsere repräsentativen Ergebnisse zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit der Schlaganfall-Läsionsvolumina und insbesondere im Vergleich zum Schlaganfallmodell mittels proximalen MCA Verschlusses, was eine Mortalität von mehr als 50% aufweist, sehr niedrige Mortalitätsraten, was insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung von Langzeitergebnissen sowie regenerativen Prozessen hoch relevant ist(81,82). Im Hinblick auf klinisch relevante Parameter muss bei dem angewandten distalen Schlaganfallmodell jedoch beachtet werden, dass die Sensitivität von funktionellen Tests hierbei sehr begrenzt ist(54).

Das chronische Schädelfenster zur Langzeitbeobachtung wurde auch genutzt, um die lokale Anwendung einer neuartigen Darreichungsform des Calciumantagonisten Nicardipin zu untersuchen. Die topische Applikation von NicaPlant im Mausmodell induzierte keine unerwünschten Nebenwirkungen wie gesteigerte Inflammation oder Neuronenverlust. Weiterhin

bietet die neuartige Nicardipinformulierung in vitro eine kontinuierliche, nahezu lineare Freisetzung von Nicardipin über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen, was auf den pathophysiologischen Zeitverlauf der aSAB nahezu ideal abgestimmt ist(37,83). Die lokale Anwendung dieser neuartigen Nicardipin-Darreichungsform nach aSAB ist ein vielversprechender Ansatz, um den Krankheitsverlauf dieser Patienten zu verbessern. Unsere experimentellen Vorarbeiten konnten dazu beitragen, dass aktuell die Sicherheit, Verträglichkeit, Wirksamkeit und Pharmakokinetik von NicaPlant® bei Patienten mit aSAB in einer Phase 2 Studie untersucht wird (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04269408>).

4 Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist epidemiologisch und sozioökonomisch ein hochrelevantes Krankheitsbild. In der vorliegenden Arbeit stellen wir ein gut charakterisiertes und zuverlässiges Modell zur Verfügung, um den Einfluss von chronischem Stress bei Schlaganfall zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass chronische Stressexposition über die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zu einer stressinduzierten endothelialen Dysfunktion führt, was bei Schlaganfall eine erhöhte Vulnerabilität zur Folge hat.

Weiterhin charakterisieren wir multimodal ein neues Mausmodell für die Post-Schlaganfall Depression, das die mögliche pathophysiologische Bedeutung von sekundären Veränderungen des mesolimbischen dopaminergen Systems hervorhebt. Das Ansprechen der EPND auf medikamentöse Interventionen könnte ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für eine subakute Schlaganfallbehandlung darstellen.

Darüber hinaus wurde ein experimentelles Schlaganfallmodell entwickelt, das ein etabliertes kortikales Schlaganfall-Modell um ein chronisches Schädelfenster erweitert und so die longitudinale Intravitalmikroskopie als auch die lokale Applikation von Medikamenten ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit der Schlaganfallvolumina und niedrige Komplikationsraten, was insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung von Langzeitverläufen sowie regenerativen Prozessen hoch relevant ist. Die Gefäßdichte, Dynamik des Blutflusses als auch die dynamische Rekrutierung zirkulierender Zellen sowie Zell-zu-Zell-Interaktionen können mit Hilfe eines Multi-Fluoreszenz-Epifluoreszenz-Mikroskopiesystems bzw. eines konfokalen Dual-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops untersucht werden. In Vorbereitung auf eine klinische Studie, konnten wir das chronische Schädelfenster zur Langzeitbeobachtung auch nutzen, um die lokale Anwendung einer neuartigen Applikationsform (NicaPlant®) des Calciumantagonisten Nicardipin zu untersuchen. Die topische Applikation von NicaPlant® im Mausmodell führte zu keinen unerwünschten Nebenwirkungen und bietet *in-vitro* eine nahezu lineare Freisetzung von

Nicardipin über einen Zeitraum von 21 Tagen, was auf den pathophysiologischen Zeitverlauf der aSAB abgestimmt ist.

Literaturverzeichnis

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 05;139(10):e56–528.
2. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017 Feb 3;120(3):439–48.
3. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 May;18(5):439–58.
4. Thrift AG, Howard G, Cadilhac DA, Howard VJ, Rothwell PM, Thayabaranathan T, et al. Global stroke statistics: An update of mortality data from countries using a broad code of “cerebrovascular diseases.” *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc*. 2017;12(8):796–801.
5. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, et al. Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections From a Population-Based Stroke Registry. *Stroke*. 2006 May 1;37(5):1179–83.
6. Winter Y, Wolfram C, Schöffski O, Dodel RC, Back T. [Long-term disease-related costs 4 years after stroke or TIA in Germany]. *Nervenarzt*. 2008 Aug;79(8):918–20, 922–4, 926.
7. O’Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet Lond Engl*. 2010 Jul 10;376(9735):112–23.
8. Surtees PG, Wainwright NWJ, Luben RN, Wareham NJ, Bingham SA, Khaw K-T. Psychological distress, major depressive disorder, and risk of stroke. *Neurology*. 2008 Mar 4;70(10):788–94.

9. Hachinski V, Donnan GA, Gorelick PB, Hacke W, Cramer SC, Kaste M, et al. Stroke: Working toward a Prioritized World Agenda. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* 2010 Aug;5(4):238–56.
10. Kolominsky-Rabas PL, Wiedmann S, Weingärtner M, Liman TG, Endres M, Schwab S, et al. Time trends in incidence of pathological and etiological stroke subtypes during 16 years: the Erlangen Stroke Project. *Neuroepidemiology.* 2015;44(1):24–9.
11. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet Lond Engl.* 2008 May 10;371(9624):1612–23.
12. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988 Sep;19(9):1083–92.
13. Schlunk F, Greenberg SM. The Pathophysiology of Intracerebral Hemorrhage Formation and Expansion. *Transl Stroke Res.* 2015 Aug;6(4):257–63.
14. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron.* 2010 Jul 29;67(2):181–98.
15. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):391–7.
16. Khandelwal P, Yavagal DR, Sacco RL. Acute Ischemic Stroke Intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Jun 7;67(22):2631–44.
17. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med.* 2008 May;14(5):497–500.
18. Ebinger M, Kunz A, Wendt M, Rozanski M, Winter B, Waldschmidt C, et al. Effects of golden hour thrombolysis: a Prehospital Acute Neurological Treatment and Optimization of Medical Care in Stroke (PHANTOM-S) substudy. *JAMA Neurol.* 2015 Jan;72(1):25–30.
19. Kunz A, Nolte CH, Erdur H, Fiebich JB, Geisler F, Rozanski M, et al. Effects of Ultraearly Intravenous Thrombolysis on Outcomes in Ischemic Stroke. *Circulation.* 2017 May 2;135(18):1765–7.

20. Provost C, Soudant M, Legrand L, Ben Hassen W, Xie Y, Soize S, et al. Magnetic Resonance Imaging or Computed Tomography Before Treatment in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2019;50(3):659–64.
21. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49(3):e46–110.
22. Lövblad K-O, Altrichter S, Mendes Pereira V, Vargas M, Marcos Gonzalez A, Haller S, et al. Imaging of acute stroke: CT and/or MRI. *J Neuroradiol J Neuroradiol*. 2015 Feb;42(1):55–64.
23. Vert C, Parra-Fariñas C, Rovira À. MR imaging in hyperacute ischemic stroke. *Eur J Radiol*. 2017 Nov;96:125–32.
24. De Cocker LJL, Lövblad K-O, Hendrikse J. MRI of Cerebellar Infarction. *Eur Neurol*. 2017;77(3–4):137–46.
25. Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA. Acute stroke intervention: a systematic review. *JAMA*. 2015 Apr 14;313(14):1451–62.
26. Scheldeman L, Wouters A, Boutitie F, Dupont P, Christensen S, Cheng B, et al. Different Mismatch Concepts for Magnetic Resonance Imaging-Guided Thrombolysis in Unknown Onset Stroke. *Ann Neurol*. 2020 Jun;87(6):931–8.
27. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet Lond Engl*. 2016 Apr 23;387(10029):1723–31.
28. Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, Churilov L, Levi CR, Hsu C, et al. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N Engl J Med*. 2019 09;380(19):1795–803.

29. Deutsche Gesellschaft für Neurologie e. V.; Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Rekanalisierende Therapie (Ergänzung 2015). Available from: <https://dgn.org/leitlinien/030-140-rekanalisierende-therapie-ergaenzung-akuttherapie-schlaganfall-special/>; Stand 03.01.2021.
30. McDermott M, Jacobs T, Morgenstern L. Critical care in acute ischemic stroke. *Handb Clin Neurol.* 2017;140:153–76.
31. Jüttler E, Hacke W. Early decompressive hemicraniectomy in older patients with nondominant hemispheric infarction improves outcome. *Stroke.* 2011 Mar;42(3):843–4.
32. Wijdicks EFM, Sheth KN, Carter BS, Greer DM, Kasner SE, Kimberly WT, et al. Recommendations for the management of cerebral and cerebellar infarction with swelling: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2014 Apr;45(4):1222–38.
33. Datar S, Rabinstein AA. Cerebellar hemorrhage. *Neurol Clin.* 2014 Nov;32(4):993–1007.
34. Dempsey RJ, Bowman K. The past, present, and future of neurosurgery’s role in stroke. *J Neurosurg.* 2020 Apr 3;1(aop):1–7.
35. Fischer MA, M Das J. Cerebellar Hematoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Aug 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541076/>
36. Reinink H, Jüttler E, Hacke W, Hofmeijer J, Vicaut E, Vahedi K, et al. Surgical Decompression for Space-Occupying Hemispheric Infarction: A Systematic Review and Individual Patient Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2021 Feb1;78(2):208-216
37. Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, Shuttleworth CW, Dohmen C, et al. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(5):1595–625.

38. Lückl J, Lemale CL, Kola V, Horst V, Khojasteh U, Oliveira-Ferreira AI, et al. The negative ultraslow potential, electrophysiological correlate of infarction in the human cortex. *Brain J Neurol*. 2018 01;141(6):1734–52.
39. Woitzik J, Dreier JP, Hecht N, Fiss I, Sandow N, Major S, et al. Delayed cerebral ischemia and spreading depolarization in absence of angiographic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Feb;32(2):203–12.
40. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol*. 2016;15(8):869–81.
41. Endres M, Engelhardt B, Koistinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, et al. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2008;25(3):268–78.
42. Biose IJ, Dewar D, Macrae IM, McCabe C. Impact of stroke co-morbidities on cortical collateral flow following ischaemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2020 May;40(5):978–90.
43. Cipolla MJ, Liebeskind DS, Chan S-L. The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(12):2129–49.
44. Kutlubaev MA, Hackett ML. Part II: predictors of depression after stroke and impact of depression on stroke outcome: an updated systematic review of observational studies. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc*. 2014 Dec;9(8):1026–36.
45. Booth J, Connelly L, Lawrence M, Chalmers C, Joice S, Becker C, et al. Evidence of perceived psychosocial stress as a risk factor for stroke in adults: a meta-analysis. *BMC Neurol*. 2015 Nov 12;15:233.
46. Kotłęga D, Gołąb-Janowska M, Masztalewicz M, Ciećwież S, Nowacki P. The emotional stress and risk of ischemic stroke. *Neurol Neurochir Pol*. 2016 Aug;50(4):265–70.

47. Senior K. Stress increases risk of ischemic stroke. *Nat Rev Neurol*. 2009 Dec;5(12):635–635.
48. Valenzuela PL, Carrera-Bastos P, Gálvez BG, Ruiz-Hurtado G, Ordovas JM, Ruilope LM, et al. Lifestyle interventions for the prevention and treatment of hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Oct 9;
49. Pan A, Sun Q, Okereke OI, Rexrode KM, Hu FB. Depression and Risk of Stroke Morbidity and Mortality: A Meta-analysis and Systematic Review. *JAMA*. 2011 Sep 21;306(11):1241–9.
50. Das J, G K R. Post stroke depression: The sequelae of cerebral stroke. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;90:104–14.
51. Kim JS. Post-stroke Mood and Emotional Disturbances: Pharmacological Therapy Based on Mechanisms. *J Stroke*. 2016 Sep;18(3):244–55.
52. Kronenberg G, Gertz K, Heinz A, Endres M. Of mice and men: modelling post-stroke depression experimentally. *Br J Pharmacol*. 2014 Oct;171(20):4673–89.
53. Kronenberg G, Katchanov J, Endres M. [Post-stroke depression: clinical aspects, epidemiology, therapy, and pathophysiology]. *Nervenarzt*. 2006 Oct;77(10):1176, 1179–82, 1184–5.
54. Balkaya M, Cho S. Optimizing functional outcome endpoints for stroke recovery studies. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(12):2323–42.
55. Winter B, Bert B, Fink H, Dirnagl U, Endres M. Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke*. 2004 Jan;35(1):191–5.
56. Kronenberg G, Schöner J, Nolte C, Heinz A, Endres M, Gertz K. Charting the perfect storm: emerging biological interfaces between stress and stroke. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2017;267(6):487–94.

57. May M, McCarron P, Stansfeld S, Ben-Shlomo Y, Gallacher J, Yarnell J, et al. Does psychological distress predict the risk of ischemic stroke and transient ischemic attack? The Caerphilly Study. *Stroke*. 2002 Jan;33(1):7–12.
58. DeVries AC, Joh HD, Bernard O, Hattori K, Hurn PD, Traystman RJ, et al. Social stress exacerbates stroke outcome by suppressing Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11824–8.
59. Ghiadoni L, Donald AE, Copley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, et al. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000 Nov 14;102(20):2473–8.
60. Mausbach BT, Roepke SK, Ziegler MG, Milic M, von Känel R, Dimsdale JE, et al. Association between chronic caregiving stress and impaired endothelial function in the elderly. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 8;55(23):2599–606.
61. Nakajima M, Hirano T, Terasaki T, Uchino M. Signal change of the substantia nigra on diffusion-weighted imaging following striatal infarction. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2010;49(1):65–8.
62. Winter B, Brunecker P, Fiebach JB, Jungehulsing GJ, Kronenberg G, Endres M. Striatal Infarction Elicits Secondary Extrafocal MRI Changes in Ipsilateral Substantia Nigra. *PloS One*. 2015;10(9):e0136483.
63. Kronenberg G, Balkaya M, Prinz V, Gertz K, Ji S, Kirste I, et al. Exofocal dopaminergic degeneration as antidepressant target in mouse model of poststroke depression. *Biol Psychiatry*. 2012 Aug 15;72(4):273–81.
64. Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, et al. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Dtsch Arzteblatt Int*. 2017 Mar 31;114(13):226–36.
65. Suarez JI, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*. 2006 Jan 26;354(4):387–96.

66. Sandow N, Diesing D, Sarrafzadeh A, Vajkoczy P, Wolf S. Nimodipine Dose Reductions in the Treatment of Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2016 Aug;25(1):29–39.
67. Dirnagl U, Hakim A, Macleod M, Fisher M, Howells D, Alan SM, et al. A concerted appeal for international cooperation in preclinical stroke research. *Stroke*. 2013 Jun;44(6):1754–60.
68. Meairs S, Wahlgren N, Dirnagl U, Lindvall O, Rothwell P, Baron J-C, et al. Stroke research priorities for the next decade--A representative view of the European scientific community. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2006;22(2–3):75–82.
69. Balkaya M, Prinz V, Custodis F, Gertz K, Kronenberg G, Kroeber J, et al. Stress worsens endothelial function and ischemic stroke via glucocorticoids. *Stroke*. 2011 Nov;42(11):3258–64.
70. Prinz V, Hetzer A-M, Müller S, Balkaya M, Leithner C, Kronenberg G, et al. MRI heralds secondary nigral lesion after brain ischemia in mice: a secondary time window for neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Dec;35(12):1903–9.
71. Custodis F, Gertz K, Balkaya M, Prinz V, Mathar I, Stamm C, et al. Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress: effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. *Stroke*. 2011 Jun;42(6):1742–9.
72. Wegner S, Uhlemann R, Boujon V, Ersoy B, Endres M, Kronenberg G, et al. Endothelial Cell-Specific Transcriptome Reveals Signature of Chronic Stress Related to Worse Outcome After Mild Transient Brain Ischemia in Mice. *Mol Neurobiol*. 2020 Mar;57(3):1446–58.
73. Eriksson M, Johansson K, Sarabi M, Lind L. Mental stress impairs endothelial vasodilatory function by a beta-adrenergic mechanism. *Endothel J Endothel Cell Res*. 2007 Jun;14(3):151–6.

74. Shah SM, Meadows JL, Burg MM, Pfau S, Soufer R. Effects of Psychological Stress on Vascular Physiology: Beyond the Current Imaging Signal. *Curr Cardiol Rep.* 2020 Oct 9;22(12):156.
75. Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci.* 2004 May;27(5):283–9.
76. Gerischer LM, Flöel A, Endres M. [Stroke - lifestyle and environment]. *Nervenarzt.* 2015 Aug;86(8):947–53.
77. Schmidt W, Endres M, Dimeo F, Jungehulsing GJ. Train the vessel, gain the brain: physical activity and vessel function and the impact on stroke prevention and outcome in cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis Basel Switz.* 2013;35(4):303–12.
78. Bayerl SH, Ghori A, Nieminen-Kelhä M, Adage T, Breitenbach J, Vajkoczy P, et al. In vitro and in vivo testing of a novel local nicardipine delivery system to the brain: a preclinical study. *J Neurosurg.* 2019 Jan 25;132(2):465–72.
79. Bayerl SH, Nieminen-Kelhä M, Broggini T, Vajkoczy P, Prinz V. Lateral Chronic Cranial Window Preparation Enables In Vivo Observation Following Distal Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *J Vis Exp JoVE.* 2016 Dec 29;(118).
80. Bayerl SH, Niesner R, Cseresnyes Z, Radbruch H, Pohlan J, Brandenburg S, et al. Time lapse in vivo microscopy reveals distinct dynamics of microglia-tumor environment interactions-a new role for the tumor perivascular space as highway for trafficking microglia. *Glia.* 2016 Jul;64(7):1210–26.
81. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp JoVE.* 2011 Jan 6;(47).
82. Meisel C, Prass K, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, et al. Preventive Antibacterial Treatment Improves the General Medical and Neurological Outcome in a Mouse Model of Stroke. *Stroke.* 2004 Jan 1;35(1):2–6.
83. Wilson DA, Nakaji P, Albuquerque FC, McDougall CG, Zabramski JM, Spetzler RF. Time course of recovery following poor-grade SAH: the incidence of delayed

improvement and implications for SAH outcome study design. J Neurosurg. 2013
Sep;119(3):606–12.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Chef Herrn Professor Dr. Peter Vajkoczy. Er bot mir die Möglichkeit einer hervorragenden klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung, die Voraussetzung für diese Arbeit war. Er unterstützte und förderte meine wissenschaftliche Arbeit auf vielfältige Weise und initiierte selbst viele Projekte dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Matthias Endres, der mir seit meiner Dissertation stets mit seinem wissenschaftlichen und kollegialen Rat zur Seite steht und mir gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Vajkoczy den Wechsel in die Neurochirurgie ermöglichte.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Arbeitskolleginnen und Kollegen der AG Vajkoczy, insbesondere danke ich Frau Melina Nieminen für die hervorragende Laborarbeit, sowie auch meinen KooperationspartnerInnen Prof. Dr. Karen Gertz, Prof. Dr. Golo Kronenberg, Dr. Mustafa Balkaya und Dr. Adnan Ghorri.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Marcus Czabanka. Wissenschaftlich, aber vor allem klinisch und operativ konnte ich sehr viel von ihm lernen und mich stets auf ihn verlassen.

Herr PD Dr. Simon Bayerl und Herr Dr. Tobias Finger begleiteten mich wissenschaftlich und klinisch, vor allem aber stets als Freunde.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für ihre Unterstützung, für Aufmunterung und Geduld auch in schwierigen Phasen dieser Arbeit.

In besonderer Weise danke ich meiner Frau Dr. Verena Komanek-Prinz für ihre unglaubliche Unterstützung, Kraft und Loyalität. Ohne sie wäre mir sowohl die wissenschaftliche als auch die klinische Arbeit als Neurochirurg nicht möglich gewesen.

Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden;
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Unterschrift