

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Pathomorphologische Veränderungen der Basalmembranen der kleinen
Hirngefäße in einem Tiermodell der sporadischen zerebralen Mikroangiopathie

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Friederike Held
Ilmenau
2020

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Friederike Held:

Pathomorphologische Veränderungen der Basalmembranen der kleinen Hirngefäße in einem Tiermodell der sporadischen zerebralen Mikroangiopathie

2020, 65 Seiten, 14 Abbildungen, 11 Tabellen, 82 Literaturangaben

Kurzreferat

Unter dem Begriff zerebraler Mikroangiopathien werden heterogene pathomorphologische Besonderheiten subsumiert, die entsprechend des Ausprägungsgrades eine kognitive Einschränkung (*vascular cognitive impairment*) und im finalen Stadium eine vaskuläre Demenz bedingen können. Gegenstand dieser Arbeit war die Betrachtung von Gefäßwandveränderungen und gefäßwandständigem Amyloid beta (A β), unter besonderer Berücksichtigung der vaskulären Drainagewege von A β in einem Tiermodell der hypertensiven Arteriopathie (Spontan hypertensive stroke-prone Ratte (SHRSP)) im Vergleich zu Wistar-Kontroll-Ratten. Experimentell gelang der Nachweis verdickter arteriöler Gefäßwände in der SHRSP. Zudem konnte eine Basalmembrandickenzunahme und beeinträchtigte Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) in Kapillaren der SHRSP nachgewiesen werden. Immunhistochemische Färbungen erwiesen eine häufig altersabhängige Koinzidenz endogener A β -Ablagerungen an Orten einer beeinträchtigten BHS in der SHRSP. Stereotaktische A β -Injektionen offenbarten eine vermehrte A β Ablagerung innerhalb der Gefäßwände der SHRSP. Zusammenfassend zeigt das Tiermodell der hypertensiven Arteriopathie altersabhängig ausgeprägte Veränderungen der Gefäßwände und der Strukturen der neurovaskulären Einheit. Diese sind mit der Ablagerung pathologischer Proteine, d.h. von vaskulärem A β assoziiert. Folglich muss anhand der vorliegenden Daten ein Zusammenhang zwischen hypertensiver Arteriopathie und einer gestörten Proteindrainage angenommen werden.

Inhaltsverzeichnis

<u>I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	VI
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
1.1 DER BEGRIFF DEMENZ UND DEREN EPIDEMIOLOGIE	1
1.2 VASKULÄRE DEMENZ UND VASKULÄR KOGNITIVE BEEINTRÄCHTIGUNG	1
1.3 ZEREBRALE MIKROANGIOPATHIE	2
1.3.1 ARCHITEKTUR INTRAZEREBRALER GEFÄßE	3
1.3.2 AUFBAU DER ZEREBROVASKULÄREN BASALMEMBRAN ALS BESTANDTEIL DER EXTRAZELLULÄRMATRIX	4
1.3.3 BLUT-HIRN-SCHRANKE UND DIE BEDEUTUNG DER NEUROVASKULÄREN EINHEIT	6
1.3.4 KLASSIFIKATION DER SPORADISCHEN ZEREBRALEN MIKROANGIOPATHIE	8
1.3.5 HYPERTENSIVE ARTERIOPATHIE	8
1.3.6 SPORADISCHE ZEREBRALE AMYLOIDANGIOPATHIE	9
1.3.6.1 Transportmechanismen für Amyloid- β	10
1.3.7 ZUSAMMENHANG VON HYPERTENSIVER ARTERIOPATHIE UND ZEREBRALER AMYLOIDANGIOPATHIE	12
1.4 HYPOTHESEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	13
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	14
2.1 ZIELSETZUNG	14
2.2 TIERMODELL SHRSP UND WISTAR RATTE	14
2.2.1 HALTUNG UND FÜTTERUNG	16
2.3 METHODEN.....	17
2.4 AUFBEREITUNG DES HIRNGEWEBES	17
2.5 HISTOPATHOLOGIE	18
2.5.1 MOVAT-PENTACHROM FÄRBUNG NACH VERHÖFF.....	18
2.5.2 KOMBINATIONSFÄRBUNG VON A β (KONGOROT) UND EISENIONEN (BERLINER-BLAU).....	19
2.5.3 KOMBINATIONSFÄRBUNG VON A β (THIOFLAVIN S/T) UND EISENIONEN (BERLINER BLAU)	20

2.6	IMMUNHISTOCHEMIE	21
2.6.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON KOLLAGEN TYP IV UND LAMININ.....	21
2.6.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE ENDOTHEL- UND A β - FÄRBUNG	22
2.7	TRANSMISSION-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	23
2.8	STEREOTAKTISCHE Aβ - INJEKTION IN SHRSP	23
2.9	DATENANALYSE UND QUANTIFIZIERUNG	26
2.9.1	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER GEFÄßWANDDICKE (MOVAT-FÄRBUNG).....	26
2.9.2	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON KOLLAGEN IV BZW. LAMININ	26
2.9.3	HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VON ENDOGENEM A β	27
2.9.4	VERTEILUNG VON INTRAZEREBRAL INJIZIERTEM A β	27
2.9.5	ANALYSE DER ZEREBROVASKULÄREN BASALMEMBRAN MITTELS TRANSMISSION- ELEKTRONENMIKROSKOPIE	28
2.10	STATISTIK	28
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	30
3.1	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER VASKULÄREN EXTRAZELLULÄRMATRIX	30
3.2	EXPRESSIONSLEVEL VON LAMININ UND KOLLAGEN IV INNERHALB DER GEFÄßWÄNDE	31
3.3	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG PATHOMORPHOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN KAPILLÄRER GEFÄßWÄNDE	34
3.4	ENDOGENE Aβ - ABLAGERUNGEN INNERHALB KAPILLÄRER, ARTERIOLÄRER UND ARTERIELLER GEFÄßWÄNDE	38
3.5	VERTEILUNGSVERHALTEN VON INTRAZEREBRAL INJIZIERTEM Aβ INNERHALB KAPILLÄRER, ARTERIOLÄRER UND ARTERIELLER GEFÄßWÄNDE	39
4.	<u>DISKUSSION</u>	41
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	44
II.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	46
III.	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	54
IV.	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	55

DANKSAGUNG I

EHRENERKLÄRUNG II

DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES III

I. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
A β	Amyloid-beta
ABC	ATP-Binding Cassette
AD	Alzheimer Demenz
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AQP4	Aquaporin-4
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAA	Zerebrale Amyloidangiopathie, <i>engl. Cerebral Amyloid Angiopathy</i>
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CPS	Cryoprotectant solution
CSF	Liquor cerebrospinalis, <i>engl. Cerebral Spinal Fluid</i>
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl. Desoxyribonucleid acid</i>
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – V
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HA	Hypertensive Arteriopathie
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - 10
Ig	Immunglobulin
ISF	Interstitielle Flüssigkeit, <i>engl. Interstitial Fluid</i>
MMP	Matrixmetalloproteasen
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung, <i>engl. Standard deviation</i>
SHR.....	Spontan Hypertensive Ratte
SHRSP	Spontan Hypertensive Stroke-Prone Ratte
SLT.....	Solanum Tuberosum Lektin
TEM.....	Transmission-Elektronenmikroskopie
VCI.....	Vascular Cognitive Impairment
ZNS.....	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Der Begriff Demenz und deren Epidemiologie

Demographisch zeichnet sich eine Zunahme der Lebenserwartung und der damit verbundenen Prävalenz und Inzidenz der Demenz ab. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, 12/2017) sind weltweit ca. 50 Millionen Menschen an einer Demenz erkrankt; die Inzidenz wird auf 10 Millionen pro Jahr geschätzt. Die Demenz im Allgemeinen ist stark altersabhängig; die häufigste Form ist die Alzheimer Demenz (AD), gefolgt von der vaskulären Demenz, welche für ca. 20% aller Demenzen ursächlich ist (1, 2). Häufig sind es allerdings Mischpathologien aus Alzheimer und vaskulären Pathologien, die wahrscheinlich noch häufiger für kognitive Dysfunktionen im hohen Alter verantwortlich sind (1, 3).

1.2 Vaskuläre Demenz und vaskulär kognitive Beeinträchtigung

Die aktuelle Leitlinie (4) zur vaskulären Demenz bezieht sich in den klinischen Kriterien auf die Klassifizierung der *American Heart Association* (1), die auf der Kombination von zwei Faktoren beruht: dem Nachweis einer kognitiven Beeinträchtigung mittels neuropsychologischer Testung und dem Nachweis eines vorangegangenen Schlaganfalls bzw. einer Hirngefäßerkrankung. Der kausale Zusammenhang beider Faktoren muss gegeben sein. Gorelick et al. schlagen eine einheitliche Verwendung des Begriffes „vaskulär bedingte kognitive Beeinträchtigungen (engl. *Vascular cognitive impairment (VCI)*)“ für alle Formen der kognitiven Beeinträchtigung, beruhend auf einer vaskulären Hirnschädigung, vor, unabhängig der Ätiologie (ischämisch, atherosklerotisch, hämorrhagisch, etc.) (1). Das klinische Profil der VCI beinhaltet eine psychomotorische Verlangsamung, Defizite die Konzentration und Aufmerksamkeit betreffend, ein dys-exekutives Syndrom, sowie Adynamie. Das finale Stadium einer VCI mündet dann in einer vaskulären Demenz.

Neben den klinischen Diagnosekriterien einer vaskulären Demenz existiert eine Klassifikation entsprechend der zu Grunde liegenden pathomorphologischen Veränderungen. Es wird eine Multiinfarkt-Demenz, eine durch strategische

ischämische Infarkte bedingte Demenz, eine mit Hirnblutungen assoziierte Demenz, sowie eine subkortikale ischämische Demenz mit Marklagerläsionen und Lakunen unterschieden (4).

1.3 Zerebrale Mikroangiopathie

Etwa 25% aller ischämischen Schlaganfälle und ca. 45% der Demenzen sind mit einer zerebralen Mikroangiopathie assoziiert (5, 6). Die zerebrale Mikroangiopathie ist die häufigste Ursache einer vaskulären Demenz im Alter. Unter dem Begriff zerebrale Mikroangiopathie werden sämtliche Pathologien vereint, welche eine beeinträchtigte Integrität kleiner intrakranieller Arterien, Arteriolen, Kapillaren und Venen bedingen (5, 7). Zeitgleich wird der Begriff als klinische, bildgebende und histopathologische Diagnose verwendet, welche als ätiologische Einflussgröße auf Schlaganfall und Demenz innerhalb der vergangenen Jahre stark an Bedeutung gewonnen hat (8). Im klinischen Alltag entspricht die Bezeichnung meist einem Syndrom, bestehend aus klinischer Präsentation und bildgebendem Befund (9). Mittels bildgebender Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT) und der Computertomographie (CT) sind nur die gefäßassoziierten Läsionen ersichtlich, allen voran die Läsionen innerhalb der weißen Substanz, und nicht die ursächlichen Gefäßpathologien, welche weit früher beginnen. Dementsprechend wird der Begriff Mikroangiopathie häufig auch als Synonym für parenchymale Läsionen angeführt (10).

Elementare Aufgabe der kleinen Hirngefäße ist die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutflusses (11). Arteriolen und kleine Arterien werden überwiegend als Gefäße mit einem Durchmesser von 5 µm bis 2 mm und Kapillaren als Gefäße mit einem Durchmesser bis 10 µm definiert (6, 11). Entsprechend der Lokalisation entstammen tief intraparenchymal gelegene kleine Arterien entweder den leptomeningealen superfiziellen Arterien oder den basal gelegenen Arterien des *Circulus Willisii* (5, 11). Aufgrund der endarteriellen Versorgung der weißen Substanz von basal und superfiziell ist diese besonders empfindlich gegenüber Blutflussschwankungen. Eine insuffiziente Gewebepерfusion, eine beeinträchtigte Autoregulation der Gefäße und eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sind die Schlüsselfaktoren für Mikroangiopathie-assoziierte vaskuläre und parenchymale pathomorphologische Veränderungen.

1.3.1 Architektur intrazerebraler Gefäße

Die Gefäßarchitektur intrazerebraler Arterien weist je nach Gefäßkaliber und intraparenchymaler Lokalisation Besonderheiten auf. Innerhalb des Subarachnoidalraumes ziehen leptomeningeale (piale) Arterien entlang (siehe Abbildung 1), deren luminale *Lamina elastica interna* stark gefaltet vorliegt und eine flexible Anpassung an unterschiedliche Blutdruckverhältnisse und Pulsationen begünstigt. Eine gute Kontraktilität verleihen die multiplen Lagen glatter Muskelzellen innerhalb der *Tunica media*. Eine äußere Schicht Leptomeningeum trennt die kollagenreiche *Tunica Adventitia* vom Liquor im Subarachnoidalraum. Zwischen dem Gefäß und der umgebenden *Pia mater* und der *Glia limitans* befindet sich ein perivaskulärer Raum, auch genannt Virchow-Robin Raum (12, 13).

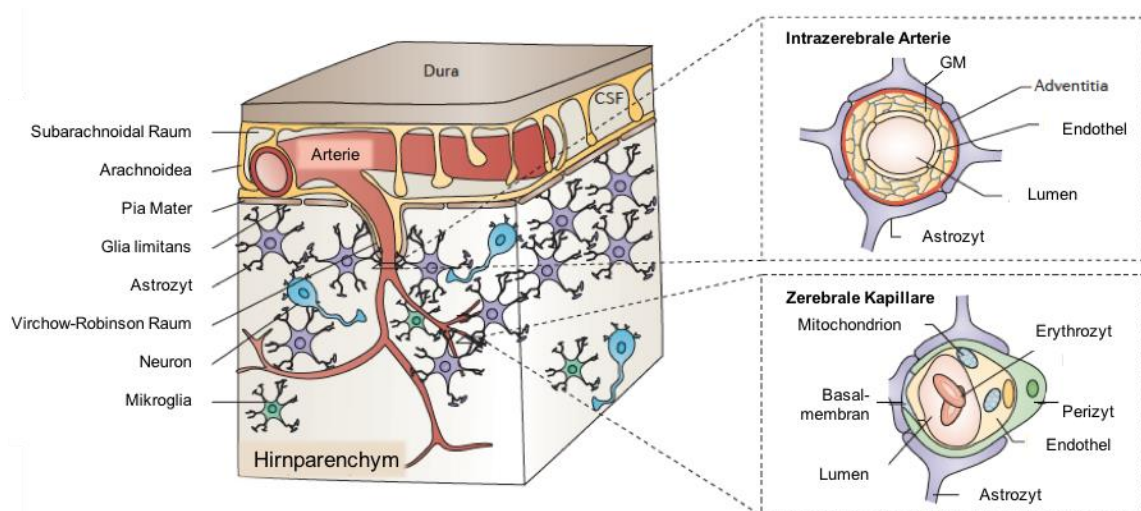


Abbildung 1: Gefäßaufbau intrazerebraler Gefäße

Arterielle Gefäße innerhalb des Subarachnoidalraumes sind durch eine Schicht *Pia Mater* von dem umgebenden *Liquor cerebrospinalis* getrennt. Arterielle Äste umgeben von *Pia Mater* (direkt den Gefäßen aufliegend) und *Glia limitans* (gebildet von Astrozyten-Endfüßen) dringen in das Hirnparenchym ein, bis schließlich auf Höhe der Kapillaren die *Pia Mater* ausläuft und kein perivaskulärer Raum (Virchow-Robin-Raum) mehr vorhanden ist. Arterien haben neben der endothelialen Auskleidung eine dicke *Tunica Media* mit glatten Muskelzellen und mehreren Schichten Basalmembran, welche nach außen durch eine Schicht *Tunica Adventitia* begrenzt ist. Auf Höhe der Kapillaren existiert einzig eine endotheliale Auskleidung mit Perizyten innerhalb der endothelialen Basalmembran, welche nach extern lediglich durch die *Glia limitans* begrenzt ist. Abkürzung: GM: Glatte Muskelzelle.

Abbildung modifiziert nach Zlokovic, Nat Rev Neurosci, 2011 (14).

Abzweigende Arterien versorgen den Kortex und subkortikale Regionen mit Blut. Letztere ziehen unverzweigt durch den Kortex in die unterliegende weiße Substanz. Bis zu der Ebene kleiner Arteriolen verdünnt sich die umgebende glatte Muskelschicht zunehmend. Ein dünner Bezug *Pia Mater* separiert das Gefäß von der umgebenden *Glia limitans*, zusammen bilden sie die piaie-gliale Basalmembran (15, 16). Ein perivaskulärer Raum existiert in diesen Gefäßen nicht (13). Arterien, welche basal gelegen direkt den großen Arterien des *Circulus Willisii* entspringen, versorgen die tiefen Schichten der grauen Substanz (Basalganglien, Thalamus), sowie die weiße Substanz von basal. Die Besonderheit besteht in den zwei Lagen Leptomeningen, zwischen denen sich ein perivaskulärer Raum befindet, welcher aufgrund der variablen Dehnbarkeit eine fundamentale Bedeutung für Transportprozesse einnimmt (13, 17). Auf der Ebene der Kapillaren ist die gemeinsame Basalmembran von Endothelzellen, Perizyten und Astroglia über Integrine mit dem Zytoskelett verankert (18). Perizyten liegen innerhalb der endothelialen Basalmembran in prä-kapillären Arteriolen, Kapillaren und post-kapillären Venolen. Neben der Expression von Proteinen der Extrazellulärmatrix und Oberflächenantigenen beeinflussen Perizyten die Permeabilität der BHS durch Expression von Tight junction-Molekülen (12, 19–23). Durch Ausbildung der *Glia limitans* sind Astrozyten integraler Bestandteil der gemeinsamen Basalmembran mit den Endothelzellen und Perizyten und tragen über Aquaporin-4 (AQP4) Kanäle an den Astrozyten-Endfüßen zum Stoffaustausch mit dem Interstitium bei (24).

1.3.2 Aufbau der zerebrovaskulären Basalmembran als Bestandteil der Extrazellulärmatrix

Als integraler Bestandteil der BHS der kleinen Hirngefäße ist die zerebrale vaskuläre Basalmembran ein hochspezialisiertes drei-dimensionales Netzwerk, welches als basale Schicht alle Endothelzellen und Epithelzellen umsäumt, sowie Muskelzellen umgibt. Funktionell bildet sie ein stabiles Gerüst und ist Teil der vaskulären Extrazellulärmatrix. Sie fungiert zeitgleich als Transportweg und physiologische Barriere und ist an der zellulären Signaltransduktion beteiligt (25). Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten synthetisieren Proteine der vaskulären Extrazellulärmatrix, welche nach extrazellulär sezerniert werden und in Komposition die Basalmembran

bilden. Hauptbestandteile der 50-100 nm dicken mikrovaskulären Basalmembranen sind Kollagen IV, Laminin, Nidogen und Hauptvertreter der Heparansulfatproteoglykane (Perlecan, Agrin und Fibronectin) (siehe Abbildung 2) (26).

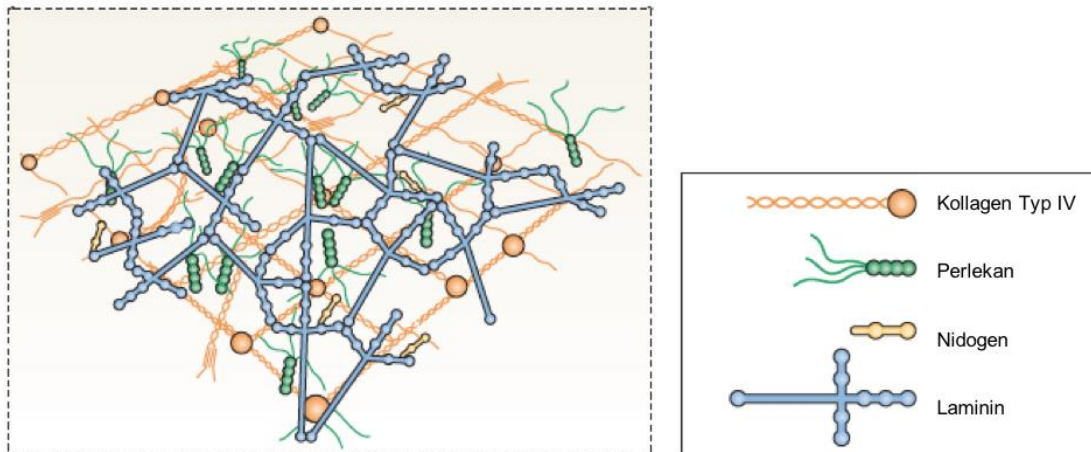


Abbildung 2: Grundlegender Aufbau der Basalmembran

Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Basalmembran mit den wichtigsten Komponenten Laminin, Kollagen IV, Nidogen 1 und/oder 2, sowie Perlecan. Zusammen bilden sie ein ca. 50-100 nm dickes Netzwerk der vaskulären Basalmembran.

Abbildung modifiziert nach Sorokin, Nat Rev Immunol, 2010 (27).

Das Laminin-Kollagen-Netz ist für die Integrität der Gefäßwände unerlässlich. Veränderungen innerhalb zerebraler Gefäßwände bedingen eine vermehrte Fragilität oder Steifigkeit der Gefäße mit konsekutiver Beeinträchtigung des Stoffaustausches zwischen Blutbahn und Gehirn, sowie der perivaskulären Drainagefunktion.

Pathomorphologische Veränderungen der Basalmembran im Rahmen verschiedener neurodegenerativer und neuroinflammatorischer Erkrankungen wurden tierexperimentell und in vitro vielfach untersucht. Die Basalmembran als Transportweg für Amyloid- β ($A\beta$) scheint im Rahmen einer zerebralen Amyloidangiopathie (engl. *Cerebral amyloid angiopathy (CAA)*), einer Variante der zerebralen Mikroangiopathie, und AD schon vor einer manifesten $A\beta$ -Ablagerung pathologisch verändert zu sein (19, 28, 29). Eine kompensatorische Kollagen IV-Zunahme verhindert zusammen mit Laminin und Nidogen zunächst eine wandständige $A\beta$ -Ablage durch Unterbindung einer fibrillären Konstitution der $A\beta$ -Peptide (30, 31). Eine mit zunehmender Wanddicke, Gefäßsteifigkeit und assoziierter Abtransportstörung von $A\beta$ beobachtete

Zunahme der Heparansulfatproteoglykane, allen voran Perlecan und Fibronectin, fördert hingegen eine wandständige A β -Aggregation und triggert die Entwicklung einer CAA (20). Dieses Krankheitsmodell implementiert den häufigen histopathologischen Befund einer initialen Wanddickenzunahme ohne relevante A β -Ablagerung und chronischen Befund einer Wanddickenabnahme (Atrophie) in Folge einer verminderten transmuralen Nährstoffversorgung im Rahmen einer manifesten CAA.

Die Integrität der Basalmembran bedarf einer intakten Kommunikation von Astrozyten, Perizyten und vaskulären Muskelzellen, sowie der Einbettung in das perineuronale und interstitielle Gewebe. Alle Transport- und Signalwege bedürfen einer intakten Integrität der vaskulären Extrazellulärmatrix.

1.3.3 Blut-Hirn-Schranke und die Bedeutung der neurovaskulären Einheit

Die BHS stellt eine physiologische Barriere zwischen der Peripherie und dem Hirnparenchym dar, gewährleistet ein chemisches und strukturelles Gleichgewicht innerhalb des Hirnparenchyms und sorgt für einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen der Peripherie und dem zentralen Nervensystem (ZNS) (22). Gleichzeitig schützt sie vor dem Eintritt toxischer Metabolite und unterstützt den Abtransport überschüssiger Stoffwechselprodukte aus dem ZNS in das Blut (32). Für die Instandhaltung der BHS sind die intakte Interaktion zwischen Perizyten, Astrozyten, vaskulären glatten Muskelzellen, sowie die Integrität der vaskulären Extrazellulärmatrix von essentieller Bedeutung. Der Verbund aus Neuronen, vaskulären Zellen (Endothelzellen, Perizyten, glatten Muskelzellen) und Gliazellen (Astroglia, Oligodendroglia, Mikroglia) wird als neurovaskuläre Einheit bezeichnet (siehe Abbildung 3) (33). Ein Verlust der Barriere-Funktion der BHS resultiert in einer neurovaskulären Entkopplung mit konsekutivem Eintritt toxischer Metabolite, verminderter Perfusion und konsekutiver Hypoxie verbunden mit dem Untergang von Neuronen (14).

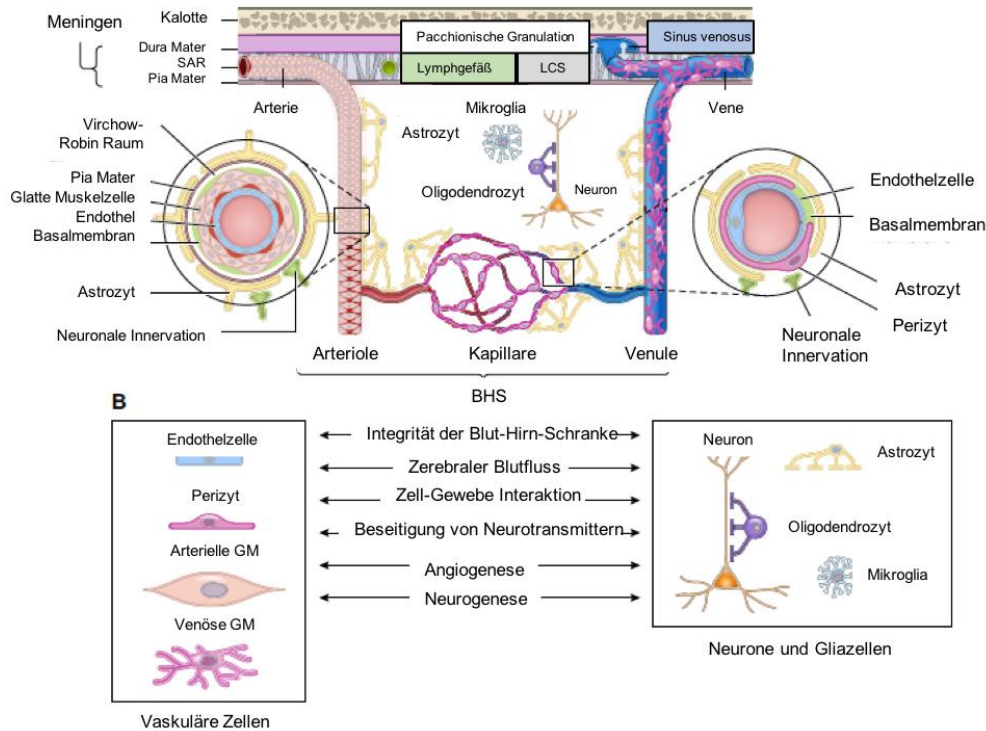


Abbildung 3: Zusammensetzung der Neurovaskulären Einheit und ihre wichtigsten Funktionen

Zur neurovaskulären Einheit gehören vaskuläre Zellen (Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen innerhalb kleiner Arterien, Arteriolen und Venen), Gliazellen (Astroglia, Mikroglia und Oligodendrozyten) und Neurone, welche untereinander durch neuronale Innervation von glatten Muskelzellen, Perizyten und Astrozyten interagieren. Eine intakte neurovaskuläre Einheit ist Voraussetzung für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und hat maßgeblichen Anteil an der Modulation des zerebralen Blutflusses, Aufrechterhaltung der Homöostase, sowie neuroinflammatorische Prozesse und Angio-/Neurogenese. Abkürzung: SAR: Subarachnoidal Raum; LCS: *Liquor cerebrospinalis*; BHS: Blut-Hirn-Schranke; GM: Glatte Muskelzellen.

Modifiziert nach Sweeney et al., Nat Rev Neurol., 2018 (24).

Bereits vor dem Auftreten klinischer und makroskopischer Veränderungen neurodegenerativer Erkrankungen konnte experimentell eine BHS-Störung als Ausdruck einer mikrovaskulären Schädigung nachgewiesen werden (34, 35). Pathomorphologisch kommt es initial zu einer kapillären Wandschädigung mit konsekutiver Extravasation von Blutplasmabestandteilen, sowie Erythrozyten (35). Ab kann ko-lokalisiert auftreten und einen Indikator für eine perivaskuläre oder endotheliale Transportstörung darstellen (36, 37). Eine pro-inflammatorische Kaskade begünstigt eine weitere Hirngewebsdestruktion. Letztere wird durch ein Versagen der rezeptorvermittelten transmembranen A β -Transportwege aggraviert (38, 39). Es lässt sich zusammenfassend eine Kaskade aus initialer struktureller Gefäßwandschädigung mit konsekutiver BHS-Störung darstellen, welche durch Versagen zellulärer und

trophischer Signalwege eine funktionelle Beeinträchtigung der neurovaskulären Interaktion bewirkt und einen weiterführenden Hirnparenchymschaden begünstigt. In Folge setzen neurodegenerative Prozesse mit assoziierten kognitiven Dysfunktionen ein.

1.3.4 Klassifikation der sporadischen zerebralen Mikroangiopathie

Die häufigsten Varianten der sporadischen zerebralen Mikroangiopathie sind die hypertensive Arteriopathie (HA) und die CAA. Beide teilen das Alter als gemeinsamen Risikofaktor. Neben der sporadischen Form der zerebralen Mikroangiopathie existieren auch genetisch determinierte Krankheitsformen wie z.B. die zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (*engl. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy, CADASIL*), auf die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.

1.3.5 Hypertensive Arteriopathie

Häufig auch unter dem Begriff einer Hypertonie- oder Alters-assoziierten zerebralen Mikroangiopathie bekannt, vereint die Untergruppe der HA die am häufigsten vorliegende Pathologie kleiner intrazerebraler Gefäße im Alter. Betroffen sind kleine Arterien, Arteriolen, Kapillaren und Venolen innerhalb der tiefen grauen (Basalganglien, Thalamus, Pons, Kleinhirn) und weißen Substanz. Alters- und Hypertonie-assoziiert findet eine Extravasation von Proteinen und eine Bindegewebsvermehrung innerhalb der *Tunica media* statt (13). Das morphologische Resultat sind eine fibrinoide Nekrose und Lipohyalinose mit wandständigen Mikroatheromen, welche eine Einengung des Gefäßlumens, sowie eine zunehmende Steifigkeit und Brüchigkeit der Gefäßwände bewirken (siehe Abbildung 4) (5, 11, 13, 40, 41). Makroskopisch sind kleine (z.T. subklinische) subkortikal gelegene Hirninfarkte innerhalb der weißen Substanz, sowie große intrazerebrale Blutungen in „*loco typico*“ innerhalb der tiefen grauen Substanz die Folge.

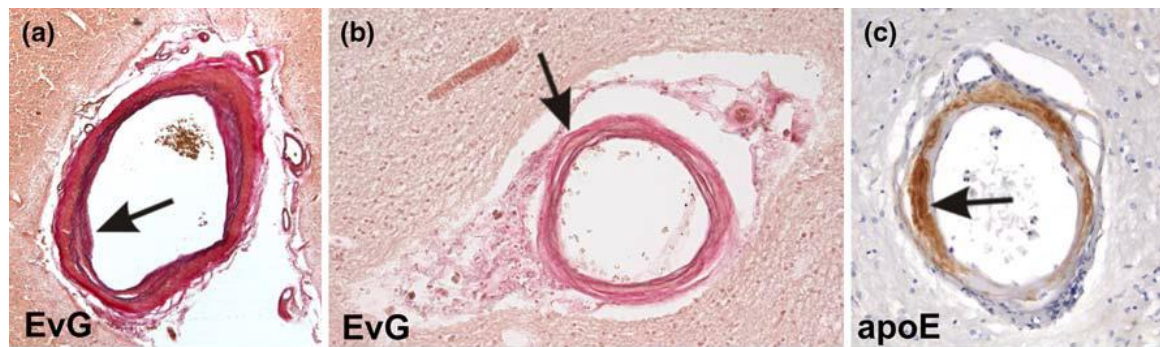


Abbildung 4: Histopathologische Befunde zerebraler Mikroangiopathien

(a) Leptomeningeale Arterie mit Proliferation der Intima und konsekutiver Aufspaltung der *Lamina elastica interna* (Pfeil) in Folge einer Arteriosklerose/Atherosklerose. (b) Arterie innerhalb der weißen Substanz mit Lipohyalinose und Fibrosierung der Gefäßwand, sowie Aufspaltung der einzelnen Gefäßwandschichten (Pfeil) und fibrinoider Nekrose. (c) Arterie innerhalb der weißen Substanz mit Anfärbung von Apolipoprotein E (braun) (Pfeil), indikativ für eine Lipohyalinose. EvG: Elastica van Gieson Färbung, apoE: Anti-Apolipoprotein E Färbung (Covance Dedham, USA, D6E10).

Abbildung entnommen aus Grinberg et al., *Acta Neuropathologica*, 2010 (40).

1.3.6 Sporadische zerebrale Amyloidangiopathie

Das Krankheitsbild der CAA gilt als Indikator für eine gestörte perivaskuläre Drainagefunktion mit konsekutiver Ablagerung von Bestandteilen der Extrazellulärflüssigkeit (36). Eine Hauptkomponente mit weitreichenden Effekten stellt das kongophile, immunreaktive A β -Protein₁₋₄₀ dar, welches vorwiegend in den Wänden kleiner und mittelgroßer leptomeningealer und kortikaler Arterien bzw. Arteriolen, sowie in geringerer Ausprägung auch in Venen und Kapillaren, vorzufinden ist (5, 11, 41). Topographisch erscheint der Okzipitallappen am häufigsten und am schwerwiegendsten betroffen zu sein, weniger häufig betroffen sind der Frontal-, Temporal-, und Parietallappen (42). Die Basalganglien, der Thalamus und die weiße Substanz sind meist ausgespart oder nur in fortgeschrittenen Krankheitsstadien von einer CAA betroffen. Histologisch betrachtet sind A β -Ablagerungen während der Ausbildung einer CAA zunächst vereinzelt abluminal zwischen den glatten Muskelzellen innerhalb der Basalmembranen der *Tunica media* vorzufinden, wobei die Integrität der Gefäßwände erhalten bleibt. Bei größeren leptomeningealen Arterien ist das abgelagerte A β zunächst innerhalb der *Tunica adventitia* vorzufinden und

nachfolgend innerhalb der *Tunica media* (13). Mit zunehmender Schwere der Erkrankung finden sich Amyloidablagerungen in allen Wandschichten, ersetzen glatte Muskelzellen und Basalmembranbestandteile und führen zunächst zu einer generalisierten Wandverdickung mit Lumeneinengung (42). Das Endstadium der CAA führt zu einer zirkulären Ablösung der *Tunica media* von der *Lamina elastica interna* mit mikroskopischem Nachweis einer doppelläufigen Zellwand (40). Eine endotheliale Dysfunktion mit gesteigerter Permeabilität der BHS, einer porösen Gefäßwandstruktur und einer Veränderung des perivaskulären Raumes resultiert in einer gestörten Autoregulation mit irreversibler Schädigung physiologischer transendothelialer, intramuraler und perivaskulärer Transportvorgänge. In deren Folge wird eine weiterführende A β -Ablagerung begünstigt und eine Amyloid-vermittelte lokale Entzündungsreaktion getriggert.

Die A β -Proteine entstammen einem membranständigen, glykolysierten Amyloid-Vorläufer-Protein (engl. *amyloid precursor protein*, APP), welches eine große extrazelluläre und kleine intrazelluläre Domäne aufweist und posttranslational variabel glycosyliert wird (43–45). Durch proteolytische Spaltung von APP entstehen die pathologischen A β -Peptide, welche aufgrund einer nicht akkurat definierten Schnittstelle eine variable Aminosäuresequenz von 40-42 Aminosäuren aufweisen. A β ₄₀-Peptide sind hydrophiler und überwiegend im Rahmen einer CAA vorzufinden, wohingegen A β ₄₂-Peptide hydrophob und dominierender Bestandteil der Amyloid-Plaques sind (44).

1.3.6.1 Transportmechanismen für Amyloid- β

Transportwege von löslichem A β umfassen die extrazelluläre enzymatische Spaltung, die zelluläre Aufnahme mittels Endozytose und intrazelluläre Degradierung, den Transport über die BHS entlang der Blut-Liquor-Schranke und die Rezirkulation oder den Abtransport in die Lymphe. Eine Abtransportstörung von A β wird als relevanter Pathomechanismus für die Entstehung vaskulärer Demenzen angenommen (12, 46).

Es existieren zwei Modelle wie ein Abtransport von A β intraparenchymal erfolgt: (i) die perivaskuläre und (ii) die glymphatische Drainage. Bei der perivaskulären Drainage (siehe Abbildung 5) wird ein Abtransport der interstitiellen Flüssigkeit (ISF), inklusive

A β , entgegengesetzt des Blutflusses entlang kapillärer endothelialer und nachfolgend arteriöler und arterieller Basalmembranen innerhalb der *Tunica media* angenommen. Nach Mündung in den Subarachnoidalraum sind eine Rezirkulation oder ein Abstrom entlang meningealer Lymphgefäße nach extrakraniell etablierte Drainagewege (15, 16). Das Modell einer glymphatischen Drainage fand durch Iliff et al. 2012 erstmals Erwähnung. Maßgebliche Unterschiede sind eine Glia-vermittelte Drainage paravaskulär mit einem para-venösen Abtransport von ISF und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) (47–49). Auf Einzelheiten wird hier jedoch nicht eingegangen.

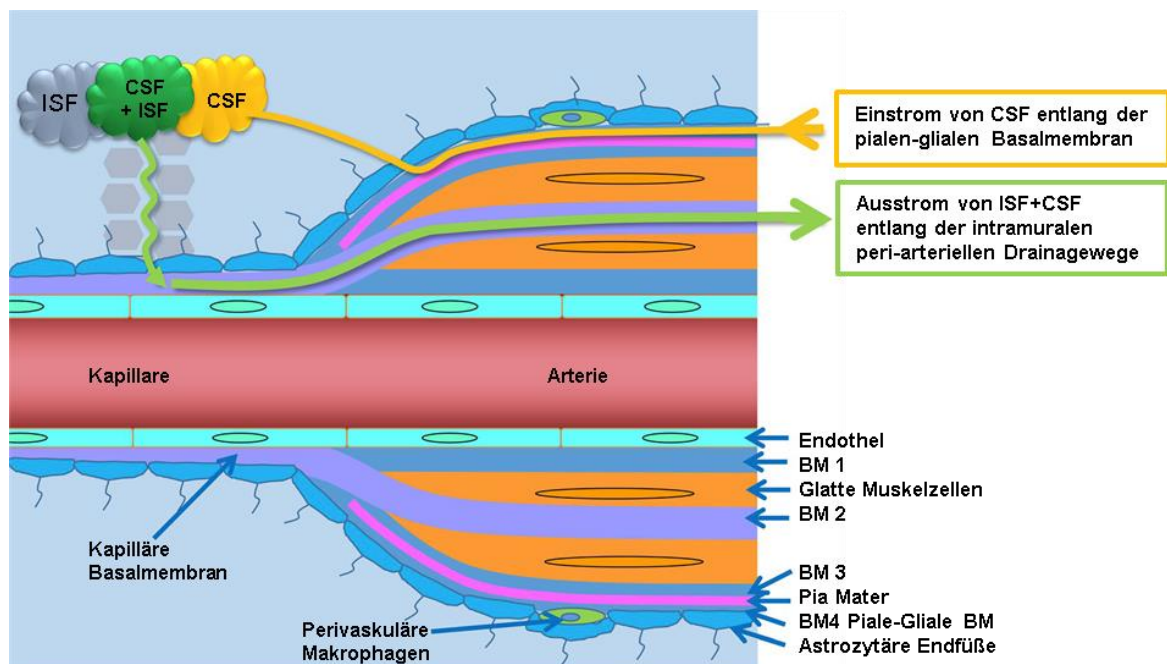


Abbildung 5: Detailliertere Darstellung der perivaskulären Drainage

Mit gelb markiert ist der Einstrom der Zerebrospinalflüssigkeit (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) entlang der pialen-glialen Basalmembran (BM) mit Ausstrom in das Hirnparenchym und folgend in die inneren Liquorräume, wo es zu einer Vermischung der CSF mit der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) kommt. Mit grün markiert ist der Ausstrom von CSF und ISF entlang der kapillären endothelialen Basalmembran und nachfolgenden intramuralen peri-arteriellen Drainagewege.

Abbildung modifiziert nach Albargothy et al., Acta Neuropathologica 2018(16).

Ursachen für eine fehlerhafte Drainagefunktion im Alter werden kontrovers diskutiert. Als etablierter Pathomechanismus wird eine beeinträchtigte Integrität der Gefäßwände mit konsekutiv veränderten perivaskulären und paravaskulären Räumen angenommen, wodurch eine vermehrte A β -Ablagerung begünstigt wird (50). Eine

zunehmende Steifigkeit der Gefäße durch Proteinablagerungen und der Verlust vaskulärer glatter Muskelzellen resultieren in einer verminderten Pulsatilität mit weiterführender Beeinträchtigung einer perivaskulären Drainage (15).

Verminderte arterielle Pulsationen münden in einer „Stase“ von ISF und CSF. Proteinefehlfaltung und -ablagerung werden als Komplikation angenommen (47). Rezirkulierende CSF mit hohem Anteil an A β kann eine Proteinablagerung ebenso begünstigen und eine intrinsische Verstärkung der A β -Ablagerung durch bereits akkumuliertes A β bewirken. Der experimentelle Nachweis einer deutlich eingeschränkten Drainage der ISF bei AQP4-defizienten Mäusen wies auf die hohe Relevanz einer glialen Transportfunktion hin (12, 23, 47).

1.3.7 Zusammenhang von hypertensiver Arteriopathie und zerebraler Amyloidangiopathie

Die HA und die CAA sind Unterformen der zerebralen Mikroangiopathie. Gemeinsamer Risikofaktor ist das zunehmende Alter (11, 51). Eine arterielle Hypertonie gilt als zentraler vaskulärer Risikofaktor für eine HA. Die Entwicklung einer CAA kann durch eine genetisch determinierte Allelkonfiguration des Apolipoproteins E (ϵ 2 und/oder ϵ 4) begünstigt werden (52). Klinisch können sich beide Angiopathien mit transienten oder alltagsrelevanten neurologischen Defiziten manifestieren. Lakunäre ischämische Infarkte, sowie typische intrazerebrale Blutungen sind bei der HA vorwiegend subkortikal innerhalb der weißen Substanz, dem Thalamus, den Basalganglien, sowie im Hirnstamm vorzufinden (6, 53). Die CAA manifestiert sich vorwiegend durch lobär gelegene atypische intrazerebrale Blutungen mit Prädominanz im Okzipitallappen (41).

Histopathologische Untersuchungen ergaben eine häufige Ko-inzidenz der beiden Mikroangiopathie Formen, HA und CAA, im gleichen Hirn (40, 41). Ein darüber hinaus möglicher kausaler Zusammenhang zwischen beiden Varianten kann über eine (hypertensive) Gefäßwandschädigung mit assoziierter Drainagestörung und anschließender A β -Akkumulation diskutiert werden. Umgekehrt fördert vaskuläres A β die Gefäßwandschädigung und kann so die mit einer HA-assoziierten Wandpathologien triggern.

1.4 Hypothesen der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurde die wissenschaftliche Annahme einer Überlappung von HA und Proteinopathie unter Berücksichtigung eines spezifischen Risikoprofils vertiefend untersucht. Bereits bekannt ist eine Hypertonie-getriggerte Destruktion der Wände kleiner Hirngefäße mit bildgebendem Befund vorwiegend subkortikal gelegener Läsionen. Eine Alters-abhängige Aggravation der Hypertonie-getriggerten Gefäßwanddestruktion ist zudem bekannt. Unabhängig davon wurde eine Proteinopathie bisher als Alters-abhängige Transportstörung postuliert. Zur Annäherung an die Hypothese der Koinzidenz einer CAA an Orten einer HA wurden in der spontan hypertensiven stroke-prone Ratte (SHRSP), einem validen Tiermodell der HA, und der Wistar-Kontrollratte folgende Fragestellung experimentell untersucht:

1. In welchem Ausmaß sind quantitative Wandveränderungen Hypertonie-assoziiert in SHRSP vorzufinden im Vergleich zu Wistar Ratten?
2. Treten qualitative Wandveränderungen in Kapillaren, Arteriolen und kleinen Arterien gleichermaßen auf?
3. Welchen Einfluss hat das Alter als Komorbidität für Hypertonie-getriggerte Wandveränderungen?
4. Werden BHS-Störungen Alters-unabhängig durch eine HA aggraviert?
5. Findet eine endogene A β -Ablagerung in beiden Rattenmodellen statt?
6. An welchen Orten im Gefäßnetz lagert sich endogenes A β ab?
7. Gibt es eine Koinzidenz bestehend aus BHS-Störung und A β -Ablagerung?
8. Unterscheidet sich die A β -Drainage in SHRSP und Wistar Kontrollratten?

2. Material und Methoden

2.1 Zielsetzung

Zur Untersuchung pathomorphologischer Veränderungen der zerebralen Basalmembranen kleiner Hirngefäße, die eine überlappende Gefäßpathologie bestehend aus HA und CAA offenbart, wurde:

1. die Integrität der Basalmembranen kleiner Arterien, Arteriolen und Kapillaren betrachtet. Hierbei dienten histochemische (MOVAT-Pentachromfärbung) Untersuchungen der Betrachtung quantitativer Wandveränderungen. Die nachfolgende Analyse qualitativer Wandveränderungen erfolgte durch Anwendung immunhistochemischer (Laminin/Collagen IV Färbung, Thioflavin T/S und Berliner Blau Färbung) und elektronenmikroskopischer Nachweisverfahren.
2. das Vorhandensein einer CAA unter Beachtung des Risikoprofils (arterielle Hypertonie, hohes Lebensalter) in beiden Rattenmodellen immunhistochemisch untersucht.
3. der Transportprozess von A β evaluiert. Histochemische Untersuchungen dienten der Betrachtung quantitativer Wandveränderungen. Die nachfolgende Analyse qualitativer Wandveränderungen erfolgte durch Anwendung immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Nachweisverfahren. Unter der Annahme einer perivaskulären Drainagestörung in Folge hypertensiver struktureller Gefäßwandveränderungen sollte hier die Frage geklärt werden, ob an Orten einer beschädigten Gefäßwand ein höheres Risiko für eine A β -Ablagerung besteht und als Trigger für die spätere Entwicklung einer CAA fungiert. Final wurde der Frage nachgegangen, ob eine HA mit einer perivaskulären A β -Drainagefunktionsstörung assoziiert ist. Dies sollte mittels immunhistochemischer Nachweismethoden und stereotaktischer A β -Injektion erreicht werden.

2.2 Tiermodell SHRSP und Wistar Ratte

Ein geeignetes Tiermodell der zerebralen Mikroangiopathie ist die SHRSP, die durch multiple und selektive Verpaarung aus der spontan hypertensiven Ratte (SHR)

hervorgegangen ist (54). Pathophysiologisch ist die SHRSP durch eine Überaktivität des Renin-Angiotensin-Systems, einen gesteigerten Sympathikotonus sowie ein modifiziertes Endothelin-System, verbunden mit einer Insulinresistenz und einer gemischten Hyperlipidämie, gekennzeichnet. Es besteht ein genetisch determinierter, chronisch arterieller Hypertonus mit spontaner Entwicklung zerebraler Infarkte, wodurch die SHRSP ein valides Modell für die Untersuchung risikoassoziierter mikroangiopathischer Veränderungen im Alter darstellt (55, 56).

Ein geeignetes Tiermodell für die Kontrollgruppe ist die Wistar-Kyoto Ratte. Sie weisen im Vergleich zur SHRSP weder einen arteriellen Hypertonus, noch das typische Risikoprofil mikroangiopathischer Veränderungen (Hyperlipidämie, Insulinresistenz) auf (57). Die Blutdruckwerte von SHRSP und Wistar-Kontrollratten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Gewicht und Blutdruckwerte von SHR, SHRSP und Wistar-Ratten im zeitlichen Verlauf.

Mit Stern (*) sind signifikante Gruppenunterschiede zwischen SHR/SHRSP und Wistar-Kontrollratten gekennzeichnet. Signifikanzniveau nicht näher bekannt.

Modifiziert nach Ritz et al., Curr Neurovasc Research, 2009 (57).

Alter	2 Monate	4 Monate	6 Monate	9 Monate
<i>Körpergewicht (in Gramm)</i>				
SHR	218±15*	328±15*	346±20*	380±11*
SHRSP	214±8*	307±11*	337±12*	343±15*
WKY	258±12	372±14	440±23	465±21
<i>Mittlerer arterieller Druck (mm Hg)</i>				
SHR	143±16	183±14*	186±35*	144±10
SHRSP	141±11	184±33*	196±20*	205±10*
WKY	114±14	122±6	124±10	122±21

Als Versuchstiere wurden mit Genehmigung der Tierversuchsanträge (Referenznummer 42502-2-1148 DZNE; 42502-2-943 Uni MD; 42502-2-1277 Uni MD) durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt 82 männliche SHRSP und 59 männliche Wistar-Ratten unterschiedlichen Alters in die Studie inkludiert (siehe Tabelle 2). Die SHRSP wurden von den "Charles River Laboratories International" in

Wilmington, Massachusetts, USA und die Wistar-Ratten von den “Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH” in Sulzfeld bezogen.

Tabelle 2: Anzahl verwendeter SHRSP und Wistar Ratten entsprechender Altersgruppen für das jeweilige Experiment

Experiment	Gruppe	Alter in Wochen									
		18	24	25	28	31	32	33	34	35	44
Histologie	SHRSP	6	6	1		3	9		1		10
	Wistar	4	5			1	5	1		1	6
IHC Coll/Lam	SHRSP	5	5				5				
	Wistar	5	5				5				
IHC Endothel	SHRSP	3	3				3				
	Wistar	3	3				3				
IHC A β	SHRSP	1			2		7				
	Wistar										
TEM	SHRSP	3	3				3				
	Wistar	3	3				3				
Stereotaxie	SHRSP								3		
	Wistar								3		

2.2.1 Haltung und Fütterung

Die Versuchstiere unterlagen homogen den gleichen Haltungsbedingungen mit einem natürlichen Tag-Nacht (hell-dunkel) Zyklus und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung. Es erfolgte eine tägliche Begutachtung von Spontanaktivität, Koordination und Gleichgewicht. Gewichtskontrollen fanden wöchentlich statt.

2.3 Methoden

Zur Quantifizierung von kleinen Gefäßen mit verdickten Gefäßwänden erfolgte eine MOVAT-Pentachromfärbung (siehe 2.5.1). Zur Untersuchung von Veränderungen der Basalmembranen der kleinen Gefäßwände erfolgten immunhistochemische Färbungen mit Collagen IV und Laminin (siehe 2.6.1). Die Assoziation einer BHS-Störung mit Austritt von Blut durch die geschädigte Gefäßwand und gefäßwandständigen A β -Ansammlungen wurde durch histochemische Nachweismethoden mit Kongorot bzw. Thioflavin S/T und Berliner Blau (siehe 0), sowie immunhistochemischen Nachweismethoden (Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), A β) (siehe 2.6.2) untersucht. Für eine genauere qualitative Untersuchung der neurovaskulären Einheit inklusive der Basalmembranen erfolgte die Untersuchung zerebraler Kapillare mittels Transmission-Elektronmikroskopie (TEM) (siehe 2.7). Abschließend erfolgten stereotaktische Injektionen von A β in den Hippokampus der SHRSP und Wistar Ratte und die anschließende immunhistochemische Detektion, um einer möglichen Drainagestörung nachzugehen (siehe 2.8). Kapillaren (MOVAT-Färbung: Diameter <20 μ m, Immunhistochemische Färbung Diameter <15 μ m) und Arteriolen (MOVAT-Färbung: Diameter >20 μ m, Immunhistochemische Färbung Diameter >15 μ m) wurden jeweils einzeln betrachtet.

2.4 Aufbereitung des Hirngewebes

Zur Gewebegewinnung wurden die Ratten zunächst mit Pentobarbital (40 mg/kg, 1 ml auf 100 g Körpergewicht, intraperitoneal) narkotisiert. Bereits für die Stereotaxie verwendete, narkotisierte Tiere (SHRSP n=3, Wistar n=3) wurden direkt im Anschluss in den Perfundierungsvorgang überführt. Für immunhistochemische und histologische Färbungen folgte eine transkardiale Perfusion mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) 0,1 Molar (pH = 7,2) und die anschließende Fixation des Hirngewebes mit 4% Paraformaldehyd (PFA). Insgesamt dauerte die Perfusion 8 Minuten. Im Anschluss erfolgten die Dekapitation der Ratten sowie die Gehirnentnahme. Die Gehirne wurden für weitere 48 Stunden in PFA postfixiert und anschließend in 30%iger Saccharose-Lösung kryokonserviert. Zur

Aufbewahrung wurden die Gehirne mit Hilfe von -80 °C kaltem Methylbutan schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vierundzwanzig Stunden vor der Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Hirne in einen Gefrierschrank mit -20 °C überführt und anschließend Koronarschnitte (30 µm) am Kryostat angefertigt. Im Abstand von je ca. 1 mm wurden 11 Schnittebenen (frontaler bis okzipitaler Pol) angefertigt; pro Schnittebene wurden jeweils 3 Schnitte für die histologischen Färbungen entnommen. Die restlichen Schnitte wurden in mit Kryoprotektionslösung (engl. *cryoprotectant solution*, CPS; Glycerin, Ethylenglykol, 0,1 M PBS im Verhältnis 1:1:2) gefüllten 96-Well-Platten bei 4 °C gelagert und nachfolgend für immunhistochemische Färbungen und die Durchführung der Elektronenmikroskopie in kleinen Zentrifugenröhrchen nach Southampton versandt.

Bei geplanter Durchführung der Transmission-Elektronenmikroskopie fand nach stattgehabter Perfusion mit PBS die Fixation des Hirngewebes mit einer Glutaraldehyd(2,5%)-Formalin(2%)-Lösung statt. Zum Erhalt der Gewebestruktur folgte die Nachfixierung der Hirne über 48 Stunden mit der zuvor verwendeten Glutaraldehyd-Fixierlösung. Die Hirne wurden anschließend weiter in der Fixierlösung gelagert und ebenfalls nach Southampton versandt. Es erfolgte die Anfertigung von Sagittalschnitten (100 µm) am Kryostat, welche bis zur Weiterverarbeitung in PBS 0,01M (pH 7,2) aufbewahrt wurden.

2.5 Histopathologie

Für die MOVAT-, ThioflavinT/S- und Berliner Blau- Färbungen wurden Gefrierschnitte nach Aufbereitung des Hirngewebes auf Objektträger überführt und anschließend entsprechend gefärbt.

2.5.1 MOVAT-Pentachrom Färbung nach Verhöff

Objektträger mit je 4 Hirnschnitten von jedem Tier wurden in Küvetten überführt. Anschließend staffelte sich der Färbeablauf wie folgt (siehe Tabelle 3). Die angefärbten Strukturen in den histologischen Abbildungen waren wie folgt: Zellkerne

blau-schwarz, Zellplasma rötlich, elastische Fasern rot, Kollagen gelb, Grundsubstanz (Matrix) blau.

Tabelle 3: Färbeablauf MOVAT-Pentachrom Färbung nach Verhöff

Durchführung	Zeit in Minuten
1. Waschung (Leitungswasser)	5
2. Vorbehandlung mit 3%iger Essigsäurelösung	0,5
3. Erste Färbung mit 1%iger Acianblau-Lösung (Glycosaminoglycane, Mucine)	30
4. Waschung (Aqua dest.)	1
5. Zweite Färbung mit Verhöff-Gebrauchslösung (Zellkerne)	6
6. Waschung (Aqua dest.)	10
7. Dritte Färbung mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsinlösung (Zellplasma)	3
8. Spülung mit 1% Essigsäure	0,5
9. Beize mit 2%iger Phosphorwolframsäure	15
10. Entwässerung mit 100%igem Alkohol	1
11. Vierte Färbung mit 6% Safran du Gatains (Kollagenes Bindegewebe)	3
12. Entwässerung mit 100%igem Alkohol (Rotisol)	5
13. Eintauchen in Xylol	5
14. Eindeckelung mit Histomount	

2.5.2 Kombinationsfärbung von A β (Kongorot) und Eisenionen (Berliner-Blau)

Für die kombinierte Kongorot- und Berliner-Blau-Färbung wurden pro Tier 11 Hirnschnitte aus 11 Schnittebenen (1 Schnitt pro Ebene) wie folgt gefärbt (siehe Tabelle 4). Nach Durchführung der Färbung erscheinen die Zellkerne im Lichtmikroskop rot, Eisenionen blau und A β -Peptide orange-rot.

Tabelle 4: Färbeablauf Kombinationsfärbung Kongorot und Berliner-Blau

Durchführung	Zeit in Minuten
1. Waschung (Aqua destl).	0,5
2. Erste Färbung mit 10%ig Kaliumferrocyanidlösung (Kaliumhexacyanoferrat) und 25%iger Salzsäure (HCL) (Eisen-Ionen)	30
3. Waschung (Aqua dest.)	1
4. Zweite Färbung mit Kernechtrot (Zellkerne)	5
5. Waschung (Leitungswasser)	10

6. Dritte Färbung mit	20
- Gebrauchslösung 1 (Stammlösung (30 g Natriumchlorid in 200 ml Aqua dest. + 800 ml Rotisol)+1% Natriumhydroxid (NAOH))	
- Kongorot-Gebrauchslösung 2 (Stammlösung+ Kongorot 2,5g + NAOH) (A β)	10
7. Entwässerung mit 80%igem und 100%igem Alkohol (Rotisol)	5
8. Eintauchen in Xylol	5
9. Eindeckelung mit Histomount	

2.5.3 Kombinationsfärbung von A β (Thioflavin S/T) und Eisenionen (Berliner Blau)

Neben der Kongorot-Färbung existieren Thioflavin T und Thioflavin S als etablierte histopathologische Nachweismethoden für A β -Peptide (58–60). Die simultane Anfärbung von A β -Peptiden durch die Thioflavin-Färbungen und Eisenionen (Fe³⁺) in der Berliner-Blau-Färbung erfolgte zur Untersuchung der CAA bei gleichzeitiger Detektion von BHS-Störungen. A β -Peptide erscheinen nach Anfärbung mit Thioflavin dunkelrot im Lichtmikroskop.

Es wurden zwei Kombinationsfärbungen zum Vergleich durchgeführt: (i) Thioflavin S und Berliner-Blau, (ii) Thioflavin T und Berliner-Blau. Pro Tier wurden 11 Hirnschnitte aus 11 Schnittebenen (1 Schnitt pro Ebene) wie folgt gefärbt (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: Färbeablauf immunhistochemischer Detektion mittels Thioflavin T/S und Berliner Blau

Durchführung	Zeit in Minuten
1. Waschung (Aqua destl).	0,5
2. Erste Färbung mit 10%ig Kaliumferrocyanidlösung (Kaliumhexacyanoferrat) und 25%ig Salzsäure (HCL) (Eisen-Ionen)	30
3. Waschung (Aqua dest.)	1
4. Zweite Färbung mit Kernechtrot (Zellkerne)	5
5. Waschung (Leitungswasser)	10
6. Dritte Färbung (A β) mit 1%ig Thioflavin S oder 1%ig Thioflavin T	8
7. Entwässerung mit 80%igem und 100%igem Alkohol	5
8. Eintauchen in Xylol	5
9. Eindeckelung mit Histomount	

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Immunhistochemische Detektion von Kollagen Typ IV und Laminin

Zwölf Hirnschnitte pro Tier wurden gefärbt (siehe Tabelle 6). Anschließend wurden Lichtmikroskopische Aufnahmen (Leica) zur Quantifizierung in Image J (NIH, Maryland, USA) importiert.

Tabelle 6: Immunhistochemische Detektion von Kollagen IV und Laminin

Durchführung	Zeit in Minuten
1. Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	0,5
2. Inkubation mit Wasserstoffperoxid	15
3. Enzymverdau mit Pepsin (1 mg/ml in 0,2N HCL, 37 °C)	4
4. Blockierung der endogenen biologisch aktiven Moleküle mit 15% Ziegen-Normalserum (RT)	15
5. Inkubation mit dem Primärantikörper in 0,5% Triton X-100 in 0,1M PBS (PBSt) (i) Kaninchen-gegen-Ratte Kollagen IV, 1:500, AbCam Ab6586, Cambridge, UK oder (ii) Kaninchen-gegen Ratte Laminin, 1:500, Sigma-Aldrich L9396, Dorset, UK	Über Nacht
6. Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	1
7. Inkubation der Gewebeschnitte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper in PBSt (Ziege-gegen-Kaninchen IgG, 1:400, VECTOR BA-1000, Peterborough, UK)	60
8. Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	1
9. Inkubation mit ABC-Reagenz (1:200)	60
10. Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	1
11. Waschung mit Natrium-Acetatpuffer 0,1M (pH 6,0)	1
12. Inkubation mit DAB-Nickel-Lösungsansatz zzgl. Ammoniumchlorid, D-Glucose und Glucose-Oxidase	5
13. Entwässerung mit 80%igem und 100%igem Alkohol	5
14. Eintauchen in Xylol	5
15. Eindeckelung mit Histomount	

2.6.2 Immunhistochemische Endothel- und A β - Färbung

Der immunhistochemische Nachweis von A β erfolgte als Kombinationsfärbung mit dem FITC-gekoppeltem Solanum tuberosum Lektin (SLT) als Endothelmarker und dem Zellkernmarker 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (siehe Tabelle 7).

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI färbt spezifisch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA) der Zellkerne an. Gebunden an die DNA fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich, das Emissionsmaximum befindet sich bei 461 nm.

Fünf Koronarschnitte pro Tier je Gruppe wurden in den Färbeprozess inkludiert.

Tabelle 7: Färbeablauf immunhistochemische Detektion von A β und Endothelzellen

Durchführung	Zeit in Minuten
1. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5
2. Vorinkubation mit Citratpuffer (65°C)	30
3. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5
4. Blockierung endogen aktiver Moleküle mittels 10% Esel-Normalserum in PBSt	60
5. Inkubation mit der primären Antikörperlösung (PBSt + 5% Esel-Normalserum + STL-FITC (1:500, Axxora, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, GER) + Kaninchen-gegen-A β (1:500, Covance, Dedham, MA, USA) bei 4°C	Über Nacht
6. 3x Waschung mit PBS 0,01M pH 7,4	Je 5
7. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (PBSt+ 5% Esel-Normalserum + Cy3-gekoppeltes Esel-gegen-Kaninchen IgG, 1:500, Jackson Immuno Research, Philadelphia, USA)	2h
8. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5
9. Inkubation mit DAPI (1:10000; MoBiTec, Göttingen; GER)	20
10. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5
11. Entwässerung mit 50%igem, 70%igem, 90%igem und 100%igem Alkohol (Rotisol)	Je 5
12. Eintauchen in Xylol	5
13. Eindeckelung mit Histomount	

2.7 Transmission-Elektronenmikroskopie

Die Durchführung der TEM erfolgte unter Leitung von Herrn Anton Page, Biomedical Imaging Unit, Southampton mit Unterstützung durch Herrn Alan Moris, PhD.

Mit dem Transmission-Elektronenmikroskop ist eine Beurteilung der Ultrastruktur kleinster Zellbestandteile möglich. Für die Darstellung der Mikromorphologie zerebraler Kapillaren wurden zuvor angefertigte und in PBS 0,01M (pH 7,2) aufbewahrte, saggitale Hirnschnitte (100 µm) in die Regionen Kortex (frontoparietal), Striatum und Thalamus zerlegt. Eine anschließende Waschung der Gewebeschnitte mit isotonem Phosphat-Puffer (pH 7,2) begünstigte die feine Vernetzung und starke Denaturierung der Proteine. Eine Fixierung der Lipide mit Erhöhung des Gewebekontrastes wurde nachfolgend durch die Inkubation mit Osmiumtetroxid (1% in 0,1M PBS (pH 7,2), 1 h) erreicht. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (30% für 10 min, 50% für 10 min, 70% (in 2% Uranylacetat) für 40 min, 90% über Nacht und 2x 100% für je 10 min) wurden die Proben zunächst entwässert. Nach Lagerung der Gewebeproben in reinem Azetonitril (10 min) wurden diese in eine Azetonitril-Kunstharz (Resin)-Lösung (Verhältnis 1:1) (TAAB Laboratories Equipment, Aldermaston, UK) überführt und über Nacht gelagert. Es folgte die erneute Zugabe von flüssigem Kunstharz mit anschließender Transferierung und Polymerisierung der Proben in flüssigem Kunstharz bei 60 °C (über 18 h). Um die genaue Darstellung der Zellstrukturen zu gewährleisten wurden zunächst 0,5 µm dünne Schnitte an einem Ultramikrotom (Leica-Reichert Ultracut E ultra-microtome, Leica, UK) angefertigt und anschließend lichtmikroskopisch (Nikon 80i, Japan, 75x Vergrößerung) auf das Vorhandensein kapillärer Strukturen untersucht. Vorselektierte Schnitte mit einer ausreichenden Anzahl an Kapillaren wurden schließlich zu Ultradünnschnitten (90 nm) verdünnt und auf Kupfer-Palladium-Netze überführt.

2.8 Stereotaktische A β - Injektion in SHRSP

Um den Transport und die Verteilung von A β in den Wänden kleiner Arterien, Arteriolen und Kapillaren *in vitro* zu beobachten, erfolgte die stereotaktische Injektion von fluoreszenzmarkiertem A β in den Hippokampus der Ratten. Die Tiere wurden zu

Beginn mit Pentobarbital (1 ml pro 100 g Körpergewicht, intraperitoneal appliziert) narkotisiert. Ein Erlöschen des Lidschlussreflexes und Greifreflexes galt als Indikator für eine ausreichende Narkotisierungstiefe. Für die Stereotaxie wurde der Kopf der Tiere in einer Stereotaxie-Apparatur (Stölting Europe, Dublin, IRL) frontal (Nase) und temporal (Schädelkalotte) fixiert. Eine Konstanthaltung der Körpertemperatur bei 37 °C wurde durch Verwendung einer Wärmematte (Harvard Apparatus, March, GER) gewährleistet. Mit einer Inzision der Kopfhaut, median entlang der Kopfoberfläche, wurde zunächst die Schädelkalotte freigelegt. Unter Verwendung einer 3%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung erfolgte anschließend die Reinigung und Desinfektion des Schädels. Die Koordinaten zur Auffindung des linken Hippokampus wurden online dem anatomischen Handbuch für Stereotaxie an Ratten entnommen und konsekutiv nach Übertragung der Koordinaten auf das Rattenhirn (Koordinaten ausgehend von Bregma: Anterior-posterior (A-P) = -3,7 mm; Medio-Lateral (M-L) = 3,0 mm; Deep-Vertical (D-V) = 3,5 mm) ein Loch durch Schädelkalotte und Dura mater gebohrt (siehe Abbildung 6, Tabelle 9) ⁸⁵. Unter Ausrichtung der in der Apparaturenvorrichtung eingespannten Injektionsnadel (4970 Energy Way, Reno, Nevada, USA) erfolgte die Injektion von 0,5 µl fluoreszenzkonjugiertem Aβ 1-40 (HiLyte Fluor 555-konjugiert, AnaSpec, USA; 3 µl in 1% NH₄OH) innerhalb von 2,5 Minuten in den linken hinteren Hippokampus. Anschließend erfolgte die sofortige Perfundierung der Tiere, Entnahme der Hirne und Versendung dieser nach Southampton zur Durchführung der Färbung (siehe Tabelle 8). Zur Sichtbarmachung einer Aβ-Akkumulation in den Wänden kleiner Arterien, Arteriolen und Kapillaren erfolgte die zusätzliche Anfärbung glatter Muskelzellen mittels *α-Smooth muscle actin* (*α-SMA*):

Tabelle 8: Färbeablauf zur Detektion von von glatten Muskelzellen (*α-SMA*) nach Aβ-Injektion

Durchführung	Zeit in Minuten
1. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5
2. Blockierung endogen aktiver Moleküle mittels 10% Esel-Normalserum in PBSt	60
3. Inkubation mit der primären Antikörperlösung (PBSt + 5% Esel-Normalserum + Maus anti- <i>α-SMA</i> (1:250, Sigma-Aldrich L9396, Doret, UK) bei 4°C	Über Nacht
4. 3x Waschung mit PBS 0,01M pH 7,4	Je 5
5. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (PBSt+ 5% Esel-Normalserum + Ziege-gegen-Maus IgG AF488, 1:200, Invitrogen A11029, Paisley, UK)	2h
6. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5

7. Inkubation mit DAPI (1:10000; MoBiTec, Göttingen; GER)	20
8. 3x Waschung mit PBS 0.01M, pH 7,4	Je 5
9. Entwässerung mit 50%igem, 70%igem, 90%igem und 100%igem Alkohol (Rotisol)	Je 5
10. Eintauchen in Xylol	5
11. Eindeckelung mit Histomount	

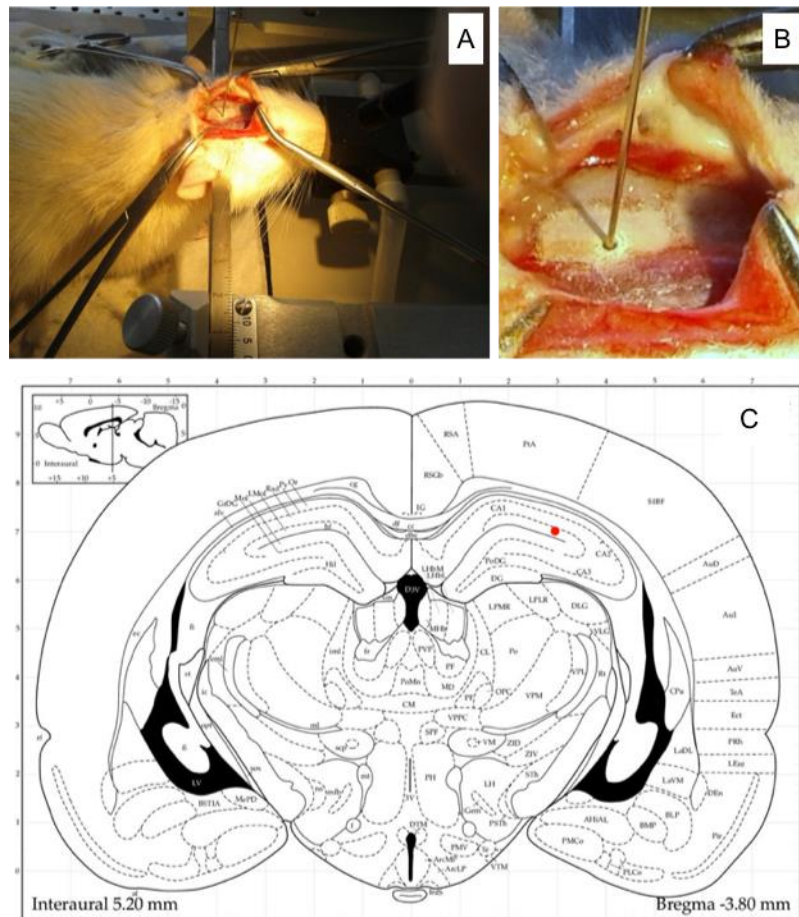


Abbildung 6: Photographische Darstellung der stereotaktischen Prozedur und Ausschnitt aus dem digitalen anatomischen Atlas von Rattenhirnen

A: Fixierung der Ratte an Nase und Schädelkalotte (temporal) in der Stereotaxie-Apparatur. B: Darstellung der freigelegten Schädelkalotte mit Injektionsnadel im Bereich des linken, dorsalen Hippokampus. C: Koronarschnitt eines Rattenhirnes; mit rot markiert ist der verwendete Zielort im linken, dorsalen Hippokampus.

Entnommen aus Paxinos, George and Charles Watson, Elsevier, 2006(61).

Tabelle 9: Verwendete Koordinaten für die stereotaktische A β -Injektion in den linken Hippokampus in SHRSP und Wistar-Ratten

A-P: Anterior-Posterior, M-L: Medial-Lateral; DV: Dorsal-Ventral

	Gewicht in Gramm	Koordinaten ausgehend vom Bregma		
		A-P (in mm)	M-L (in mm)	D-V (in mm)
SHRSP				
1	365	6,83	3,46	1,95
2	415	5,9	3,05	1,33
3	333	5,82	3,16	1,41
Wistar				
W1	534	5,88	3,27	1,77
W2	468	6,23	3,24	1,66
W3	575	6,4	3,53	1,83

2.9 Datenanalyse und Quantifizierung

2.9.1 Histologische Untersuchung der Gefäßwanddicke (MOVAT-Färbung)

Pro Tier wurden in vier Hirnschnitten mittels Lichtmikroskopie (Typ Leica DMR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit einer Vergrößerung von 20x vier Sichtfelder auf das gesamte Gehirn verteilt, im Sinne einer explorativen Analyse, betrachtet. Es wurden pro Sichtfeld alle Gefäße in die Quantifizierung einbezogen, deren luminaler Durchmesser bestimmt, sowie die Wanddicke unter Abmessung des dünnsten und des dicksten Bereiches (zwei Messungen pro Gefäß) mit anschließender Mittelwertbildung errechnet. Entsprechend des Diameters wurden Gefäße als Arteriolen (20-60 μm) oder kleine Arterien (>60 μm) klassifiziert.

2.9.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen IV bzw. Laminin

Betrachtet wurden regionale (Parietalkortex, Thalamus, Basalganglien), interindividuelle (SHRSP vs. Wistar) und kaliberabhängige (Kapillaren vs.

Arteriolen/kleine Arterien) Expressionsunterschiede der Basalmembranmarker Laminin und Kollagen IV. Entsprechend der Hirnregion (Kortex, Striatum, Thalamus) erfolgte die Quantifizierung der lichtmikroskopischen Aufnahmen (Leica) in 4 Blickfeldern pro Region mit dem Bildanalyseprogramm Image J (NIH, Maryland, USA). Es wurde ein Grenzwert für Signalintensität und Durchmesser der Gefäße ($>15 \mu\text{m}$) festgelegt. Gefärbte Areale oberhalb des Intensitäts-Schwellenwertes und je nach Erfassung von Kapillaren oder Arterien ober- oder unterhalb des Größen-Grenzwertes von $>15 \mu\text{m}$ wurden so als Zielstruktur maximal erfasst, bei gleichzeitiger Minimierung möglicher Hintergrundaktivität. Oberhalb des Schwellenwertes liegende Bereiche waren somit als positiv definiert und gaben Auskunft über den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche (pro Blickfeld). Zudem wurde die Anzahl an Gefäßen pro Blickfeld erfasst.

2.9.3 Histologische und Immunhistochemische Untersuchung von endogenem A β

Es erfolgte eine zweistufige Analyse von immunhistochemisch oder histologisch angefärbten A β -Ablagerungen innerhalb der Gefäßwände von Kapillaren und Arteriolen. Zunächst wurden alle angefärbten Hirnschnitte auf das Vorhandensein von gefäßwandständigen A β -Ablagerungen untersucht. Bei Vorhandensein erfolgte eine Erfassung aller A β -beladenen Gefäße in drei Blickfeldern pro Hirnschnitt. Die weitere Quantifizierung erfolgte nach regionalem Verteilungsmuster (Kortex, Striatum, Hippokampus, Thalamus).

2.9.4 Verteilung von intrazerebral injiziertem A β

Es wurden Gefäße mit Nachweis von α -SMA und A β in jeweils zwei Blickfeldern pro Hirnschnitt betrachtet. Pro Tier wurden vier Hirnschnitte einbezogen, sodass am Ende 8 Blickfelder pro Tier in die Auswertung inkludiert wurden. Mittels Image J (NIH, Maryland, USA) erfolgte die Quantifizierung unter Verwendung eines Schwellenwertes für Signalintensität, Diameter der Gefäße ($>15 \mu\text{m}$) und Trennung der Farbkanäle. Analysiert wurde der prozentuale Anteil an detektiertem Signal (indikativ für α -SMA

und A β Ko-Färbung) in Relation zu isoliert α -SMA-positiven Gefäßen im gesamten Blickfeld (siehe 2.9.2). Eine Ko-lokalisierung von α -SMA und A β entsprach einer A β -Akkumulation in den Wänden kleiner Arterien, Arteriolen und Kapillaren.

2.9.5 Analyse der zerebrovaskulären Basalmembran mittels Transmission-Elektronenmikroskopie

Hirngewebe auf drei ultradünnen Karbon-beschichteten TEM Grids (Netzträgern) pro Tier wurden zur Untersuchung der Kapillaren von Kortex, Striatum, Hippokampus und Thalamus einbezogen. Kapillaren wurden definiert als Gefäße mit einem Gefäßlumen von 4-15 μ m, umgeben von einer Schicht Endothelzellen, sowie interendothelialen Tight junction Molekülen und umsäumt von einer gemeinsamen Basalmembran von Endothelzellen und Astrozyten. Für die weiterführende Analyse wurden fünf senkrecht erfasste Kapillaren mit einer Vergrößerung von x9.0000 erfasst. Nachfolgend wurde in einer Vergrößerung von x50.000 die durchschnittliche Dicke der Basalmembran (BM) mittels 20 Einzelmessungen im Bereich des dünnsten BM-Durchmessers und im gegenüberliegenden Abschnitt der BM quantifiziert (ITEM Software, Olympus, UK). Zusätzlich erfolgte die morphologische Inspizierung der kapillären Gefäßwände (Photoshop CS software, Adobe, UK) mit Beurteilung endothelialer Vakuolen, Ausbuchtung der Endothelzellen in das Gefäßlumen, strukturell veränderter Tight Junctions, sowie abnormer Morphologie der Perizyten.

2.10 Statistik

Zur Auswertung der Wanddicke nach Anfärbung mittels MOVAT-Pentachrom wurde der Zweistichproben t-Test angewandt und die Mittelwerte der Gefäßwanddicken von SHRSP und Wistar-Ratten pro Altersgruppe miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ gesetzt.

Für die Untersuchung relevanter Gruppenunterschiede zwischen Wistar-Ratten und SHRSP wurden generelle lineare Modelle angewandt. Als unabhängige Variable galt jeweils das Tiermodell. Als abhängige Variable flossen ein der prozentuale Anteil an

detektiertem Signal (ImageJ) indikativ für immunhistochemisch markiertes Kollagen und Laminin pro Blickfeld, die Dicke der Basalmembran und das Verhältnis von A β / α -SMA-doppelt-positiven Gefäßen zu allen α -SMA-positiven Gefäßen.

Histochemische und immunhistochemische Färbungen, sowie Daten der Elektronenmikroskopie wurden mittels parametrischer und nicht parametrischer Korrelationen zum Alter der Tiere in Beziehung gesetzt.

Für die Gruppenvergleiche wurde das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl untersuchter Regionen korrigiert:

- Immunhistochemisch detektiertes Kollagen IV/Laminin (jeweils drei Regionen untersucht) $p \leq 0,05/6 = 0,008$;
- Dicke der Basalmembran (vier Regionen untersucht) $p \leq 0,05/4 = 0,013$;
- Gefäßständiges A β nach stereotaktischer hippokampaler A β -Injektion $p \leq 0,05$

3. Ergebnisse

3.1 Histologische Untersuchung der vaskulären Extrazellulärmatrix

Die lichtmikroskopische Untersuchung der vaskulären Extrazellulärmatrix mittels MOVAT-Färbung ergab eine signifikante, altersabhängige, vornehmlich konzentrische Verdickung der Gefäßwände von Arteriolen und kleinen Arterien in SHRSP verglichen mit Kontrolltieren (siehe Abbildung 7, Abbildung 8). Entsprechend der Färbungen entsprachen Wandverdickungen der Arteriolen einer Zunahme an Kollagen und weiteren Matrixproteinen (v.a. Glycosaminoglycane). Mehrheitlich waren die Gefäße der SHRSP zudem von einem gelb-roten Randsaum umgeben, indikativ für Kollagen. Die Gefäße der Wistar Ratten wiesen altersunabhängig eine dünnere Gefäßwand auf.

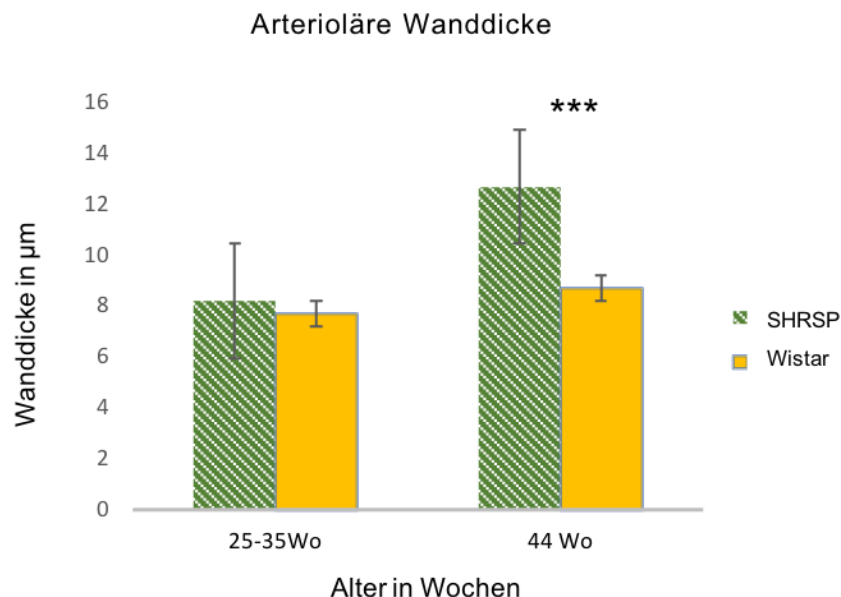


Abbildung 7: Quantifizierung der Basalmembrandicke von SHRSP und Kontrolltieren nach histologischer Färbung mittels MOVAT-Pentachrom

In SHRSP zeigte sich eine altersabhängige signifikante Dickenzunahme der arteriolen Gefäßwände ($p < 0,001$). SHRSP: Spontan hypertensive stroke-prone Ratte. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. SHRSP n=23, Wistar n=23.

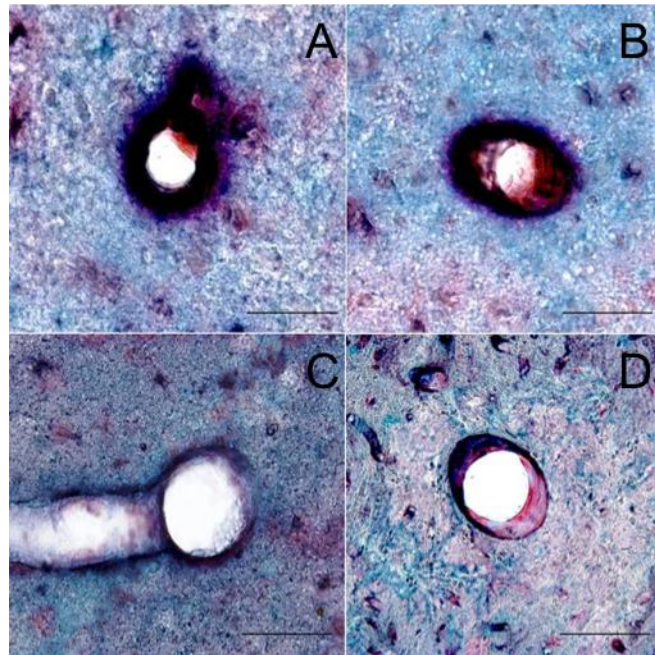


Abbildung 8: Histologische Darstellung arteriolärer Gefäßwände mittels MOVAT-Pentachrom Färbung

A & B: Ausgeprägte Verdickung arteriolärer Gefäßwände als Indikator für eine Proliferation der Extrazellulärmatrix in SHRSR. C & D: Vergleichsweise dünne arterioläre Gefäßwände in Wistar Kontrolltieren. A & B: SHRSR 44 Wochen, Thalamus; C: Wistar 44 Wochen Striatum; D: Wistar 44 Wochen Hippokampus.

Maßbalken entsprechen 50µm. SHRSR: Spontan hypertensive stroke-prone Ratte.

3.2 Expressionslevel von Laminin und Kollagen IV innerhalb der Gefäßwände

Hierbei zeigte sich in SHRSR im Vergleich zu Wistar-Ratten ein signifikant höherer Kollagen IV-Anteil in Arteriolen und Arterien unabhängig von der untersuchten Hirnregion (siehe Abbildung 9). Am Deutlichsten kam dies im Striatum ($p = 0,002$) zur Darstellung, nachfolgend auch im Kortex ($p = 0,003$) und im Thalamus ($p = 0,005$) (siehe Tabelle 10). Innerhalb kapillärer Gefäßwände war kein interindividueller Unterschied von Kollagen IV objektivierbar. Abbildung 10 zeigt die immunhistochemische Detektion von Kollagen IV in SHRSR und Wistar Ratten.

Die Färbeintensität von Laminin war ohne signifikante interindividuelle und regionale Unterschiede.

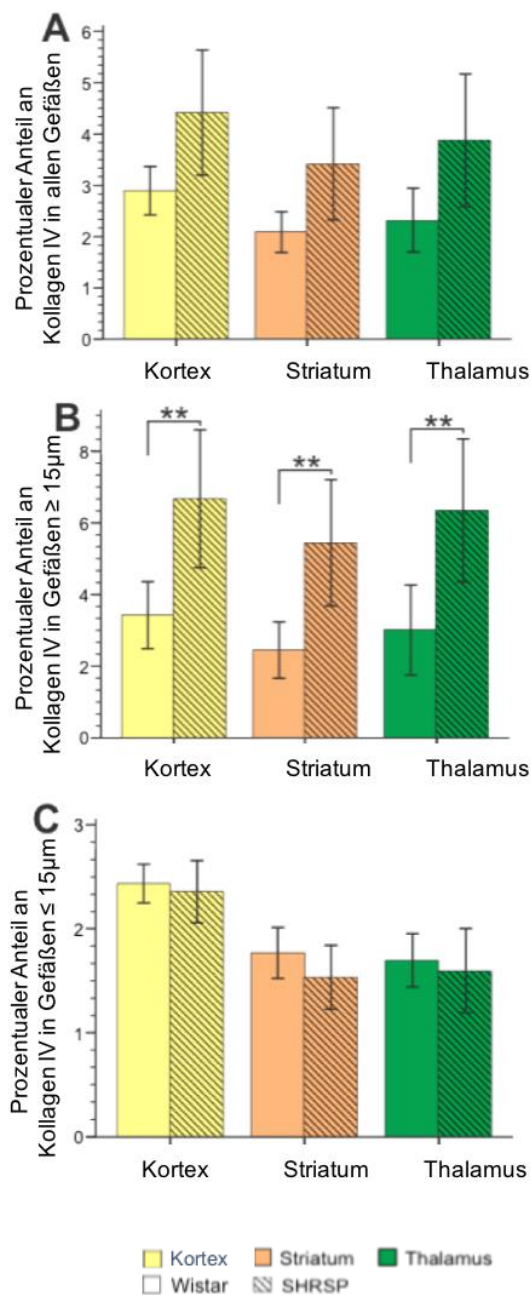


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von Collagen IV in SHRSP und Wistar-Kontrolltieren

Die Histogramme veranschaulichen den prozentual erhobenen Anteil an Collagen IV in SHRSP und Wistar-Kontrolltieren mit regionalen Unterschieden innerhalb kleiner Gefäße (A), isoliert in kleinen Arterien und Arteriolen mit einem Durchmesser $\geq 15\mu\text{m}$ (B) und spezifisch in Kapillaren mit einem Durchmesser $\leq 15\mu\text{m}$ (C). In Arteriolen und kleinen Arterien war der prozentuale Anteil an detektiertem Collagen IV pro Sichtfeld signifikant höher in SHRSP verglichen mit Wistar-Kontrolltieren in Kortex, Striatum und Thalamus (B). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. SHRSP n=15, Wistar n=15.

SHRSP - Spontan hypertensive stroke-prone Ratte.

Tabelle 10: Prozentualer Anteil an detektiertem Signal mittels Image J, indikativ für Kollagen IV in Gefäßwänden der SHRSP und Wistar Ratten innerhalb der spezifischen Regionen

SHRSP: Spontan hypertensive stroke-prone Ratte. Das Signifikanzniveau wurde nach Korrektur des α -Fehlers mit $p \leq 0,008$ definiert; signifikante p-Werte sind farbig markiert. Werte entsprechen dem prozentualen Anteil an detektiertem Signal (Kollagen IV) im Verhältnis zum Gesamtblickfeld erfasst mittels Image J. In die Analyse wurden 15 SHRSP und 15 Wistar Ratten im Alter von 18-32 Wochen inkludiert.

		Wistar	SHRSP	
Gefäße	Region	Durchschnitt [SD]	Durchschnitt [SD]	F-ratio (p-Wert)
Kollagen IV In allen Gefäßen	Cortex	2,90 [1,29]	4,40 [3,18]	6,59 (0,013)
	Striatum	2,09 [1,07]	3,39 [2,92]	6,17 (0,016)
	Thalamus	2,32 [1,73]	3,91 [3,48]	5,45 (0,023)
Kollagen IV in Gefäßen >15 µm	Cortex	3,40 [1,71]	6,67 [3,42]	10,95 (0,003)
	Striatum	2,44 [1,42]	5,46 [3,14]	11,51 (0,002)
	Thalamus	2,99 [2,28]	6,30 [3,58]	9,46 (0,005)
Kollagen IV in Gefäßen <15 µm	Cortex	2,43 [0,37]	2,40 [0,56]	0,21 (0,65)
	Striatum	2,44 [1,42]	1,58 [0,57]	1,52 (0,23)
	Thalamus	1,69 [0,5]	1,60 [0,75]	0,40 (0,53)

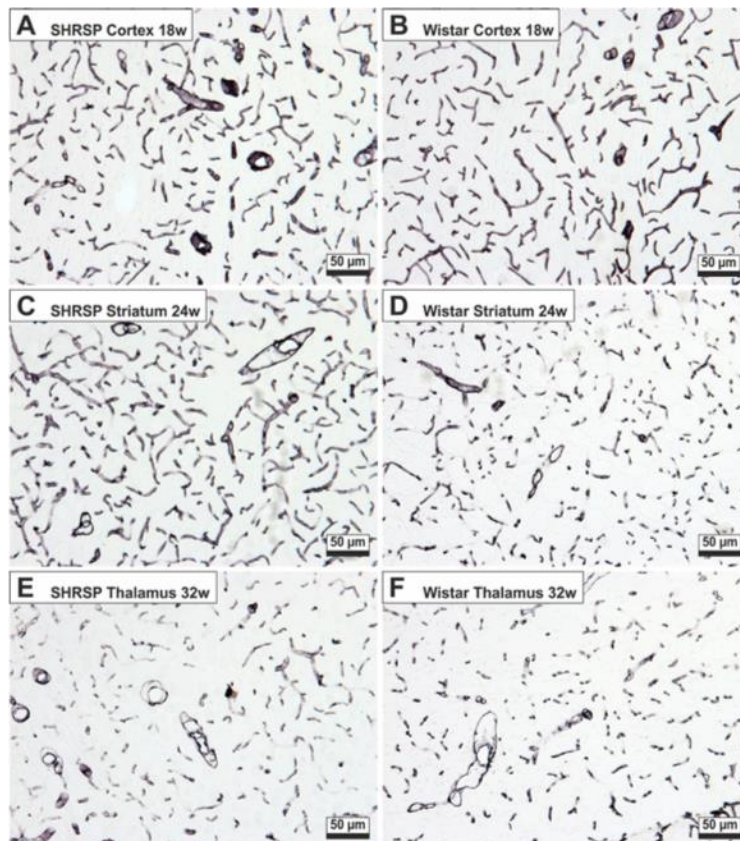


Abbildung 10: Bildmorphologische Darstellung Kollagen-IV-angefärbter Gefäße

Immunhistochemische Detektion von Kollagen IV In SHRSP (A, C, E) und Wistar-Ratten (B, D, F) mit regionaler Differenzierung in Kortex (A & B), Striatum (C & D) und Thalamus (E & F). Es zeigte sich ein signifikant höherer prozentualer Anteil an detektiertem Kollagen IV in angefärbten Hirnschnitten männlicher SHRSP verglichen mit gleichaltrigen männlichen Wistar-Kontrolltieren.

SHSRP: Spontan hypertensive stroke-prone Ratte, w: Wochen.

3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung pathomorphologischer Veränderungen kapillärer Gefäßwände

In Kooperation mit der Forschungsgruppe von Frau Prof. Carare, Institute of clinical Neuroscience, Southampton erfolgte eine altersabhängige, regionale und interindividuelle Beurteilung kapillärer Gefäßwände mit Betrachtung des Diameters, qualitativen Veränderungen und quantitativen Auffälligkeiten. Mit zunehmendem Alter zeichnete sich innerhalb der SHRSP eine Zunahme des Durchmessers kapillärer Basalmembranen ab (siehe Tabelle 11 und Abbildung 11); interindividuell erschien die Basalmembran hippokampal, striatal und thalamisch signifikant dicker in SHRSP verglichen mit gleichaltrigen Kontrolltieren. Ein solcher Trend zeichnete sich auch bei

Betrachtung kortikaler Kapillaren ab. Innerhalb der Wistar-Kontrolltiere ließen sich keine relevanten altersabhängigen oder regionalen Unterschiede feststellen.

Tabelle 11: Mittels Elektronenmikroskopie erhobene Diameter kapillärer Basalmembranen in SHRSP und Wistar-Ratten

Dicke der kapillären Basalmembran in Nanometer (nm) mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung (SD) in jeweils neun untersuchten Wistar Ratten und SHRSP. Ein signifikanter Gruppenunterschied zeigte sich in striatal, hippocampal und thalamisch gelegenen Kapillaren (signifikante p-Werte **fett** markiert). F-Ratio: Varianz der Werte innerhalb einer Region und Gruppe dividiert durch die Varianz der Werte innerhalb einer Region beider Gruppen.

		Wistar, n=9	SHRSP, n=9	
	Region	Mittelwert [SD]	Mittelwert [SD]	F-Ratio (p-Wert)
Dicke der Basalmembran in mm	Kortex	52,19 [3,26]	68,14 [17,82]	6,98 (0,018)
	Striatum	51,76 [5,53]	67,22 [10,83]	19,43 (0,001)
	Hippokampus	52,93 [4,86]	66,06 [8,25]	22,7 (< 0,001)
	Thalamus	51,65 [4,39]	64,22 [10,68]	8,38 (0,004)

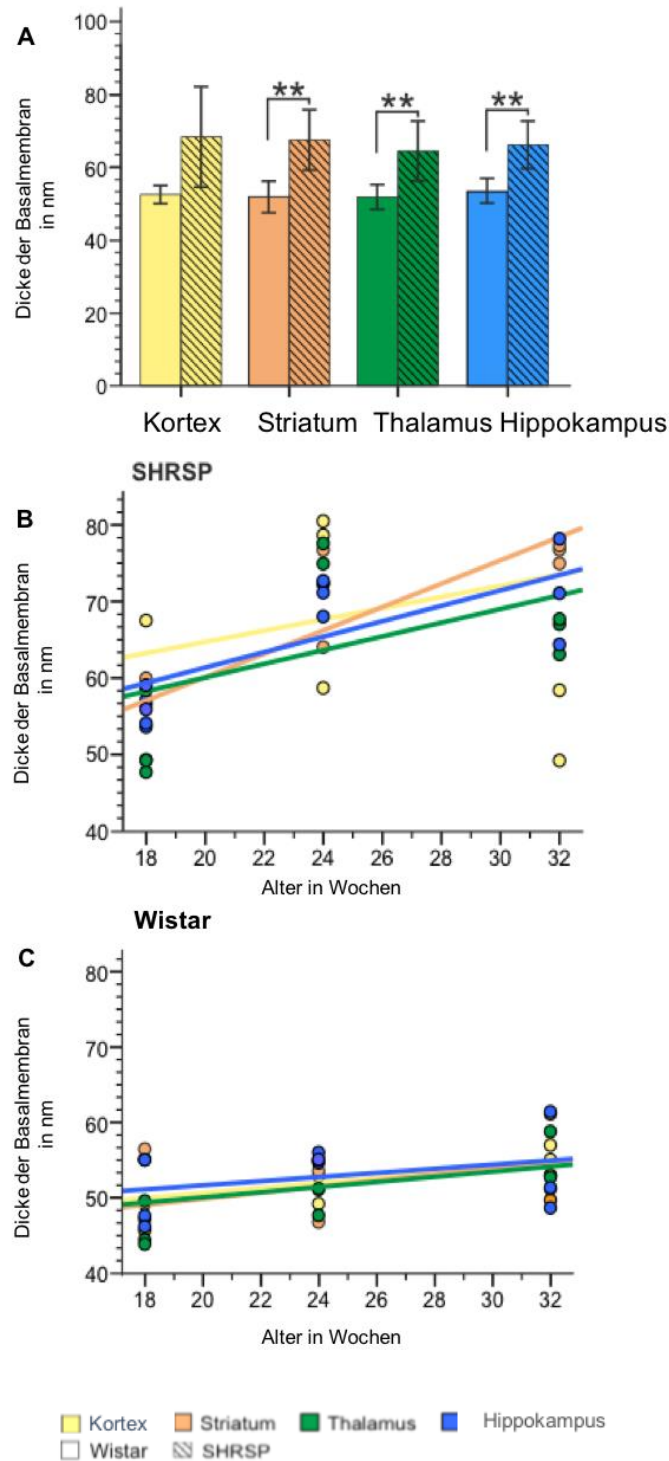


Abbildung 11: Dicke der Basalmembranen von Kapillaren in Abhängigkeit von Tiermodell, Alter und Hirnregion ermittelt mittels TEM

SHRSP wiesen striatal, hippokampal und thalamisch im Vergleich zu Wistar-Ratten Kapillaren mit signifikant dickeren Basalmembranen auf (A). Weiterhin zeigten SHRSP bei elektronmikroskopischer Betrachtung (TEM) eine signifikante Dickenzunahme mit steigendem Alter (B). Eine relative altersabhängige Zunahme der Basalmembran war auch bei der Wistar-Ratte zu erkennen (C).

Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall, ** $p \leq 0,01$. SHRSP und Wistar jeweils 18w - n=3, 24w - n=3, 32w - n=3. SHRSP: Spontan hypertensive stroke-prone Ratte, w: Wochen.

Elektronenmikroskopisch lagen bei beiden Rattenstämmen qualitative pathomorphologische Veränderungen der kapillären Gefäßwände vor (siehe Abbildung 12). In SHRSP war dies eine altersunabhängige Beobachtung (18-32 Wochen). Wistar Ratten wiesen diese Veränderungen erst in einem fortgeschrittenen Alter (32 Wochen) auf. Innerhalb der Endothelzellen imponierte eine vermehrte Anzahl von Lysosomen und Lipofuscinablagerungen. Weiterhin wiesen Endothelzellen (v.a. striatal und hippokampal) und Perizyten (v.a. kortikal) eine veränderte Morphe mit vermehrten Einstülpungen (Kaveolen) auf. Hierdurch bedingt zeigte sich die interzelluläre Konnektivität zwischen den Endothelzellen mittels Tight Junctions beeinträchtigt.

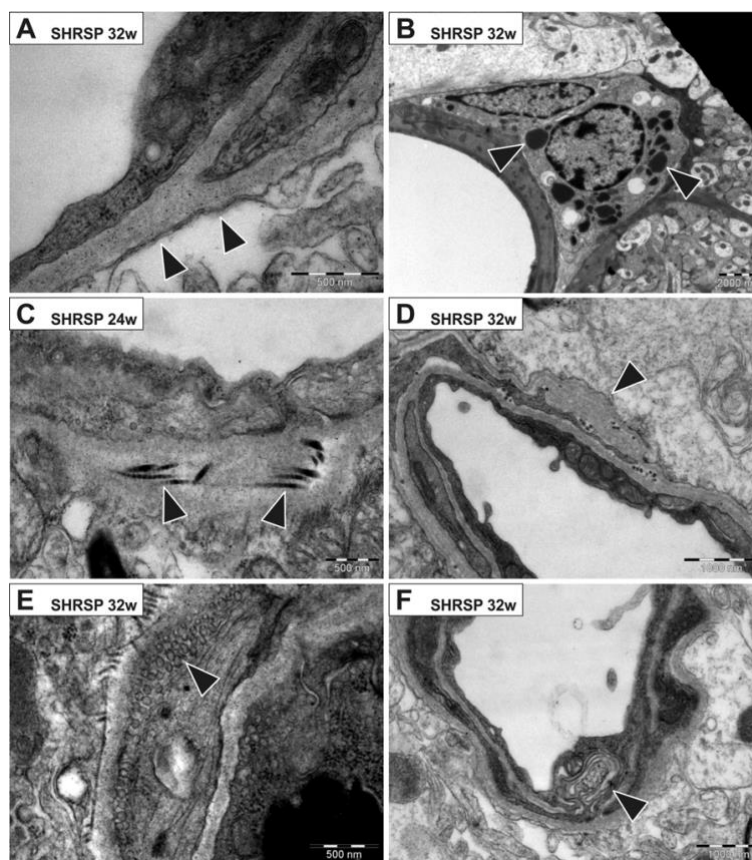


Abbildung 12: Mikroskopische Darstellung pathomorphologischer Gefäßwandveränderung kortikaler Kapillaren in SHRSP.

Ultrastrukturelle Veränderung zerebraler Gefäßwände der SHRSP (24-32w): (A) Diskontinuierliche Ausbreitung der Astrozytenendfüße (Pfeil) entlang des Endothels mit intermittierenden endothelialen Auftreibungen; (B) Lipofuscin-Akkumulation (Pfeil) innerhalb von Perizyten; (C) Ablagerung fibrillärer Strukturen (Pfeil) innerhalb der Basalmembran; (D) Hypertrophie der kapillären Basalmembran (Pfeil); (E) überschießende Vakuolenbildung (Pfeil) in Perizyten und Endothelzellen; (F) Morphologie von Tight Junctions (Pfeil).

SHRSP: Spontan hypertensive stroke-prone Ratte; w: Wochen.

3.4 Endogene A β - Ablagerungen innerhalb kapillärer, arteriolärer und arterieller Gefäßwände

In der Histologie waren kleine Arterien/Arteriolen und Kapillaren zu gleichen Anteilen von A β -Ablagerungen betroffen. Regional war eine Prädominanz der CAA innerhalb des Hippokampus ersichtlich (Hippokampus 90%, Kortex 50%, Thalamus 50%, Striatum 40%). Das A β erschien plaqueartig in dichten Verbänden, vorwiegend abluminal lokalisiert. Vereinbar mit den histologischen Befunden lieferten immunhistochemische Nachweismethoden von A β den bildgebenden Befund einer CAA in 90% der untersuchten SHRSP älter als 28 Wochen. In 95% der A β -Ablagerungen konnten zusätzlich Eisenablagerungen nachgewiesen werden, indikativ für eine begleitende BHS-Störung (Kortex 95%, Striatum 97%, Hippokampus 97%, Thalamus 96%) (siehe Abbildung 13). Voruntersuchungen unserer Gruppe ergaben, dass Wistar Kontrollratten keine endogenen Amyloidablagerungen aufweisen, weshalb hier auf die Untersuchung der A β -Pathologie in den Kontrolltieren verzichtet wurde.

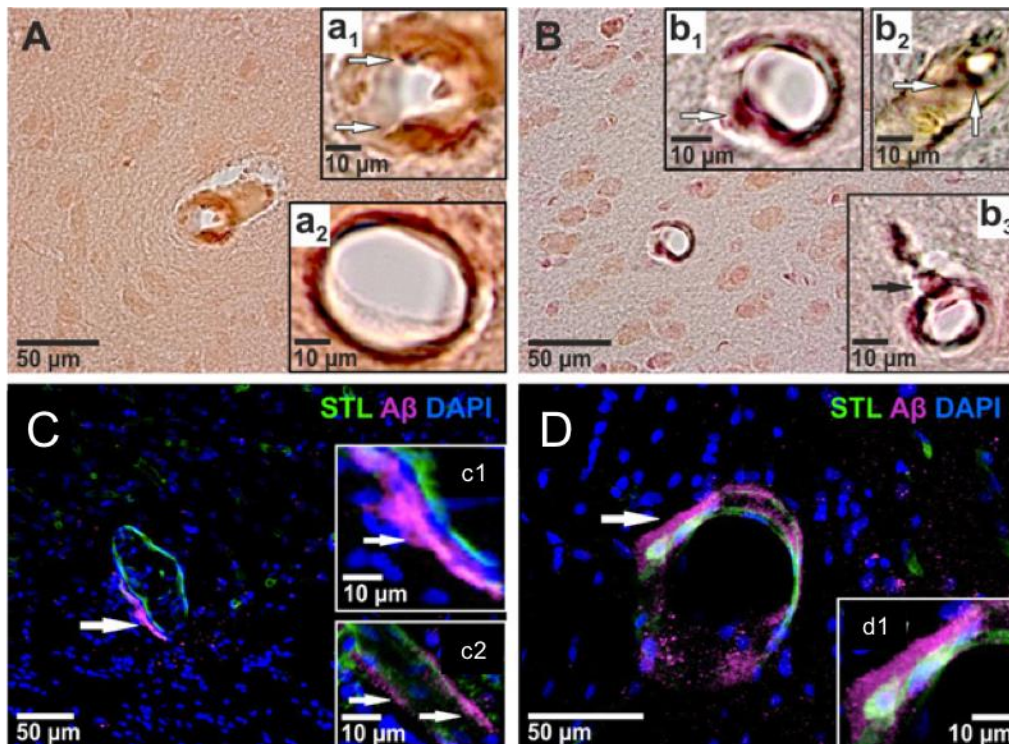


Abbildung 13: Histochemischer und immunhistochemischer Nachweis einer zerebralen Amyloidangiopathie in SHRSP

Amyloidablagerungen (dunkelrot in Thioflavin T-Färbung; rot-orange in Kongorot-Färbung) innerhalb kapillärer (**a1**, **b2**, **b3**, **c2**) und arteriolärer/arterieller Gefäßwände (**a2**, **b1**, **c1**). Mit Pfeilen markiert (a1, b1-b3) sind gefäßwandständige Akkumulationen von Eisen-Ionen, indikativ für eine Blut-Hirn-Schrankenstörung, umsäumt von Amyloidablagerungen. Immunhistochemisch kam das endogene Amyloid- β ($A\beta$) vorwiegend abluminal lokalisiert zur Darstellung (**C-D**, Pfeile).

STL: Solanum Tuberosum Lectin-fluorescein isothiocyanat (Endothelmarker); DAPI: 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole (Zellkernmarker); A,a1, a2: Berliner Blau/Kongorot -Färbung; B, b1, b3: Berliner Blau/Thioflavin T-Färbung; b2: Berliner Blau/Thioflavin S-Färbung; C, c1, c2: Immunhistochemie; A, a1, B, b1, b3: 18 Wochen; a2, b2, C, c1, c2, D, d1: 32 Wochen.

3.5 Verteilungsverhalten von intrazerebral injiziertem $A\beta$ innerhalb kapillärer, arteriolärer und arterieller Gefäßwände

Nach stereotaktischer Injektion von fluoreszenz-markiertem $A\beta$ erschien eine in Kapillaren, Arteriolen und Arterien wandständige $A\beta$ -Ablagerung in Form einer CAA ohne signifikante Unterschiede zwischen SHRSP und Wistar-Kontrollratten (alle Tiere betroffen)(siehe Abbildung 14). In SHRSP zeigte sich eine relativ höhere Gefäßanzahl α -SMA angefärbter Gefäße mit wandständigem $A\beta$, jedoch ohne statistische Signifikanz.

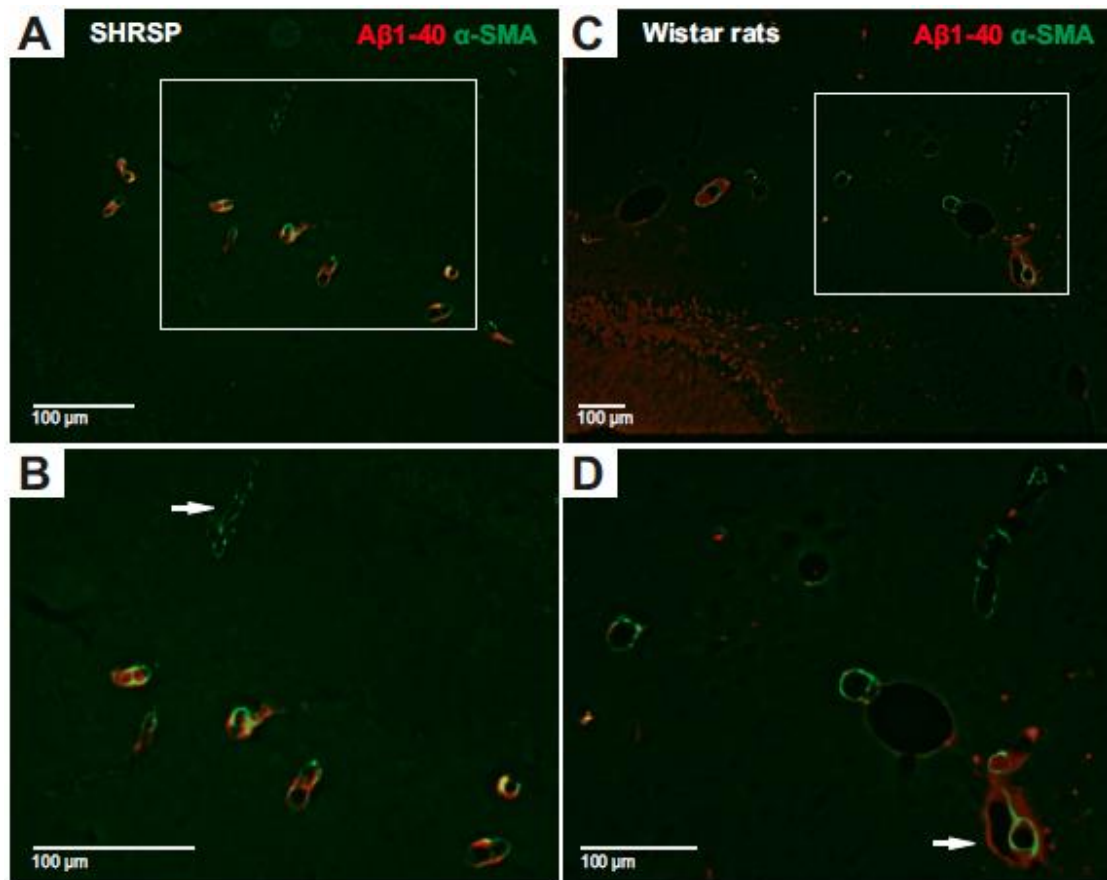


Abbildung 14: Gefäßwandständige Amyloid-Ablagerungen nach hippocampaler stereotaktischer Aβ - Injektion

Fluoreszenzmarkiertes Aβ (rot) innerhalb α-SMA-positiver Arteriolen und kleiner Arterien (grün) in SHRSP (**A & B**) und Wistar-Ratten (**C & D**). Obgleich einer fehlenden statistischen Signifikanz war eine Ko-lokalisierung von Aβ und α-SMA (gelb) häufiger in SHRSP vorzufinden verglichen mit Wistar-Kontrolltieren. SHRSP wiesen nur vereinzelt Gefäße auf ohne Nachweis von Aβ (Pfeil in B), während in Wistar Ratten Aβ-beladene Gefäße nur vereinzelt zu sehen waren (Pfeil in D). Beispielhaft in D dargestellt sind Aβ-Ablagerungen im perivaskulären Raum.

α-SMA: α-Smooth Muscle Actin, Aβ: Amyloid beta, SHRSP: Spontan Hypertensive Stroke-Prone Ratte.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnten qualitative und quantitative Unterschiede der Gefäßwände zwischen SHRSP und Wistar Ratten festgestellt werden: der Kollagengehalt subkortikal und kortikal gelegener arteriolärer und arterieller Gefäßwände erschien in SHRSP altersunabhängig signifikant erhöht und elektronenmikroskopisch ließen sich verdickte Basalmembranen in der SHRSP objektivieren. A β konnte an Orten einer gestörten Blut-Hirn-Schranke in SHRSP nachgewiesen werden. Unterstützend ließ sich nach stereotaktischer Injektion eine vermehrte vaskuläre A β -Aggregation in der SHRSP detektiert.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen einen Zusammenhang zwischen Gefäßwandschädigung und Proteinopathie im Modell der SHRSP. Translational könnten die Ergebnisse auf einen kausalen Zusammenhang zwischen HA und CAA hindeuten.

Eine vermehrte Kollagenexpression innerhalb arterieller Gefäßwände wurde bereits als Risikofaktor für einen insuffizienten perivaskulären Abtransport von A β mit konsekutiver Entwicklung einer CAA diskutiert (39). Neben Kollagen IV konnten in früheren Studien bereits weitere Basalmembranbestandteile (Laminin, Nidogen und Perlecan) als Stellglieder vaskulärer Umbauprozesse identifiziert werden (20, 26). Ritz et al. konstatierten in Übereinkunft mit unseren Daten eine altersabhängige verdickte *Tunica media* innerhalb kleiner Arterien und Arteriolen in SHRSP und führten dies auf eine verminderte Aktivität von Kollagen IV Proteinase (u.a. MMP-9) zurück (57).

Die Beobachtung einer altersabhängigen Dickenzunahme endothelialer Basalmembranen und qualitativer Veränderungen einzelner Bestandteile in SHRSP war bereits aus früheren Studien bekannt (56). Hierbei handelt es sich vermutlich um einen kompensatorischen Ersatz degenerierter vaskulärer glatter Muskelzellen durch Zunahme der Extrazellulärmatrix (34, 35, 57, 62). Eine regionale Minderperfusion des Hirnparenchyms in Folge einer hypertensiven Arteriopathie wurde zuvor beschrieben (57, 63–65). Neben primär strukturellen Ursachen wurde ebenso eine reduzierte Ausschüttung vasodilatatorisch wirkender Botenstoffe (z.B. NO, Prostazyklin) als Trigger für eine Hypoperfusion diskutiert (66, 67). Mit dem Umbau der vaskulären Extrazellulärmatrix gehen eine endotheliale Dysfunktion und BHS-Störung (Zunahme

der transendothelialen und interendothelialen Permeabilität) einher (68). Der Nachweis eines perivaskulären Umgebungsödems in SHRSP stützt diesen Befund (48, 57, 69, 70). Tagami et al. führten darüber hinaus eine Hypertonie-getriggerte Destruktion von Perizyten als primäre Pathologie an der BHS an (71, 72). Der Nachweis ko-lokalisierter Eisenablagerungen neben abluminal detektiertem A β stützt darüber hinaus die Annahme dysfunktionaler Transportprozesse an Orten einer BHS-Störung (34, 35). Aus dem exklusiven Vorhandensein gefäßwandständiger A β -Ablagerung innerhalb der *Tunica media* leitete sich die Bedeutung der Extrazellulärmatrix und das Konzept der perivaskulären A β -Drainage für die Entwicklung einer CAA ab (28, 73–75).

Entscheidender Risikofaktor für die strukturellen und funktionellen Gefäßwandveränderungen zerebraler Kleingefäße und indikativ für die Gruppenunterschiede zwischen SHRSP und Wistar-Kontrollratten ist die chronisch arterielle Hypertonie (66, 76, 77). Verdeutlicht wurde dies durch die strukturellen Gefäßwandveränderungen, dem Nachweis vermehrter subkortikaler Mikroinfarkte in früheren Studien und der assoziierten vaskulären A β -Pathologie (78, 79).

In Abgrenzung der strikt kortikal gelegenen CAA Pathologie im Menschen zeigten sich gefäßwandständige A β -Ablagerungen in der SHRSP zudem vermehrt subkortikal. Als Erklärungsansatz kam eine modifizierte Gefäßarchitektur bei im Menschen gesondert vorhandenen perivaskulären Räumen entlang subkortikaler Gefäße in Betracht.

Eine Gegenüberstellung der Wistar Kontrollratte und der SHRSP lieferte Einblicke in pathomorphologische Besonderheiten beider Modelle. Das zu Grunde liegende Risikoprofil, ohne künstliche Erschaffung hypertensiver Blutdruckwerte (z.B. Okklusion der *A. cerebri media*) in SHRSP, lieferte die Voraussetzung für eine kontinuierliche Betrachtung Alters- und Hypertonie-assoziiierter Gefäßpathologien in beiden Rattenmodellen. Die Anwendung elektronenmikroskopischer Betrachtungen lieferte neben quantitativen und qualitativen Aussagen zu der Basalmembranen tiefer liegende Erkenntnisse über die Integrität der Tight Junction Moleküle und Perizyten. Dysfunktionen einer beeinträchtigten BHS ließen sich hierdurch direkt ableiten. Die zusätzliche Applikation von A β in SHRSP und Wistar Kontrollratten ließ bei Letzteren einen Rückschluss über Transportprozesse trotz fehlendem Vorhandensein von endogenem A β zu.

Unter Berücksichtigung der chronisch arteriellen Hypertonie als Risikofaktor für die Entwicklung einer HA und konsekutiv CAA kommt der Primär- und Sekundärprophylaxe der arteriellen Hypertonie besondere Bedeutung zu. Neben dem Einsatz antihypertensiver Medikamente bereits bei jungen pre-hypertensiven SHRSP (Primärprophylaxe), wäre zudem ein späterer Einsatz der Medikation mit Untersuchung der Reversibilität (Sekundärprophylaxe) pathomorphologischer Stigmata interessant. Als Langzeit-Outcome sollten kognitive Testungen angewandt werden.

Suboptimal war die nicht einheitliche Verwendung gleicher Altersgruppen bei den jeweiligen Experimenten. Eine unzureichende Betrachtung regionaler Unterschiede ließ nur eine eingeschränkte Beurteilung diesbezüglich zu. Suboptimal war ebenfalls eine zu Beginn nicht einheitlich vorgenommene Definierung des Cut-off Wertes zerebraler Arteriolen und Kapillaren. Statistisch signifikante Ergebnisse wären in der Stereotaxie möglicherweise durch eine Vergrößerung der Stichprobe erreicht worden. Schließlich ist zur Beantwortung der Frage der therapeutischen Konsequenz der Einsatz antihypertensiver Medikamente ausstehend.

Qualitative und quantitative Unterschiede innerhalb der Basalmembran, eine beeinträchtigte Integrität der BHS, sowie eine relevante endogene gefäßwandständige Amyloid-Last charakterisieren die SHRSP als ein valides Model zur Identifizierung zu Grunde liegender Pathomechanismen zerebraler Mikroangiopathien. Konsekutiv beeinträchtigte Transportfunktionen transmural und perivaskulär kommen ursächlich für den histologischen und immunhistochemischen Nachweis endogener gefäßwandständiger Amyloidablagerungen in Betracht. Der Nachweis kortikal-dominierender, generalisierter gefäßwandständiger Ablagerungen von endogenem A β in SHRSP, nicht aber in Wistar-Kontrollratten, stützt die These einer Hypertonie-assoziierten altersabhängigen Gefäßpathologie mit morphologischer und funktioneller Beeinträchtigung als Grundlage für die Entwicklung einer CAA. Eine Verdickung zerebrovaskulärer Basalmembranen in vulnerablen Regionen (v.a. Kortex) als Trigger für die Entwicklung einer CAA wurde wiederholt beschrieben (20, 30, 80). Auf lange Sicht sind eine Brüchigkeit und Ausdünnung der Gefäßwände die Folge, wodurch die Gefäßkontraktilität als Impulsgeber für eine perivaskuläre A β -Drainage erlischt und die Entwicklung einer CAA weiterführend begünstigt wird (26, 81, 82).

5. Zusammenfassung

Die zerebrale Mikroangiopathie beruht überwiegend auf einer Mischpathologie, die in fortgeschrittenen Stadien hinsichtlich der zu Grunde liegenden Pathomorphologie und assoziierter Risikofaktoren nur schwer zu differenzieren ist. Ziel der Arbeit war die Betrachtung der Frühstadien einer zerebralen Mikroangiopathie mit dem Fokus auf der Entstehung einer hypertensiven Arteriopathie (HA) und Proteinopathie in Abhängigkeit der Risikofaktoren Alter und Hypertonie.

Es wurde zu Beginn die Frage adressiert, in welchem Ausmaß quantitative Wandveränderungen Hypertonie-assoziiert in SHRSP vorzufinden sind im Vergleich zu Wistar Kontrollratten. Mittels MOVAT-Pentachrom Färbung ließ sich eine Hypertonie-assoziierte und altersabhängig signifikant verdickte, arterioläre Gefäßwand in SHRSP nachweisen. Immunhistochemisch zeigte sich erklärend hierfür eine signifikante Zunahme an Kollagen IV innerhalb arteriolärer Gefäßwände in Kortex, Striatum und Thalamus. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob pathomorphologische Auffälligkeiten in Kapillaren, Arteriolen und kleinen Arterien gleichermaßen vorzufinden sind. Es konnte auf dem Niveau der Kapillaren eine signifikant verdickte kapilläre Basalmembran (BM) striatal, thalamisch und hippokampal in SHRSP mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung von steigendem Alter als Komorbidität zeigte sich zudem eine signifikante altersabhängige BM-Dickenzunahme in SHRSP im Vergleich zu Wistar Kontrollratten. Weiterhin waren qualitative Veränderungen der kapillären BM altersabhängig in SHRSP und altersunabhängig auch in Wistar Ratten ersichtlich. So erschienen morphologisch veränderte Endothelzellen und Perizyten, sowie eine Desintegrität der interendothelialen Tight Junction Moleküle, die eine beeinträchtigte Blut-Hirn-Schranke (BHS) suggerierten. Nach genauerer Betrachtung morphologischer Veränderungen im Rahmen einer HA widmeten sich nachfolgende Untersuchungen der Entstehung einer Proteinopathie. Zunächst fiel bei Untersuchung einer endogenen perivaskulären A β -Ablagerung auf, dass diese immunhistochemisch in SHRSP nachweisbar war. Eine postulierte altersabhängige Koinzidenz von A β -Akkumulation an Orten einer gestörten BHS konnte innerhalb der SHRSP gezeigt werden. Als der zu Grunde liegende Pathomechanismus ließ sich nach stereotaktischer Injektion von A β eine Protein-Drainagestörung in SHRSP

objektivieren mit vermehrter perivaskulärer A β -Akkumulation innerhalb kleiner Arterien und Arteriolen. Die Ausbildung einer zerebralen Amyloidangiopathie (engl. *Cerebral amyloid angiopathy*, CAA) wurde hierdurch begünstigt.

Zusammenfassend wurde die A β -Drainagestörung als Folge einer HA gewertet, sodass ein Zusammenhang zwischen HA und einer gestörten Proteindrainage entlang der geschädigten Gefäßwand angenommen werden muss.

Davon abgeleitet ist eine relevante Bedeutung der Primär- und Sekundärprophylaxe der arteriellen Hypertonie zur Vermeidung einer HA mit konsekutiver Ausbildung einer CAA anzunehmen.

II. Literaturverzeichnis

1. P. B. Gorelick, A. Scuteri, S. E. Black, C. DeCarli, S. M. Greenberg, C. Iadecola, L. J. Launer, S. Laurent, O. L. Lopez, D. Nyenhuis, R. C. Petersen, J. A. Schneider, C. Tzourio, D. K. Arnett, D. A. Bennett, H. C. Chui, R. T. Higashida, R. Lindquist, P. M. Nilsson, G. C. Roman, F. W. Sellke, S. Seshadri, Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Stroke*. **42**, 2672–2713 (2011).
2. C. Iadecola, The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron*. **80**, 844–866 (2013).
3. J. V. Bowler, Modern concept of vascular cognitive impairment. *Br. Med. Bull.* **83**, 291–305 (2007).
4. M. Dichgans, Vaskuläre Demenzen. *Leitlinien für Diagnostik und Ther. der Neurol. AWMF-Regis* (2017).
5. Q. Li, Y. Yang, C. Reis, T. Tao, W. Li, X. Li, J. H. Zhang, Cerebral Small Vessel Disease. *Cell Transplant.* **27**, 1711–1722 (2018).
6. A. Charidimou, L. Pantoni, S. Love, The concept of sporadic cerebral small vessel disease: A road map on key definitions and current concepts. *Int. J. Stroke*. **11**, 6–18 (2016).
7. L. Østergaard, T. S. Engedal, F. Moreton, M. B. Hansen, J. M. Wardlaw, T. Dalkara, H. S. Markus, K. W. Muir, Cerebral small vessel disease: Capillary pathways to stroke and cognitive decline. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 302–325 (2016).
8. S. Love, J. S. Miners, Small vessel disease, neurovascular regulation and cognitive impairment: post-mortem studies reveal a complex relationship, still poorly understood. *Clin. Sci.* **131**, 1579–1589 (2017).
9. R. N. Kalaria, The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology*. **134**, 226–239 (2018).
10. J. M. Wardlaw, C. Smith, M. Dichgans, Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *Lancet. Neurol.* **12**, 483–97 (2013).
11. L. Pantoni, Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical

- characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* **9**, 689–701 (2010).
12. C. Iadecola, The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron.* **96**, 17–42 (2017).
 13. R. O. Weller, D. Boche, J. a R. Nicoll, Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and their potential impact on therapy. *Acta Neuropathol.* **118**, 87–102 (2009).
 14. B. V Zlokovic, Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 723–38 (2011).
 15. R. O. Weller, E. Djuanda, H.-Y. Yow, R. O. Carare, Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol.* **117**, 1–14 (2009).
 16. N. J. Albarogthy, D. A. Johnston, M. Macgregor, S. Roy, O. W. Ajay, C. A. Hawkes, R. O. Carare, Convective influx / glymphatic system : tracers injected into the CSF enter and leave the brain along separate periaarterial basement membrane pathways. *Acta Neuropathol.* **136**, 139–152 (2018).
 17. R. Brown, H. Benveniste, S. E. Black, S. Charpak, M. Dichgans, A. Joutel, M. Nedergaard, K. J. Smith, B. V Zlokovic, J. M. Wardlaw, Understanding the role of the perivascular space in cerebral small vessel disease. *Cardiovasc. Res.* **44**, 1462–1473 (2018).
 18. M. D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne, A. R. Nelson, B. V Zlokovic, Z. Zhao, A. Montagne, N. Ar, Z. B. V. B. Barrier, Blood-Brain barrier: From Physiology to disease and back. *Physiol. Rev.* **99**, 21–78 (2019).
 19. Z. Cai, C. Wang, W. He, H. Tu, Z. Tang, M. Xiao, L. J. Yan, Cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease. *Clin. Interv. Aging.* **10**, 1695–1704 (2015).
 20. M. S. Thomsen, L. J. Routhe, T. Moos, The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 3300–3317 (2017).
 21. L. W. Lau, R. Cua, M. B. Keough, S. Haylock-Jacobs, V. W. Yong, Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 722–729 (2013).

22. B. V Zlokovic, Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nat. Med.* **16**, 1370–1 (2010).
23. A. R. Nelson, M. D. Sweeney, A. P. Sagare, B. V Zlokovic, Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 887–900 (2016).
24. M. D. Sweeney, A. P. Sagare, B. V Zlokovic, Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 133–150 (2018).
25. B. V Zlokovic, The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* **57**, 178–201 (2008).
26. A. W. J. Morris, R. O. Carare, S. Schreiber, C. a. Hawkes, The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of A β -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 1–9 (2014).
27. L. Sorokin, The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 712–723 (2010).
28. S. Jandke, C. Garz, D. Schwanke, M. Sendtner, H. Heinze, R. O. Carare, S. Schreiber, The association between hypertensive arteriopathy and cerebral amyloid angiopathy in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *Brain Pathol.* **28**, 844–859 (2018).
29. G. Banerjee, D. Wilson, H. R. Jäger, D. J. Werring, Novel imaging techniques in cerebral small vessel diseases and vascular cognitive impairment. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 926–938 (2016).
30. C. Hawkes, M. Gatherer, M. Sharp, A. Dorr, H. M. Yuen, R. Kalaria, R. Weller, R. Carare, P3-074: Regional differences in perivascular drainage of beta-amyloid from the aging mouse brain. *Alzheimer's Dement.* **9**, P576–P577 (2013).
31. F. C. Bronfman, J. Garrido, A. Alvarez, C. Morgan, N. C. Inestrosa, Laminin inhibits amyloid- β -peptide fibrillation. *Neurosci. Lett.* **218**, 201–203 (1996).
32. N. J. Abbott, Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* **36**, 437–449 (2013).
33. Z. Zhao, A. R. Nelson, C. Betsholtz, B. V Zlokovic, Perspective Establishment

- and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*. **163**, 1064–1078 (2015).
34. S. Schreiber, C. Z. Bueche, C. Garz, H. Braun, Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model. *Exp. Transl. Stroke Med.* **5**, 4 (2013).
 35. S. Schreiber, C. Z. Bueche, C. Garz, S. Kropf, F. Angenstein, J. Goldschmidt, J. Neumann, H.-J. Heinze, M. Goertler, K. G. Reymann, H. Braun, The pathologic cascade of cerebrovascular lesions in SHRSP: is erythrocyte accumulation an early phase? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 278–90 (2012).
 36. R. O. Weller, M. Subash, S. D. Preston, I. Mazanti, R. O. Carare, Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **18**, 253–66 (2008).
 37. M. D. Sweeney, K. Kisler, A. Montagne, A. W. Toga, B. V Zlokovic, The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* **21**, 1318–1331 (2018).
 38. A. Montagne, Z. Zhao, B. V Zlokovic, Alzheimer's disease: A matter of blood–brain barrier dysfunction? *J. Exp. Med.* **214**, 3151–3169 (2017).
 39. M. Merlini, E. P. Meyer, A. Ulmann-Schuler, R. M. Nitsch, Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice. *Acta Neuropathol.* **122**, 293–311 (2011).
 40. L. T. Grinberg, D. R. Thal, Vascular pathology in the aged human brain. *Acta Neuropathol.* **119**, 277–90 (2010).
 41. A. Charidimou, G. Boulouis, M. E. Gurol, C. Ayata, B. J. Bacskai, M. P. Frosch, A. Viswanathan, S. M. Greenberg, Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* **140**, 1829–1850 (2017).
 42. J. Attems, K. Jellinger, D. R. Thal, W. Van Nostrand, Review: Sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37**, 75–93 (2011).
 43. E. E. Smith, S. M. Greenberg, Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke.* **40**, 2601–6 (2009).
 44. C. Reinhard, S. S. Hébert, B. De Strooper, The amyloid-?? precursor protein: Integrating structure with biological function. *EMBO J.* **24**, 3996–4006 (2005).
 45. R. Pluta, M. Ulamek, M. Jablonski, Alzheimer's Mechanisms in Ischemic Brain

- Degeneration. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **292**, 1863–1881 (2009).
46. J. M. Tarasoff-Conway, R. O. Carare, R. S. Osorio, L. Glodzik, T. Butler, E. Fieremans, L. Axel, H. Rusinek, C. Nicholson, B. V Zlokovic, B. Frangione, K. Blennow, J. Ménard, H. Zetterberg, T. Wisniewski, M. J. de Leon, Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 457–470 (2015).
 47. A. Louveau, B. A. Plog, S. Antila, K. Alitalo, M. Nedergaard, J. Kipnis, Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J. Clin. Invest.* **127**, 3210–3219 (2017).
 48. H. Mestre, S. Kostrikov, R. I. Mehta, M. Nedergaard, Perivascular spaces, glymphatic dysfunction, and small vessel disease. *Clin. Sci.* **131**, 2257–2274 (2017).
 49. N. I. Bower, B. M. Hogan, Brain drains: new insights into brain clearance pathways from lymphatic biology. *J. Mol. Med.* **96**, 383–390 (2018).
 50. N. J. Abbott, M. E. Pizzo, J. E. Preston, D. Janigro, R. G. Thorne, The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a ‘glymphatic’ system? *Acta Neuropathol.* **135**, 387–407 (2018).
 51. A. Charidimou, A. Viswanathan, Multiple neuropathologies and dementia in the aging brain: A key role for cerebrovascular disease? *Alzheimer’s Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2**, 281–282 (2016).
 52. A. Biffi, S. M. Greenberg, Cerebral amyloid angiopathy: A systematic review. *J. Clin. Neurol.* **7**, 1–9 (2011).
 53. A. Charidimou, G. Boulouis, K. Haley, E. Auriel, E. S. Van Etten, P. Fotiadis, Y. Reijmer, A. Ayres, A. Vashkevich, Z. Y. Dipucchio, K. M. Schwab, S. Martinez-Ramirez, J. Rosand, A. Viswanathan, S. M. Greenberg, M. E. Gurol, White matter hyperintensity patterns in cerebral amyloid angiopathy and hypertensive arteriopathy. *Neurology.* **86**, 505–511 (2016).
 54. K. Okamoto, Y. Yamori, A. Nagaoka, Establishment of the SHRSP. *Circ. Res.* **34**, 143–153 (1974).
 55. E. L. Bailey, J. McCulloch, C. Sudlow, J. M. Wardlaw, Potential Animal Models of Lacunar Stroke. *Stroke.* **40**, 451–458 (2009).

56. E. L. Bailey, C. Smith, C. L. M. Sudlow, J. M. Wardlaw, Is the Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Rat a Pertinent Model of Sub Cortical Ischemic Stroke? A Systematic Review. *Int. J. Stroke.* **6**, 434–444 (2011).
57. M.-F. Ritz, F. Fluri, S. T. Engelter, N. Schaeren-Wiemers, P. a Lyrer, Cortical and putamen age-related changes in the microvessel density and astrocyte deficiency in spontaneously hypertensive and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Curr. Neurovasc. Res.* **6**, 279–87 (2009).
58. S. M. Saeed, G. Fine, Thioflavin-T for amyloid detection. *Am. J. Clin. Pathol.* **47**, 588–593 (1967).
59. M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, A. M. Donald, The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications. *J. Struct. Biol.* **149**, 30–37 (2005).
60. M. Groenning, Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J. Chem. Biol.* **3**, 1–18 (2010).
61. Praxinos, George, W. Charles, The rat brain in stereotaxic coordinates (online). <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/> ,05.12.2017 (2006).
62. K. Yamagata, M. Tagami, Y. Nara, H. Fujino, A. Kubota, F. Numano, T. Kato, Y. Yamori, Faulty induction of blood-brain barrier functions by astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **24**, 686–691 (1997).
63. M. Muller, Y. Van Der Graaf, Hypertension and Longitudinal Changes in Cerebral Blood Flow : The SMART-MR Study. *Ann. Neurol.* **71**, 825–833 (2012).
64. F. Amenta, D. Tomassoni, in *Animal Models of Dementia*, P. P. De Deyn, D. Van Dam, Eds. (Humana Press, Totowa, NJ, 2011), vol. 48 of *Neuromethods*, pp. 577–611.
65. M. Ueno, Y. Chiba, K. Matsumoto, R. Murakami, R. Fujihara, M. Kawauchi, H. Miyanaka, T. Nakagawa, Blood-brain barrier damage in vascular dementia. *Neuropathology.* **36**, 115–124 (2016).
66. P. W. Pires, C. M. Dams Ramos, N. Matin, A. M. Dorrance, The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304**, H1598-614 (2013).

67. M. H. Wu, Endothelial focal adhesions and barrier function. *J. Physiol.* **569**, 359–366 (2005).
68. A. Lippoldt, U. Kniesel, S. Liebner, H. Kalbacher, T. Kirsch, H. Wolburg, H. Haller, Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood–brain barrier endothelial cells. *Brain Res.* **885**, 251–261 (2000).
69. D. Tomassoni, V. Bramanti, F. Amenta, Expression of aquaporins 1 and 4 in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* **1325**, 155–163 (2010).
70. H. Ishida, K. Takemori, K. Dote, H. Ito, Expression of glucose transporter-1 and aquaporin-4 in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats in relation to the blood-brain barrier function. *Am. J. Hypertens.* **19**, 33–9 (2006).
71. K. Yamagata, Pathological alterations of astrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats under ischemic conditions. *Neurochem. Int.* **60**, 91–8 (2012).
72. M. Tagami, Y. Nara, A. Kubota, H. Fujino, Y. Yamori, Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* **21**, 1064–1071 (1990).
73. R. O. Carare*, M. Bernardes-Silva†, T. A. Newman†, A. M. Page‡, V. J. A. R. Nicoll*, . H. Perry†, R. O. Weller, Solutes , but not cells , drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries : significance for cerebral amyloid angiopathy a. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **34**, 131–144 (2008).
74. A. W. J. Morris, M. M. Sharp, N. J. Albargothy, R. Fernandes, C. A. Hawkes, A. Verma, R. O. Weller, R. O. Carare, Vascular basement membranes as pathways for the passage of fluid into and out of the brain. *Acta Neuropathol.* **131**, 725–736 (2016).
75. D. R. Thal, E. Ghebremedhin, U. Rüb, H. Yamaguchi, K. Tredoci Del, H. Braak, Two Types of Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* **61**, 282–293 (2002).

76. S. K. Tayebati, D. Tomassoni, F. Amenta, Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. *J. Neurol. Sci.* **322**, 241–9 (2012).
77. A. S. Izzard, D. Rizzoni, E. Agabiti-Rosei, A. M. Heagerty, Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage. *J. Hypertens.* **23**, 247–50 (2005).
78. H. Braun, S. Schreiber, Microbleeds in cerebral small vessel disease. *Lancet Neurol.* **12**, 735–6 (2013).
79. F. Held, A. W. J. Morris, D. Pirici, S. Niklass, M. M. G. Sharp, C. Garz, A. Assmann, H.-J. Heinze, F. Schreiber, R. O. Carare, S. Schreiber, Vascular basement membrane alterations and β -amyloid accumulations in an animal model of cerebral small vessel disease. *Clin. Sci.* **131**, 1001–1013 (2017).
80. C. Zarow, E. Barron, H. C. Chui, L. S. Perlmutter, L. Angeles, B. Corporation, W. Haven, Vascular Basement Membrane Pathology and Alzheimer ' s Disease. *Ann. New York Acad. Sci.*, 147–160 (1997).
81. M. J. C. Burke, L. Nelson, J. Y. Slade, A. E. Oakley, A. A. Khundakar, R. N. Kalaria, Morphometry of the hippocampal microvasculature in post-stroke and age-related dementias. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **40**, 284–295 (2014).
82. K. E. Biron, D. L. Dickstein, R. Gopaul, W. A. Jefferies, Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease. *PLoS One.* **6**, e23789 (2011).

III. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GEFÄßAUFBAU INTRAZEREBRALER GEFÄßE	3
ABBILDUNG 2: GRUNDLEGENDER AUFBAU DER BASALMEMBRAN	5
ABBILDUNG 3: ZUSAMMENSETZUNG DER NEUROVASKULÄREN EINHEIT UND IHRE WICHTIGSTEN FUNKTIONEN	7
ABBILDUNG 4: HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE ZEREBRALER MIKROANGIOPATHIEN.....	9
ABBILDUNG 5: DETAILLIERTERE DARSTELLUNG DER PERIVASKULÄREN DRAINAGE	11
ABBILDUNG 6: PHOTOGRAPHISCHE DARSTELLUNG DER STEREOTAKTISCHEN PROZEDUR UND AUSSCHNITT AUS DEM DIGITALEN ANATOMISCHEN ATLAS VON RATTENHIRNEN	25
ABBILDUNG 7: QUANTIFIZIERUNG DER BASALMEMBRANDICKE VON SHRSP UND KONTROLLTIEREN NACH HISTOLOGISCHER FÄRBUNG MITTELS MOVAT-PENTACHROM.....	30
ABBILDUNG 8: HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG ARTERIOLÄRER GEFÄßWÄNDE MITTELS MOVAT-PENTACHROM FÄRBUNG	31
ABBILDUNG 9: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON COLLAGEN IV IN SHRSP UND WISTAR- KONTROLLTIEREN.....	32
ABBILDUNG 10: BILDMORPHOLOGISCHE DARSTELLUNG KOLLAGEN-IV-ANGEFÄRBTER GEFÄßE.....	34
ABBILDUNG 11: DICKE DER BASALMEMBRANEN VON KAPILLAREN IN ABHÄNGIGKEIT VON TIERMODELL, ALTER UND HIRNREGION ERMITTELT MITTELS TEM	36
ABBILDUNG 12: MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG PATHOMORPHOLOGISCHER GEFÄßWANDVERÄNDERUNG KORTIKALER KAPILLAREN IN SHRSP.....	37
ABBILDUNG 13: HISTOCHEMISCHER UND IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS EINER ZEREBRALEN AMYLOIDANGIOPATHIE IN SHRSP.....	39
ABBILDUNG 14: GEFÄßWANDSTÄNDIGE AMYLOID-ABLAGERUNGEN NACH HIPPOKAMPALER STEREOTAKTISCHER A β -INJEKTION.....	40

IV. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GEWICHT UND BLUTDRUCKWERTE VON SHR, SHRSP UND WISTAR-RATTEN IM ZEITLICHEN VERLAUF.	15
TABELLE 2: ANZAHL VERWENDETER SHRSP UND WISTAR RATTEN ENTSPRECHENDER ALTERSGRUPPEN FÜR DAS JEWEILIGE EXPERIMENT.....	16
TABELLE 3: FÄRBEABLAUF MOVAT-PENTACHROM FÄRBUNG NACH VERHÖFF	19
TABELLE 4: FÄRBEABLAUF KOMBINATIONSFÄRBUNG KONGOROT UND BERLINER-BLAU.....	19
TABELLE 5: FÄRBEABLAUF IMMUNHISTOCHEMISCHER DETEKTION MITTELS THIOFLAVIN T/S UND BERLINER BLAU.....	20
TABELLE 6: IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON KOLLAGEN IV UND LAMININ	21
TABELLE 7: FÄRBEABLAUF IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON A β UND ENDOTHELZELLEN.....	22
TABELLE 8: FÄRBEABLAUF ZUR DETEKTION VON VON GLATTEN MUSKELZELLEN (α -SMA) NACH A β -INJEKTION	24
TABELLE 9: VERWENDETE KOORDINATEN FÜR DIE STEREOTAKTISCHE A β -INJEKTION IN DEN LINKEN HIPPOKAMPUS IN SHRSP UND WISTAR-RATTEN.....	26
TABELLE 10: PROZENTUALER ANTEIL AN DETEKTIERTEM SIGNAL MITTELS IMAGE J, INDIKATIV FÜR KOLLAGEN IV IN GEFÄßWÄNDEN DER SHRSP UND WISTAR RATTEN INNERHALB DER SPEZIFISCHEN REGIONEN.....	33
TABELLE 11: MITTELS ELEKTRONENMIKROSKOPIE ERHOBENE DIAMETER KAPILLÄRER BASALMEMBRANEN IN SHRSP UND WISTAR-RATTEN.....	35

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. S. Schreiber (Klinik für Neurologie, Otto-von-Guericke Universität (OvGU) Magdeburg; Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE)), für Ihre überdauernde, fachlich überaus kompetente und außerordentlich engagierte Betreuung innerhalb der vergangenen acht Jahre. Ich danke dem Forschungsteam, allen voran C. Garz (Klinik für Neurologie, OvGU Magdeburg; DZNE) und Dr. rer. nat. S. Jandke (Klinik für Neurologie, OvGU; DZNE), für die fachliche und praktische Unterstützung im Labor, den wissenschaftlichen Exkurs in den Labmeetings und die Zuarbeiten in Phasen von Prüfungen im Studium. Weiterhin gilt ein großer Dank dem kooperierenden Labor um Frau Prof. R. Carare, MD PhD, Frau C. Hawkes, PhD und Herrn A. Morris, PhD, die meinen Forschungsaufenthalt im Institute of clinical Neuroscience, University of Southampton zu einer fachlichen und persönlichen Bereicherung werden ließen.

Ein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. H.-J. Heinze (Klinik für Neurologie, OvGU Magdeburg; DZNE), ohne dessen Lenkung in sehr jungen Jahren (2008), vor meinem Studium (2010), ich nie zum Medizinstudium gefunden hätte und der 2012 die Angliederung an die Forschungsgruppe von Frau Prof. S. Schreiber bahnte. Die Kombination aus exzellenter fachlicher Expertise, empathischer Art und uneingeschränkter Motivation ließen Frau Prof. S. Schreiber definitiv zu einem Vorbild für meine universitäre Laufbahn werden.

Die multiplen Konferenzbesuche und Auslandsaufenthalte waren nur tragbar durch Reisestipendien, Promotionsstipendien und finanzielle Förderung der Klinik für Neurologie, sodass ich mich hiermit bei der Fakultät für Medizin und der Klinik für Neurologie für die Unterstützung bedanken möchte.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die in der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Pathomorphologische Veränderungen der Basalmembranen der kleinen Hirngefäße in einem Tiermodell der sporadischen zerebralen Mikroangiopathie

In der Klinik für Neurologie (Direktor Prof. Dr. med. H.-J. Heinze)

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. med. S. Schreiber

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in – oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

München, den 18.01.2021



Darstellung des Bildungsweges

Seit 03/2018

Facharztausbildung Neurologie

Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

09/2013 – 07/2014

Forschungsaufenthalt im Rahmen der medizinischen Promotion

General Hospital, Faculty of Medicine, Institute of Clinical Neuroscience, Southampton, England

10/2010 – 12/2017

Studium der Humanmedizin

Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 12/2017

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 10/2012

06/2010

Allgemeine Hochschulreife

Friedrich-Schiller-Gymnasium, Weimar

München, den 18.01.2021

