

DISSERTATION

Auflösung der zerebralen Inflammation nach
Subarachnoidalblutung
Resolution of neuroinflammation following subarachnoidal
hemorrhage

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Victor Stavros Patsouris

Erstbetreuer*in: Prof. Dr. med. Vajkoczy

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Subarachnoidalblutung.....	5
1.2 Neuroinflammation im Rahmen der SAB.....	6
1.3 Resolutionsphase.....	7
1.4 Zielsetzung.....	7
2 Materialien und Methodik.....	9
2.1 Materialien.....	9
2.2 Methodik.....	14
2.2.1 Experimentelle SAB - endovaskuläres Filament-Perforationsmodell.....	14
2.2.2 Mortalität.....	16
2.2.3 Präparation von akuten Hirnschnitten und immunhistochemische Analyse..	16
2.2.4 Morphologie der Mikroglia-/Makrophagenzellen.....	17
2.2.5 Neuronaler Zelltod.....	18
2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR.....	18
2.2.7 Enzym-Immunsorbent-Assay.....	19
2.2.8 Statistische Auswertung.....	19
3. Ergebnisse.....	20
3.1 Kaplan-Meier-Kurve.....	20
3.2 Resolution der Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation und Zellmorphologie nach experimenteller SAB.....	21
3.3 Resolution des neuronalen Zelltods nach experimenteller SAB.....	23
3.4 Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL1 β und TNF α in Gesamthirnsaten nach experimenteller SAB.....	26
3.5 Bestimmung der IL6-Konzentration im Hirngewebe nach experimenteller	

SAB.....	27
4. Diskussion	29
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	29
4.2 Interpretation der Ergebnisse.....	31
4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand	33
4.4 Stärken und Schwächen der Studie(n).....	36
4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung.....	38
5. Schlussfolgerungen.....	39
Literaturverzeichnis.....	40
Eidesstattliche Versicherung	44
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	45
Auszug aus der Journal Summary List	47
Druckexemplar(e) der Publikation(en)	52
Lebenslauf.....	72
Komplette Publikationsliste.....	75
Danksagung	76

Abbildungsverzeichnis

1. Endovaskuläres Filament-Perforationsmodell im SAB-Mausmodell.....	15
2. Kaplan-Meier-Kurve.....	20
3. Resolution der Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation nach experimenteller SAB.....	22
4. Resolution des neuronalen Zelltods und der neuronalen Überlebensrate nach SAB...	25
5. Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL1 β und TNF α in Gesamthirnhomogenaten nach SAB.....	27
6. IL6-Konzentration im Hirngewebe nach Tag 1, Monat 1, 2 und 3 nach SAB.....	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte.....	9
Tabelle 2:	Medikamente.....	10
Tabelle 3:	Chemikalien.....	10
Tabelle 4:	Software.....	11
Tabelle 5:	OP/Labor.....	11
Tabelle 6:	Kits.....	12
Tabelle 7:	Primärantikörper.....	12
Tabelle 8:	Sekundärantikörper.....	13
Tabelle 9:	qPCR Primer.....	13
Tabelle 10:	Tiere.....	13

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Arteria carotis communis
ACE	Arteria carotis externa
ACI	Arteria carotis interna
ANOVA	Analysis of variance/Einfaktorielle Varianzanalyse
BHS	Blut-Hirn.Schranke
CBF	Zerebraler Blutfluss
cCT	Zerebrale Computertomographie
CSF	Zerebrospinale Flüssigkeit/Liquor
CytC	Zytochrom C
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
DCI	Delayed cerebral ischemia/verzögerte zerebrale Ischämie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glyceraldehyd-phosphat-Dehydrogenase
HSVTK	Herpes-simplex-virus-thymidin-Kinase
HPF	High power field/Hauptgesichtsfeld
Iba 1	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül-1
ICP	Intrakranieller Druck
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
NeuN	Neuronal Nuklei
NSAIDn	Nicht-steroidales Antirheumatikum
NFκB	Nuklearer Faktor Kappa-B
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PUFA	Polyunsaturated fatty acids/Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
SPM	Spezialisierte Proresolutions-Mediatoren
SAB	Subarachnoidalblutung
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	Terminal deoxyuridine triphosphate-nick end labeling
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abstract

Objective: Cerebral inflammation and neuronal cell death play an important role in the development of brain injury after aneurismal subarachnoid hemorrhage (SAH). SAH remains, despite the improvement through therapeutic interventions, a devastating cerebrovascular disorder with high rates of mortality and long-term disability. Cerebral inflammation is promoted through microglial accumulation and phagocytosis, but also through pro-inflammatory cytokine release and neuronal cell death, among other processes. The termination of these inflammation processes and restoration of tissue homeostasis are of utmost importance regarding a possible chronicity of cerebral inflammation and the improvement of clinical outcomes for affected patients post-SAH. The aim of this study was to analyze the inflammatory resolution phase post-SAH and consider indications for potential tertiary brain damage in the case of incomplete resolution.

Methods: The endovascular filament perforation mouse model was used to induce experimental SAH. On days 1, 7 and 14, and after 1, 2 and 3 months post-SAH induction, animals were sacrificed. Brain cryosections were immunolabeled for NeuN to visualize neurons, Iba-1 to detect microglia. TUNEL staining was also used to identify apoptotic cells. In all experimental groups (SAH- and sham-operated mice), the numbers of microglia and neuronal cells were counted in regions of interest. Additionally, the gene expression of various proinflammatory cytokines in whole brain samples was analysed using qPCR, and the IL6 protein was quantified using ELISA.

Results: A restoration of tissue homeostasis due to a lowered microglial/macrophage accumulation and neuronal cell death one month after insult was observed. However, mRNA expression of IL6 was still elevated for up to one month post-SAH and TNF α for up to two months. The gene expression of IL1 β reached its maximum on day 1, whereas at later time points, no significant differences were detected between the groups.

Conclusions: Although a resolution of inflammation could be observed on the histological level, the overexpression of pro-inflammatory cytokines suggested a potential tertiary brain injury by incomplete resolution on the molecular level. Inflammatory

resolution and tissue homeostasis particularly represent an important contribution to the disease pathology and define the impact on brain damage and outcome after SAH. Therefore, a novel complementary or even superior therapeutic approach should be carefully rethought in the management of cerebral inflammation after SAH. In addition, SPMs as high potent anti-inflammatory factors may play an important role in the treatment of inflammatory cerebrovascular diseases and in the sensible interaction between inflammation and resolution. An acceleration of the resolution phase on the cellular and the molecular level could serve as a therapeutic avenue in this context.

Zusammenfassung

Einleitung: Zerebrale Inflammation und neuronaler Zelltod spielen eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung einer Hirnschädigung nach Subarachnoidalblutung (SAB). In früheren Studien wurden eine Reihe von SAB-induzierten Entzündungsprozessen im Gehirn nachgewiesen: Mikroglia-Akkumulation, Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und neuronaler Zelltod. Die Beendigung dieser entzündlichen Prozesse ist von größter Bedeutung für die Wiederherstellung der Gewebemöostase nach SAB. Daher wurde in dieser Arbeit die Resolutionsphase dieser Inflammationsprozesse experimentell im SAB-Mausmodell untersucht, wobei die Möglichkeit einer möglichen tertiären Hirnschädigung bei unvollständiger Rückbildung der Inflammation berücksichtigt wurde.

Methoden: Die Auslösung der experimentellen SAB wurde durch das endovaskuläre Filament-Perforationsmodell bei Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden an den Tagen 1, 7, 14 und nach 1, 2 und 3 Monaten nach der SAB sakrifiziert. Histologische Gehirnschnitte wurden anschließend in den jeweiligen Gruppen für Iba-1 (Mikroglia/Makrophagen), für NeuN (Neuronen) und mittels TUNEL-Färbung (Apoptose) immunmarkiert. Die Anzahl der Mikroglia und Neuronen wurde in allen Versuchsgruppen zu allen Zeitpunkten in den definierten Regionen erfasst. Zusätzlich wurde die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine in Ganzhirnlysaten mittels qPCR sowie die IL6-Proteinmenge mittels ELISA untersucht. Sham-Mäuse dienten hier als Kontrollen.

Ergebnisse: Es konnte eine wiederhergestellte Gewebemöostase aufgrund einer signifikanten Verringerung der Mikroglia-/Makrophagenanzahl, der neuronalen Apoptose und der IL6-Proteinkonzentration auf Sham-Niveau einen Monat nach SAB beobachtet werden. Allerdings war die Genexpression von IL6 und TNF α nach einem bzw. zwei Monaten nach SAB weiterhin signifikant erhöht. Die Genexpression von IL1 β erreicht am Tag 1 ihr Maximum, wohingegen zu späteren Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten.

Diskussion: Obwohl eine Auflösung der Entzündung auf histologischer Ebene beobachtet werden konnte, deutet die Überexpression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine auf eine potenzielle tertiäre Hirnschädigung durch unvollständige Auflösung auf molekularer Ebene hin. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ablaufenden Prozesse - Inflammation und Resolution – über einen deutlich längeren Zeitraum ablaufen als zunächst angenommen. Die Auflösung der Inflammation und die Wiederherstellung der Gewebemöostase spielen insbesondere eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Krankheit und zeigen mögliche Auswirkungen auf die Hirnschädigung und das Outcome nach SAB. Daher ist davon auszugehen, dass ein neuer therapeutischer Ansatz bei der Behandlung von zerebralen Entzündungen nach SAB sorgfältig überdacht werden sollte. Eine Beschleunigung der Auflösungsphase auf zellulärer und molekularer Ebene könnte in diesem Zusammenhang ein möglicher Ansatz sein.

1 Einleitung

1.1 Subarachnoidalblutung

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist eine Art des Schlaganfalles, die durch eine Blutung in den Subarachnoidalraum definiert wird, meistens ausgelöst durch eine spontane Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas (am häufigsten der Arteria communicans anterior oder der Arteria cerebri anterior) oder eines Traumas. Wegen ihrer hohen Letalität (25 % in den ersten 24 h nach Insult) und der möglichen schwerwiegenden Komplikationen (Nachblutungen, Vasospasmus, Perfusionsdefizite, Liquorzirkulationsstörungen) stellt die SAB ein wichtiges Krankheitsbild in der Neurochirurgie dar. Das Durchschnittsalter der betroffenen Personen liegt bei fünfzig Jahren und jährlich sind ca. 5200 Patientinnen und Patienten von einer SAB betroffen (Inzidenz 9/100 000 Einwohner in Europa). Diese Blutung ist für ca. 5 % aller Schlaganfälle verantwortlich. Bis zu 30 % der betroffenen Personen bleiben dauerhaft pflegebedürftig, so dass hier auch ein wichtiger sozioökonomischer Zusammenhang besteht. Nur ein Drittel der Betroffenen ist nach überstandener SAB wieder fähig, den Alltag selbstständig zu bewältigen [1]. Typische Kardinalsymptome sind ein plötzlich auftretender Kopfschmerz ('Vernichtungskopfschmerz'), Übelkeit, Erbrechen, Lichtscheu, Bewusstseinsbeeinträchtigung bzw. Koma; auch epileptische Anfälle und sensomotorische Defizite können auftreten [2, 3]. Zu den allgemeinen Risikofaktoren der Erkrankung zählen u.a. Alkohol- und Nikotinabusus, eine arterielle Hypertonie, eine positive Familienanamnese, sowie Schwangerschaft und Geburt. Bei Vorliegen der Verdachtsdiagnose einer SAB wird zum Nachweis der Blutung zunächst notfallmäßig eine native Computertomographie des Kopfes (cCT) durchgeführt (bei negativer cCT und weiterhin hochgradigem Verdacht auf SAB wird eine Lumbalpunktion zum Nachweis von Blut im Liquor durchgeführt). Im weiteren Verlauf stellt die Darstellung der Gefäße mittels digitaler Subtraktionsangiographie zum zusätzlichen Informationsgewinn (Größe des Aneurysmas, Lage, Konfiguration) einen wichtigen diagnostischen Schritt dar. Abhängig von der Lokalisation und der Konfiguration des Aneurysmas kann anschließend eine therapeutische Versorgung meistens mittels Clipping oder endovaskulären Coilings erfolgen [2, 3]. Eine intensivmedizinische Überwachung/Therapie ist in diesem Zusammenhang grundsätzlich notwendig. Nach aufgetretener SAB folgt die primäre Hirnschädigung unmittelbar nach dem Insult durch einen Anstieg des intrakraniellen

Drucks, der zu einer Abnahme der zerebralen Perfusion und einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) führt und in einem Hirnödem gipfelt [1]. Eine sekundäre Hirnschädigung nach SAB wurde bis dato hauptsächlich mit ischämischen Ereignissen in Verbindung gebracht, die durch verzögerte zerebrale Vasospasmen und die kortikale Depolarisation ausgelöst wurden [2, 3]. Trotz einer substanziellen Wiederherstellung der zerebralen Vasokonstriktion nach SAB gelang es in großen klinischen Studien jedoch nicht, eine klinisch wirksame Behandlung mit verbessertem klinischem Outcome zu entwickeln [4-6]. Diese klinischen und experimentellen Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass neben dem Vasospasmus auch andere Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung des klinischen Outcomes spielen, wie z. B. die zerebrale Inflammation [7-9].

1.2 Neuroinflammation im Rahmen der SAB

Neben den primären Hirnschädigungsprozessen, die direkt nach der Subarachnoidalblutung beginnen, tritt im späteren Verlauf auch eine sekundäre Hirnschädigung auf, deren Ursachen unter Anderem im zerebralen Vasospasmus oder auch in der kortikalen Streu-Depolarisation gesehen werden können. Des Weiteren wurde im Rahmen der experimentellen Untersuchung dieser sekundären Hirnschädigung auch eine zerebrale Inflammation beobachtet, die zunehmend Bedeutung unter den pathophysiologischen Mechanismen erhält. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, wie die zerebrovaskuläre Inflammation eine intraparenchymale Schädigung auslöst [10]. Ebenso wurde festgestellt, dass eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen auftritt, die für den neuronalen Zelltod verantwortlich ist. Diese beginnt vier Tage nach der Blutung in der unmittelbaren hämorrhagischen Region und breitet sich wellenförmig bis zum 14. Tag über das gesamte Gehirn aus [10]. Darüber hinaus konnte eine signifikant erhöhte Rate von Mikroglia-/Makrophagen-Phagozytose und morphologische Unterschiede hinsichtlich des Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierungszustands mit einer gleichzeitig höheren Interaktionsrate zwischen Mikroglia/Makrophagen und neuronalen Zellen aufgrund des SAB-Ereignisses im Mausmodell nachgewiesen werden [11]. Ebenso sind in diesem Zusammenhang eine erhöhte Ausschüttung von unterschiedlichen, proinflammatorischen Zytokinen und ein gesteigerter neuronaler Zelluntergang beobachtet worden.

1.3 Resolutionsphase

Ausgehend von den zuvor erläuterten Ergebnissen wurden in dieser Arbeit für die Dauer von drei Monaten nach experimentell ausgelöster SAB im Mausmodell histologische und molekulare Parameter im Hinblick auf die sog. Resolutionsphase untersucht. Unter optimalen Bedingungen wurden nach der akuten Entzündungsphase direkte und indirekte Mechanismen implementiert, um die Rückkehr zur Gewebekomöostase herzustellen. Nach aktuellem Forschungsstand ist die Resolutionsphase ein stark regulierter, aktiver Prozess und nicht, wie lange Zeit angenommen, ein ausschließlich passiver, von der Zytokinkonzentration abhängiger Mechanismus [12-14]. In dieser Phase sollen die Überexpression proinflammatorischer Mediatoren gehemmt, die Akkumulation von Entzündungszellen im betroffenen Gewebe gebremst und darüber hinaus geeignete Mechanismen zur Hemmung der akuten Entzündung aktiviert werden, um eine vollständige Homöostase des Gewebes herbeizuführen [12-14]. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass eine große und immer noch wachsende Klasse resolutionsfördernder und entzündungshemmender Faktoren, die sog. spezialisierten Pro-Resolving-Mediatoren (SPMs), ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial besitzen. Resolvine, Protectine und Lipoxine sind die bekanntesten Mitglieder dieser entzündungshemmenden Biomoleküle, die von verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden können und zusätzlich die Entzündung hemmen [15]. Laut aktuellem Forschungsstand ist die Resolutionsphase bereits zu Beginn einer Entzündungsphase festgesetzt. Somit scheinen sich pro- und anti-inflammatorische Mechanismen direkt zu beeinflussen und können einen Einfluss auf das Ausmaß der Resolution der Inflammation haben. Bei diesem hochsensiblen Zusammenspiel kann eine unvollständige Resolution des Gewebes daher relativ leicht zu einer chronischen und nicht endenden Entzündung führen.

1.4. Zielsetzung

Im klinischen Umfeld wird häufig, neben langanhaltenden somatischen, neuropsychologischen und kognitiven Defiziten, auch eine globale Hirnatrophie oder ein Hippocampus-Volumenverlust bei Patienten beobachtet, die eine SAB überlebt haben

[16,17]. Es ist daher sinnvoll zu untersuchen, ob chronische Entzündungsprozesse zu diesen langanhaltenden Beeinträchtigungen oder bleibenden Schäden beitragen können. Vor diesem Hintergrund wurde hier eine mögliche Resolution der zerebralen Entzündung mittels etabliertem experimentellem SAB-Mausmodell untersucht. Darüber hinaus wurde im Rahmen einer möglichen tertiären Hirnschädigung Hinweisen auf eine mögliche Chronifizierung nachgegangen, welche durch eine unvollständige Resolution der Entzündung im betroffenen Gewebe verursacht werden könnte. Die tertiäre Hirnschädigung wird definiert als *„Schädigung, die durch langanhaltende entzündliche Prozesse nach primärer/sekundärer Hirnschädigung verursacht wird, die das Outcome verschlechtert, für weitere Schädigung prädisponiert oder eine Reparatur/Regeneration des Gewebes verhindert“* [18]. Die Untersuchung eines tertiären Hirnschadens in diesem Zusammenhang ist daher ein wichtiger Ansatz, um den Verlauf und eine mögliche Chronifizierung des nach SAB auftretenden Entzündungszustands aufzudecken.

2 Materialien und Methodik

2.1 Materialien

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzreader	Microplate-fluorescence reader infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Konfokalmikroskop	LSM5	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Homogenisator	Dispomix Ultra Turrax	IKA, Staufen, Deutschland
Licht- /Fluoreszenzmikroskop	Axiotech Observer Stemi 2000CS und Axioacam 105	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wärmeschrank	CS5000	Memmert, Schwabach, Deutschland
OP-Mikroskop	OPMICS-NC Varioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
qPCR	7900 fast real-time PCR	Applied Biosystems, Foster city, USA
Tiefkühler	Ultra light	Sanyo, Osaka, Japan
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Tischzentrifuge	C1300 RT	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Waage	Contura	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Wärmeplatte	14800	Medax, Neumünster, Deutschland
Zentrifuge	Ultra speed centrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Rasierer	C1301B-230V	Wella, Darmstadt, Deutschland

Verwendete Geräte für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 2: Medikamente

Medikament	Hersteller
Dexpanthenol 5% (Bepanthen®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Aqua	Braun, Frankfurt, Deutschland
Ketamin (Ketanest®)	Pfizer Pharma, New York City, USA
NaCl 0,9%	Braun, Frankfurt, Deutschland
Penicillin 1 Mega 10 Vial	Grünenthal, Aachen, Deutschland
Tramadolhydrochlorid (Tramal®)	Grünenthal, Aachen, Deutschland
Isofluran Forene	Abott, Chicago, USA
Lidocainhydrochlorid 2% (Xylocain®)	AstraZeneca, Cambridge, England
Xylozin (Rompun®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland

Verwendete Medikamente für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 3: Chemikalien

Substanz	Hersteller
Albumin bovine (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Casein from bovine milk	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DAPI	Dianova, Hamburg, Deutschland
D-Saccharose	Roth, Graz, Österreich
Ethanol 70%, 96%	Roth, Graz, Österreich
Ethylen glycol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Evans Blue	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fitc Dextran	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Gelatin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Mayers Hämalaumlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylforamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PBS Tabletten	Gibco, Dublin, Irland
Saccharose	Roth, Graz, Österreich
Xylol 98%	Roth, Graz, Österreich

Verwendete Chemikalien für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 4: Software

Software	Analyse
ABI PRISM 7300 SDS	qPCR
Axio Vision 4,6	Kamera
Endnote	Zitate
GraphPad Prism 6.01	Statistik
ImageJ©	Bildauswertung

Verwendete Software für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 5: OP/Labor

Geräte/Substanz	Hersteller
23 Gauge Nadel Sterican	Braun, Frankfurt, Deutschland
2-Propanol 70%	Braun, Frankfurt, Deutschland
96 well Platte	Greiner bio one, Leipzig, Deutschland
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	VWR, Dresden, Deutschland
Eppendorf Tubes 1.5ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Gefäßclips	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
gentleMACS Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mounting Medium mit DAPI	Dianova, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Roth, Graz, Deutschland
Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen Biospheere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polyester Faden 4-0 Ethibond	Ethicon, Somerville, USA
Polypropylen Faden 8-0	Ethicon, Somerville, USA
Schere	Fine Science Tools, Heidelberg,

	Deutschland
Softasept®	Braun, Frankfurt, Deutschland
Spritze BD Discardit™ 5ml, 10ml, 20ml	BD, Franklin Lakes, USA
Sterilium® classic pure	Bode, Hamburg, Deutschland
Transpore® White Surgical Tape	3M, Saint Paul, USA
Vaskulärer Faden 3-0	Ethicon, Somerville, USA
Wattestäbchen	HGV Verbandstoffe, Lindhorst, Deutschland

Verwendete Geräte/Substanzen für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 6: Kits

Kit	Funktion	Hersteller
ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit	Apoptose	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Onestep RT-PCR	cDNA Synthese	Qiagen, Hilden, Deutschland
Premix ex Taq Perfect Real time Kit	qPCR	Takara, Kusatsu, Japan
Rneasy Mini-Kit	RNA-Isolation	Qiagen, Hilden, Deutschland

Verwendete Kits für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung)

Tabelle 7: Primärantikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
anti Iba 1 rabbit	1:250	WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan
anti NeuN mouse	1:200	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Verwendete Primärantikörper für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
DyLight651 Donkey anti-rabbit IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab, Cambridge, England
DyLight488 Donkey anti-rabbit IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab, Cambridge, England
FITC Donkey anti-mouse IgG	1:100	Jackson ImmunoResearch Lab, Cambridge, England

Verwendete Sekundärantikörper für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 9: qPCR Primer

Target	Forward Primer 5' - 3'	Reverse Primer 3' - 5'
IL1 β	ATCACTCATTGTGGCTGTGG	CATCTCGGAGCCTGTAGTGC
TNF α	CACAGCCTTCCTCACAGAGC	GGAGGCAACAAGGTAGAGAGG
IL6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
GAPDH	TCTCCTGCGACTTCAACA	TGTAGCCGTATTCAATTGTCA

Verwendete qPCR Primer für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

Tabelle 10: Tiere

Tiere	Beschreibung
Mäuse	Es wurden 60 männliche C57BL/6J-Mäuse mit einem Gewicht von 30-32g (12-14 Wochen alt) für die Experimente durch die hauseigene Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Alle Experimente wurden gemäß den Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGESO) durchgeführt.

Verwendete Tiere für die Durchführung der Experimente (eigene Darstellung).

2.2 Methodik

2.2.1 Experimentelle SAB - endovaskuläres Filament-Perforationsmodell

Die Tierversuche wurden von der zuständigen Ethikkommission genehmigt und gemäß den behördlichen Richtlinien und Standards des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin, sowie gemäß dem Europäischen Übereinkommen (ETS 123 von 1986) durchgeführt. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um das Leid und die Anzahl der verwendeten Tiere zu minimieren. Alle Abschnitte des Manuskripts wurden gemäß den ARRIVE-Richtlinien (Animal Research Reporting in vivo Experiments) beschrieben. Alle diagnostischen Beurteilungen erfolgten auf der Grundlage unserer institutionellen Richtlinien. An dieser Studie nahmen 60 männliche C57BL/6J-Mäuse mit einem Gewicht von 30-32 g teil (12-14 Wochen alt), die in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit untergebracht waren und freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Alle Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip einer von zwei Gruppen zugeteilt: Sham- und SAB-Gruppe. Von den Gruppen wurden jeweils 5 Tiere für die immunhistochemische Untersuchung von Kryo-Gewebe und für die mRNA-Analyse von Koronarschnitten der Gehirnhälften verwendet, wie in den Abbildungen und Legenden angegeben sind. Die SAB wurde durch das endovaskuläre Perforationsmodell an Mäusen ausgelöst, wie in Abbildung 1 beschrieben ist. Bei den Sham-Mäusen wurde das gleiche Operationsverfahren angewandt, mit dem Unterschied, dass die Punktionsnadel sofort zurückgezogen wurde, wenn ein Widerstand an der Gefäßwand zu spüren war. Wie bereits gezeigt, war die Auslösung einer experimentellen SAB in hohem Maße reproduzierbar [10]. Durch eine Standard-Hämatoxylin/Eosin-Färbung konnten intrazerebrale Blutungen und territoriale Infarkte nach der Blutung ausgeschlossen werden. Wegen des zu erwartenden Auftretens von intraparenchymalen Blutungen oder Schlaganfällen wurden Tiere, die nach der Operation eine Hemiparese aufwiesen, von den Versuchen ausgeschlossen [10].

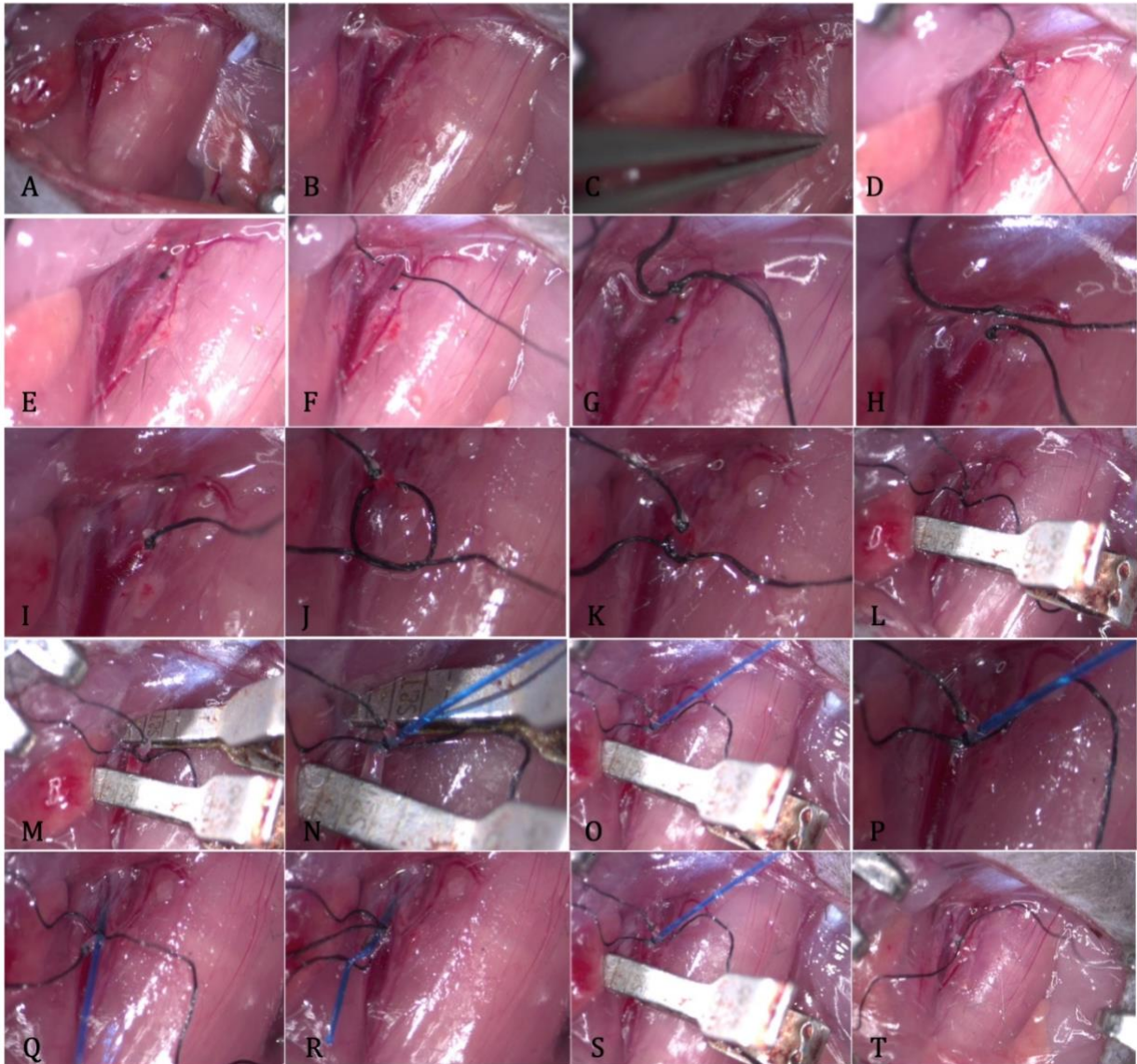


Abbildung 1. Endovaskuläres Filament-Perforationsmodell im SAB-Mausmodell

Das Tier wird in Rückenlage unter dem Mikroskop fixiert und der Kopf sollte in einem Winkel von fast 45 Grad zur kontralateralen Seite der gewünschten Perforationsseite (hier: rechts) gedreht werden. Nun erfolgt ein Hautschnitt (ca. 1,5-2,0 cm) auf der rechten Seite, lateral der Mittellinie und das Freilegen der rechten Arteria carotis communis durch stumpfe Präparation des Bindegewebes zwischen den Speicheldrüsen (Gl. submandibulares). Ein guter Überblick über das OP-Feld wird durch den Einsatz eines chirurgischen Retraktors gewährleistet (A). Die A. carotis communis, A. carotis externa und interna sowie deren kleinen Äste (A. thyroidea superior, A. occipitalis und A. pterygopalatinum) werden freigelegt und teilmobilisiert. Die umgebenden Nerven (v.a. N. vagus) sollten hierbei nicht verletzt werden (B, C). Um einen besseren Winkel für die anschließende Gefäßpunktion zu erhalten wird unter Verwendung

eines 4-0 chirurgischen Fadens die A. thyroidea superior ligiert und durchtrennt (D, E). Die A. carotis externa wird mit zwei 4-0 Polyethylen-Fäden ligiert und das Gefäß durchtrennt (F-I). Um die durchtrennte A. carotis externa wird eine 8-0-Naht schlingenartig positioniert und verknotet. Die A. carotis externa sollte jedoch nicht vollständig ligiert werden, da das Filament für die Gefäßpunktion durch das Gefäß in den nächsten Schritten geführt werden muss (J, K). Nachdem ein mikrochirurgischer Gefäßclip über die Arteria carotis communis und ein zweiter Gefäßclip über die Arteria carotis interna gesetzt werden, erfolgt am proximalen Ende des Gefäßes ein Schnitt mit einer Mikroschere. Anschließend wird ein 1-1,5 cm langes Stück 5-0 Nylon-Monofilament, dessen Ende stumpf oder scharf abgeschnitten ist in das Gefäß eingeführt und die schlingenartig gesetzte Naht um das Gefäß und dem Filament festgezogen (L-N). Die Blutperfusion wird durch Entfernung der Gefäßclips wieder hergestellt (O, P) und das Filament nun vorsichtig weiter in die Arteria carotis communis und in die Arteria carotis interna vorgeschoben (Q). Im Anschluss erfolgt nach ca. 7–9 mm die Perforation der rechten A. cerebri anterior (auf den Gefäßwiderstand achten) und unmittelbar danach die Entfernung des Filamentes aus dem Gefäß, um einen Blutrückfluss zu ermöglichen und somit die SAB zu induzieren (R-T). Die Naht der Wunde erfolgte unter dem Mikroskop.

(eigene Darstellung)

2.2.2 Mortalität

Die Mortalität der Tiere aller Versuchsgruppen wurde nach 1-3 Stunden, 4-6 Stunden, 6-12 Stunden, 12-24 Stunden und nach 24 Stunden wöchentlich bewertet. Die Sterblichkeit der Tiere wurde in einer Kaplan-Meier-Kurve zusammengefasst.

2.2.3 Präparation von akuten Hirnschnitten und immunhistochemische Analyse

Die Mäuse jeder Versuchsgruppe wurden am Tag 1/7/14 und nach Monat 1/2/3 nach ausgelöster SAB sakrifiziert. Nach dem Öffnen der Haut und des Schädels, wurde das gesamte Gehirn entnommen und in eiskaltem ACSF gewaschen. Die Immunfluoreszenzanalyse der Mäusegehirnproben erfolgte in Koronarschnitten (20 µm) durchgeführt. Bei allen Tieren wurde eine Standard-Hämatoxylin/Eosin- und eine Eisenfärbung durchgeführt, um intrazerebrale Blutungen und territoriale Infarkte zu den verschiedenen Zeitpunkten auszuschließen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern inkubiert und Mikroglia/Makrophagen durch Färbung für Iba1

(Kaninchen-anti Iba1, WAKO Pure Chemical Industries, 1:250) sichtbar gemacht. Die Färbung der neuronalen Kerne (NeuN, Maus-anti NeuN, Millipore, 1:200) führte zur Identifizierung von reaktiven Neuronen. Die Inkubation der sekundären Antikörper (alle von Jackson ImmunoResearch Lab) wurde 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur ausgeführt: DyLight651 Esel-Anti-Kaninchen (1:200), DyLight488 Esel-Anti-Kaninchen (1:200) und FITC Esel-Anti-Maus (1:100). Die Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)-haltigem Einbettungsmedium (Dianova) gegengefärbt. Die für die quantitative Analyse notwendigen Bilder sind mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Microimaging GmbH) aufgenommen, welches mit einer Digitalkamera (AxioCam MRc) ausgestattet war. Die Bilderfassung der konfokalen Mikroskopie erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (TCS SP5, Leica) mit einem z-Schritt von 0,1 μm und einem 63 \times 1,4 NA Ölimmersionsobjektiv. Alle Bilder wurden mit der LCF AF Software (Leica) aufgenommen. Die Unterteilung der Immunfluoreszenzschnitte in 6 bis 10 Hochleistungsfelder (HLF) ermöglichte die Gesamtzahl der Zellen pro Hirnschnitt auf zwei verschiedenen Ebenen des Gehirns, 1,5 mm vor Bregma (ungefährer Bereich des Thalamus/Hypothalamus) und 1,5 mm hinter dem Bregma (ungefährer Bereich des Hippocampus), pro μm^2 zählen zu können. Die immunreaktive Fläche wurde mit einem computergestützten Bildanalyseprogramm (ImageJ.net) gemessen. Die Aufnahmen wurden nach dem Zufallsprinzip mit demselben HLF aufgenommen, der auch für die Zellzählung verwendet wurde um diese Bereiche für die Untersuchung zu verwenden. Die Software ImageJTool® automatisiert die Bildanalyse, indem sie alle immunmarkierten Elemente eines Schwellenbereichs in rein schwarze Pixel und den Rest des Bildes in rein weiße Pixel umwandelt. Die Software quantifiziert anschließend die Gesamtzahl und den prozentualen Anteil der schwarzen und weißen Pixel und ermöglichte so eine statistische Analyse der Daten.

2.2.4 Morphologie der Mikroglia-/Makrophagenzellen

Mikroglia/Makrophagen zeichnen sich durch eine starke Plastizität und unterschiedliche Morphologie aus. Im gesunden Gehirn zeigen die meisten Mikrogliazellen einen ‚Ruhezustand‘ mit einem kleineren Zytoplasma und mehrfach verzweigten Zellkörpern. Die Verzweigungen sind sehr fein und dünn [19]. Dennoch ‚ruhen‘ diese Mikrogliazellen nicht wirklich, sondern scannen ihre Umgebung auf pathologische Zustände und regulieren gleichzeitig auch die neuronale Aktivität [20]. In verschiedenen Situationen der

Neuroinflammation oder nach Hirnschädigung wird eine schrittweise Deramifizierung der Mikrogliazellen beobachtet. Verzweigte Mikroglia können in diesem Fall in einen ‚aktivierten Zustand‘ eintreten, der einerseits durch eine große Zellzahl mit einem größeren Zellkörper und andererseits mit kürzeren, dicken Fortsätzen und einer relativ geringeren Anzahl von Verzweigungen gekennzeichnet ist [21]. Ruhe- und Aktivierungszustand zeigen die beiden unterschiedlichen morphologischen Typen, die je nach Aktivierungsrate und genauem Zeitpunkt der Entzündungsprozesse zusätzlich ein Spektrum von Zwischenphänotypen der Zellen aufweisen können [22]. In der hier vorgestellten Studie wird die Morphologie der Mikroglia/Makrophagen durch Färbung für Iba1 (Kaninchen-anti Iba1, WAKO Pure Chemical Industries, 1:250) beschrieben. Die morphologische Charakterisierung anhand verschiedener, in früheren Studien beschriebener Marker und die Anzahl der Iba1-positiven Zellen werden für die statistische Analyse verwendet [22]. Iba1 wird entweder in Mikroglia oder Makrophagen exprimiert, die beide aufgrund der Expression der am häufigsten verwendeten Zellmarker *in vivo* nicht zu unterscheiden sind. Allerdings ist die Spezifität der Färbung in verletztem Hirngewebe, in welches auch periphere Makrophagen eindringen können, begrenzt. Daher werden die für Iba1 positiven Zellen im gesamten Skript als Mikroglia/Makrophagen bezeichnet.

2.2.5 Neuronaler Zelltod

Der neuronale Zelltod wurde durch die terminale Desoxyuridintriphosphat-Nickend-Markierung (TUNEL, ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) gemäß dem Herstellerprotokoll nachgewiesen, gefolgt von der Markierung mit NeuN und DAPI. Zellen, die dreifach positiv für TUNEL, NeuN und DAPI waren, wurden als Neuronen betrachtet, die dem Zelltod unterliegen.

2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Durchführung der RNA-Isolierung aus Homogenaten des gesamten Hirngewebes (PureLink RNA Mini Kit, Life Technologies), der cDNA-Synthese (Onestep RT-PCR Kit, Qiagen) und der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) (Premix ex Taq Perfect Real Time Kit, Takara) erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Für die qPCR-Amplifikation wurden Mausgen-spezifische Primer (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH)

verwendet, die mit der Primer Express Software entwickelt wurden. Die ABI PRISM 7300 SDS-Software (relative Quantifizierung) wurde verwendet, um die Zyklusschwelle (ZS) für jede Reaktion zu bestimmen; die für jedes Gen ermittelte Genexpression wurde auf die Expression des endogenen Housekeeping-Gens Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die mittlere Veränderung der Expression des Zielgens wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet: $\Delta\Delta ZS = \Delta ZS \text{ Zielgen} - \Delta ZS \text{ GAPDH}$. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft.

2.2.7 Enzym-Immunsorbent-Assay

Um die Entwicklung der IL-6-Konzentration im Hirngewebe nach SAB bis zu 3 Monate lang zu verfolgen, wurde das Enzymimmunoassay (ELISA) gemäß den Anweisungen des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Durch die statistische Analyse der Daten mit GraphPad Prism 6.1 (GraphPad Software) unter Verwendung der ANOVA-Testung mit paarweisem Vergleich oder der Holm-Sidak-Methode wurde die Signifikanz für * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ und **** $P < 0,0001$ bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Kaplan-Meier-Kurve.

Die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mittels Kaplan-Meier-Kurve in den untersuchten Gruppen SAB und Sham für den Zeitraum von 3 Monaten bestimmt. Von den 30 Tieren der SAB-Gruppe starb 1 Tier innerhalb von 4 Stunden (3,34 %) nach erfolgter SAB, 2 Tiere nach 12 Stunden (6,68 %), 2 Tiere nach 24 Stunden (6,68 %) und 1 Tier (3,34 %) nach 48 Stunden. Hier wurde eine Gesamtsterblichkeitsrate von 20,04 % ermittelt. In der Sham-Gruppe (25 Tiere) wurde keine Sterblichkeit dokumentiert (Abbildung 2).

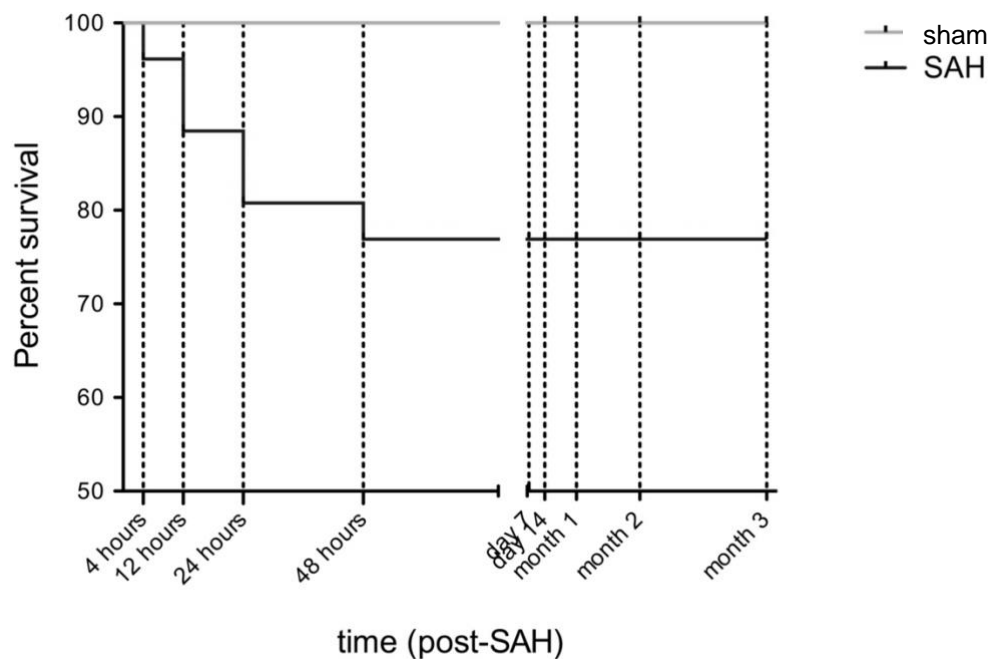


Abbildung 2: Mittels Kaplan-Meier-Kurve wurde die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit für den Zeitraum von 3 Monaten nach SAB ermittelt. In der SAB-Gruppe zeigt sich eine postoperative Mortalität bis 48h nach der Blutung, wohingegen sich in der Sham-Gruppe keine Mortalität zeigt.

Abk.: SAH = subarachnoidal hemorrhage (dt.: Subarachnoidalblutung)

(Abbildung übernommen aus [23])

3.2 Resolution der Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation und Zellmorphologie nach experimenteller SAB.

Mittels immunohistochemischer Färbungen von koronaren Hirnschnitten erfolgte die Auswertung der Anzahl und die Verteilung der Mikroglia/Makrophagen über einen Zeitraum von 3 Monaten mit einem Antikörper gegen Iba1 nach SAB im Vergleich zu Sham-Tieren (Abbildung 3A). Die untersuchte Region der Hirnschnitte liegt ipsilateral zur SAB-Punktion im Bereich des Corpus callosum und des Hippocampus (Abbildung 3B). Nach Monat 1 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, was eine vollständige Auflösung von Mikroglia/Makrophagen auf zellulärer Ebene zeigt. In Bezug auf die Morphologie und den ‚Aktivitätszustand‘ der Iba1-positiven Mikroglia/Makrophagen, die in diesem Zeitraum untersucht wurden, zeigten die Zellen bei SAB-Mäusen in den ersten 14 Tagen einen amöboiden und runden Zellkörper mit langen Fortsätzen, welche den ‚aktivierten‘ Zustand der Zellen widerspiegelt [19]. Iba1-positive Zellen in SAB-Mäusen nach Monat 1 und in Sham-Mäusen zeigten einen ‚inaktiven‘ Zustand mit dünnen und länglichen Zellkörpern (Abbildung 3D). Die unterschiedliche Zellmorphologie und damit der Aktivitätszustand von Iba1-positiven Mikroglia/Makrophagen wurden an anderer Stelle charakterisiert [19].

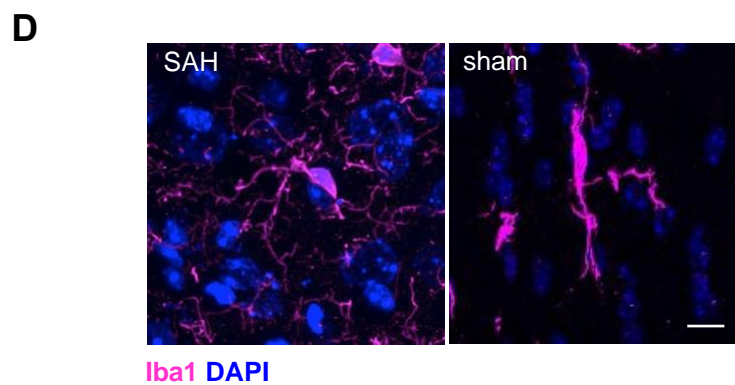
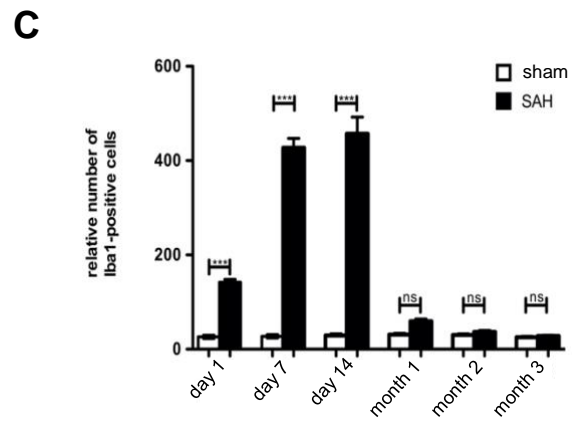
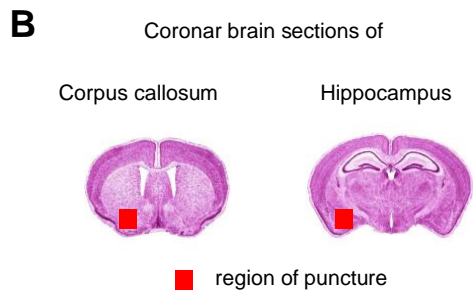
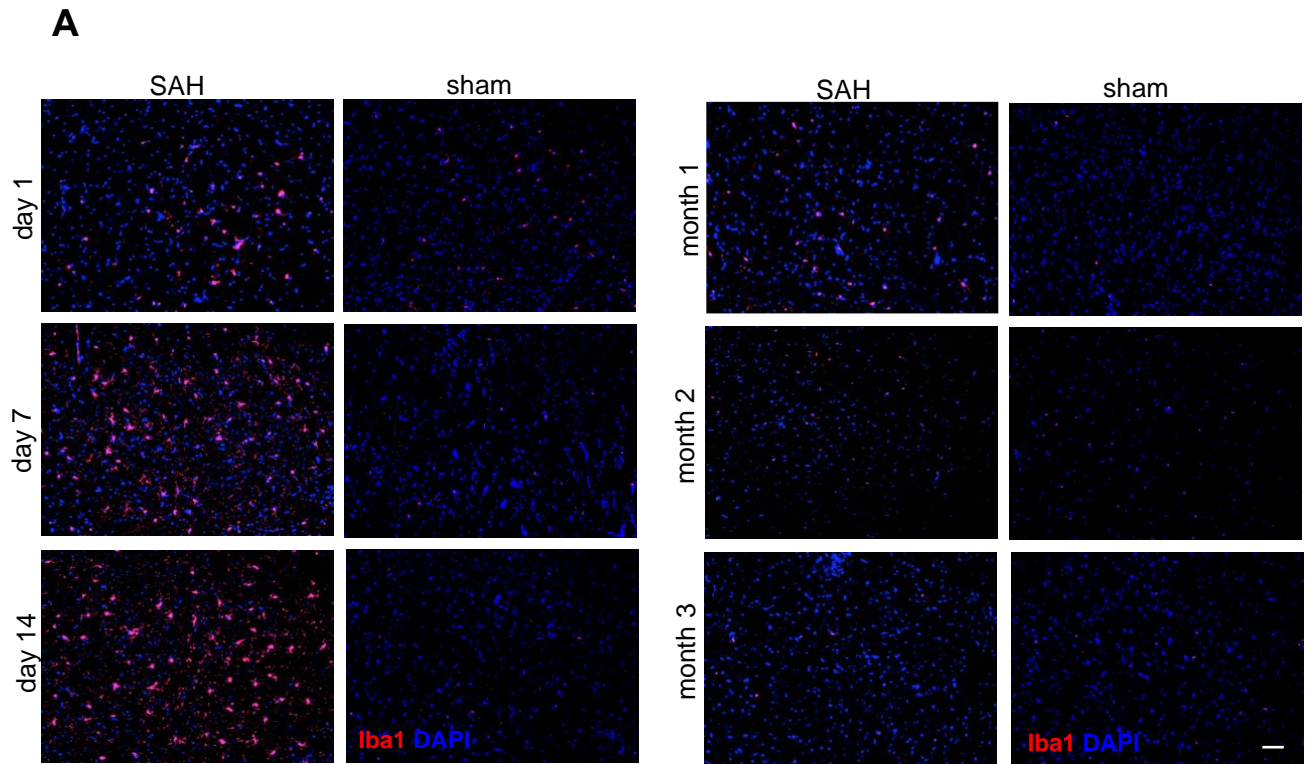


Abbildung 3: (A) Für verschiedene Zeitpunkte (Tag 1/7/14 und Monat 1/2/3) wurden koronare Gehirnschnitte von SAB-operierten Mäusen und Sham-Mäusen mit Antikörpern gegen Iba1 (magenta) und DAPI (blau) immunohistochemisch gefärbt, um die zeitabhängige Ansammlung von Mikroglia/Makrophagen und deren Resolution zu betrachten. Repräsentative Gehirnschnitte wurden erfasst und die Anzahl der Iba1-positiven Zellen (rot) wurde mittels ImageJ[®]-Software ausgezählt. Der Balken zeigt 50 µm an.

(B) Die roten Quadrate zeigen die untersuchte Region der koronaren Gehirnschnitte, welche sich ipsilateral der Punktion im Bereich des Corpus callosum und des Hippocampus an der Basis des Gehirns befinden.

(C) In der Graphik zeigt sich eine signifikante Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen bei SAB-Mäusen im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe bis Tag 14. Ab Monat 1 traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen auf, was auf eine vollständige Auflösung von Mikroglia/Makrophagen auf zellulärer Ebene hindeutet. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, (n = 5 Tiere pro Gruppe), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 und ****P < 0,0001 gegenüber Sham, statistische Signifikanz bestimmt durch einfaktorielle ANOVA-Testung.

(D) Immunohistochemische Färbung von Mikroglia/Makrophagen zur Darstellung der Morphologie ihres aktivierten Zustands im direkten Vergleich zu ihrem ‚Ruhephänotyp‘. Dieser ‚Ruhephänotyp‘ überwiegt in der Sham-Gruppe und einen Monat nach SAB. Der Balken zeigt 10 µm an.

Abk.: ANOVA = analysis of variance (dt.: einfaktorielle Varianzanalyse); DAPI = 4',6-Diamidino-2-phenylindol; Iba1 = Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (dt.: ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül-1); SAH = subarachnoidal hemorrhage (dt.: Subarachnoidalblutung); SEM = standard error of mean (dt. Standardfehler des Mittelwerts).

(Abbildung übernommen aus [23])

3.3 Resolution des neuronalen Zelltods nach experimenteller SAB.

Über streng regulierte inflammationshemmende und -fördernde Signalkaskaden sind Mikroglia/Makrophagen, als Immunzellen des Zentralen Nervensystems an einer Vielzahl pathologischer und physiologischer Prozesse beteiligt. Diese Zellen kommunizieren in diesem Zusammenhang ständig u.a. mit Neuronen und steuern somit viele neuronale Funktionen [24]. Basierend auf vorangegangenen Experimenten mit Mikroglia-depletierten Mäusen, wird der neuronale Zelltod im Rahmen der sekundären Hirnschädigung nach experimenteller SAB hauptsächlich durch eine massive

Akkumulation residenter Mikrogliazellen als durch infiltrierende Makrophagen vermittelt [10]. In diesem Zusammenhang zeigt sich auch eine vermehrte Mikroglia/Makrophagen-Neuronen Interaktion, welche mit einer Initiierung des neuronalen Zelltodes einhergeht [11]. Um diese Interaktion zwischen Mikroglia/Makrophagen-Ansammlung und neuronalem Zelltod über einen Zeitraum von 3 Monaten nach SAB zu untersuchen, wurde ein TUNEL-Assay verwendet. Es konnte eine anfänglich erhöhte Anzahl von TUNEL-NeuN-DAPI-dreifach positiven Zellen in SAB-Mäusen bis zum 14. Tag nachgewiesen werden (Abbildung 4A und 4B). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in vorangegangenen Studien [10, 11]. Ab Monat 1 gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, was auf eine Hemmung des neuronalen Zelltods hindeutet. Die signifikant niedrigste neuronale Überlebensrate wurde 14 Tage nach der SAB beobachtet. Dies markiert den höchsten Punkt der neuronalen Zellschädigung, wohingegen ab Monat 1 mehr als 90% der vorhandenen Neuronen in jeder SAB-Gruppe überlebten (Abbildung 4C). Durch die immunohistochemische Analyse der gleichen Lokalisation der koronaren Gehirnschnitte, welche auch für die Mikroglia/Makrophagen-Resolution verwendet wurden, kann somit eine mögliche Interaktion zwischen diesen beiden Auflösungsprozessen beobachtet werden.

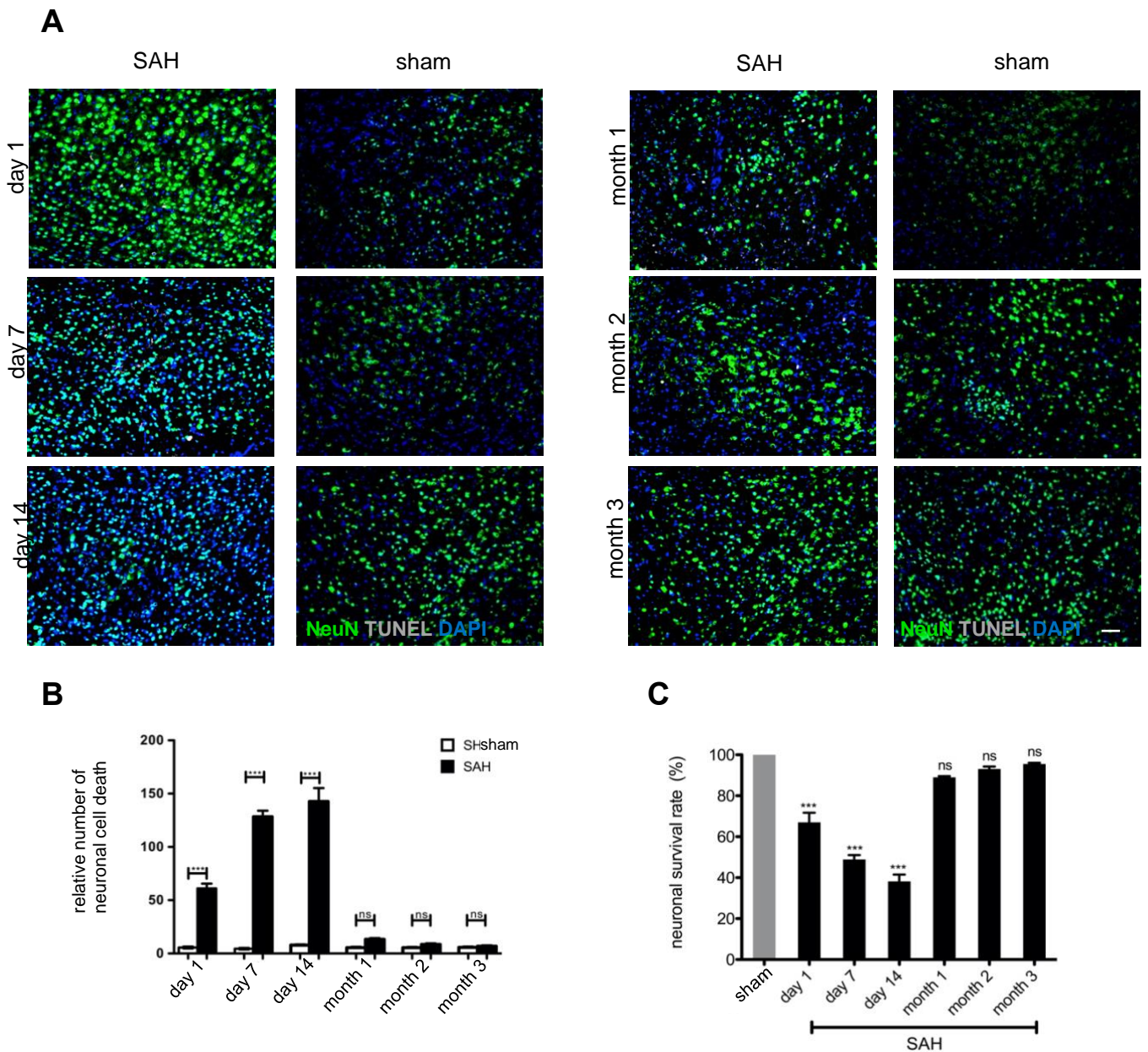


Abbildung 4: (A) Kryoschnitte der Gehirne wurden an Tag 1, 7, 14 und nach Monat 1, 2, 3 in der SAB- sowie in der Sham-Gruppe für NeuN immunmarkiert, um Neurone sichtbar zu machen. Anschließend erfolgte mittels TUNEL-Färbung die Darstellung des neuronalen Zelltodes. TUNEL-positive (weiß) NeuN-markierte neuronale Zellkörper (grün) wurden in allen Versuchsgruppen in den untersuchten Regionen gezählt (ImageJ®-Software) und ein Zeitverlauf erstellt. Die koronaren Hirnschnitte wurden in den Regionen des Corpus callosum und des Hippocampus, ipsilateral der Blutung analysiert (siehe auch Abbildung 3B).

(B) Eine signifikante Zunahme des neuronalen Zelltodes ist bei den SAB-Mäusen im Vergleich zu den Sham-Tieren ab Tag 1 bis Tag 14 zu

beobachten. Ähnlich wie bei der Mikroglia/Makrophagen-Akkumulation (Abbildung 3C) zeigt sich nach Monat 1 kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen, was auf eine Abnahme des neuronalen Zelltods zwischen Tag 14 und Monat 1 hinweist.

(C) Durch Auszählen der neuronalen Zellkörper (TUNEL-negativ) für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt, wird eine neuronale Überlebensrate, verglichen mit den jeweiligen Sham-Tieren gezeigt. An Tag 14 nach SAB zeigt sich die niedrigste neuronale Überlebensrate. Ab Monat 1 gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der neuronalen Überlebensrate in der SAB-Gruppe und der Sham-Gruppe, was auf eine Resolution des neuronalen Zelltods auf zellulärer Ebene hindeutet. Der Balken zeigt 50 μm an.

Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, (n = 5 Tiere pro Gruppe), *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 und ****P < 0,0001 gegenüber Sham, statistische Signifikanz bestimmt durch einfaktorielle ANOVA-Testung.

Abk.: ANOVA = analysis of variance (dt.: einfaktorielle Varianzanalyse); DAPI = 4',6-Diamidino-2-phenylindol; Iba1 = Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (dt.: ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül-1), NeuN = neuronal nuclei (dt.: neuronale Nuklei); SAH = subarachnoidal hemorrhage (dt.: Subarachnoidalblutung); SEM = standard error of mean (dt.: Standardfehler des Mittelwerts); TUNEL = Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling. (Abbildung adaptiert aus [23])

3.4 Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL1 β und TNF α in Gesamthirnlysaten nach experimenteller SAB.

Im Rahmen verschiedener zerebraler Erkrankungen und nach SAB entsteht eine übermäßige Neuroinflammation, welche vor allem durch die exzessive Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen, wie IL1 β , TNF α und IL6 initiiert und aufrechterhalten wird [24]. Die Produktion dieser entzündungsfördernden Mediatoren wird u.a. durch aktivierte Mikroglia/Makrophagen-Zellen und andere Zellen des ZNS nach SAB stimuliert [10]. Dieser Einfluss auf die Genexpression unterschiedlicher Zytokine wurde hier über einen längeren Zeitraum in Gesamthirnlysaten beobachtet. Die Genexpression von TNF α , IL6 und IL1 β ist in der akuten Phase nach SAB (Tag 1) im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 5). Insbesondere wurde eine Zunahme der Genexpression von IL6 bis Monat 1 nach SAB bemerkt, die im Anschluss wieder Sham-Niveau erreichte. Ebenso nahm die Genexpression von TNF α bis zum 2. Monat zu und fiel im 3. Monat nach der Blutung auf Sham-Werte ab. Die Genexpression von IL1 β

erreichte an Tag 1 ihr Maximum, wohingegen zu späteren Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden.

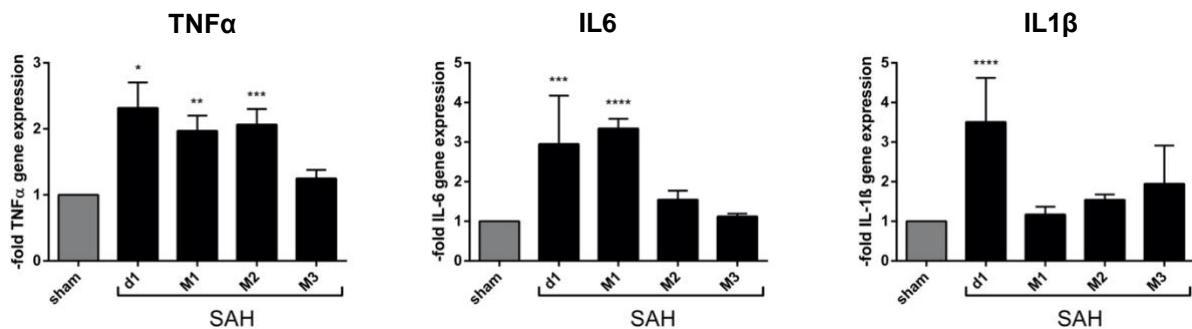


Abbildung 5. Die Genexpression der untersuchten Zytokine TNF α , IL6 und IL1 β wurde mittels qPCR an Tag 1, sowie nach Monat 1,2 und 3 in der SAB-Gruppe bestimmt und mit den Sham-Kontrollen verglichen. Die Gewebemöostase der Genexpression aller untersuchten Zytokine ist nach Monat 3 erreicht; hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den SAB und Sham-Mäusen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, (n = 5 Tiere pro Gruppe) ****P < 0,0001, ***P < 0,001, **P < 0,01, *P < 0,05 gegenüber Sham, statistische Signifikanz bestimmt durch einfaktorielle ANOVA-Testung.

Abk.: ANOVA = analysis of variance (dt.: einfaktorielle Varianzanalyse); IL = interleukin (dt.: Interleukin); qPCR = quantitative polymerase chain reaction (dt.: quantitative Polymerase-Kettenreaktion); SAH = subarachnoidal hemorrhage (dt. Subarachnoidalblutung); SEM = standard error of mean (dt.: Standardfehler des Mittelwerts); TNF = tumour necrosis factor (dt.: Tumornekrosefaktor)
(Abbildung übernommen aus [23])

3.5 Bestimmung der IL6-Konzentration im Hirngewebe nach experimenteller SAB.

Der dynamische Verlauf der IL6-Proteinkonzentration wurde nach experimenteller SAB im Maus-Modell im Vergleich zu Sham-Mäusen nach Tag 1, Monat 1,2 und 3 mittels ELISA-Assays bestimmt (Abbildung 6). Das Zytokin IL6 besitzt eine Schlüsselrolle in Entzündungsreaktionen und kann diese in komplexer Art und Weise regulieren [25]. Hier zeigt sich während des akuten Stadiums der SAB (Tag 1) eine signifikante Erhöhung der IL6-Proteinkonzentration von bis zu $1,7 \pm 1,2$ -fache der Kontrollgruppe. Ab Monat 1 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (SAB und Sham), so dass hier eine Gewebemöostase der IL6-Proteinkonzentration erreicht ist

und von einer vollständigen Resolution der IL6-Proteinmenge im Gehirngewebe ausgegangen werden kann.

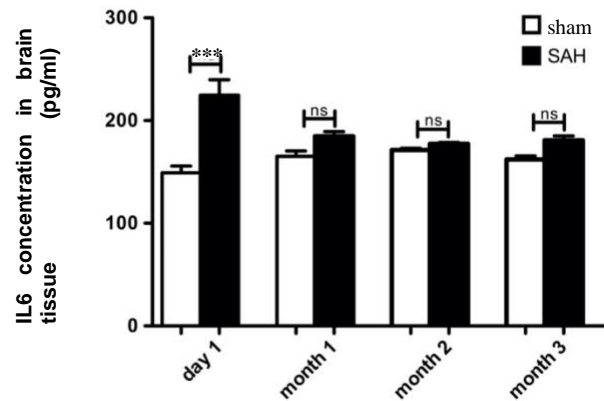


Abbildung 6: Die Bestimmung der IL6-Proteinkonzentration erfolgte mittels ELISA-Assays in Gesamthirnlysaten von SAB und Sham-Mäusen in einem zeitlichen Verlauf von 3 Monaten (Tag 1, Monat 1,2 und 3 nach SAB vs. Sham). Im akuten Stadium der Blutung (Tag 1) zeigt sich in der Abbildung eine signifikante Zunahme der IL6-Proteinkonzentration im Vergleich zur Sham-Gruppe ($1,7 \pm 1,2$ -fache der Sham-Kontrolle). Nach Monat 1 sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen erkennbar. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, ($n = 5$ Tiere pro Gruppe), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ und **** $P < 0,0001$ gegenüber Sham, statistische Signifikanz bestimmt durch einfaktorielle ANOVA-Testung.

Abk.: ANOVA = analysis of variance (dt.: einfaktorielle Varianzanalyse); ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IL = interleukin (dt.: Interleukin); SAH = subarachnoidal hemorrhage (dt.: Subarachnoidalblutung); SEM = standard error of mean (dt.: Standardfehler des Mittelwerts).
(Abbildung übernommen aus [23])

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Bedeutung der Resolutionsphase im pathophysiologischen Kontext der chronischen Inflammation für verschiedene immunvermittelte Entzündungskrankheiten, wie die rheumatoiden Arthritis oder im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen [26,27], aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen [28] hat das Forschungsinteresse in diesem Bereich in den letzten Jahren stark geprägt. Im Verlauf des Auftretens einer rheumatoiden Arthritis gibt es viele Hinweise darauf, dass die betroffenen Gelenke über solide intrinsische Resolutionsprozesse verfügen, die die Chronifizierung der vorherrschenden Inflammation und die Entwicklung der Arthritis hemmen [29]. Eine signifikante Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen wurde auch bei der Parkinson-Krankheit festgestellt [30,31]. Interessanterweise wurde in einer Meta-Analyse von Studien mit entzündungshemmenden Medikamenten ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAIDs) und einem geringeren Risiko für die Entwicklung der Parkinson-Krankheit festgestellt, was darauf hindeutet, dass neuroinflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen [30-32]. Dadurch kann eine therapeutische Immunmodulation in diesem Zusammenhang einen möglichen Therapieansatz darstellen [33,34]. Ähnliche inflammatorische Prozesse, wie bei der Parkinson-Krankheit, bei der eine entstehende Neuroinflammation im Gewebe mit einer Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen und einer Degeneration der dopaminergen, nigrostriatalen Nervenbahn verbunden ist [35], wurden nach ausgelöster experimenteller SAB in früheren Studien beschrieben [36-42]. Dazu gehören unter anderem eine massive Zunahme der Anzahl an Iba1-positiven Mikroglia/Makrophagen, eine erhöhte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und ein vermehrter neuronaler Zelltod [10]. Darüber hinaus zeigte sich, dass sich die meisten Mikroglia/Makrophagen zunächst am Ort der Blutungsauslösung ansammeln, woraufhin sich die Entzündungsreaktion über das restliche Gehirn ‚wellenartig‘ ausbreitet, was zu einer sekundäre Hirnschädigung führen kann [43-47]. Interessanterweise scheinen diese intrazerebral aktivierten Mikroglia/Makrophagen zusätzlich durch eine intravaskuläre Entzündungsreaktion nach dem SAB-Ereignis ausgelöst zu werden [36]. In einer kürzlich durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass Mikroglia/Makrophagen hauptsächlich durch eine typisch aktivierte Zellmorphologie charakterisiert sind und eine signifikant erhöhte Phagozytose-

Rate nach SAB aufweisen. Des Weiteren war auch die Interaktionsrate zwischen Mikroglia/Makrophagen und Neuronen höher als bei Sham-Tieren, was zu einer signifikanten Erhöhung der neuronalen Apoptose führte [11]. In der hier vorgestellten Arbeit wurde nun zum ersten Mal eine Langzeit-Studie der Mikroglia-/Makrophagen-Akkumulation, des neuronalen Zelltods und der Protein- und Genexpression wesentlicher proinflammatorischer Zytokine über einen Zeitraum von drei Monaten nach experimentell ausgelöster SAB im Mausmodell durchgeführt. Durch die Untersuchung dieser inflammatorischen Parameter über einen längeren Zeitraum sollte herausgefunden werden, ob sich der akute Entzündungszustand nach SAB auf das Kontrollniveau zurückbildet, was als Hinweis auf das Abklingen der Inflammation gewertet werden könnte. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Mikroglia-/Makrophagen-Akkumulation in Mäusen nach SAB im Vergleich zu der Sham-Gruppe bis zum Tag 14 deutlich erhöht war. Nach dem ersten Monat gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den untersuchten Gruppen, was auf eine vollständige Resolution der Mikroglia-/Makrophagen-Zellzahl hinweist (Abbildung 3). Hinsichtlich der Mikroglia-/Makrophagen-Morphologie überwiegt bis zu einem Monat nach SAB der ‚Ruhe-Phänotyp‘ mit kleinerem Zytoplasma und feinen, mehrfach verzweigten Zellkörpern gegenüber der typisch aktivierten Zellmorphologie mit einem amöboiden Zellkörper und langen Fortsätzen, die bis zu einem Monat nach SAB vorherrscht (Abbildung 3). Gleichzeitig wurde die signifikant niedrigste neuronale Überlebensrate 14 Tage nach SAB beobachtet, so dass zu diesem Zeitpunkt die neuronale Zellschädigung am höchsten ist. Zwischen dem 1. und 3. Monat nach der SAB überlebten mehr als 90 % der Neuronen (Abbildung 4). In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass der SAB-induzierte neuronale Zellverlust mit der durch Mikroglia/Makrophagen vermittelten Neuroinflammation in direkter Verbindung steht [10]. Dieser Aspekt wurde von unserer Gruppe anhand eines transgenen Mikroglia-depletierten Mausmodells (HSVTK) eingehend untersucht, wobei akkumulierte Iba1-positive Zellen als residente Mikrogliazellen identifiziert wurden. Darüber hinaus war das Ausmaß des neuronalen Zelltods nach der Akkumulation der Mikroglia/Makrophagen signifikant reduziert, was zusätzlich auf diesen interzellulären Zusammenhang hinweist [10]. Ebenso wird die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren durch aktivierte Mikroglia/Makrophagen und andere Zellen des ZNS [10] nach der SAB stimuliert. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Genexpression von IL1 β , TNF α und IL6 am Tag 1 nach SAB im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erhöht war. Insbesondere wurde ein

Anstieg der IL6-Genexpression bis zum ersten Monat nach der SAB beobachtet, der im zweiten Monat wieder auf Sham-Niveau zurückfiel. Die TNF α -Genexpression stieg bis zum zweiten Monat an und ging drei Monate nach SAB auf SHAM-Niveau zurück. Im Vergleich zu IL6 und TNF α erreichte die Genexpression von IL1 β ihr Maximum sehr schnell nach der SAB (am Tag 1), während zu späteren Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Sham- und SAB-Gruppen festgestellt werden konnten (Abbildung 5). Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Proteinkonzentration von IL6 im betroffenen Gesamthirngewebe während des akuten Krankheitsstadiums signifikant erhöht ist und nach Monat 1 post SAB kein signifikanter Unterschied zwischen SAB und Sham-Kontrollen besteht (Abbildung 6).

4.2 Interpretation der Ergebnisse

So sehr Entzündungen bedeutende pathophysiologische Prozesse sind, tragen sie, wenn sie über einen langen Zeitraum andauern und bestehen, zu einem breiten Spektrum chronischer Erkrankungen bei [48]. Die Einleitung einer akuten Entzündungsreaktion wird durch einen fein abgestimmten Auflösungsprozess begleitet, der die Homöostase des Gewebes wiederherstellt und die Heilung des Gewebes in seinen ursprünglichen strukturellen und funktionellen Zustand fördert. Unter pathologischen Bedingungen ist dieses Gleichgewicht oft gestört [49,50]. Obwohl in diesem Zusammenhang nicht die primären Schädigungsmechanismen ausschlaggebend sind, können sekundäre oder tertiäre Hirnschädigungen, die durch eine bestehende Entzündungsreaktion vermittelt werden, die Rückkehr zur Homöostase stören. Im Rahmen der SAB sind sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften von aktivierten Mikroglia/Makrophagen in der Literatur beschrieben. Im Allgemeinen gelten kurzfristig aktivierte Mikroglia/Makrophagen als wichtige modulatorische Zellen, welche eine Gewebekomöostase aufrechterhalten können und als wichtige Vermittler zwischen anderen Zellarten (z.B. Neuronen, Astrozyten) wirken. Eine verlängerte Aktivierung dieser Zellen kann jedoch auch zu Schädigungen im Gewebe und einer inflammatorischen Chronifizierung führen [13,14]. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die durch Mikroglia/Makrophagen verursachte zerebrale Neuroinflammation auf histologischer Ebene einen Monat nach SAB aufgelöst worden ist und dass eine Gewebekomöostase erreicht ist. Gleichzeitig konnte die niedrigste neuronale Überlebensrate 14 Tage nach

ausgelöster SAB nachgewiesen werden, was auf einen Höhepunkt der neuronalen Zellschädigung zu diesem Zeitpunkt hindeutet. Zwischen Monat 1 und 3 nach SAB, überlebten jedoch mehr als 90 % der vorhandenen Neuronen, so dass auch hier eine Resolution der neuronalen Apoptose nach einem Monat eingetreten ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den zuvor gemachten Beobachtungen überein, dass der SAB-induzierte neuronale Zellverlust mit der Zunahme der Anzahl Iba-1-positiver Mikroglia/Makrophagen zeitlich korreliert, wie anhand eines transgenen Mikroglia-depletierten Mausmodells (HSVTK) gezeigt wurde [10]. Allerdings war die Genexpression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α zu diesem Zeitpunkt noch auf einem hohen Niveau, wodurch ein Ausschluss einer möglichen tertiären Hirnschädigung durch eine unvollständige Resolution nicht bestätigt werden kann. Im Hinblick auf das klinische Outcome nach der Blutung und dem beschriebenen zeitlichen Verlauf neuroinflammatorischer Prozesse wäre ein wichtiges Ziel weiterer Studien, zu ermitteln, auf welche Weise diese Inflammation frühzeitig gestoppt oder wie dieser entgegengewirkt werden könnte. Auch im Hinblick auf einen möglichen günstigen Einfluss auf das klinische Outcome würde die Evaluation des optimalen Zeitpunkts eines möglichen therapeutischen Nutzens der Resolutionsphase eine wichtige Rolle spielen.

Das proinflammatorische Zytokin IL6 wurde von mehreren Autoren als potenzieller Biomarker für die sog. „delayed cerebral ischemia“ (DCI) und Inflammation nach aneurysmatischer SAB erforscht [47]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Proteinkonzentration von IL6 im betroffenen Gesamthirngewebe während des akuten Krankheitsstadiums signifikant erhöht ist und nach Monat 1 post SAB kein signifikanter Unterschied zwischen SAB und Sham-Kontrollen besteht (Abbildung 6). Um das klinische Umfeld einer SAB-induzierten Inflammation zu untersuchen, identifizierte die Arbeitsgruppe des Verfassers in einer anderen Arbeit eine Hochregulierung von entzündlichen Zytokinen in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Patienten, die an einer SAB litten [48]. Darüber hinaus haben mehrere klinische Studien gezeigt, dass CSF-Konzentrationen klassischer proinflammatorischer Zytokine wie IL6, IL8, IL1 β , TNF α , Hämoxygenase-1 und Monozyten-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) mit einer verzögerten zerebralen Entzündung und einem schlechten Outcome einhergehen [49,50]. Diese Korrelation zeigt vor allem, dass hohe IL6-Spiegel im Liquor der Patienten mit der Entwicklung von Sekundärfarkten und zerebralen Entzündungen nach SAB assoziiert sind [51]. Dies wird besonders interessant, wenn man ZNS-spezifische

Mikroglia, die den Großteil von IL6 produzieren, und Gehirnkapillare untersucht. Die IL6-Expression in den Gehirnkapillaren ist relativ gering ausgeprägt und steigt nur als Reaktion auf inflammatorische Stimuli drastisch an. Außerdem verlieren Endothelzellen nach Zugabe von rekombinantem IL6 ihre Integrität [39]. IL6 kann dann wahrscheinlich über die geschädigte Bluthirnschranke in den Blutkreislauf gelangen und ebenfalls eine systemische Entzündungsreaktion auslösen. Angesichts dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass IL6 in diesem zeitabhängigen Verlauf nur kurz nach dem SAB-Insult signifikant erhöht ist, müsste eine weitere differenzierte Untersuchung spezifischer Zell- und Gewebetypen auf die Expression von SAB-induziertem IL6 im Hinblick auf die Resolutionsphase vorgenommen werden.

4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Nach aktuellem Forschungsstand ist die Auflösung von Entzündungen ein stark regulierter, aktiver Prozess und nicht nur ein passives Abklingen der Inflammation, wie früher angenommen wurde [13]. Darüber hinaus wird die Resolution bereits zu Beginn der Entzündung kodiert und ist dadurch direkt mit einer Vielzahl von Entzündungssignalkaskaden verknüpft [13-15]. Die wichtigsten Resolutionsziele zum Erreichen einer Gewebekomöostase umfassen die Hemmung des weiteren Einstroms von Entzündungszellen, die Clearance des Gewebes dieser Zellen und die Herunterregulierung der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen [13-15]. Serhan et al. haben diese Resolutionsphase auf histologischer Ebene als das Intervall vom Maximum der Zellinfiltration bis zu ihrem Verlust aus dem Gewebe definiert [13]. Darüber hinaus scheinen auch andere Gewebekomponenten eine wesentliche Rolle bei der Initiierung neuroinflammatorischer Prozesse zu spielen, schaffen gleichzeitig aber auch ein entzündungsförderndes Umfeld, das andere Zelltypen innerhalb des ZNS beeinflusst. Wesentliche Auflösungsmechanismen des Hirngewebes wurden im Rahmen der SAB-Forschung bisher jedoch wenig untersucht [16].

Darüber hinaus wurde in der Literatur gezeigt, dass eine Gruppe spezialisierter Pro-Resolving-Mediatoren (Protectine, Lipoxine, Resolvine und Maresine) eine wesentliche Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Inflammation und Resolution spielt [15]. Serhan et al. haben die Resolution auf histologischer Ebene als „das Intervall vom Maximum der inflammatorischen Zellinfiltration bis zu ihrem Austritt aus dem Gewebe“ definiert [15].

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, einschließlich der anlässlich der vorliegenden Arbeit angefertigten Vorstudien, konzentrierten sich auf pathophysiologische Prozesse, die mit der Neuroinflammation nach ausgelöster SAB auftreten. Es wurde festgestellt, dass nicht die aus der Peripherie rekrutierten Makrophagen, sondern vor allem residente Mikrogliazellen eine wichtige Rolle bei zerebralen Entzündungsvorgängen nach SAB spielen [10]. Darüber hinaus scheinen andere Zellarten, wie Hirnendothelzellen, eine wesentliche Rolle bei der Initiierung von neuroinflammatorischen Prozessen zu spielen und auch eine entzündungsfördernde Umgebung zu schaffen, die andere Zelltypen innerhalb des ZNS beeinflussen. Wesentliche Resolutionsmechanismen des Hirngewebes nach SAB wurden bisher jedoch kaum untersucht. Zudem berücksichtigen die meisten experimentellen und klinischen Parameter die Krankheitsaktivität und Hirnschädigung, aber nur wenige heben die wesentlichen Heilungs- und Reparaturvorgänge hervor [15]. Parameter, die den Fortschritt der Gewebeauflösung messen, könnten die oben erwähnten spezialisierten Pro-Resolving-Mediatoren sein, die von verschiedenen Zelltypen wie Neutrophilen, Makrophagen, Mikrogliazellen oder Astrozyten während einer Entzündungsreaktion freigesetzt werden und eine wichtige Rolle bei der Einleitung und Förderung der Resolution spielen [51]. Diese bioaktiven Moleküle werden durch enzymatische Oxygenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) zu Beginn der Entzündungskaskade von verschiedenen Zelltypen produziert. Sie hemmen die Inflammation und kontrollieren die Regeneration von Gewebeschäden [50]. Eine kürzlich publizierte Studie legt nahe, dass SPMs das Gleichgewicht zwischen pathogenen T-Zellen (Th1/Th17) und regulatorischen T-Zellen kontrollieren, indem sie spezifisch auf adaptive Immunzellen zielen. Insbesondere reduzieren SPMs die Zytokinproduktion von aktivierten CD8+- und CD4+-T-Zellen und schränken somit die Differenzierung von nativen CD4+-T-Zellen in Th1- und Th17-Zellen ein [52]. Die Existenz eines solchen intrinsischen Mechanismus im Körper, der das Gleichgewicht zwischen Entzündung und Resolution steuert, ist von größter Bedeutung, da genau dieselben angeborenen Immunzellen, die eine akute Entzündung verbreiten, indem sie Entzündungsmediatoren produzieren, dem laufenden Entzündungsprozess entgegenwirken und ihn hemmen können.

In Bezug auf neuroinflammatorische Prozesse und das Erreichen der Homöostase des Gehirns nach solchen entzündlichen Ereignissen wurde berichtet, dass die Anzahl der reaktiven Astroglia nach SAB ebenfalls signifikant erhöht war und dies zur Entwicklung einer zerebralen Inflammation beitragen könnte [11]. In diesem Zusammenhang können

LXA4 und RvD1, zwei weitere SPMs, den ALX/FPR2-Rezeptor von Astrozytenzellen binden und ihre Reaktivität verringern, indem sie ihre Aktivierung und die Produktion proinflammatorischer Zytokine hemmen und somit Neuronen schützen, was eine Astrozyten-abhängige neuroprotektive Aktivität darstellt [53]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass SPMs die Mikroglia-Aktivierung und ihre Fähigkeit hemmen, entzündungsfördernde Mediatoren zu produzieren, die somit zur Gewebemöostase beitragen [54]. Andere Arbeiten beschreiben, dass nicht nur die intrinsisch produzierten SPMs das Ausmaß der Entzündung und die durch proinflammatorische Signalwege ausgelöste Schädigung reduzieren. Mehrere Berichte zeigen die Auswirkungen der exogenen SPM-Verabreichung auf die Genesung von unterschiedlichen zerebrovaskulären Erkrankungen und unterstreichen damit die Bedeutung dieser Faktoren bei der Auflösung von Neuroinflammation und Hemmung einer möglichen Chronifizierung. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass die Gabe von Maresin-1, das Mäusen mit experimentell induzierter autoimmuner Enzephalomyelitis verabreicht wurde, zu einer signifikanten Verringerung entzündungsfördernder Zytokine führte und die Anzahl der Immunzellen im Rückenmark und Blutkreislauf verringerte. Darüber hinaus wurde auch die Gesamtzahl der Th1-Zellen reduziert. Gleichzeitig führte dies zu einer Zunahme regulatorischer T-Zellen und veränderte die Makrophagen-Verteilung zu einem entzündungshemmenden Phänotyp mit vorherrschenden Resolutionsmechanismen, die die Rückkehr zur Gewebemöostase fördern [55]. Ebenso zeigten In-vitro-Studien von Rey C. et al., dass Resolvin D1 und E1 die Resolution einer Inflammation fördern, indem sie den NFκB-Signalweg und die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine in Mikrogliazellen regulieren [56]. Eine andere Arbeit hat gezeigt, dass Lipoxin A4 das Schlaganfallvolumen, den Zusammenbruch der Bluthirnschranke und die Neuroinflammation signifikant reduzieren kann, indem es unmittelbar nach Beginn des ischämischen Schlaganfalls direkt in das Gehirn von Ratten injiziert wurde [57]. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen und der hier vorgestellten Ergebnissen könnte eine zielgerichtete Behandlung mittels Pro-Resolutions-Faktoren und -Mechanismen ein sinnvoller therapeutischer Ansatz bei SAB und anderen schweren entzündlichen Erkrankungen sein.

4.4 Stärken und Schwächen der Studie(n)

Eine detaillierte Beschreibung der Resolutionsphase wäre in diesem Zusammenhang sehr hilfreich, um die pathophysiologischen Prozesse zu verstehen, die an der Hirnschädigung und dem klinischen Outcome beteiligt sind, sowie deren Einfluss auf eine mögliche sekundäre oder tertiäre Hirnschädigung nach SAB zu erklären. In der Literatur gibt es bereits unterschiedliche Aussagen zu diesem Thema. In einigen Studien wurde festgestellt, dass eine mögliche Modifizierung der Neuroinflammation nach SAB einen positiven Einfluss auf das klinische Outcome hat [58]. Andere Studien hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen der Inflammationsreaktion und dem Outcome feststellen [59,60]. Möglicherweise ist der Zeitpunkt nach SAB, zu dem die Entzündungsreaktion oder die Resolutionsphase beeinflusst wird, sowie die Art der beteiligten Zellen entscheidend dafür, ob eine neuroinflammatorische Modifizierung zu einem schützenden oder schädigenden Effekt führt. Inwieweit nun eine Ausschaltung inflammatorischer Stimuli bzw. eine Förderung der Resolutionsphase positive Wirkungen auf das Outcome der Patientinnen und Patienten nach SAB haben, müsste in weiteren experimentellen und klinischen Studien genauer untersucht werden.

In einer früheren Studie konnte durch die Verabreichung von Minocyclin, einem entzündungshemmenden Medikament im SAB-Mausmodell, eine signifikant verringerte phagozytotische Aktivität von Mikroglia/Makrophagen, begleitet von einer verminderten Interaktion mit Neuronen und einer Hemmung der neuronalen Apoptose, erreicht werden. Darüber hinaus wurde die SAB-induzierte Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen durch das Medikament deutlich verringert [11]. Obwohl die jeweiligen Zelltypen, die für die Überexpression der hier analysierten proinflammatorischen Marker verantwortlich sind, in dieser Arbeit nicht spezifiziert wurden, wurde die wichtige Rolle der Resolutionsphase auf histologischer und molekularer Ebene nach SAB beschrieben. Es wird angenommen, dass eine übermäßige Entzündungsreaktion unter anderem zu einem Hirnödem, einer mitochondrialen Dysfunktion, einer Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und neuronalem Zelltod führt und somit eine schlechte Prognose von Patienten mit SAB bedeutet. Solche Mechanismen kommen nicht nur im Rahmen einer ZNS-Schädigung vor, sondern gelten auch für physiologische zelluläre Zustände, bei denen Mikroglia/Makrophagen z.B. die Hippocampus-Neurogenese bei Erwachsenen positiv beeinflussen können. Unter diesen physiologischen Bedingungen zeigen sich ebenfalls eine erhöhte IL-6 Genexpression und Proteinkonzentration [44]. Viele Untersuchungen

haben gezeigt, dass die IL-6-Signalgebung sowohl schützende als auch schädigende Wirkungen aufweisen kann, z. B. wirkt IL-6 der NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitotoxizität nach einer Hirnischämie entgegen und fördert auch die Nervenregeneration. IL6 ist sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen im Gehirn beteiligt und wird primär durch die Aktivität verschiedener IL6-Signalwege gelenkt [44]. Ähnliche experimentelle Beobachtungen hinsichtlich einer möglichen Funktionsänderung im Rahmen einer reparativen Kaskade zeigen auch die anderen untersuchten Zytokine TNF- α und IL-1 β . Es wird deutlich, dass z. B. IL-1 β für eine normale Gehirnfunktion wichtig ist [45]. Obwohl sich Anti-IL-1-Therapien als revolutionäre Behandlungen für mehrere autoinflammatorische Erkrankungen erwiesen haben und eine wichtige Rolle bei diesen Krankheiten spielen, besteht nicht immer eine klare Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vorhandensein von neuroinflammatorischen Prozessen und ZNS-Schäden [45]. Tatsächlich zeigt auch IL-1 β pleiotropische Wirkungen im Gehirn auf, welche einerseits entzündungsfördernde Funktionen, andererseits neuroprotektive Eigenschaften haben [46]. Zusammenfassend könnte also eine wichtige Frage sein, ob die beobachteten Zytokin-Veränderungen Gewebeschäden auslösen, aus Schäden resultieren und die Inflammation fördern oder diese im Zeitverlauf stoppen und neuroprotektiv wirken. Diese mögliche Funktionsänderung (schädlich vs. protektiv) der Zytokine kann stark vom jeweiligen pathophysiologischen Kontext abhängen, d. h. der lokalen Zytokinkonzentration, dem vorherrschenden Gewebemilieu, dem zellulären Target, dem Vorhandensein oder Fehlen negativer Rückkopplungsregulatoren und den zeitlichen Eigenschaften der Resolutions- oder Inflammationskaskade.

Zusätzlich zu den erwähnten strukturellen Entzündungsveränderungen im Hirngewebe nach ausgelöster SAB wäre eine neurokognitive und Verhaltensanalyse bei den Mäusen, die eine mögliche Verschlechterung des experimentellen/klinischen Outcomes beschreiben, von Vorteil gewesen, um festzustellen, ob diese strukturellen Unterschiede tatsächlich zu einer klinisch relevanten Problematik führen. Bei Ratten wurden verschiedene neurologische und mentale Tests mit guten Anzeigeparametern für klinische Tests und Ergebnisse etabliert [58]. In Bezug auf das SAB-Mausmodell (endovaskuläre Filamentperforation) wurden in früheren Studien umfangreiche neurologische Verhaltenstests durchgeführt, einschließlich eines Angsttests und eines Depressionstest an Mäusen, welche jedoch keine signifikanten Veränderungen zwischen SAB- und Sham-Mäusen (Daten nicht veröffentlicht) zeigten. Ein möglicher Grund, der

dieses Dilemma erklären könnte, ist ein bei Mäusen im Vergleich zu Ratten kleinerer Subarachnoidalraum, was entsprechend zu einem geringeren Blutvolumen und zu einer eher milderen Art der Blutung führt.

4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung

Die vorliegende Arbeit bildet im neurochirurgischen Forschungsbereich der Subarachnoidalblutung einen wichtigen Fortschritt und zeigt ausschlaggebende Grundlagen in der Pathophysiologie der Erkrankung hinsichtlich der Resolutionsphase der Neuroinflammation. Es wurden einerseits maßgebliche neue Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie im längeren Zeitverlauf nach experimenteller Auslösung einer Subarachnoidalblutung im Mausmodell beschrieben sowie andererseits mögliche Ansatzpunkte für zukünftige therapeutische Behandlungsstrategien aufgezeigt. In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich des Weiteren feststellen, dass die Entzündungsprozesse im geschädigten Gehirn möglicherweise länger andauern als ursprünglich erwartet. Interessanterweise gibt es mehrere Arbeiten, die zeigen, dass langfristige Veränderungen in der Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine insbesondere im Hippocampus und im limbischen System die kognitiven Funktionen nach ischämischen Hirnverletzungen beeinflussen [38]. In diesem Zusammenhang könnten die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse einen potenziellen Faktor erklären, der zu den häufig beobachteten kognitiven Langzeitbehinderungen nach einer SAB führt. Es werden jedoch weitere experimentelle und klinische Studien benötigt, um die genauen Prozesse der Resolutionsreaktion sowie den klinischen Wert dieser Ergebnisse näher definieren zu können.

5. Schlussfolgerungen

Die Komplexität der ablaufenden Resolutionsprozesse, die unter anderem den Abbau der infiltrierten Inflammationszellen aus dem betroffenen Gewebe, aber auch die Hemmung der Akkumulation von weiteren Inflammationszellen und der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen beinhalten, muss durch die genauere Analyse dieser Auflösungsmechanismen bei akuter und chronischer Entzündung nach SAB weiter untersucht werden. Ebenso spielt die Einbeziehung der gewebespezifischen Umgebung des Gehirns und der betroffenen Zellarten (u. a. Mikroglia, Neuronen, Astrozyten) eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus könnten die erwähnten SPMs als hochpotente entzündungshemmende Faktoren eine wichtige Rolle bei der Behandlung von entzündlichen zerebrovaskulären Erkrankungen spielen. In dieser Arbeit wurde die wichtige pathophysiologische Rolle der Resolutionsphase auf histologischer und molekularer Ebene nach SAB aufgezeigt. Die intensive Untersuchung dieser Faktoren in der Zukunft wird zu einem besseren Verständnis der langfristigen Mechanismen bei der Resolution der Inflammation führen und könnte zur Entwicklung neuer supplementär oder autonom wirkender, resolutionsbasierender, therapeutischer Ansätze bei der Behandlung der zerebralen Entzündung nach SAB führen.

Literaturverzeichnis

1. Fujii, M., Yan, J., Rolland, W.B., Soejima, Y., Caner, B., Zhang, J.H. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res* 2013;4(4):432-46.
2. Westermaier, T., Stetter, C., Koehler, D., Weiland, J.Lilla, N. Acute reaction of arterial blood vessels after experimental subarachnoid hemorrhage - An in vivo microscopic study. *J Neurol Sci* 2019;396:172-7.
3. Sanchez-Porras, R., Zheng, Z., Santos, E., Schöll, M., Unterberg, A.W., Sakowitz, O.W. The role of spreading depolarization in subarachnoid hemorrhage. *Eur J Neurol* 2013;20(8):1121-7.
4. Macdonald, R.L., Higashida, R.T., Keller, E., Mayer, S.A., Molyneux, A., Raabe, A., Vajkoczy, P., Wanke, I., Frey, A., Marr, A., Roux, S., Kassell, N.F. Preventing vasospasm improves outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: rationale and design of CONSCIOUS-2 and CONSCIOUS-3 trials. *Neurocrit Care* 2010;13(3):416-24.
5. Macdonald, R.L., Kassell, N.F., Mayer, S., Ruefenacht, D., Schmiedek, P., Weidauer, S., Frey, A., Roux, S., Pasqualin, A. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke* 2008;39(11):3015-21.
6. Pickard, J.D., Murray, G.D., Illingworth, R., Shaw, M.D., Teasdale, G.M., Foy, P.M., Humphrey, P.R., Lang, D.A., Nelson, R., Richards, P. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *BMJ* 1989;298(6674):636-42.
7. Sehba, F.A., Pluta, R.M.Zhang, J.H. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol* 2011;43(1):27-40.
8. Hansen-Schwartz, J., Vajkoczy, P., Macdonald, R.L., Pluta, R.M.Zhang, J.H. Cerebral vasospasm: looking beyond vasoconstriction. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28(6):252-6.
9. Pluta, R.M., Hansen-Schwartz, J., Dreier, J., Vajkoczy, P., Macdonald, R.L., Nishizawa, S., Kasuya, H., Wellman, G., Keller, E., Zauner, A., Dorsch, N., Clark, J., Ono, S., Kiris, T., Leroux, P., Zhang, J.H. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res* 2009;31(2):151-8.
10. Schneider, U.C., Davids, A.M., Brandenburg, S., Müller, A., Elke, A., Magrini, S., Atangana, E., Turkowski, K., Finger, T., Gutenberg, A., Gehlhaar, C., Brück, W., Heppner, F.L., Vajkoczy, P. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol* 2015;130(2):215-31.
11. Blecharz-Lang, K.G., Patsouris, V., Nieminen-Kelha, M., Seiffert, S., Schneider, U.C., Vajkoczy, P. Minocycline Attenuates Microglia/Macrophage Phagocytic Activity and Inhibits SAH-Induced Neuronal Cell Death and Inflammation. *Neurocrit Care* 2022.
12. Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A.J., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 2007;21(2):325-32.
13. Serhan, C.N.Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005;6(12):1191-7.

14. Ortega-Gomez, A., Perretti, M., Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 2013;5(5):661-74.
15. Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 2007;447(7146):869-74.
16. Bendel, P., Koivisto, T., Hanninen, T., Kolehmainen, A., Könönen, M., Hurskainen, H., Pennanen, C., Vanninen, R. Subarachnoid hemorrhage is followed by temporomesial volume loss: MRI volumetric study. *Neurology* 2006;67(4):575-82.
17. Bendel, P., Koivisto, T., Niskanen, E., Könönen, M., Aikiä, M., Hänninen, T., Koskenkorva, P., Vanninen, R. Brain atrophy and neuropsychological outcome after treatment of ruptured anterior cerebral artery aneurysms: a voxel-based morphometric study. *Neuroradiology* 2009;51(11):711-22.
18. Fleiss, B., Gressens, P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol* 2012;11(6):556-66.
19. Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011;91(2):461-553.
20. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005;308(5726):1314-8.
21. Davis, B.M., Salinas-Navarro, M., Cordeiro, M.F., Moons, L., De Groef, L. Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction. *Sci Rep* 2017;7(1):1576.
22. Jurga, A.M., Paleczna, M., Kuter, K.Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 2020;14:198.
23. Patsouris, V., Blecharz-Lang, K.G., Nieminen-Kelhä, M., Schneider, U.C., Vajkoczy, P. Resolution of Cerebral Inflammation Following Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2023 Aug;39(1):218-228.
24. Suzumura, A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci* 2013;14(1):16-20.
25. Yang, S.H., Gangidine, M., Pritts, T.A., Goodman, M.D., Lentsch, A.B. Interleukin 6 mediates neuroinflammation and motor coordination deficits after mild traumatic brain injury and brief hypoxia in mice. *Shock* 2013;40(6):471-5.
26. Chan, M.M., Moore, A.R. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J Immunol* 2010;184(11):6418-26.
27. Rogler, G. Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2(7):521-30.
28. Chao, Y., Wong, S.C., Tan, E.K. Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *Biomed Res Int* 2014;2014:308654.
29. McGonagle, D., McInnes, I.B., Deodhar, A., Schett, G., Shawi, M., Kafka, S., Karyekar, C.S., Kollmeier, A.P., Hsia, E.C., Xu, X.L., Sheng, S., Agarwal, P., Zhou, B., Ritchlin, C.T., Rahman, P., Mease, P.J. Resolution of enthesitis by guselkumab and relationships to disease burden: 1-year results of two phase 3 psoriatic arthritis studies. *Rheumatology (Oxford)* 2021;60(11):5337-50.
30. Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B., Brooks, D.J. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006;21(2):404-12.
31. Ferreira, S.A., Romero-Ramos, M. Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha-Synuclein Intervention. *Front Cell Neurosci* 2018;12:247.

32. Gagne, J.J., Power, M.C. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology* 2010;74(12):995-1002.
33. Moehle, M.S., West, A.B. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience* 2015;302:59-73.
34. Long-Smith, C.M., Sullivan, A.M., Nolan, Y.M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2009;89(3):277-87.
35. Lee, J.K., Tran, T., Tansey, M.G. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009;4(4):419-29.
36. Atangana, E., Schneider, U.C., Blecharz, K., Magrini, S., Wagner, J., Nieminen-Kelhä, Kremenetskaia, I., Heppner, F.L., Engelhardt, B., Vajkoczy, P. Intravascular Inflammation Triggers Intracerebral Activated Microglia and Contributes to Secondary Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage (eSAH). *Transl Stroke Res* 2017;8(2):144-56.
37. Heinz, R., Brandenburg, S., Nieminen-Kelha, M., Kremenetskaia, I., Boehm-Sturm, P., Vajkoczy, P., Schneider, U.C. Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). *J Neuroinflammation* 2021;18(1):36.
38. Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Gulyaeva, N.V., Lanshakov, D.A., Dygalo, N.N. Changes in Gene Expression and Neuroinflammation in the Hippocampus after Focal Brain Ischemia: Involvement in the Long-Term Cognitive and Mental Disorders. *Biochemistry (Mosc)* 2021;86(6):657-66.
39. Schneider, U.C., Schiffler, J., Hakiy, N., Horn, P., Vajkoczy, P. Functional analysis of Pro-inflammatory properties within the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *J Neuroinflammation* 2012;9:28.
40. Sarrafzadeh, A., Schlenk, F., Gericke, C., Vajkoczy, P. Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 2010;13(3):339-46.
41. Ahn, S.H., Savarraj, J.P.J., Parsha, K., Hergenroeder, G.W., Chang, T. R., Kim, D.H., Kitagawa, R.S., Blackburn, S.L., Choi, H.A. Inflammation in delayed ischemia and functional outcomes after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation* 2019;16(1):213.
42. Vlachogiannis, P., Hillered, L., Khalil, F., Enblad, P., Ronne-Engström, E. Interleukin-6 Levels in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Patients with Severe Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg* 2019;122:e612-e8.
43. Juttler, E., Tarabin, V., Schwaninger, M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist* 2002;8(3):268-75.
44. Blecharz-Lang, K.G., Wagner, J., Fries, A., Nieminen-Kelhä, M., Rösner, J., Schneider, U.C., Vajkoczy, P. Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Transl Stroke Res* 2018;9(6):631-42.
45. Maimone, D., Annunziata, P., Simone, I.L., Livrea, P., Guazzi, G.C. Interleukin-6 levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1993;47(1):55-61.
46. Dodd, W.S., Laurent, D., Dumont, A.S., Hasan, D.M., Jabbour, P.M., Starke, R.M., Hosaka, K., Polifka, A.J., Hoch, B.L., Chalouhi, N. Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: A Review. *J Am Heart Assoc* 2021;10(15):e021845.
47. Frase, S., Steimer, M., Selzner, L., Kaiser, S., Foit, N.A., Niesen, W., Schallner, N. Temporal Expression Pattern of Hemoxygenase-1 Expression and Its Association

- with Vasospasm and Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care* 2021.
48. Gilroy, D., De Maeyer, R. New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol* 2015;27(3):161-8.
 49. Serhan, C.N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J* 2017;31(4):1273-88.
 50. Sugimoto, M.A., Sousa, L.P., Pinho, V., Perretti, M., Teixeira, M.M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol* 2016;7:160.
 51. Serhan, C.N., Chiang, N., Dalli, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol* 2015;27(3):200-15.
 52. Chiurchiu, V., Leuti, A., Dalli, J., Jacobsson, A., Battistini, L., Maccarrone, M., Serhan, C.N. Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med* 2016;8(353):353ra111.
 53. Ren, Y.Z., Zhang, B.Z., Zhao, X.J., Zhang, Z.Y. Resolvin D1 ameliorates cognitive impairment following traumatic brain injury via protecting astrocytic mitochondria. *J Neurochem* 2020;154(5):530-46.
 54. Dokalis, N., Prinz, M. Resolution of neuroinflammation: mechanisms and potential therapeutic option. *Semin Immunopathol* 2019;41(6):699-709.
 55. Sanchez-Fernandez, A., Zandee, S., Mastrogiovanni, M., Charabati, M., Rubbo, A.P., López-Vales, R. Administration of Maresin-1 ameliorates the physiopathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 2022;19(1):27.
 56. Rey, C., Nadjar, A., Buaud, B., Vaysse, C., Aubert, A., Pallet, V., Layé, S., Joffre, C. Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain Behav Immun* 2016;55:249-59.
 57. Hawkins, K.E., DeMars, K.M., Alexander, J.C., Alexander, J.C., Leon, L.G., Pacheco, S.C., Graves, C., Yang, C., McCrea, A.O., Frankowski, J.C., Garrett, T.J., Febo, M., Candelario-Jalil, E. Targeting resolution of neuroinflammation after ischemic stroke with a lipoxin A4 analog: Protective mechanisms and long-term effects on neurological recovery. *Brain Behav* 2017;7(5):e00688.
 58. Turan, N., Miller, B.A., Heider, R.A., Nadeem, M., Sayeed, I., Stein, D.G., Pradilla, P. Neurobehavioral testing in subarachnoid hemorrhage: A review of methods and current findings in rodents. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017;37(11):3461-74.
 59. Chaichana, K.L., Pradilla, G., Huang, J., Tamargo, R.J. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg* 2010;73(1):22-41.
 60. Rasmussen, R., Bache, S., Stavngaard, T., Møller, K. Plasma Levels of IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, IFN γ , and TNF α are not Associated with Delayed Cerebral Ischemia, Cerebral Vasospasm, or Clinical Outcome in Patients with Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg* 2019;128:e1131-e6.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Victor Stavros Patsouris, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Auflösung der zerebralen Inflammation nach Subarachnoidalblutung/Resolution of neuroinflammation following subarachnoidal hemorrhage, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

15.11.2023

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Victor Stavros Patsouris hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Resolution of cerebral inflammation following subarachnoid hemorrhage.

V. Patsouris^{1,2}, K.G. Blecharz-Lang, PhD¹, M. Nieminen-Kelhä¹, U.C. Schneider, MD³ and P. Vajkoczy, MD^{1,2,4}

¹ Institute of Experimental Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

² Department of Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

³ Department of Neurosurgery, Cantonal Hospital of Lucerne, Lucerne, Switzerland

⁴ Center for Stroke Research Berlin (CSB), Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Journal of Neurocritical Care, Impact Factor 3,532 (2021)

Beitrag im Einzelnen

- Entwicklung der Fragestellung, Zeitverlauf und Studienkonzept, sowie Literaturrecherche durch Victor Stavros Patsouris in Rücksprache mit Betreuer
- Experimentelles, endovaskuläres SAB-Modell (Maus - operativ): Nach kurzer Einarbeitung selbstständige Durchführung und Weiterentwicklung/Verbesserung der Operationstechnik (längere Überlebenszeit der Mäuse) durch Victor Stavros Patsouris
- Selbstständige Aufarbeitung (Dezerebration, Anfertigung von Gehirnschnitten) und immunhistochemische Färbungen der einzelnen Gehirnschnitten in den jeweiligen experimentellen Gruppen (Iba1, NeuN, TUNEL, DAPI für Figures 2 und 3) im Labor
- Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und IL-6-Konzentrationsverlauf von Gesamthirnllysaten (qPCR und ELISA für Figures 4 und Supplementary Figure 1) nach Einarbeitung selbstständige Durchführung durch Victor Stavros Patsouris
- Bilderanalyse mit ImageJ (Figure 2 und 3), morphologische Analyse der Mikroglia und Neuronen (Figure 2) und statistische Auswertung (alle Figures und Tabellen), sowie Interpretation der Daten durch Victor Stavros Patsouris
- Erstellung der Abbildungen (Figure 1, 2, 3 und 4 sowie Supplemental Figure 1) und Diagramme/Tabellen (Tabelle 1) durch Victor Stavros Patsouris
- Verfassung des Manuskripts/Papers mit Diskussionsteil und zukünftiger Weiterentwicklung, Einreichung der Publikation, sowie Reviewprozess durch Victor Stavros Patsouris nach Korrekturlesen und Diskussion mit den Koautoren/Betreuer bis zur endgültigen Publikation

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2021** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"CLINICAL NEUROLOGY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 212 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	LANCET NEUROLOGY	49,221	59.935	0.06262
2	Nature Reviews Neurology	18,852	44.711	0.02950
3	JAMA Neurology	21,007	29.907	0.05043
4	Alzheimers & Dementia	26,516	16.655	0.03970
5	ACTA NEUROPATHOLOGICA	30,046	15.887	0.03384
6	BRAIN	69,241	15.255	0.05988
7	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	38,495	13.654	0.02508
8	NEURO-ONCOLOGY	20,825	13.029	0.02439
9	PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCES	6,445	12.145	0.00577
10	NEUROLOGY	115,450	11.800	0.09703
11	SLEEP MEDICINE REVIEWS	12,620	11.401	0.01356
12	Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation	5,161	11.360	0.01049
13	ANNALS OF NEUROLOGY	45,647	11.274	0.03862
14	STROKE	86,009	10.170	0.07454
15	Stroke and Vascular Neurology	1,741	9.893	0.00369
16	MOVEMENT DISORDERS	35,923	9.698	0.02884
17	Brain Stimulation	10,760	9.184	0.01497
18	Alzheimers Research & Therapy	7,513	8.823	0.01287
19	Journal of Stroke	2,036	8.632	0.00391
20	JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN	6,592	8.588	0.01107

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
21	PAIN	46,662	7.926	0.02957
22	Epilepsy Currents	1,428	7.872	0.00170
23	BRAIN PATHOLOGY	7,083	7.611	0.00689
24	NEUROSCIENTIST	6,603	7.235	0.00538
25	International Journal of Stroke	7,698	6.948	0.01415
26	Translational Stroke Research	4,125	6.800	0.00500
27	EPILEPSIA	36,294	6.740	0.02447
28	JOURNAL OF NEUROLOGY	24,906	6.682	0.02746
29	JOURNAL OF AFFECTIVE DISORDERS	59,622	6.533	0.06912
30	CNS DRUGS	6,627	6.497	0.00642
31	Therapeutic Advances in Neurological Disorders	2,816	6.430	0.00398
32	SLEEP	31,283	6.313	0.01904
33	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	17,087	6.288	0.01965
34	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	7,258	6.283	0.00814
35	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	5,197	6.250	0.00447
36	Neurotherapeutics	7,998	6.088	0.00899
37	CEPHALALGIA	13,467	6.075	0.01470
38	Current Neurology and Neuroscience Reports	5,335	6.030	0.00686
39	European Stroke Journal	1,210	5.894	0.00411
40	Multiple Sclerosis Journal	15,617	5.855	0.01778
41	EUROPEAN ARCHIVES OF PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCE	6,005	5.760	0.00577
42	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	8,630	5.678	0.00655

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
43	CLINICAL AUTONOMIC RESEARCH	2,484	5.625	0.00248
44	JOURNAL OF PAIN AND SYMPTOM MANAGEMENT	16,737	5.576	0.01740
45	NEUROLOGIA	2,146	5.486	0.00235
46	Annals of Clinical and Translational Neurology	5,916	5.430	0.01380
47	EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	9,792	5.415	0.00876
48	JOURNAL OF NEUROSURGERY	44,049	5.408	0.02790
49	NEUROEPIDEMIOLOGY	4,955	5.393	0.00350
50	JOURNAL OF PAIN	13,915	5.383	0.01264
51	BIPOLAR DISORDERS	6,472	5.345	0.00541
52	NEUROSURGERY	34,433	5.315	0.02469
53	HEADACHE	11,263	5.311	0.01220
54	JOURNAL OF SLEEP RESEARCH	9,708	5.296	0.00912
55	PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	15,970	5.201	0.01295
56	JOURNAL OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM	2,488	5.188	0.00249
57	JPAD-Journal of Prevention of Alzheimers Disease	873	5.020	0.00220
58	AMERICAN JOURNAL OF NEURORADIOLOGY	29,851	4.966	0.02313
59	NEUROREHABILITATION AND NEURAL REPAIR	7,555	4.895	0.00615
60	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	19,581	4.869	0.01717
61	DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY	17,461	4.864	0.01202
62	CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY	25,162	4.861	0.01585
63	SLEEP MEDICINE	17,340	4.842	0.01628
64	Multiple Sclerosis and Related Disorders	7,487	4.808	0.01284

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
65	Journal of Neurogastroenterology and Motility	2,606	4.725	0.00349
66	Journal of Neuromuscular Diseases	1,350	4.693	0.00275
67	Journal of Neurologic Physical Therapy	1,571	4.655	0.00153
68	CNS SPECTRUMS	3,558	4.604	0.00290
69	JOURNAL OF NEURORADIOLOGY	1,789	4.600	0.00198
70	JOURNAL OF PSYCHOPHARMACOLOGY	9,324	4.562	0.00949
71	JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES	23,403	4.553	0.01804
72	Movement Disorders Clinical Practice	2,088	4.514	0.00399
73	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY	16,733	4.506	0.01490
74	Neurology and Therapy	917	4.446	0.00196
75	JOURNAL OF NEURO-OPHTHALMOLOGY	2,897	4.415	0.00286
76	PARKINSONISM & RELATED DISORDERS	13,677	4.402	0.01510
77	Pain Physician	6,200	4.396	0.00630
78	CLINICAL NEUROPSYCHOLOGIST	6,059	4.373	0.00451
79	Neurosurgical Focus	10,856	4.332	0.01139
80	Journal of Clinical Sleep Medicine	11,389	4.324	0.01245
81	REVUE NEUROLOGIQUE	3,295	4.313	0.00325
82	Spine Journal	13,705	4.297	0.01567
83	Expert Review of Neurotherapeutics	5,795	4.287	0.00476
83	BRAIN TOPOGRAPHY	3,529	4.275	0.00351
85	Journal of Movement Disorders	709	4.229	0.00126
86	PEDIATRIC NEUROLOGY	7,875	4.210	0.00711
87	Sleep Health	2,865	4.207	0.00513

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
87	Frontiers in Neurology	27,128	4.086	0.04871
89	Journal of Neurodevelopmental Disorders	2,054	4.074	0.00278
90	Epilepsia Open	1,125	4.026	0.00263
91	Current Treatment Options in Neurology	1,872	3.972	0.00239
92	JOURNAL OF NEUROSURGICAL ANESTHESIOLOGY	1,988	3.969	0.00148
92	Pain and Therapy	941	3.960	0.00171
94	NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY	11,600	3.960	0.01224
94	ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA	8,854	3.915	0.00637
96	Current Pain and Headache Reports	3,600	3.904	0.00341
97	MUSCLE & NERVE	16,166	3.852	0.01052
98	JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION	9,768	3.850	0.00683
99	NEUROLOGICAL SCIENCES	10,952	3.830	0.01262
100	NEUROLOGIC CLINICS	3,546	3.787	0.00283
101	EUROPEAN JOURNAL OF PAEDIATRIC NEUROLOGY	4,458	3.692	0.00541
102	Neurology-Genetics	1,641	3.663	0.00455
103	EUROPEAN JOURNAL OF PAIN	9,804	3.651	0.00876
104	NEUROMUSCULAR DISORDERS	7,104	3.538	0.00684
105	Neurocritical Care	6,230	3.532	0.00762
106	Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration	4,833	3.528	0.00437
107	Behavioral Sleep Medicine	2,419	3.492	0.00270
108	JOURNAL OF NEUROSURGERY-SPINE	10,739	3.467	0.01197
109	CLINICAL JOURNAL OF PAIN	8,913	3.423	0.00665
110	Neurodegenerative Diseases	1,871	3.417	0.00115



Druckexemplar(e) der Publikation(en)


Neurocrit Care <https://doi.org/10.1007/s12028-023-01770-w>



ORIGINAL WORK

Resolution of Cerebral Inflammation Following Subarachnoid Hemorrhage



Victor Patsouris^{1,2*} , Kinga G. Blecharz-Lang¹, Melina Nieminen-Kelhä¹, Ulf C. Schneider³ and Peter Vajkoczy^{1,2,4}

© 2023 The Author(s)

Abstract

Background: Aneurismal subarachnoid hemorrhage (SAH) is a type of hemorrhagic stroke that, despite improvement through therapeutic interventions, remains a devastating cerebrovascular disorder that has a high mortality rate and causes long-term disability. Cerebral inflammation after SAH is promoted through microglial accumulation and phagocytosis. Furthermore, proinflammatory cytokine release and neuronal cell death play key roles in the development of brain injury. The termination of these inflammation processes and restoration of tissue homeostasis are of utmost importance regarding the possible chronicity of cerebral inflammation and the improvement of the clinical outcome for affected patients post SAH. Thus, we evaluated the inflammatory resolution phase post SAH and considered indications for potential tertiary brain damage in cases of incomplete resolution.

Methods: Subarachnoid hemorrhage was induced through endovascular filament perforation in mice. Animals were killed 1, 7 and 14 days and 1, 2 and 3 months after SAH. Brain cryosections were immunolabeled for ionized calcium-binding adaptor molecule-1 to detect microglia/macrophages. Neuronal nuclei and terminal deoxyuridine triphosphate-nick end labeling staining was used to visualize secondary cell death of neurons. The gene expression of various proinflammatory mediators in brain samples was analyzed by quantitative polymerase chain reaction.

Results: We observed restored tissue homeostasis due to decreased microglial/macrophage accumulation and neuronal cell death 1 month after insult. However, the messenger RNA expression levels of *interleukin 6* and *tumor necrosis factor α* were still elevated at 1 and 2 months post SAH, respectively. The gene expression of *interleukin 1 β* reached its maximum on day 1, whereas at later time points, no significant differences between the groups were detected.

Conclusions: By the herein presented molecular and histological data we provide an important indication for an incomplete resolution of inflammation within the brain parenchyma after SAH. Inflammatory resolution and the return to tissue homeostasis represent an important contribution to the disease's pathology influencing the impact on brain damage and outcome after SAH. Therefore, we consider a novel complementary or even superior therapeutic approach that should be carefully rethought in the management of cerebral inflammation after SAH. An acceleration of the resolution phase at the cellular and molecular levels could be a potential aim in this context. **Keywords:** Resolution, Inflammation, Microglia, Neuronal cell death, Cytokines, Subarachnoid hemorrhage

¹ Institute of Experimental Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

*Correspondence: victor.patsouris@charite.de

Introduction

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a type of stroke defined by bleeding into the subarachnoid space, most often due to spontaneous rupture of an intracranial aneurysm or simply because of trauma. Primary brain injury after SAH involves an increase in intracranial pressure, – a decrease in cerebral perfusion and blood brain barrier (BBB) breakdown that culminates in brain edema [1].

Secondary brain injury following SAH has been mainly associated with ischemic events induced by delayed cerebral vasospasm and cortical depolarization [2, 3]. However, despite achieving a substantial restoration of cerebral vasoconstriction after SAH, large clinical trials failed to develop a clinically effective treatment with an improved outcome [4–6]. These clinical and experimental experiences led to the idea that in addition to vasospasm, other mechanisms may play a decisive role in affecting the general clinical condition, such as cerebral inflammation [7–9]. This conclusion was supported by numerous experimental

data. Among others, we have demonstrated in this context how cerebrovascular inflammation triggers intraparenchymal injury [10, 11].

In this work, we focused on tertiary brain damage, which has been defined by others as “injury caused by long-persisting processes following brain insult that worsen outcome, predispose to further injury or prevent repair/regeneration” [12]. Under optimum conditions, after the acute phase of inflammation, direct and indirect mechanisms are implemented to ensure the return to tissue homeostasis. This highly regulated phase called the resolution of inflammation is, according to the current state of research, an active process and not, as it was believed for a long time, exclusively a passive mechanism dependent on cytokine concentration [13–16]. In this phase, the overexpression of proinflammatory mediators should be inhibited, the accumulation of inflammatory cells within the affected tissue attenuated, and furthermore, appropriate mechanisms triggering the recovery from acute inflammation should be activated to constitute a complete recovery of the tissue from inflammation [13–16]. In accordance with the literature, there is strong evidence for a certain resolution program being

already set at the beginning of the inflammation phase. Thus, proinflammatory and anti-inflammatory mechanisms seem to affect each other in a direct manner and may have an influence on the extent of resolution. Concerning this highly sensitive interaction, an incomplete resolution of the tissue may therefore increase the risk of chronic inflammation.

In the clinical setting, global brain atrophy or hippocampal volume loss is often observed in addition to long-lasting physical, neuropsychological, and cognitive deficits in patients who have survived SAH [17, 18]. It is therefore reasonable to ask whether chronic inflammatory processes may contribute to these long-lasting impairments or permanent lasting injuries. Regarding these facts, we conducted a long-term observation over 3 months after SAH insult and analyzed histological and molecular parameters in view of the phase called resolution of inflammation. Against this background, we aimed to characterize a potential resolution of cerebral inflammation induced in the well-established model of experimental SAH in mice. Moreover, we aimed to reveal any indications of

chronicity accompanying tertiary brain damage driven by an incomplete resolution of inflammation within the affected tissue. Unresolved tertiary brain damage in this context is therefore an important approach to examine the progression and possible chronicity of the inflammatory state occurring after SAH.

Materials and Methods

Animals, Experimental Groups, and SAH Mouse Model

Animal experiments were authorized by the corresponding ethics committee and accomplished according to the regulatory guidelines and criteria predetermined by the Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, and performed with respect to the European Convention (ETS 123 of 1986). All sections in the manuscript were stated in accordance with Animal Research Reporting in vivo Experiments guidelines. All diagnostic evaluations were performed on the basis of our institutional regulations, and all efforts were made to reduce suffering and total numbers of animals used.

Sixty 12 to 14-week-old male C57BL/6J mice (30–32 g weight) were included in this study and were housed in a 12-h day/night cycle under controlled conditions with free access to food and water. Animals were randomly

distributed to one of two groups: sham and SAH. Among the groups, five animals were killed for cryo-tissue immunohistochemical examination and for messenger RNA analysis of coronal sections of brain hemispheres, as indicated in the figures and figure legends.

SAH was induced by the endovascular perforation mouse model, as described elsewhere [10]. Sham-operated mice were operated on identically except that the filament was instantly removed when resistance was noted.

As described before, the induction of experimental SAH was reproducible [10]. Standard hematoxylin/eosin staining excluded territorial infarctions or intracerebral hemorrhage after SAH. Because of the expected occurrence of stroke or intraparenchymal hemorrhage, animals suffering from hemiparesis following the operation were excluded from the experiments [10].

Mortality

The mortality of animals from all experimental groups was analyzed at 1–3 h, 4–6 h, 6–12 h, 12–24 h, and

weekly thereafter. Animal mortality was outlined in the – Kaplan Meier curve.

Acute Brain Slice Preparation, Immunohistochemistry, and Image Analysis

Mice in each experimental group were decapitated on days 1, 7, and 14 and months 1, 2, and 3 following SAH. After the skin and skull were removed, the whole brain was detached and washed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (134 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM K₂HPO₄, and 10 mM glucose).

Immunofluorescence examination of mouse brain specimens was conducted in coronal sections (20 μm), which were prepared with a vibratome VT 1000 S (Leica). Whole mouse brains were cut into two parts for the investigated regions 1.5 mm before and 1.5 mm behind the bregma point (approximately the area of the hippocampus and corpus callosum). Standard hematoxylin/eosin and iron staining were performed to preclude any territorial infarctions or intracerebral hemorrhage at the different time points. Afterward, slides were incubated with primary antibodies at 4 °C for 12 h. Microglia/macrophages were imaged by ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (Iba1) immunolabeling (rabbit-anti Iba1, WAKO Pure Chemical Industries, 1:250),

and neuronal nuclei (NeuN) (mouse-anti NeuN, Millipore, 1:200) staining was used to identify neurons. Afterward, the following secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Lab) were incubated with the tissue for 1.5 h at room temperature: DyLight651 donkey anti-rabbit (1:200), DyLight488 donkey-anti-rabbit (1:200) and FITC donkey-antimouse (1:100). Nuclei were then counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing mounting medium (Dianova). For quantitative analysis, images were taken by fluorescence microscopy (Zeiss, Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Microimaging GmbH) equipped with a digital camera (AxioCam MRc). Image acquisition of confocal microscopy was obtained with a confocal microscope (TCS SP5, Leica) using a z step of 0.1 μm and a 63 \times 1.4 NA oil immersion objective. All images were acquired using LCF AF software (all from Leica). Immunofluorescence areas were divided into 6–10 high power fields allowing for total cell counts per brain section. By using a computer-assisted image analysis program (ImageJ.net), the immunoreactive region was measured. Images were analyzed using

ImageTool software, which executes the analysis by converting all immune-labeled elements that fall within a threshold range into black pixels and the rest of the image into white pixels. The software then quantified the total number and percentages of black and white pixels, allowing for statistical analysis of the data.

Morphology of Microglial/Macrophage Cells

Microglia/macrophages are characterized by strong plasticity and differential morphology. In the healthy brain, most microglial/macrophage cells show a “resting state” with a smaller cytoplasm and poly-branched bodies. However, the branches are very fine and thin [19]. These microglial cells are not actually resting but frequently scan their environment for pathological conditions and regulate neuronal activity [20, 21]. Stepwise deramification of microglial cells with a larger cell body and shorter, thick processes has been observed in different situations of neuroinflammation or after brain injury, indicating an “activated state” [21]. These two differing morphological types additionally produce the spectrum characteristic of in-between phenotypes depending on their activation rate and exact time point of inflammation processes [20]. In the present study, the morphology of

microglia/ macrophages was described by staining for Iba1 (rabbit anti Iba1, WAKO Pure Chemical Industries, 1:250). Morphological characterization by using different markers described in previous studies and the number of Iba1 positive cells were used for statistical analysis [22]. Iba1 is expressed either in microglia or macrophages, both of which are indistinguishable due to the expression of most commonly used cell markers in vivo. However, the precision of the staining is limited in injured brain tissue, where peripheral macrophages may infiltrate. Therefore, cells positive for Iba1 were described as microglia/macrophages throughout the article.

Neuronal Cell Death

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) (ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) was used to detect neuronal cell death in accordance with the manufacturer's instructions, followed by labeling with NeuN and DAPI. Cells triple-positive for TUNEL, NeuN, and DAPI were rated as neurons undergoing secondary cell death.

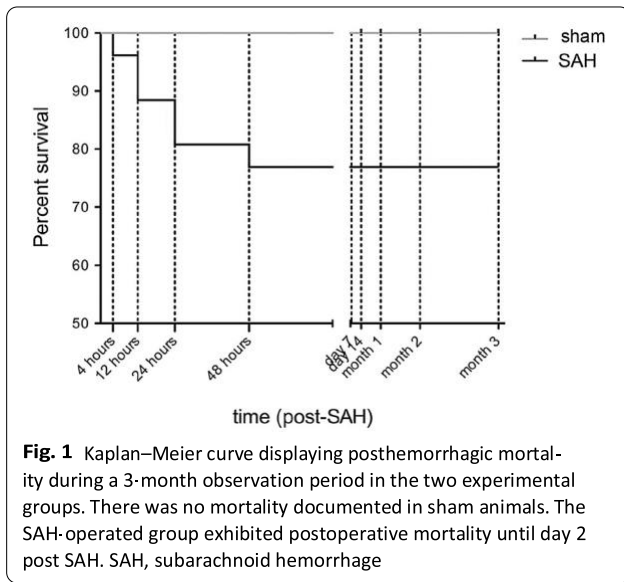
Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

RNA isolation from whole brain tissue samples (PureLink RNA Mini Kit, Life Technologies), complementary DNA – synthesis (Onestep RT PCR Kit, Qiagen) and quantitative real-time polymerase chain reaction (Premix ex Taq Perfect Real Time Kit, Takara) were performed according to the manufacturers' protocol. For quantitative real-time polymerase chain reaction amplification, we used mouse gene-specific primers (obtained from TIB Molbiol Syntheselabor GmbH) designed using Primer Express Software (listed in Table 1). ABI PRISM 7300 SDS software (Relative quantification study) was used to determine the cycle threshold (CT) for each reaction, and gene expression determined for

Table 1 Primer sequences used for quantitative real-time PCR

Target	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 3'–5'
m_IL18	ATC ACT CAT TGT GGC TGT GG	CAT CTC GGA GCC TGT AGT GC
m_TNF α	CAC AGC CTT CCT CAC AGA GC	GGA GGC AAC AAG GTA GAG AGG
m_IL6	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGACC	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
m_GAPDH	TCT CCT GCG ACT TCA ACA	TGT AGC CGT ATT CAT TGT CA

GAPDH, glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, IL, interleukin, PCR, polymerase chain reaction, TNF, tumor necrosis factor



each gene was normalized to the expression of the endogenous housekeeping gene glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. For gene expression analyses the relative quantification method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) was used. The specificity of the PCR products was proven by melting curve analysis.

Statistical Analysis

GraphPad Prism 6.1 (GraphPad Software) using analysis of variance with pairwise comparison or the Holm Sidak method. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, and $****P < 0.0001$ were used for statistical analysis of data.

Results

Mortality

In the SAH group consisting of 30 animals, 1 animal died within 4 h (3.34%), 2 died 12 h after onset (6.68%), 2 died after 24 h (6.68%), and 1 out of 26 (3.34%) died 48 h post SAH induction. There was no mortality later than 48 h after induction of the bleeding in our study. An overall mortality rate of 20.04% was determined in the SAH group. No mortality was documented in the sham group consisting of 25 animals (Fig. 1).

Resolution of Microglia/Macrophage Accumulation After Experimental SAH

To investigate the effect of experimental SAH on the dissemination of microglia/macrophages over a long-term period of up to 3 months, immunohistochemistry of coronal brain sections with an antibody against Iba1 was used in SAH versus sham animals (Fig. 2a). These coronal brain slices were analyzed ipsilateral to the puncture in the area of the corpus callosum and hippocampus, both at the base of the brain (Fig. 2b). Microglia/macrophage accumulation was significantly increased in SAH mice compared with sham controls until day 14 after induction of bleeding, as reflected by the graph in Fig. 2c. This significant time-dependent increase in Iba1-positive cell

number was not observed between day 14 and month 1, and after passing month 1, there were no significant differences between the SAH group and the sham-operated mice (Fig. 2a, c). The mean microglia/macrophage density was also much higher in the SAH group than in sham controls over all early time points. A complete resolution of microglia/macrophage

accumulation at the cellular level after month 1 was shown for the SAH-operated mice.

Fig. 2 Resolution of microglia/macrophage accumulation after experimental SAH. **a** Coronal brain sections of SAH-operated mice and sham mice were stained for Iba1 (magenta) and DAPI (blue) for different time points (days 1/7/14 and months 1/2/3) to show the time-dependent accumulation of microglia/macrophages and its resolution. Representative brain sections were processed and the number of Iba1-positive cells (red) was counted using ImageJ software. Bar indicates 50 μm . **b** Coronal brain slices were analyzed ipsilateral to the puncture, in the area of the corpus callosum and hippocampus at the base of the brain, as marked by red squares. **c** Microglia/macrophage accumulation was significantly increased in SAH mice compared with sham control until day 14. After month 1, there were no significant differences between the investigated groups, showing a complete resolution of microglia/macrophages on cellular level. Values from graph are means \pm SEM, ($n = 5$ animals per group), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ versus sham respectively, statistical significance determined by one-way ANOVA. **d** Morphology of the “activated” state of a microglia/macrophage on day 7 post SAH in direct comparison to the “resting” phenotype of microglia/macrophages, characterized by a ramified morphology. This “resting” phenotype predominates under sham conditions and after month 1 post SAH, whereas the “activated” phenotype predominates until day 14 post SAH. Bar indicates 10 μm . ANOVA, analysis of variance, DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Iba1, Ionized calcium-binding adapter molecule 1, SAH, subarachnoid hemorrhage, SEM, standard error of mean (Color figure online)

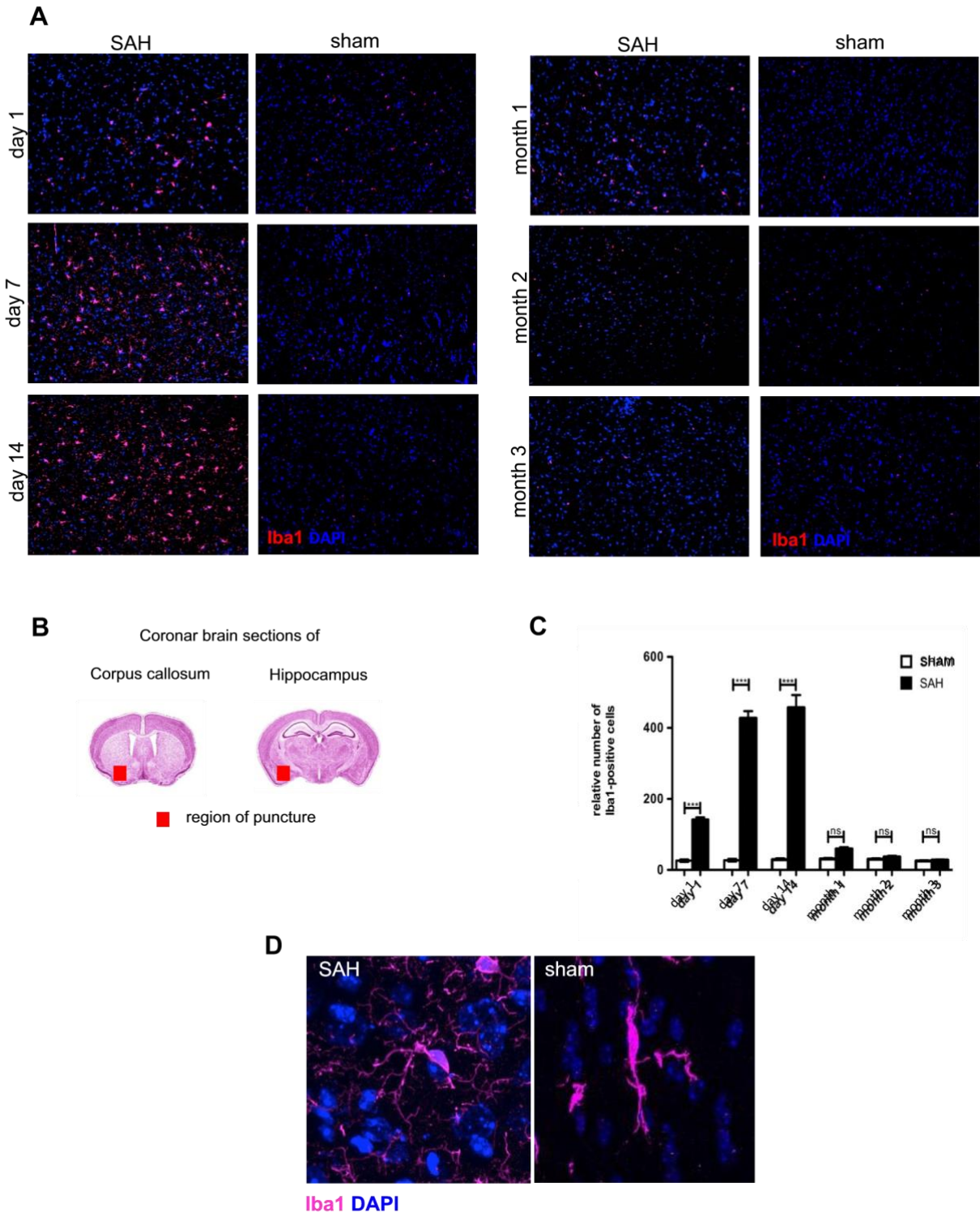


Fig. 2 (See legend on previous page.)

Regarding the morphology and activity state of Iba1-positive microglia/macrophage cells observed in this long-term lapse, we examined differences between microglia/macrophages found in sham-operated versus SAH-operated mice. In SAH mice, microglia/macrophages showed an amoeboid and round cell body with long processes, as in a high state of cell activation. Iba1-positive cells in sham and SAH mice after month 1 revealed a low level of activation or inactive state with thin and elongated cell bodies (Fig. 2d). The different morphology and thus activity states of Iba1-positive microglia/macrophages are characterized elsewhere [19].

Time-Dependent Resolution of Neuronal Cell Death and Neuronal Survival Rate Post SAH

Microglia/macrophages are known to communicate with neurons and coordinate many neuronal functions [23]. As demonstrated by our experiments with microglia-depleted mice, neuronal cell death following experimental SAH is mediated by the massive accumulation of resident microglial cells [10]. In this context, we also found a more prominent microglia/macrophage–neuronal conjunction either with the cell body or with more than one process of microglial cells in SAH-operated mice, indicating that there is increased interaction between these two cell types in the event of SAH [11]. Regarding neuronal cell death, we used a TUNEL assay and were able to describe an initial increased number of TUNEL-NeuN-DAPI-triple-positive cells in SAH mice until day 14 (Fig. 3a). At month 1, there were no significant differences between the groups, showing complete tissue resolution of neuronal cell death. The significantly lowest neuronal survival rate was observed 14 days post SAH, indicating the highest point of neuronal cell damage. Passing month one, more than 90% of the extant neurons in each SAH group survived. By analyzing the same areas of coronal brain slices we used for microglia/macrophage tissue resolution, a comparison between these two resolution processes was conducted. In particular, by examining the dynamic courses of microglial accumulation (Fig. 2c) and neuronal cell death (Fig. 3b), the association between microglial accumulation and neuronal cell death was clearly recognizable.

Regulated Gene Expression of Proinflammatory Cytokines in Mouse Brain Homogenates After SAH over an Extended Period of Time

Many clinical and experimental studies have noted the important role of different proinflammatory cytokines, such as *interleukin (IL) 1 β* , *tumor necrosis factor (TNF) α* , and *IL6*, in the context of cerebral inflammation [24]. The effects of experimental SAH on inflammatory cytokine gene expression over a long-term period were determined in whole

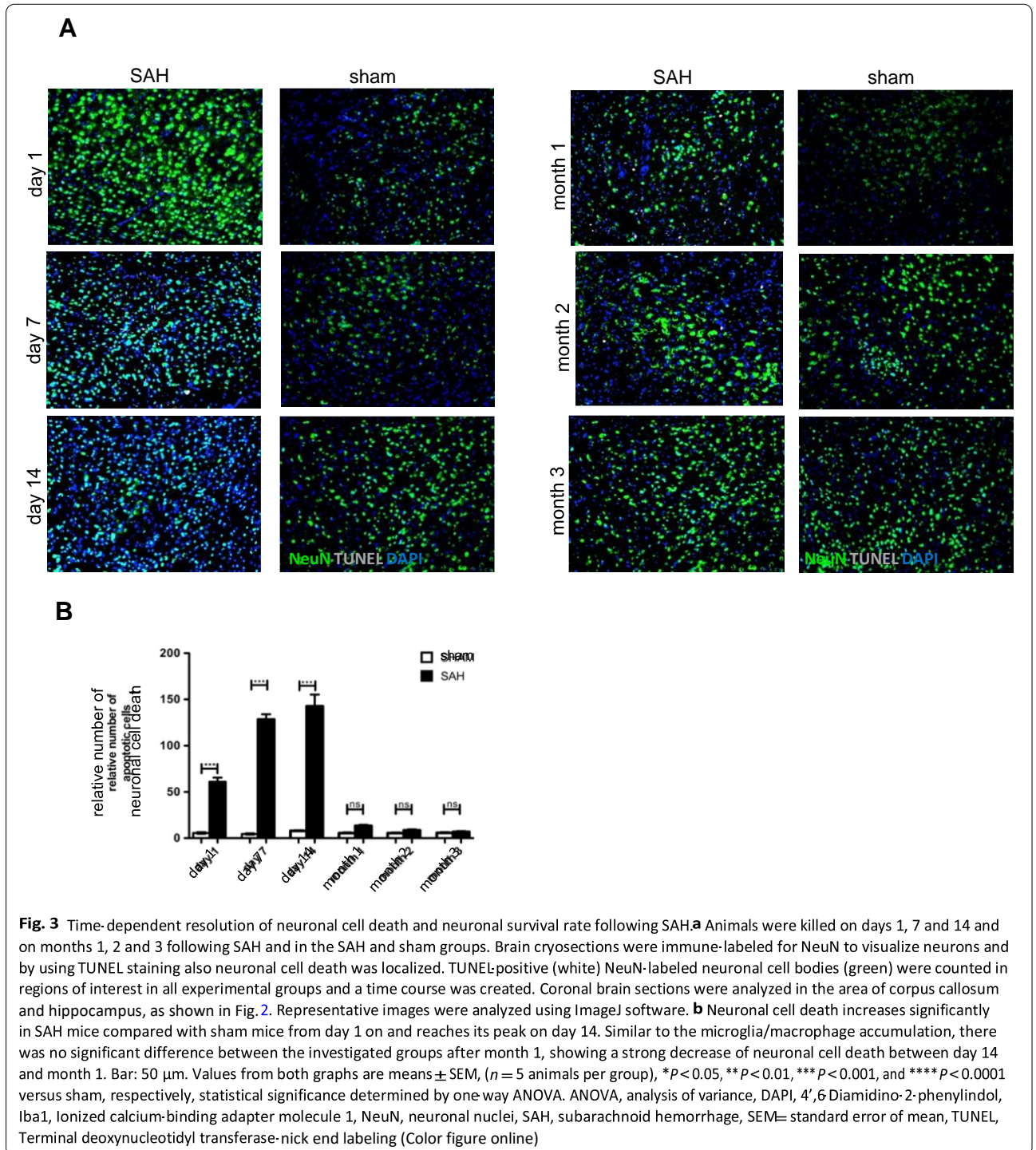
brain tissue isolated at 1 day and 1, 2, and 3 months after SAH in comparison with the respective sham-operated mice. SAH stimulates the production of proinflammatory mediators by activated microglia/macrophages and other cells of the central nervous system (CNS) [10]. As indicated in Fig. 4, the gene expression of *IL1 β* , *TNF α* and *IL6* was significantly increased on day 1 after SAH compared with the sham control. In particular, we observed an increase in the gene expression of *IL6* until month 1 post SAH, which then reached sham levels again. Likewise, the gene expression of *TNF α* increased until month 2 and sloped down to sham levels on month 3 after the insult. The gene expression of *IL1 β* reached its maximum on day 1, whereas at later time points, no significant differences between the groups were detected, as reflected by the graph in Fig. 4.

Discussion

The resolution of cerebral inflammation regarding a possible chronicity of the inflammatory state in the case of incomplete resolution has not yet been considered in the context of SAH, although it seems to play a very important role in the pathophysiology of the disease. Our study demonstrates for the first time a long-term observation of microglial/macrophage accumulation, neuronal cell death and the gene expression of essential proinflammatory cytokines over 3 months after SAH in mice. By evaluating these parameters over an extended period of time, we sought to determine whether the acute inflammatory state occurring after SAH returns to the control level, which is indicative of the resolution of inflammation.

Numerous studies have revealed the importance of resolution in the pathophysiological context of chronic inflammation for different immune-mediated inflammatory diseases [25–27], but also for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease [28–32]. In accordance with these observations, we were previously able to identify various inflammatory mechanisms, such as an extended release of proinflammatory cytokines, a massive increase of Iba1-positive phagocytic microglia/ macrophages (triggered by an intravascular inflammatory response), and increased neuronal cell death following experimental SAH event [10, 11]. Furthermore, we observed that microglia/macrophages first concentrate at the site of the injury, whereupon a spreading inflammation reaction over the rest of the brain occurs, leading to brain damage due to secondary brain injury after SAH [33]. In addition, our group revealed that clinically potential anti-inflammatory

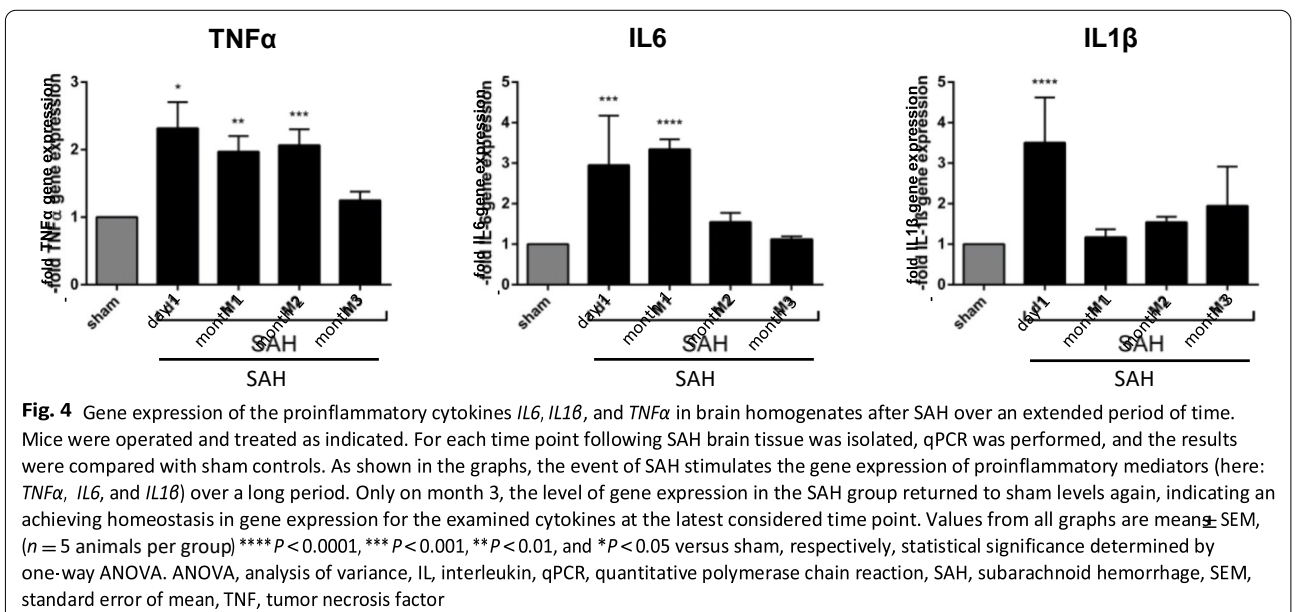
attempts preventing microglia/ macrophage accumulation or activation are interesting targets for neuroprotective treatment strategies applied after SAH insult [11, 34]. However, inflammation is an essential process in managing many threatening conditions, and when perpetuated and persistent over a long period of time, it contributes to a broad range of chronic diseases [35, 36]. The initiation of an acute inflammatory response is



counterbalanced by a fine-tuned and orchestrated resolution process that restores tissue homeostasis and promotes tissue healing to its original structural and functional state. Under pathological conditions, this balance is often disrupted [37]. Although it is not often the primary cause of damage in this context, secondary or tertiary brain damage mediated by an unresolved inflammatory response may constantly disturb the return to homeostasis.

In this work, we confirmed our previous results that microglial/macrophage accumulation is significantly increased after 14 days and is concomitant with the lowest neuronal survival rate after SAH [10, 11]. After month 1, there were no significant differences in microglia/macrophage accumulation observed between the examined groups, suggesting complete resolution with respect to the cell number of these cells (Fig. 2a, c). Regarding their morphology, we saw that the “resting phenotype” with smaller cytoplasm and thin, poly-branched bodies also predominates 1 month after SAH compared with the typical “activated” amoeboid cell morphology with long processes prevailing at every time point until month 1 (Fig. 2d). Moreover, between months 1 and 3 after SAH, more than 90% of the extant neurons survived in each SAH group (Fig. 3b).

SAH stimulates the production of proinflammatory mediators by different cell types of the CNS [10, 38]. In this study, we focused on the gene expression of only three essential cytokines—*IL1 β* , *TNF α* , and *IL6*—in the brain. Our results showed that these molecules were significantly upregulated on day 1 after SAH compared with the respective sham control. Although the expression of *IL1 β* was already downregulated, the messenger RNA levels of the two others were still increased. Briefly, *IL6* was overexpressed until



month 1 post SAH and then reduced to sham levels by month 2. *TNF α* returned to its sham levels even later, 3 months post SAH (Fig. 4). Summarizing, we see that the regulation of *TNF α* and *IL6*, within inflammatory processes takes longer than initially expected. Moreover, searching the literature, we found several studies showing that long-term changes in the proinflammatory cytokines expression, especially in the hippocampus and limbic system, can be correlated with cognitive and emotional dysfunctions in patients after ischemic brain injury [39]. Based on our results, one might speculate that the long-persisting overexpression of essential proinflammatory mediators may correspond with the commonly observed cognitive long-term disabilities accompanying SAH. However, other groups found that modulating neuroinflammation after SAH has a beneficial or no effect on the clinical outcome [40, 41]. Therefore, further specific gene expression analyses of an extended subset of cytokines considering differential brain regions or even specific cell types should be conducted to underpin our early results and correlate them with cognitive dysfunctions following SAH.

Although we did not specify the respective cell types responsible for the overexpression of the proinflammatory markers analyzed herein, we revealed the important role of resolution at the histological and molecular levels after SAH. Mild inflammation is thought to aid in injury repair, and excessive inflammation can aggravate brain edema, mitochondrial dysfunction, disruption of the BBB, and neuronal cell death, all of which cause further impairment of consciousness and are believed to contribute to the poor prognosis of patients with SAH. Such mechanisms might not only apply to CNS insult but also more broadly to physiological conditions in which microglia/macrophages are also known to positively modulate adult hippocampal neurogenesis and where *IL6* is also upregulated [42]. Many investigations have documented that besides detrimental effects, *IL6* signaling may also play a protective role depending on its activity in different signaling pathways, for example, by counteracting the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated excitotoxicity following brain ischemia or the promotion of nerve regeneration [42]. Similar pleiotropic functions and the involvement in tissue remodeling and repair were demonstrated for *TNF α* and *IL1 β* within the CNS [43, 44]. However, an important question remains whether these cytokines initiate damage, result from damage and promote, halt or repair injury. This may strongly depend on the context, that is, the local concentration, the prevailing environmental milieu, the cellular target, the presence or absence of negative feedback regulators, and the temporal characteristics of the response cascade [43, 44].

IL6 has been confirmed by several authors as a potential biomarker for delayed cerebral ischemia and inflammation following aneurysmal SAH [45–48]. We showed that the concentration of IL6 in the affected whole brain tissue was significantly increased during the acute stage of the disease, reaching a high level on day 1 following SAH, whereas after month 1, no significant difference between SAH and sham controls were observed (as shown in Supplementary Fig. 1). This becomes particularly interesting when looking at CNS-specific microglia, which are cells producing the majority of IL6, and brain capillaries. IL6 expression in brain capillaries is relatively low and is induced in response to inflammatory stimuli, correlating with an increased BBB leakage [38, 49]. Through the damaged BBB, IL6 may enter the bloodstream and trigger a systemic inflammatory response. Given these facts and that IL6 was found to be significantly increased in this time-dependent manner shortly after SAH insult, individual cell and tissue types should be examined for the expression of SAH-induced IL6 regarding the resolution phase. However, subsequent long-term experiments examining changes in the protein expression of a further subset of cytokines should be conducted to point out if the presented preliminary observations support or prevent healing after SAH. Furthermore, the source of the offending cytokines should be identified by cell specific experiments regarding their functional role at certain time points.

Given the current state of research, the resolution of inflammation is a highly regulated, active process and not only a passive burnout reaction, as was once believed [13]. Moreover, it is already encoded at the onset of inflammation and is thereby directly linked to a broad range of inflammatory signaling cascades [13–15]. The main resolution targets for achieving tissue homeostasis include the suppression of further leukocyte influx, tissue clearance of inflammatory cells and the downregulation of proinflammatory cytokines [13–15]. Serhan et al. [13] defined the resolution process at the histological level as the interval from the maximum of cell infiltration to the point when they are lost from the tissue. Numerous scientific works, including ours, have focused on processes arising from the insult itself. Resident microglial cells rather than macrophages recruited from the periphery have been identified to play a triggering role in cerebral inflammation post SAH [10]. In addition, other tissue components seem to play a substantial role in the initiation of neuroinflammatory processes but also create a proinflammatory environment influencing other cell types within the CNS [38]. However, less attention has been given to the essential resolution mechanisms and repair processes of brain tissue to date [16]. Taking these facts and the observations presented here, targeting proresolving factors

and mechanisms might be considered a meaningful therapeutic approach in severe inflammatory diseases. Evaluating the best time point for such proresolving involvement would also play an important role in the matter of a possible beneficial influence on the clinical outcome.

In summary, a detailed description of the resolution phase would be very helpful to understand processes involved in brain damage and clinical outcome, as well as its influence on brain repair in the context of secondary brain injury post SAH. There are already differing statements in the literature on this issue [41, 42]. The time point post SAH, at which the inflammatory response or the resolution phase is influenced, as well as the type of cells involved, is decisive for whether neuroinflammatory modulation leads to a protective or harmful effect regarding the resolution phase. The complexity of such processes has to be appreciated by determining differences in the mechanisms of resolution in acute and chronic inflammation as well as inclusion of the tissue-specific environment of the brain after the event of stroke. In addition to these structural changes in the brain tissue, functional read-out parameters through neurobehavioral assessments should also be examined in the future to determine whether structural changes in this context do, indeed, result in a clinically relevant problem [50].

Conclusions

The key research focus of this study was to present a long-term overview of the time-dependent cerebral processes of inflammation and resolution occurring after experimental SAH and to analyze potential tertiary brain damage due to unresolved inflammation. By evaluating the resolution of inflammation at cellular and histological levels, by estimating the gene expression of three selected cytokines in longterm experiments post SAH, a first step was taken to reveal indications of chronicity driven by incomplete resolution. The intense examination of these issues in the future would provide a better understanding of the long-term mechanisms in the resolution of inflammation and could lead to novel complementary or superior resolution-based therapeutic approaches in the management of cerebral inflammation after SAH.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12028-023-01770-w>.

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; ACSF: Artificial cerebrospinal fluid; BBB: Blood–brain barrier; CNS: Central nervous system; CSF: Cerebrospinal fluid; CT: Cycle threshold; CytC: Cytochrome C; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol; DCI: Delayed cerebral ischemia; GAPDH: Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HSVTK: Herpes simplex virus thymidine kinase; HPF: High power field; Iba1: Ionized calcium-binding adaptor molecule-1; IL: Interleukin; LPS: Lipopoly-saccharides; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; NeuN: Neuronal nuclei; NFκB: Nuclear factor kappa-B; PLX:

Pexidartinib; PBS: Phosphate buffered saline; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; SAH: Subarachnoid haemorrhage; SEM: Standard error of mean; TUNEL: Terminal deoxyuridine triphosphate-nick end labelling; TNF: Tumor necrosis factor.

Author details

¹ Institute of Experimental Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ² Department of Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ³ Department of Neurosurgery, Cantonal Hospital of Lucerne, Lucerne, Switzerland. ⁴ Center for Stroke Research Berlin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Susan Brandenburg for providing primers and Irina Kremenetskaia for excellent technical assistance.

Author contributions

VP, KGBL, UCS, and PV designed the experiments and supervised the project. VP, KGBL, and MNK collected, analyzed, and interpreted the data. PV interpreted the data and critically revised the manuscript. All authors were involved in interpretation of the data and critical revision of the manuscript and approved the final report.

Source of support

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was financially supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB TRR43) to PV and Bundesministerium für Bildung und Forschung (Center for Stroke Research Berlin) to PV.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Human and animal rights

All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

Open Access

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 30 November 2022 Accepted: 31 May 2023

Published online: 22 June 2023

References

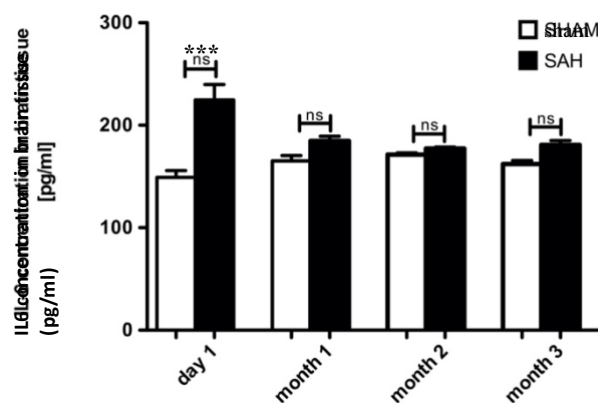
- Fujii M, Yan J, Rolland WB, et al. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res.* 2013;4(4):432–46.
- Westermaier T, Stetter C, Koehler D, Weiland J, Lilla N. Acute reaction of arterial blood vessels after experimental subarachnoid hemorrhage—an in vivo microscopic study. *J Neurol Sci.* 2019;396:172–7.
- Sanchez-Porras R, Zheng Z, Santos E, et al. The role of spreading depolarization in subarachnoid hemorrhage. *Eur J Neurol.* 2013;20(8):1121–7.
- Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, et al. Preventing vasospasm improves outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: rationale and design of CONSCIOUS-2 and CONSCIOUS-3 trials. *Neurocrit Care.* 2010;13(3):416–24.
- Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, et al. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke.* 2008;39(11):3015–21.
- Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, et al. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid hemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *BMJ.* 1989;298(6674):636–42.
- Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol.* 2011;43(1):27–40.
- Hansen-Schwartz J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. Cerebral vasospasm: looking beyond vasoconstriction. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(6):252–6.
- Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res.* 2009;31(2):151–8.

10. Schneider UC, Davids AM, Brandenburg S, et al. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol.* 2015;130(2):215–31.
11. Blecharz-Lang KG, Patsouris V, Nieminen-Kelha M, et al. Minocycline attenuates microglia/macrophage phagocytic activity and inhibits SAH-induced neuronal cell death and inflammation. *Neurocrit Care.* 2022;37:410–23.
12. Fleiss B, Gressens P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol.* 2012;11(6):556–66.
13. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007;21(2):325–32.
14. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1191–7.
15. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 2013;5(5):661–74.
16. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007;447(7146):869–74.
17. Bendel P, Koivisto T, Hanninen T, et al. Subarachnoid hemorrhage is followed by temporomesial volume loss: MRI volumetric study. *Neurology.* 2006;67(4):575–82.
18. Bendel P, Koivisto T, Niskanen E, et al. Brain atrophy and neuropsychological outcome after treatment of ruptured anterior cerebral artery aneurysms: a voxel-based morphometric study. *Neuroradiology.* 2009;51(11):711–22.
19. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461–553.
20. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314–8.
21. Davis BM, Salinas-Navarro M, Cordeiro MF, Moons LD, Groef L. Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction. *Sci Rep.* 2017;7(1):1576.
22. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:198.
23. Suzumura A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14(1):16–20.
24. Yang SH, Gangidine M, Pritts TA, Goodman MD, Lentsch AB. Interleukin 6 mediates neuroinflammation and motor coordination deficits after mild traumatic brain injury and brief hypoxia in mice. *Shock.* 2013;40(6):471–5.
25. Chan MM, Moore AR. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J Immunol.* 2010;184(11):6418–26.
26. Rogler G. Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(7):521–30.
27. McGonagle D, McInnes IB, Deodhar A, et al. Resolution of enthesitis by guselkumab and relationships to disease burden: 1-year results of two phase 3 psoriatic arthritis studies. *Rheumatology (Oxford).* 2021;60(11):5337–50.
28. Chao Y, Wong SC, Tan EK. Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:308654.
29. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2006;21(2):404–12.
30. Ferreira SA, Romero-Ramos M. Microglia response during Parkinson's disease: alpha-synuclein intervention. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:247.
31. Gagne JJ, Power MC. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology.* 2010;74(12):995–1002.
32. Moehle MS, West AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's disease: Foe and ally? *Neuroscience.* 2015;302:59–73.
33. Atangana E, Schneider UC, Blecharz K, et al. Intravascular inflammation triggers intracerebral activated microglia and contributes to secondary brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage (eSAH). *Transl Stroke Res.* 2017;8(2):144–56.
34. Heinz R, Brandenburg S, Nieminen-Kelha M, et al. Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). *J Neuroinflammation.* 2021;18(1):36.
35. Gilroy DD, Maeyer R. New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol.* 2015;27(3):161–8.
36. Serhan CN. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J.* 2017;31(4):1273–88.
37. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: What controls its onset? *Front Immunol.* 2016;7:160.
38. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, et al. Interleukin 6-mediated endothelial barrier disturbances can be attenuated by blockade of the IL6 receptor expressed in brain microvascular endothelial cells. *Transl Stroke Res.* 2018;9(6):631–42.
39. Shishkina GT, Kalinina TS, Gulyaeva NV, Lanshakov DA, Dygalo NN. Changes in gene expression and neuroinflammation in the hippocampus after focal brain ischemia: involvement in the long-term cognitive and mental disorders. *Biochemistry (Mosc).* 2021;86(6):657–66.
40. Chaichana KL, Pradilla G, Huang J, Tamargo RJ. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg.* 2010;73(1):22–41.
41. Rasmussen R, Bache S, Stavngaard T, Moller K. Plasma levels of IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, IFNgamma, and TNFalpha are not associated with delayed cerebral ischemia, cerebral vasospasm, or clinical outcome in patients with subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg.* 2019;128:e1131–6.
42. Nybo L, Nielsen B, Pedersen BK, Møller K, Secher NH. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J Physiol.* 2002;542(Pt 3):991–5.
43. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519–50.
44. Shafiq SS, Griffin WST, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation.* 2008;5:7.
45. Sarrafzadeh A, Schlenk F, Gericke C, Vajkoczy P. Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2010;13(3):339–46.
46. Schneider UC, Schiffler J, Hakiy N, Horn P, Vajkoczy P. Functional analysis of pro-inflammatory properties within the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *J Neuroinflammation.* 2012;9:28.
47. Dodd WS, Laurent D, Dumont AS, et al. Pathophysiology of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: a review. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(15):e021845.
48. Frase S, Steimer M, Selzner L, et al. Temporal expression pattern of hemoxygenase-1 expression and its association with vasospasm and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2021;36:279–91.
49. Ahn SH, Savarraj J, Parsha K, et al. Inflammation in delayed ischemia and functional outcomes after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):213.
50. Turan N, Miller BA, Heider RA, et al. Neurobehavioral testing in subarachnoid hemorrhage: a review of methods and current findings in rodents. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(11):3461–74.

Supplementary Material

Supplemental Figure 1. Development of the IL6 concentration in brain tissue after day 1, month 1, 2 and 3 following SAH. In whole brain samples of SAH-operated mice the IL6 protein quantity was examined by using ELISA for different time points and compared to sham mice. The results were summarized in the graph. On day 1 post SAH a significant increase of the IL6 protein concentration could be demonstrated, whereas passing month 1 there were no significant differences between the groups apparent. Values from all graphs are means \pm SEM, (n=5 animals per group), * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 and **** P <0.0001 versus sham, respectively, statistical significance determined by One-Way ANOVA.

Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IL = interleukin; SAH = subarachnoid hemorrhage; SEM = standard error of mean



Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Phospho-AXL is widely expressed in glioblastoma and associated with significant shorter overall survival (Oncotarget 2017, 8(31):50403-50414)

Julia Onken^{1,2}, Peter Vajkoczy¹, Robert Torka³, Claudia Hempt¹, Victor Patsouris¹, Frank L. Heppner^{2,4,5,6}, Josefine Radke^{2,4,6}

¹Department of Neurosurgery, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

³Institute of Physiological Chemistry, Martin Luther University of Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany

⁴Department of Neuropathology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

⁵Cluster of Excellence, NeuroCure, Berlin, Germany

⁶German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany

Impact-Factor (2017): 4,64

Olfactory Schwannomas – an enigmatic clinical entity (British Journal of Neurosurgery 2019, 10.1080/02688697.2019.1661968)

Hadjigeorgiou G.F.¹, Strouthou E.M.⁴, Koulousakis D¹, Schul D.B.¹, Patsouris V³, Neff F², Lumenta Ch.B.¹, Schul D.B.¹

¹Department of Neurosurgery, Klinikum Bogenhausen, Academic Teaching Hospital of the Technical University Munich, Germany

²Department of Pathology, Klinikum Bogenhausen, Academic Teaching Hospital of the Technical University Munich, Germany

³Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin Germany

⁴School of Medicine European University of Cyprus, Nicosia, Cyprus

Impact-Factor (2019): 0,87

Minocycline attenuates microglia/macrophage phagocytic activity and inhibits SAH-induced neuronal cell death and inflammation (Neurocritical Care 2022, 37(2):410-423. doi: 10.1007/s12028-022-01511-5.)

K.G. Blecharz-Lang¹, V. Patsouris¹, M. Nieminen-Kelhä¹, S. Seifert², U.C. Schneider^{1,3}, P. Vajkoczy^{1,3,4}

¹Institute of Experimental Neurosurgery, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Department of Neuropathology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

³Department of Neurosurgery, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

⁴Center for Stroke Research Berlin (CSB), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Impact-Factor (2022): 3,53

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Vajkoczy für die Unterstützung und die Möglichkeit in der Neurochirurgie meine Promotionsarbeit durchzuführen. Ebenso für die fortwährende Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragen und die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion.

Mein besonderer Dank gilt an meine Betreuer Frau Dr. Kinga Blecharz-Lang und Prof. Dr. med. Ulf C. Schneider, die dieses Projekt über all die Jahre mit viel Engagement leiteten und mich mit Ihren Anregungen, produktiven Gesprächen, sowie Ihrer unersetzbaren Hilfeleistung im Labor in jeder Hinsicht unterstützten und voranbrachten. Für die produktiven Gespräche, Ideen und den wissenschaftlichen Beistand bin ich sehr dankbar.

Für die Erlernung von neuen tierexperimentellen Techniken, die Unterstützung im Labor und die notwendige Versorgung mit Materialien danke ich Melina Nieminen-Kelhä, Irina Kremenetskaia und Sabine Seidlitz.

Ein besonderer letzter Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meinen Freunden für Ihre Geduld, Ihr Vertrauen und Ihre Hilfe in dieser Zeit.