

**Untersuchung des Zusammenhangs  
von hypertensiver Arteriopathie  
und zerebraler Amyloidangiopathie  
im Modell der spontan hypertensiven  
stroke-prone Ratte**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg

von Master of Science Solveig Jandke (geb. Niklaß)

geb. am 05.04.1989 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Jochen Heinze

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Johannes Boltze

eingereicht am: 27.11.2018

verteidigt am: 09.12.2019

## **Abstract**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der 2-Photonen-Mikroskopie (2PM) am Tiermodell der spontan hypertensiven stroke-prone Ratte (SHRSP), um die Pathologien der hypertensiven Arteriopathie (HA) intravital sowie postmortal darstellen zu können. Zusätzlich sollte getestet werden, ob der durch die HA induzierte Gefäßschaden ebenfalls die Entwicklung einer zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) begünstigt.

Für die Studie erfolgte die 2PM zur Darstellung der kortikalen Arteriolen mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Farbstoffes Dextran, die zerebrale Blutflussmessung sowie die intravitale Bildgebung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Methoxy-X04 zur Darstellung vaskulärer Amyloid-Ablagerungen. Postmortal erfolgte die histologische und immunhistochemische Untersuchung des Operationsgebietes auf das Vorhandensein einer HA und CAA.

Es konnte gezeigt werden, dass die HA in der SRHSP initial durch einen Gefäßwandschaden (Stadium 1A) sowie eine Blutfluss-Reduktion (Stadium 1B) charakterisiert ist und in der Ausbildung nicht-okkludierender (Stadium 2) und okkludierender Thromben (Stadium 3) resultiert. Wistar-Kontrolltiere zeigten intravital ebenfalls einen Gefäßwandschaden, waren jedoch nicht durch die Ausbildung der späteren HA-Stadien charakterisiert. Zusätzlich wiesen etwa die Hälfte aller SHRSP vaskuläre Amyloid-Ablagerungen in Form einer CAA auf, die sich vornehmlich in Gefäßen mit unvollständigen bzw. vollständigen Gefäßverschlüssen (Stadium 2 oder 3) darstellten. Die Daten deuten somit darauf hin, dass eine fortgeschrittene HA bei der CAA-Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt und beide Krankheitsbilder eng miteinander verbunden sind.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Hintergrund.....	1
1.2	Vaskuläre Demenz .....	2
1.3	Die zerebrale Mikrovaskulatur .....	5
1.4	Die zerebrale Mikroangiopathie .....	7
1.4.1	Hypertensive Arteriopathie und zerebrale Amyloidangiopathie.....	8
1.4.2	Die perivaskuläre Drainage von Amyloid- $\beta$ .....	10
1.4.3	Gemeinsamkeiten von hypertensiver Arteriopathie und zerebraler Amyloidangiopathie.....	11
1.4.4	Mischbilder aus hypertensiver Arteriopathie und zerebraler Amyloidangiopathie.....	11
1.5	Tiermodelle vaskulärer Hirnpathologien .....	14
1.6	Die spontan hypertensive stroke-prone Ratte als Tiermodell der zerebralen Mikroangiopathie .....	20
1.7	2-Photonen-Mikroskopie.....	26
1.8	Hypothesen der vorliegenden Arbeit .....	30
2	Material und Methoden .....	32
2.1	Tierhaltung .....	32
2.2	Tierversuche.....	32
2.3	2-Photonen-Mikroskopie.....	34
2.3.1	Anästhesie und Präparation eines kranialen Fensters.....	34
2.3.2	<i>In-vivo</i> Untersuchungen der zerebralen Blutgefäße.....	37
2.3.2.1	Blutfluss-Messungen .....	38
2.3.2.2	Methoxy-X04 .....	38

2.4	Tötung der Tiere und Gewebeaufbereitung .....	40
2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	41
2.4.2	Histologische Amyloid-Färbungen .....	42
2.4.2.1	Kongorot-Färbung .....	42
2.4.2.2	Thioflavin-T-Färbung .....	43
2.4.3	Immunhistochemische Färbungen .....	43
2.4.3.1	Fluoreszeinisothiozyanat-gekoppeltes Solanum tuberosum Lektin.....	45
2.4.3.2	Dextran.....	45
2.4.3.3	Immunglobulin G .....	46
2.4.3.4	Amyloid- $\beta$ .....	46
2.4.3.5	4',6-Diamidin-2-Phenylindol.....	46
2.4.3.6	Indodicarbocyanin-gekoppelte Sekundärantikörper .....	47
2.5	Datenanalyse .....	47
2.5.1	2PM-Datenanalyse .....	47
2.5.1.1	Phänomene, Kaskade und Stadien der hypertensiven Arteriopathie .....	47
2.5.1.2	Messung der Strömungsgeschwindigkeit der roten Blutzellen .....	48
2.5.1.3	Vaskuläre Amyloid-Akkumulationen .....	49
2.5.2	Histologische und immunhistochemische Analyse.....	49
2.6	Statistische Auswertungen .....	51
3	Ergebnisse .....	53
3.1	Etablierung der 2-Photonen-Mikroskopie .....	53
3.2	Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie .....	54
3.2.1	Darstellbarkeit der kortikalen Mikrovaskulatur... <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>	
3.2.2	Pathologien der zerebralen Blutgefäße und intravitale Phänomene der hypertensiven Arteriopathie .....	56

3.2.3	Intravitale Kaskade der hypertensiven Arteriopathie in SHRSP .....	60
3.2.4	Intravitale Stadien der hypertensiven Arteriopathie.....	63
3.2.5	Intravitale vaskuläre Amyloid-Pathologie in SHRSP .....	65
3.3	Postmortale histologische und immunhistochemische Auswertungen.....	68
3.3.1	Künstliche vaskuläre Schäden .....	68
3.3.2	Detektierbarkeit von Dextran in der Konfokalmikroskopie.....	71
3.3.3	Hypertensive Arteriopathie.....	74
3.3.4	Amyloid-Pathologie .....	79
3.4	Kaskade der hypertensiven Arteriopathie und zerebralen Amyloidangiopathie .....	82
4	Diskussion.....	84
5	Ausblick.....	97
6	Zusammenfassung.....	99
7	Literaturverzeichnis .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b>	Formen der Demenz. ....	4
<b>Abbildung 2:</b>	Gefäßdurchmesser zerebraler Blutgefäße. ....	6
<b>Abbildung 3:</b>	Systolische Blutdruckwerte in stroke-prone (SHRSP) und stroke-resistant (SHR) spontan hypertensiven Ratten. ....	23
<b>Abbildung 4:</b>	Zerebrale Mischpathologien der SHRSP. ....	25
<b>Abbildung 5:</b>	Prinzip der Konfokal- und 2-Photonen-Mikroskopie. ....	28
<b>Abbildung 6:</b>	Präparation eines kranialen Fensters für die 2-Photonen- Mikroskopie. ....	36
<b>Abbildung 7:</b>	2-Photonen-Mikroskopie der zerebralen kortikalen Mikrovaskulatur. ....	55
<b>Abbildung 8:</b>	Pathologien der zerebralen Blutgefäße und Phänomene der zerebralen hypertensiven Arteriopathie detektiert in der intravitalen 2-Photonen-Mikroskopie. ....	57
<b>Abbildung 9:</b>	Frequenzen der intravitalen Phänomene der hypertensiven Arteriopathie in SHRSP und Wistarratten. ....	59
<b>Abbildung 10:</b>	Intravitale Messung der Fließgeschwindigkeit der roten Blutzellen mittels 2-Photonen-Mikroskopie in SHRSP. ....	62
<b>Abbildung 11:</b>	Frequenzen der intravitalen Stadien der hypertensiven Arteriopathie in SHRSP und Wistarratten. ....	64
<b>Abbildung 12:</b>	Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie der vaskulären Amyloid- Pathologie in SHRSP. ....	67
<b>Abbildung 13:</b>	Künstliche vaskuläre Schäden in SHRSP und Wistarratten. ....	70

<b>Abbildung 14:</b>	Verteilung von Dextran in der Konfokalmikroskopie.....	72
<b>Abbildung 15:</b>	Immunhistochemische Darstellung einer BHS-Störung. ....	73
<b>Abbildung 16:</b>	Erythrozyten-Thromben und komplett verschlossene Gefäßabschnitte.....	75
<b>Abbildung 17:</b>	Postmortale hypertensive Arteriopathie in SHRSP und Wistarratten.....	78
<b>Abbildung 18:</b>	Postmortale Amyloid-Pathologie in der SHRSP.....	81
<b>Abbildung 19:</b>	Intravitale Kaskade der hypertensiven Arteriopathie und die damit verbundene Entwicklung der zerebralen Amyloidangiopathie in SHRSP.....	83

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b>	Vergleich der verschiedenen Tiermodelle der zerebralen Mikroangiopathie .....	18
<b>Tabelle 2:</b>	Anzahl der für die intravitale 2-Photonen-Mikroskopie geplanten SHRSP und Wistarratten pro Lebensalter. ....	33
<b>Tabelle 3:</b>	Vergleich der für die intravitale Bildgebung genutzten Fluoreszenzfarbstoffe Dextran und Methoxy-X04.....	39
<b>Tabelle 4:</b>	OP-Schaden bei der Kraniotomie in SHRSP und Wistarratten.....	54

## Abkürzungsverzeichnis

2PM	2-Photonen-Mikroskopie
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
AD	Alzheimer'sche Demenz
APP	Amyloid-Vorläufer-Proteins, engl. <i>amyloid precursor protein</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ApoE	Apolipoprotein E
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAA	Zerebrale Amyloidangiopathie, engl. <i>cerebral amyloid angiopathy</i>
CADASIL	Zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie, engl. <i>cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy</i>
CPS	Kryoprotektionslösung, engl. <i>cryoprotectant solution</i>
Cy3	Indocarbocyanin Cy3
Cy5	Indodicarbocyanin Cy5
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
df	Freiheitsgrade, engl. <i>degrees of freedom</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Eselnormalserum, engl. <i>donkey normal serum</i>
HA	Hypertensive Arteriopathie
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IZB	Intrazerebrale Blutungen
KG	Körpergewicht

KR	Kongorot
LRP1	engl. <i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
OP	Operation
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PVR	Erweiterte perivaskuläre Räume
RAGE	engl. <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RBZ	Rote Blutzellen
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SHRSP	Spontan hypertensive stroke-prone Ratte
STL	<i>Solanum tuberosum</i> Lektin
STL-FITC	Fluoreszeinisothiozyanat-gekoppeltes STL
ThioT	Thioflavin-T
VaD	Vaskuläre Demenz
VCI	Vaskulär bedingte kognitive Beeinträchtigungen, engl. <i>vascular cognitive impairment</i>
WMH	Marklagerläsionen, engl. <i>white matter hyperintensities</i>
Wo	Wochen
ZMB	Zerebrale Mikroblutungen

# **1 Einleitung**

## **1.1 Hintergrund**

Die Demenz zählt heutzutage zu den häufigsten Erkrankungen, die vor allem im höheren Lebensalter auftreten. So leiden aktuell weltweit etwa 46,8 Millionen Menschen an Demenzerkrankungen; diese Zahl soll schätzungsweise auf 74,4 Millionen Erkrankte im Jahr 2030 und sogar auf 131,5 Millionen im Jahr 2050 ansteigen (Winblad et al. 2016; Wu et al. 2017). Damit verbunden sind enorme Kosten, einschließlich derer für medizinische und soziale Betreuung, die von jährlich etwa 604 Billionen US-Dollar im Jahr 2010 bereits auf 818 Billionen US-Dollar im Jahr 2015 angestiegen sind (Winblad et al. 2016; Wimo et al. 2017). Jüngste Zahlen weisen jedoch darauf hin, dass die Inzidenzen der Demenz – wahrscheinlich zurückzuführen auf einen gesünderen Lebensstil und ein höheres Bildungsniveau – rückläufig sind, sodass der erwartete Anstieg der Demenzkranken vornehmlich im demografischen Wandel und der Alterung der Bevölkerung begründet liegt (Prince et al. 2016; Satizabal et al. 2016; Derby et al. 2017). Zudem wird ein Rückgang der Demenzerkrankten besonders in den Industrieländern erwartet, wohingegen in Entwicklungs- und Schwellenländern eine Zunahme der Menschen mit Demenzerkrankungen vermutet wird (Winblad et al. 2016). Auch ethnische Unterschiede in der Häufigkeit der Erkrankungen sind beschrieben; so sind laut einer amerikanischen Studie ältere Afro-Amerikaner und Hispano-Amerikaner deutlich häufiger von einer Demenz betroffen als gleichaltrige weiße Personen (Alzheimer's disease facts and figures 2018).

## 1.2 Vaskuläre Demenz

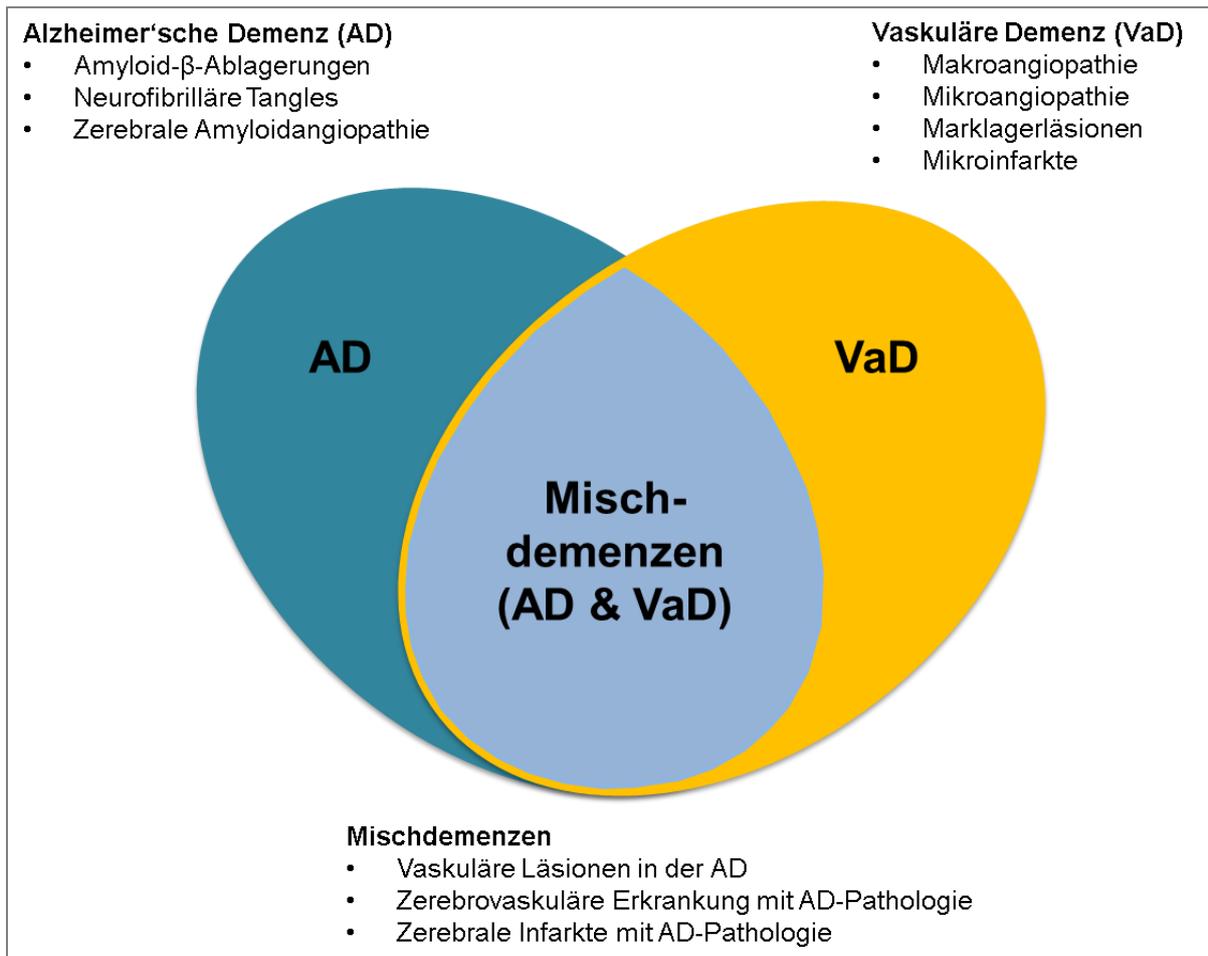
Die am häufigsten zu findende Form der Demenz ist die Alzheimer'sche Demenz (AD), gefolgt von der vaskulären Demenz (VaD) bzw. vaskulär bedingten kognitiven Beeinträchtigungen (engl. *vascular cognitive impairment*, VCI) und Mischformen aus AD und VaD. Insgesamt machen diese 3 Formen über 80% aller Demenzerkrankungen aus (Busch 2011). Die AD ist häufig durch Gedächtnisverlust als frühes klinisches Symptom gekennzeichnet; in späteren Krankheitsstadien treten Verwirrtheit, Desorientierung, Verhaltensänderungen und letztendlich Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten auf (Alzheimer's disease facts and figures 2018). Pathologisch wird die AD durch den Abbau der Nervenzellen und das Auftreten von (1) extrazellulären Ablagerungen des Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )-Proteins in Form von Amyloid-Plaques und (2) intrazellulären Ablagerungen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau als neurofibrilläre Tangles charakterisiert (Selkoe 1991; Mattson 2004). Zudem wird im Gehirn von 85% - 95% aller AD-Patienten eine zerebrale Amyloidangiopathie (engl. *cerebral amyloid angiopathy*, CAA), d.h. die Ablagerung von A $\beta$  in der Gefäßwand, identifiziert (Charidimou et al. 2017a).

Im Gegensatz zur AD ist die VaD nicht vorrangig durch Gedächtnisdefizite sondern eher durch Störungen der Exekutivfunktionen (d.h. ein beeinträchtigtes Urteilsvermögen oder eine eingeschränkte Fähigkeit, Entscheidungen zu treffen, zu planen oder zu organisieren) sowie eine zugrunde liegende vaskuläre Hirnpathologie gekennzeichnet (Kalara et al. 2016; Smith 2017). Diese Gefäßpathologie umfasst makroangiopathische Infarkte, mikroangiopathische Gefäßveränderungen wie Gefäßverschlüsse oder Mikroblutungen, Marklagerläsionen (engl. *white matter*

*hyperintensities*, WMH) sowie Mikroinfarkte (Iadecola 2013; Smith 2017; Alzheimer's disease facts and figures 2018).

Als Mischdemenzen werden Demenzformen beschrieben, bei denen sowohl Alzheimer-typische Veränderungen als auch die der vaskulären Demenz zugrunde liegenden Gefäßpathologien zu finden sind (**Abbildung 1**).

Die Pathologie der zerebralen Mikrovaskulatur, d.h. die zerebrale Mikroangiopathie, wird nicht nur für die VaD als Ursache sondern auch als beschleunigender Faktor für die Ausbildung kognitiver Defizite bei Vorliegen einer AD-Pathologie beschrieben (Busch 2011; Cai et al. 2015). Eine Zunahme des Verständnisses der Pathophysiologie der zerebralen Mikroangiopathie könnte demzufolge helfen, neue Präventions- und Therapieoptionen zu entwickeln – nicht nur für die VaD selbst, sondern möglicherweise auch für die AD und die Mischdemenzen. Die Konsequenz könnte eine Minderung der sozioökonomischen Belastung und eine Verbesserung der Situation der an Demenz erkrankten Personen und ihrer Angehörigen sein.



**Abbildung 1: Formen der Demenz.**

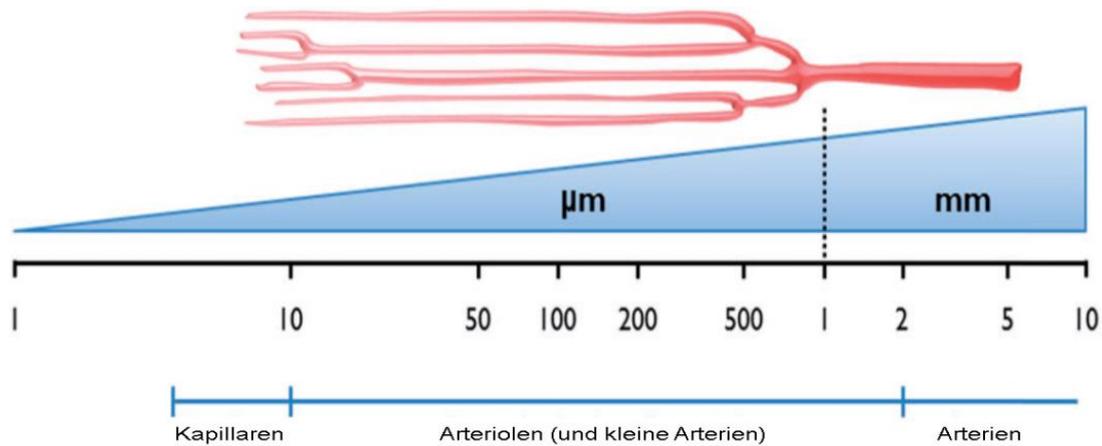
Die Alzheimer'sche Demenz, die vaskuläre Demenz und Mischdemenzen stellen die Hauptformen der diversen Demenzformen dar.

Abbildung modifiziert nach (Akinyemi et al. 2013).

### 1.3 Die zerebrale Mikrovaskulatur

Die Blutversorgung des Gehirns wird durch vier große Schlagadern gewährleistet: (i) die rechte und linke innere Halsschlagader (lat. *Arteria carotis interna*) sowie (ii) die rechte und linke Wirbelarterie (lat. *Arteria vertebralis*). Die von diesen Arterien versorgten vorderen und hinteren Hirnkreisläufe sind durch Anastomosen miteinander verbunden (lat. *Circulus arteriosus cerebri Willisii*). Weiterführend sind drei große Gehirnarterien für die Versorgung des Gehirns zuständig – die vordere, mittlere und hintere Gehirnschlagader (lat. *Arteria cerebri anterior / media / posterior*), die sich zu den perforierenden Arterien verzweigen und schließlich in den Arteriolen und dem Kapillarbett münden (Iadecola und Nedergaard 2007; Wardlaw et al. 2013a; Trepel 2015).

Dem mikrovaskulären System des Gehirns werden kleine Arterien, Arteriolen sowie Kapillaren und Venolen mit einem Gefäßdurchmesser von ungefähr 5 µm bis 2 mm zugeordnet (**Abbildung 2**) (Pantoni 2010; Wardlaw et al. 2013a; Charidimou et al. 2016b). Die Gehirne von Menschen und Nagetieren sind anatomisch ähnlich, was Ratten und Mäuse zu guten Modellen für die Untersuchung von Krankheiten des menschlichen Gehirns macht (Ellenbroek und Youn 2016). Für Ratten sind Kapillaren als kleine Blutgefäße mit einem Durchmesser von bis zu 10 µm und Arteriolen als Gefäße mit einem Durchmesser von 11 µm bis 75 µm beschrieben (Seylaz et al. 1999; Itoh und Suzuki 2012).



**Abbildung 2: Gefäßdurchmesser zerebraler Blutgefäße.**

Der Maßbalken im oberen Diagramm zeigt eine logarithmische Darstellung des Gefäßdurchmessers der zerebralen Blutgefäße (Kapillaren, Arteriolen und Arterien).

Abbildung modifiziert nach (Charidimou et al. 2016b).

Sowohl beim Menschen als auch in der Ratte bestehen Kapillaren aus einer Endothelschicht und einer Basalmembran, an deren Außenwand Perizyten – kontraktile Zellen, die die Durchblutung der Gefäße regulieren – sowie Astrozytenendfüße anliegen. Arteriolen und Arterien gleichen im Aufbau den Kapillaren, weisen jedoch zusätzlich eine oder mehrere Schichten glatter Muskelzellen (*Tunica Media*) – kontraktile Elemente, die den Gefäßdurchmesser kontrollieren – auf. Des Weiteren ist bei Arterien im Vergleich zu Arteriolen auf beiden Seiten der *Tunica Media* zusätzlich eine Membran aus elastischen Fasern zu finden (Iadecola und Nedergaard 2007; Zlokovic 2008).

Die Endothelzellen der Kapillaren sowie die Basalmembran der Blutgefäße und benachbarte Zellen inklusive Astrozyten und Perizyten bilden die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die das umliegende Hirnparenchym vom Blut abtrennt. Eine funktionierende BHS gewährleistet einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen Blut und Hirngewebe

und gleichzeitig die Aufrechterhaltung des „neuronalen Milieus“, sodass der problemlose Ablauf wichtiger Prozesse im Gehirn wie z.B. neuronale Signalübertragung, Angiogenese, Neurogenese und die Fernhaltung toxischer Stoffe ermöglicht werden kann (Zlokovic 2008; Abbott 2013; Wardlaw et al. 2013a; Trepel 2015). Eine Störung der BHS ist durch den Austritt von Plasmaproteinen in die Gefäßwand und das umliegende Hirngewebe gefolgt von einer neuronalen Schädigung, der fehlerhaften Entfernung toxischer Substanzen, Transportstörungen sowie eine Aktivierung des Endothels mit nachfolgenden Entzündungsprozessen gekennzeichnet (Wardlaw et al. 2003; Zlokovic 2008). Diese Veränderungen können pathologischen Prozessen, die zu verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie AD, VaD oder der Parkinson-Krankheit beitragen, vorangehen, zur Entstehung der Krankheit beitragen oder diese sogar beschleunigen (Zlokovic 2008; Ueno et al. 2016).

#### **1.4 Die zerebrale Mikroangiopathie**

Die sporadische zerebrale Mikroangiopathie ist ein häufig auftretendes Phänomen im alternden Gehirn und wird als eine der Hauptursachen für die Entwicklung von Schlaganfällen und einer (vaskulären) Demenz beschrieben (Pantoni 2010; Wardlaw et al. 2013a; Cai et al. 2015; Haffner et al. 2016). Die humane zerebrale Mikroangiopathie beschreibt dabei eine Mischung aus klinischen, kognitiven, bildgebenden und neuropathologischen Befunden, die auf einer pathologischen Veränderung des kleinen Gefäßsystems basiert (Wardlaw et al. 2013a; Pinter et al. 2015; Haffner et al. 2016). Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Formen der

sporadischen zerebralen Mikroangiopathie – die hypertensive Arteriopathie (HA) und die CAA (Pantoni 2010; Cai et al. 2015).

#### **1.4.1 Hypertensive Arteriopathie und zerebrale Amyloidangiopathie**

Die HA ist eine Gefäßerkrankung der kleinen Arterien, Arteriolen, Venolen und Kapillaren des Gehirns, die pathologisch durch eine Arteriosklerose, fibrinoide Nekrose und Lipohyalinose charakterisiert wird. Diese degenerativen Veränderungen der kleinen Hirngefäße umfassen den Verlust der glatten Muskelzellen der *Tunica Media*, Gefäßwandverdickungen sowie die Verengung des Gefäßlumens durch Ablagerungen von hyalinem Material (Grinberg und Thal 2010; Pantoni 2010; Charidimou et al. 2016b).

Die sporadische Form der CAA wird hingegen durch die Akkumulation von A $\beta$  in der *Tunica Media* und *Tunica Adventitia* von kortikalen Arterien, Arteriolen und Kapillaren sowie den darüber liegenden leptomeningealen Gefäßen charakterisiert (Charidimou et al. 2012; Charidimou et al. 2016b). Histopathologisch weisen von einer CAA betroffene Gefäße ebenfalls Schädigungen wie eine Verdickung der Gefäßwand sowie eine Verengung des Gefäßlumens auf. Nach der anfänglichen Ablagerung von A $\beta$  in der *Tunica Media* kommt es zur A $\beta$ -Infiltration aller Schichten der Gefäßwand, was im Endstadium zur Zerstörung der Blutgefäße inklusive der scheinbaren Spaltung der Gefäßwand (engl. *double barrelling*), einer fibrinoiden Nekrose und zur Ausbildung perivaskulärer Mikroblutungen führt (Pantoni 2010; Biffi und Greenberg 2011; Banerjee et al. 2016; Charidimou et al. 2016b).

Als Risikofaktoren für die Entstehung einer HA sind vornehmlich ein fortgeschrittenes Alter und eine arterielle Hypertonie beschrieben, doch auch Diabetes mellitus sowie Rauchen werden als Einflussfaktoren zur Ausbildung (mikro)vaskulärer Schäden aufgeführt (Pantoni 2010; Charidimou et al. 2016b; Haffner et al. 2016). Auch für die Entstehung einer CAA ist ein fortgeschrittenes Alter als entscheidender Risikofaktor beschrieben, jedoch scheint zusätzlich das Vorhandensein eines bestimmten Apolipoprotein E (ApoE) Genotyps (ApoE  $\epsilon 2$  /  $\epsilon 4$ ) eine entscheidende Rolle zu spielen (Biffi und Greenberg 2011; Schilling et al. 2013). So unterstützt das ApoE  $\epsilon 4$  Allel die vaskuläre Ablagerung von A $\beta$  im Zuge einer CAA-Entstehung, wohingegen das ApoE  $\epsilon 2$  Allel strukturelle Veränderungen der Amyloid-reichen Gefäße und folglich deren Anfälligkeit für eine Gefäßwandruptur begünstigt (Greenberg et al. 1998; Viswanathan und Greenberg 2011).

Bildgebende Verfahren sind zu Lebzeiten das wichtigste Diagnosekriterium zur Feststellung einer wahrscheinlichen HA und CAA. Die Diagnose einer definitiven CAA kann jedoch nur anhand histologischer Untersuchungen des betroffenen Hirngewebes im Rahmen einer Autopsie oder Hirnbiopsie erfolgen (Biffi und Greenberg 2011). Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) lassen sich intravital verschiedene Merkmale der zerebralen Mikroangiopathie detektieren. Zu den hämorrhagischen Markern zählen unter anderem intrazerebrale Blutungen (IZB) sowie zerebrale Mikroblutungen (ZMB). Sowohl die IZB als auch die ZMB sind im Falle einer CAA strikt lobär lokalisiert und bei einer HA eher in den tiefen Hirnregionen (Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm) zu finden (Wilson et al. 2014; Charidimou et al. 2016a; Charidimou et al. 2017b). Die nicht-hämorrhagischen Marker dagegen umfassen kleine subkortikale Infarkte, Lakunen, Mikroinfarkte, WMH

sowie erweiterte perivaskuläre Räume (PVR). Kleine subkortikale Infarkte sowie das Auftreten multipler Lakunen in tiefen Hirnregionen werden mit einer HA in Verbindung gebracht, eine Assoziation mit einer CAA ist dagegen nicht typisch (Charidimou et al. 2016b). Mikroinfarkte, die durch ihre geringe Größe von maximal 1 mm nur in der hochauflösenden 7-Tesla MRT dargestellt werden können, werden sowohl bei der HA als auch der CAA beschrieben (Smith et al. 2012). Das Auftreten von WMH in der tiefen weißen, aber auch grauen Substanz (u.a. in den Basalganglien) wird häufig bei einer HA beschrieben; bei einer CAA finden sich WMH dagegen eher im posterioren Teil des Gehirns sowie als subkortikale Spots. Generell ist das Auftreten von WMH jedoch nicht sehr sensitiv, um eine HA von einer CAA abzugrenzen (Thanprasertsuk et al. 2014; Charidimou et al. 2016a; Charidimou et al. 2017b). Auch die erweiterten PVR sind sowohl bei der HA als auch der CAA zu finden, weisen jedoch unterschiedliche Lokalisationen auf. So sind die für die HA typischen PVR vornehmlich in den Basalganglien beschrieben, wohingegen die PVR bei einer CAA eher in der weißen Substanz gefunden werden (Charidimou et al. 2017b).

#### **1.4.2 Die perivaskuläre Drainage von Amyloid- $\beta$**

Die perivaskuläre Drainage erfolgt über die interstitielle Flüssigkeit entlang der Wand der zerebralen Blutgefäße und ist ein wichtiger Prozess bei der Entfernung potentiell neurotoxischer Stoffe, wie A $\beta$ , aus dem Gehirn. Eine Störung dieser Drainage kann zur Akkumulation von A $\beta$  in der Gefäßwand führen und wird folglich als mögliche Ursache einer CAA diskutiert (Grinberg und Thal 2010; Tarasoff-Conway et al. 2015). Die Güte der perivaskulären Drainage hängt unmittelbar von der Pulsatilität der Gefäßwand ab, die eine strukturell und funktionell intakte Vaskulatur voraussetzt.

Kommt es zu einer insuffizienten Pulsation, z.B. infolge einer Gefäßwandpathologie, beeinträchtigt dies die Beseitigung von A $\beta$  entlang der Basalmembranen, und begünstigt somit die Entstehung einer CAA (Schley et al. 2006; Grinberg und Thal 2010; Tarasoff-Conway et al. 2015).

#### **1.4.3 Gemeinsamkeiten von hypertensiver Arteriopathie und zerebraler Amyloidangiopathie**

Obwohl HA und CAA häufig als separate pathologische Entitäten der zerebralen Mikroangiopathie beschrieben werden, zeigen beide Erkrankungen verschiedene Gemeinsamkeiten. So finden sich gemeinsame Risikofaktoren (z.B. Alter, siehe oben), Funktionsstörungen der Arteriolen verbunden mit Durchblutungsstörungen des Gehirns, strukturelle Veränderungen der weißen Substanz sowie eine Neurodegeneration. Zudem werden sowohl die HA als auch die CAA als Hauptursachen für die Entwicklung einer VaD bzw. VCI beschrieben (Greenberg et al. 2004; Cai et al. 2015; Reijmer et al. 2016; Charidimou et al. 2017a).

#### **1.4.4 Mischbilder aus hypertensiver Arteriopathie und zerebraler Amyloidangiopathie**

Im klinischen Alltag zeigt sich bei etwa 15% bis zu 60% der Patienten in der MRT ein Mischbild aus lobären und tiefen Blutungen (Smith et al. 2010; Yakushiji et al. 2011; Tsai et al. 2017; Pasi et al. 2018); diese können somit weder eindeutig der Gruppe der CAA- noch der HA-Patienten zugeordnet werden. Zusätzlich findet sich bei Patienten, die ein solches gemischtes Blutungsmuster aufweisen, verglichen mit den reinen HA-Patienten eine erhöhte zerebrale Amyloid-Belastung in der Positronen-

Emissions-Tomographie (Tsai et al. 2017). Insgesamt wird auf die Patientengruppe mit gemischten Blutungsmustern in der aktuellen Literatur kaum eingegangen; entsprechend unzureichend ist sie charakterisiert. Einzelne Autoren postulieren, dass es sich bei derartigen Fällen sowohl um Patienten mit einer schwersten HA bzw. einer mit vaskulären Risikofaktoren assoziierten Pathologie, als auch um solche mit einer tatsächlichen Kombination aus HA und CAA handeln könnte (Yakushiji et al. 2011; Pasi et al. 2018). In letzterer könnte eine HA-assoziierte Störung der perivaskulären A $\beta$ -Drainage zu einer beeinträchtigten Amyloid-Beseitigung und folglich zu vaskulären A $\beta$ -Ablagerungen in Form einer CAA führen (siehe 1.4.2) (Kim et al. 2016).

Unbeantwortet ist die Frage, ob im Falle des gemeinsamen Auftretens einer HA zusammen mit einer CAA im gleichen Hirn, beide Gefäßpathologien einfach koinzident sind (z.B. aufgrund des gemeinsamen Risikofaktors Alter). Neben dieser möglichen Koinzidenz von HA und CAA lässt sich alternativ auch ein kausaler Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen diskutieren, d.h. die eine Gefäßpathologie begünstigt das Auftreten der anderen im gleichen Hirn. Die Frage der Kausalität ist von hohem Interesse, da bis heute weder eine krankheitsspezifische noch eine kausal-präventive Behandlung der CAA möglich ist. Ein denkbarer kausaler Zusammenhang zur HA würde der Risikofaktorprävention als Ansatz zur Vorbeugung / Behandlung einer CAA eine vollkommen neue Bedeutung geben.

Am Menschen kann die definitive Diagnose einer zerebralen Mikroangiopathie häufig erst anhand bioptischer und Autopsie-Untersuchungen erfolgen, in denen jedoch

regelmäßig bereits weit fortgeschrittene Gefäßschädigungen (Mikroblutungen, Thrombosen, Gefäßwandverdickungen in Form einer Arteriosklerose, usw.) gefunden werden. Auch in der intravitale MRT lassen sich nur Spätstadien der Mikroangiopathie in Form von Gefäßrupturen (Mikroblutungen) oder bereits ausgedehnten Hirngewebschädigungen (z.B. Infarkte infolge von Gefäßverschlüssen, WMH) detektieren. Die direkte intravitale Darstellung der erkrankten Mikrovaskulatur zur Erfassung initialer Gefäßpathologien gelingt aktuell weder im Rahmen der klinischen MRT-Diagnostik noch in der hochauflösenden 7-Tesla MRT. Da folglich die Darstellung der Gefäßpathologien der kleinen Hirngefäße am lebenden Menschen bisher nicht möglich ist, erfordern Untersuchungen zum Verständnis der Ursachen, frühen Folgen und zur Entwicklung neuer therapeutisch-kausaler Ansätze zur Verzögerung des Fortschreitens einer zerebralen Mikroangiopathie den Einsatz von Grundlagenforschung. Daher soll in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines geeigneten Tiermodells intravitale und postmortal gezielt die (initiale) Pathologie der HA sowie der Zusammenhang zwischen HA und CAA erforscht werden, um ein tiefgreifendes Verständnis der Pathologie der zerebralen Mikroangiopathie und folglich der VaD zu erhalten.

## 1.5 Tiermodelle vaskulärer Hirnpathologien

Die Tiermodelle der zerebralen Mikroangiopathie umfassen im Wesentlichen (1) die Modelle mit embolischen Infarkten, (2) die mit einer auf einer Hypoperfusion basierenden Pathologie, (3) genetisch determinierte Krankheitsvarianten wie die zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (engl. *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*, CADASIL) und (4) die mit chronischer / induzierbarer arterieller Hypertonie.

Bei den Tiermodellen mit embolischen Infarkten wird die vaskuläre Pathologie durch die Injektion einer Suspension mit Blutgerinnseln oder durch einen photochemischen Endothelschaden hervorgerufen. Der induzierte Endothelschaden wird dabei von einer BHS-Störung begleitet. Des Weiteren zeigen sich in diesen Modellen kleine Infarkte in der grauen Substanz, deren Schaden sich in alle Kortexschichten ausbreitet. In diesen embolischen Tiermodellen werden deutliche sensomotorische und kognitive Verhaltensdefizite proportional zum Grad der Hirnverletzung und eine hohe Mortalitätsrate beschrieben (Kudo et al. 1982; Watson et al. 1985; Overgaard et al. 1992; Nishimura et al. 2006; Hainsworth und Markus 2008).

Bei den hypoperfusionsbasierten Tiermodellen führt beispielsweise ein bilateraler Verschluss der Karotiden zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses auf unter 50% sowie zu Störungen der BHS mit Ablagerungen von Collagen in den kleinen Gefäßwänden und Läsionen in der weißen Substanz. Diese Tiere zeigen zudem kognitive Beeinträchtigungen speziell beim räumlichen Lernen und in der

Gedächtnisfunktion sowie anhaltende Lerndefizite (Ni et al. 1994; Wakita et al. 1995; Ohta et al. 1997; Ueno et al. 2002; Farkas et al. 2004; Holland et al. 2015).

Die CADASIL Tiermodelle werden genutzt, um eine seltene autosomal dominante Form der zerebralen Mikroangiopathie zu untersuchen. Hierbei führt eine Mutation des Membranrezeptors Notch3 zur degenerativen Veränderung der Gefäßwand und einer Reduktion des zerebralen Blutflusses. Die chronische Hypoperfusion wird als Ursache für die ebenfalls beschriebenen WMH angesehen und führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung von Schlaganfällen. Dennoch werden für diese Tiere keine Schlaganfall-ähnlichen Läsionen beschrieben und auch Auffälligkeiten der kognitiven oder motorischen Funktionen sind scheinbar nicht zu finden (Ruchoux et al. 2003; Lacombe et al. 2005; Joutel et al. 2010; Joutel 2015; Baron-Menguy et al. 2017).

Bei den hypertensiven Tiermodellen zeigen transgene Renin-Angiotensin-Mäuse nur einen geringen Bluthochdruck von etwa 150 mmHg systolisch und kaum vaskuläre Schäden; jedoch kann durch eine Salzdiät und den Einsatz des Stickoxid-Synthase Inhibitors L-NAME eine progressive Hypertonie mit Werten von bis zu 200 mmHg systolisch hervorgerufen werden, die zur Ausbildung multipler hämorrhagischer und ischämischer Läsionen führt. Kognitive Beeinträchtigungen werden bei den Renin-Angiotensin-Mäusen bisher nicht beschrieben (Baumbach et al. 2003; Iida et al. 2005; Wakisaka et al. 2008). Die spontan hypertensive stroke-prone Ratte (SHRSP) weist ohne den Einsatz einer Salzdiät bereits im Alter von 10 Lebenswochen eine maligne arterielle Hypertonie mit systolischen Werten von 200 mmHg auf und zeigt multiple zerebrovaskuläre Läsionen vornehmlich in kortikalen Regionen und etwas

weniger häufig in den Basalganglien; zusätzlich werden durch eine Salzdiät in diesen Tieren häufig gezielt Schlaganfälle hervorgerufen. Zudem wurden Lern- und Gedächtnisdefizite in der SHRSP beschrieben. Yamori et al. 1976; Yamaguchi et al. 1994; Hainsworth und Markus 2008; Hainsworth et al. 2012; Schreiber et al. 2012.

Keines dieser Modelle spiegelt perfekt alle wesentlichen Merkmale der humanen zerebralen Mikroangiopathie wie WMH, ZMB und Lakunen wider. Problematisch ist v.a., dass die zerebral-vaskuläre Pathologie in diesen Tiermodellen häufig anhand makrovaskulärer Pathologien, wie embolischer Infarkte oder Karotidstenosen induziert wird. Human ist die Datenlage zum Zusammenhang zwischen Makro- und Mikroangiopathie jedoch inkonsistent. So beschreibt die „Framingham Heart Study“ keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ZMB in Patienten mit Karotidstenosen von  $\geq 50\%$  (Romero et al. 2016), wohingegen eine andere Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen Stenosen der großen Arterien von  $\geq 50\%$  und ZMB findet (Ding et al. 2017). Tiermodelle, bei denen die „mikrovaskuläre“ Pathologie durch makroangiopathische Veränderungen induziert wird und von einem direkten Zusammenhang zwischen Makro- und Mikroangiopathie ausgegangen wird, sind somit nicht unbedingt geeignet, um die humanen Pathologien abzubilden.

Genetische Mikroangiopathieformen wie die CADASIL sind sehr selten; CADASIL-Modelle eignen sich daher wenig, um die üblicherweise alters- und hypertoniebedingten Pathologien der sporadischen zerebralen Mikroangiopathie zu untersuchen.

Vor- und Nachteile der verschiedenen Tiermodelle zur Darstellung der verschiedenen Pathologien finden sich in **Tabelle 1**. Hypertensive Tiere stellen dabei eine gute

Alternative zu den Modellen mit makroangiopathischen Veränderungen oder genetischen Mikroangiopathie-Varianten dar. Ein Nachteil der Renin-Angiotensin-Mäuse ist, dass sie eine Hypertonie und die daraus resultierenden vaskulären Pathologien erst durch den Einsatz einer Salzdiät entwickeln, die SHRSP zeigt die entsprechenden Pathologien dagegen auch ohne derartige Maßnahmen. Zusätzlich spiegelt die SHRSP die Gefäßpathologien und hirmorphologischen Veränderungen der humanen sporadischen zerebralen Mikroangiopathie gut wider und kann daher für die Untersuchung der mikrovaskulären Pathologien höchstwahrscheinlich als sehr geeignet eingeschätzt werden (Hainsworth und Markus 2008; Bailey et al. 2011).

**Tabelle 1: Vergleich der verschiedenen Tiermodelle der zerebralen Mikroangiopathie**

	<b>Gefäßpathologie<sup>1</sup></b> <b>(zerebrale Mikroangiopathie)</b>	<b>Kleine lakunäre</b> <b>Infarkte</b>	<b>Marklagerläsionen (WMH)</b>	<b>Kognitive</b> <b>Beeinträchtigungen</b>
<b>Modelle mit embolischen Infarkten</b>				
○ Injektion einer Suspension mit Blutgerinnseln	-	+	-	na
○ Photochemischer Endothelschaden	-	-	-	+
<b>Hypoperfusions-basierte Modelle</b>				
○ bilateraler Verschluss der Karotiden	+	-	+	+
<b>Mutations-basierte Modelle mit Gefäßschaden</b>				
○ CADASIL	+	-	+	-
<b>Hypertensive Modelle</b>				
○ transgene R <sup>+</sup> /A <sup>+</sup> Mäuse	+	+	na	na
○ SHRSP	+	+	- / +	+

CADASIL - zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (engl. *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*), na - nicht angegeben, R<sup>+</sup>/A<sup>+</sup> Mäuse - Renin-Angiotensin-Mäuse, SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten, WMH - engl. *white matter hyperintensities*

<sup>1</sup> Gefäßpathologien des Gehirns einschließlich Verdickung der Gefäßwand, Verengung des Gefäßlumens, Verlust der glatten Muskelzellen, fibrinoider Nekrose, BHS-Störungen oder Extravasation von Blutzellen oder Plasmaproteinen

Es gibt nur wenige Tiermodelle, die gemischte zerebrale Pathologien aufweisen; zu diesen zählen die Modelle mit zerebraler Mikroangiopathie und gleichzeitiger Akkumulation von A $\beta$ . Zu den hypertensiven Tiermodellen, die diese Mischpathologien entwickeln, gehören C57/BL6-Mäuse, in denen die Hypertonie durch eine chronische Angiotensin-II Infusion oder durch eine Verengung der Aorta induziert wird. Diese Tiere zeigen eine erhöhte Expression von A $\beta$ -produzierenden Genen sowie eine gesteigerte Ablagerung von parenchymalem A $\beta$  im Gehirn (Gentile et al. 2009; Csiszar et al. 2013). In einer weiteren Studie wird die Hypertonie durch eine künstlich induzierte Arterienverkalkung hervorgerufen und ist mit Ablagerungen von A $\beta$  im Parenchym sowie an den zerebralen Blutgefäßen assoziiert (Carnevale et al. 2012). Als weiteres Mikroangiopathie-Modell zeigen Sprague-Dawley-Ratten mit bilateralem Karotidverschluss neben Läsionen der weißen und grauen Substanz auch eine Erhöhung von A $\beta$  im Plasma und Hirnparenchym (Liu et al. 2012).

Da eine CAA in 80%-90% der Fälle ebenfalls bei einer AD zu finden ist (Yamada 2015), können neben den Tiermodellen der zerebrale Mikroangiopathie zahlreiche transgene AD-Tiermodelle zur Untersuchung der A $\beta$ -bezogenen vaskulären Pathologie genutzt werden. Diese transgenen Modelle bilden familiäre AD-Varianten mit A $\beta$ -Mutationen ab; sie zeigen eine massive und rapide A $\beta$ -Akkumulation mit Ausbildung einer schwersten CAA (Philipson et al. 2010). Jedoch weisen diese Modelle keine Hypertonie-assoziierten Gefäßpathologien im Sinne einer HA auf. Sie sind daher wenig geeignet, um mögliche Interaktionen zwischen einer altersabhängig und sporadisch auftretenden HA und CAA zu untersuchen, was die Suche nach

einem geeigneten Tiermodell zur gemeinsamen Untersuchung der beiden Formen der zerebralen Mikroangiopathie im gleichen Hirn weiter vorantreibt.

### **1.6 Die spontan hypertensive stroke-prone Ratte als Tiermodell der zerebralen Mikroangiopathie**

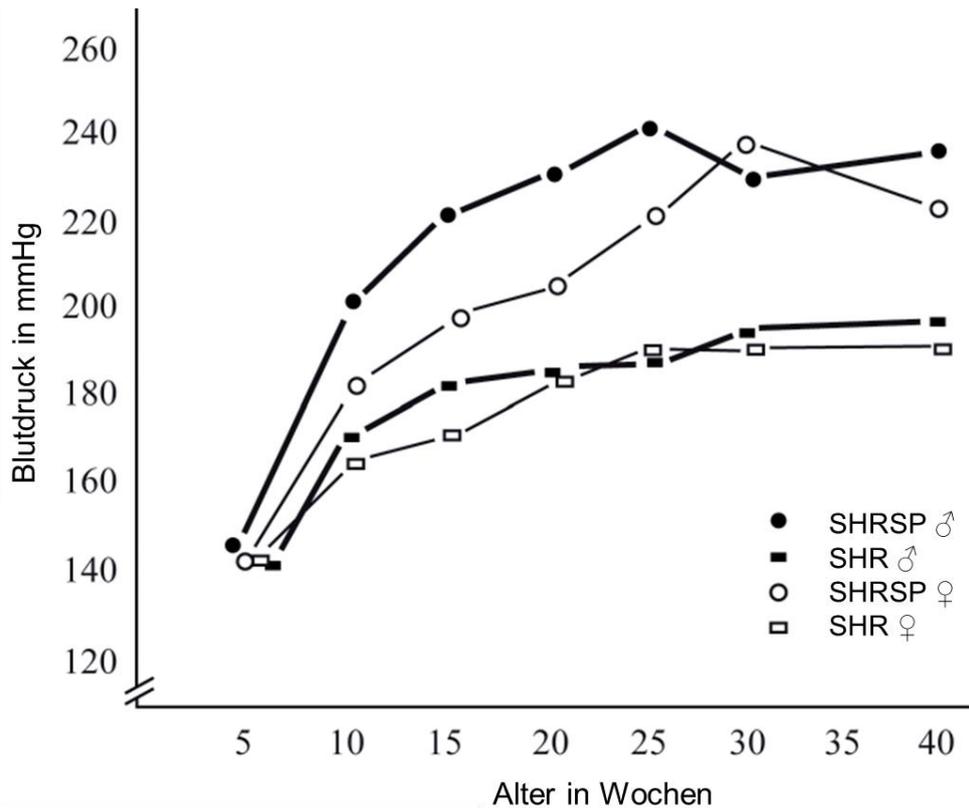
Bereits 1963 etablierten Okamoto und Aoki das Modell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) durch Verpaarung von spontan hypertensiven Wistarratten; durch diese Inzucht lag die Häufigkeit der Tiere mit arterieller Hypertonie bereits in der dritten Generation bei 100% und war daraufhin in allen folgenden Generationen feststellbar (OKAMOTO und AOKI 1963). Aus der SHR wurde 1974 die SHRSP entwickelt (OKAMOTO et al. 1974), die im Vergleich zur SHR einen signifikant erhöhten Blutdruck (**Abbildung 3**), einen signifikant erniedrigten regionalen zerebralen Blutfluss und folglich eine signifikant erhöhte Anzahl spontaner zerebraler Infarkte entwickelte. In der SHRSP konnte dabei der Kortex mit 70% gefolgt von den Basalganglien (25%) als Hauptprädispositionsstelle für spontane Infarkte festgestellt werden. Begleitend zeigte sich im Vergleich zu gesundem Gewebe eine signifikante Verringerung des zerebralen Blutflusses an den Läsionsstellen (Yamori et al. 1976; Yamori und Horie 1977; Henning et al. 2010).

Die in der SHRSP beschriebene arterielle Hypertonie wird durch viele Faktoren hervorgerufen und kann nicht auf eine alleinige spezifische Veränderung zurückgeführt werden. So werden u.a. Veränderungen des Renin-Angiotensin-Systems beschrieben: hier sind in der SHRSP im Vergleich zu Wistar-Kontrolltieren erhöhte Plasmaprenin- und Angiotensin-II-Werte zu finden; weiterhin werden erhöhte

Werte des Angiotensin-konvertierenden Enzyms sowie der Angiotensinrezeptoren 1a und 1b in der Nebennierenrinde beschrieben (Kim et al. 1992; Obata et al. 2000). Weitere Ursachen für die Ausbildung einer Hypertonie in der SHRSP sind Veränderungen des Endothelinsystems (Jesmin et al. 2007) sowie eine erhöhte adrenerge Kontrolle der Blutgefäße (Shimamura et al. 1987); auch Effekte des Prostaglandin-Systems werden als ausschlaggebend für die Entwicklung des Bluthochdrucks in der SHR beschrieben (McGiff und Quilley 1981) und könnten ebenso in der SHRSP eine Rolle spielen.

Anhand der postmortalen Daten unserer eigenen Gruppe und Daten aus der Literatur kann die zerebrale Mikroangiopathie in der SHRSP als heterogene Erkrankung charakterisiert werden, d.h. dass nicht in allen Tieren auch alle beschriebenen Pathologien zu finden sind. Zusätzlich nimmt die Schwere der HA mit fortgeschrittenem Alter zu. Allgemein ist die zerebrale Mikroangiopathie in der SHRSP histologisch etwa ab einem Alter von 18 Wochen durch eine Störung der BHS, einen Endothelschaden, die Akkumulation von Plasmaproteinen (z.B. Fibrin oder Immunglobulin G (IgG)) in den Wänden der kleinen Hirngefäße sowie ab etwa der 28. Lebenswoche durch eine degenerative Gefäßwandverdickung (Arteriolosklerose, Hyalinose) gekennzeichnet (Fredriksson et al. 1985; Tagami et al. 1987; Fredriksson et al. 1988; Ginsberg und Busto 1989; Bailey et al. 2009; Schreiber et al. 2012). Zusätzlich finden sich erweiterte PVR, die sich speziell im Bereich einer geschädigten BHS detektieren und mittels zerebraler Bildgebung mit erhöhter Frequenz auch im Gehirn von Patienten mit zerebraler Mikroangiopathie nachweisen lassen (siehe 1.4.1) (Fredriksson et al. 1988; Saito et al. 1995; Wardlaw et al. 2013a). Zudem sind ab einem Alter von 28 Wochen vermehrt

Gefäßverschlüsse von Arteriolen und kleinen Arterien zu finden, die zur Ausbildung spontaner Infarkte in etwa 10% bis 20% der Tiere führen können (Ogata et al. 1981; Tagami et al. 1987; Schreiber et al. 2012). Diese sind wiederum durch spongiöses Gewebe sowie die Ausbildung nekrotischer Zysten, das Auftreten von Makrophagen und eine vermehrte Detektierbarkeit von reaktiven Astrozyten gekennzeichnet (Ogata et al. 1981; Fredriksson et al. 1985; Saito et al. 1995). Einige Arbeiten beschreiben zudem das Auftreten großer Hirnblutungen, jedoch liegen die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten weit auseinander. So beschrieben zwei Studien makroskopische Blutungen in 14% bzw. 37% der SHRSP im Alter zwischen 22 und 40 Wochen (Takiguchi 1983; Schreiber et al. 2012). Werden die Tiere einer Salzdiät unterzogen, so steigt die Blutungsprävalenz drastisch an und liegt im Alter von 16 bis 18 Wochen bereits zwischen 70% und 100% (Smeda et al. 1999; Lee et al. 2007).



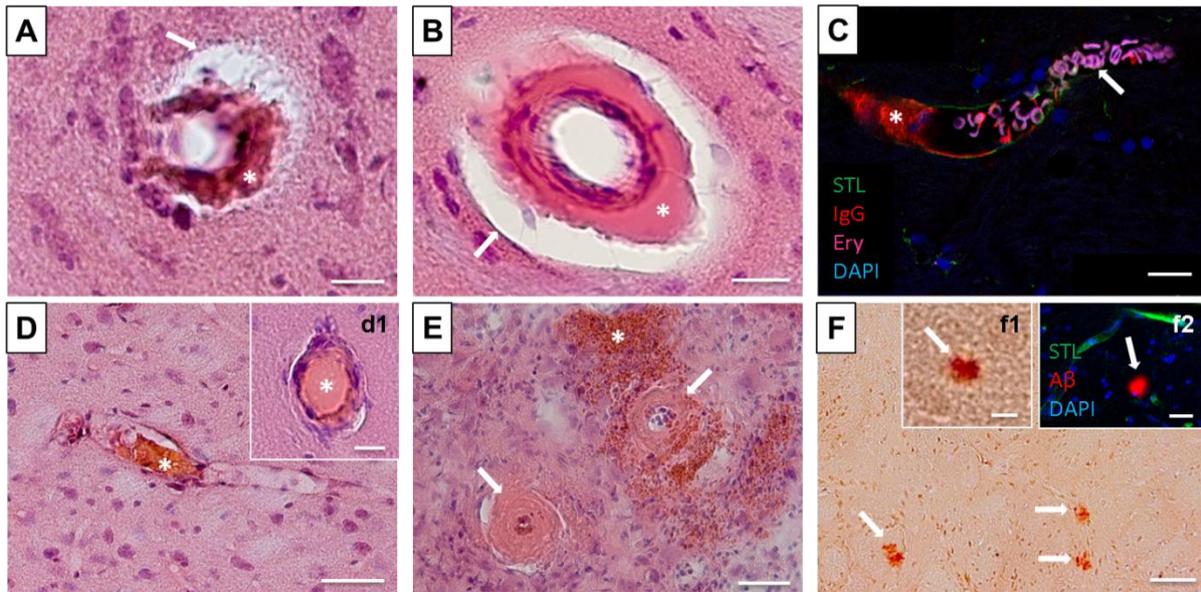
**Abbildung 3: Systolische Blutdruckwerte in stroke-prone (SHRSP) und stroke-resistent (SHR) spontan hypertensiven Ratten.**

Im Alter von 10 Wochen weisen männliche SHRSP eine maligne arterielle Hypertonie mit systolischen Werten von 200 mmHg auf und erreichen ab etwa der 25. Lebenswoche systolische Werte von bis zu 240 mmHg. Die weiblichen SHRSP erreichen systolische Blutdruckwerte von 200 mmHg mit 20 Wochen und von 240 mmHg mit 30 Wochen. Der Stamm der SHR weist sowohl für Männchen als auch Weibchen niedrigere Blutdrücke mit Maximalwerten von etwa 180-190 mmHg ab der 25. Lebenswoche auf.

Abbildung modifiziert nach (Yamori et al. 1976).

Neben den zerebralen Läsionen sind auch in anderen Organen der SHRSP pathologische Veränderungen zu finden; so zeigen sich eine fibrinoide Nekrose der Gefäßwand oder Gefäßwandverdickungen der Arteriolen und kleinen Arterien beispielsweise in der Nebenniere, im Hoden oder in den Mesenterien des Darms (Ogata et al. 1981). Am besten untersucht ist für die SHRSP abgesehen vom Gehirn jedoch die Pathologie der Niere: auch hier werden eine fibrinoide Nekrose sowie Verdickungen der *Tunica Media* und *Tunica Intima* der Gefäßwand von Arteriolen und kleinen Arterien beschrieben; weiterhin finden sich eine Glomerulosklerose, eine Schädigung des tubulointerstitiellen Gewebes sowie Stenosen oder thrombotische Gefäßverschlüsse (Ogata et al. 1981; Suganami et al. 2003; Schreiber et al. 2012).

Interessanterweise zeigen unsere eigenen Vorarbeiten, dass etwa 20% der SHRSP spontan zerebrale parenchymale Amyloid-Ablagerungen entwickeln. So findet sich das parenchymale A $\beta$  in der Histologie vornehmlich in kortikalen Regionen (ca. 70%) und weniger häufig in den Basalganglien oder dem Hippokampus (Bueche et al. 2014; Schreiber et al. 2014). Zudem konnte mittels Western Blot eine zerebrale Hochregulierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (engl. *amyloid precursor protein*, APP) im Kortex gefunden werden (Schreiber et al. 2014). Eine aktuelle Studie aus China beschreibt mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay ebenfalls ein erhöhtes A $\beta$ -Level im Kortex sowie Hippokampus der SHRSP im Vergleich zu Kontrolltieren (Zhang et al. 2018). In **Abbildung 4** werden mittels histologischer und immunohistochemischer Färbungen exemplarisch die wesentlichen Hirnpathologien der SHRSP demonstriert.



**Abbildung 4: Zerebrale Mischpathologien der SHRSP.**

Die SHRSP zeigt degenerative Gefäßwandveränderungen wie eine Arteriosklerose (**A**, Stern) und Lipohyalinose (**B**, Stern) der kortikalen Arteriolen und kleinen Arterien. In **A & B** sind dabei die pathologischen Ablagerungen in der Gefäßwand zusammen mit einem erweiterten perivaskulären Raum (Pfeile in **A & B**) um das pathologisch veränderte Gefäß zu erkennen. Die Ablagerung von IgG in der Gefäßwand von Arteriolen (**C**, Stern) ist Ausdruck einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, die zusätzlich durch die Ablagerung autofluoreszierender Erythrozyten (Ery; **C**, Pfeil) gekennzeichnet ist. Nach dem Verschluss der kleinen Blutgefäße (**D**, **d1**, Sterne) kann es zu Infarkten mit Blutungen (**E**, Stern) und Thromben (**E**, Pfeile) kommen. Neben diesen Pathologien der zerebralen Mikroangiopathie sind in der SHRSP ebenfalls parenchymale A $\beta$ -Ablagerungen (**F**, **f1**, **f2**, Pfeile) zu finden.

A $\beta$  - Amyloid- $\beta$  (Markierung von parenchymalem A $\beta$ ), DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Markierung der Zellkerne), Ery - autofluoreszierende Erythrozyten, IgG - Immunglobulin G (Markierung einer Blut-Hirn-Schranken-Störung), SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten, STL – Solanum Tuberosum Lektin (Endothelmarkierung); **A**, **B**, **D**, **d1**, **E** - Hämatoxylin-Eosin-Färbung; **F**, **f1** - Kongorot-Färbung; **C**, **f2** - Immunhistochemie. Maßbalken: **C**, **f1** - 10  $\mu$ m; **A**, **B**, **d1**, **f2** - 20  $\mu$ m; **D-F** - 50  $\mu$ m.

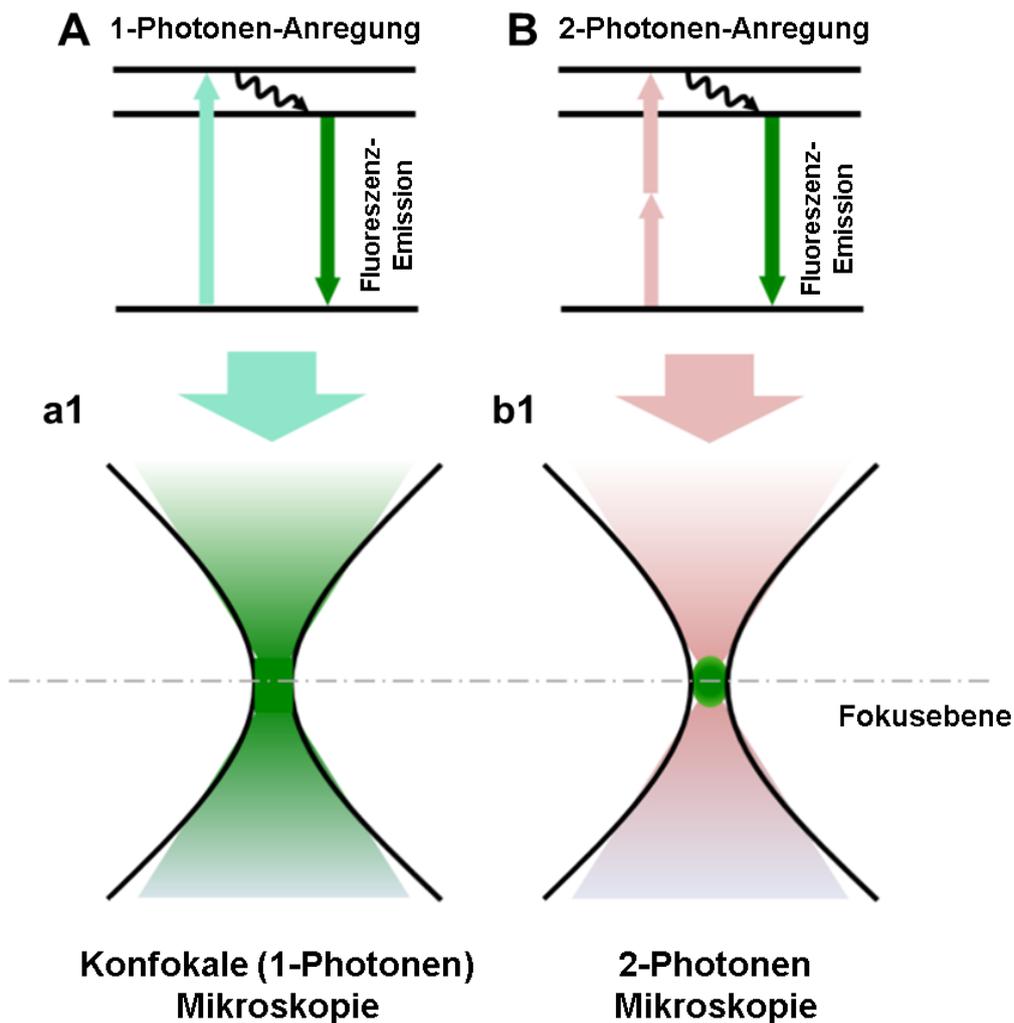
## 1.7 2-Photonen-Mikroskopie

Im Gegensatz zu den beim Menschen eingesetzten bildgebenden Techniken wie z.B. der MRT hat die in der Grundlagenforschung am lebenden Tier angewendete 2-Photonen-Mikroskopie (2PM) das Potential zur direkten Visualisierung der kleinen, kortikalen Gefäße einschließlich der Kapillaren und Arteriolen. Herkömmliche Mikroskopietechniken wie die Konfokalmikroskopie sind in ihrer Eindringtiefe ins Gewebe auf maximal 100  $\mu\text{m}$  und somit auf die Gewebeoberfläche begrenzt (Helmchen und Denk 2005). Durch den Einsatz der 2PM kann eine tiefere Bildgebung im Bereich von 300-500  $\mu\text{m}$  erfolgen (Oheim et al. 2001; Shih et al. 2012); die Visualisierung von subkortikalen Pathologien der Ratte *in vivo* ist jedoch auch mit der 2PM nicht realisierbar.

Bei der Konfokalmikroskopie erfolgt die 1-Photonen-Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe durch die Absorption eines einzelnen Photons, welches genügend Energie liefert, um den angeregten Zustand zu erreichen. Bei der 2-Photonen-Anregung dagegen werden gleichzeitig zwei Photonen niedriger Energie absorbiert; dies geschieht bei einer Wellenlänge, die etwa doppelt so groß ist wie die für die 1-Photonen-Anregung in der konfokalen Mikroskopie erforderliche Wellenlänge. Die nachfolgende Fluoreszenzemission ist dabei bei beiden Anregungsarten identisch. In der Konfokalmikroskopie wird das einfallende Licht bei Erhöhung der Eindringtiefe größtenteils vom Gewebe absorbiert oder gestreut bevor es die Fokusebene erreicht, was zur Ausbleichung der Probe bzw. Reduzierung der Stärke der Fluoreszenzfarbstoffe (Photobleichung) führt. Für eine hochauflösendere Bildgebung ist daher die 2PM von Vorteil, da durch den Einsatz von Lichtquellen mit längerer Wellenlänge und niedrigerer Energie weniger laserinduzierte Schädigungen

des Gewebes und weniger Photobleichung auftreten. Langwelliges und niederfrequentes Licht wird zudem weniger im Gewebe gestreut und ermöglicht – wie oben bereits beschrieben – eine tiefere Gewebepenetration (Denk et al. 1990; Denk und Svoboda 1997; Helmchen und Denk 2005; Svoboda und Yasuda 2006). Das Prinzip der 1- und 2-Photonen-Anregung ist in **Abbildung 5** dargestellt.

Im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie ist die 2PM von enormem Vorteil, um *in vivo* die Blutgefäße der tieferen Kortexregionen und nicht nur die Gewebeoberfläche des Rattenhirns zu untersuchen. Die Darstellbarkeit der kortikalen Mikrovaskulatur des lebenden Tieres bietet die Möglichkeit der Untersuchung der möglichen Pathologien der zerebralen Mikroangiopathie bei gleichzeitiger Messung des zerebralen Blutflusses. Da sich mit Hilfe geeigneter Marker am lebenden Tier sowohl die zerebralen Blutgefäße als auch eine A $\beta$ -Pathologie darstellen lassen, erscheint die 2PM als hervorragend geeignet, um denkbare Interaktionen zwischen mikrovaskulärer Pathologie, HA- und CAA-Entwicklung zu erfassen.



**Abbildung 5: Prinzip der Konfokal- und 2-Photonen-Mikroskopie.**

Die 1-Photonen-Anregung für die Konfokalmikroskopie erfolgt durch die Absorption eines einzelnen Photons, dessen Energie ausreicht, um den Anregungszustand herzustellen (**A**, Pfeil türkis), wohingegen sich die 2-Photonen-Anregung aus der gleichzeitigen Absorption zweier Photonen niedrigerer Energie ergibt (**B**, Pfeile rosa). Die folgende Fluoreszenzemission ist zwischen beiden Methoden nicht unterscheidbar (**A & B**, Pfeile grün). Bei der konfokalen Mikroskopie erfolgt die Anregung über das gesamte Probenvolumen (**a1**, grün), wodurch Photoschäden und Photobleichen begünstigt werden. Für die 2-Photonen-Mikroskopie erfolgt die Anregung dagegen direkt in der Fokusebene (**b1**, grüner Punkt).

Die 2PM ist an verschiedenen Rattenmodellen einschließlich Wistarratten und Sprague-Dawley-Ratten ohne intrinsische zerebrovaskuläre Pathologien (Baraghis et al. 2011; Cho et al. 2011; Shih et al. 2013) sowie SHR (Baumann et al. 2007; Calcinaghi et al. 2013), einem Tiermodell für chronische arterielle Hypertonie mit einer relativ geringen spontanen Infarktentwicklung, etabliert. Sowohl SHR als auch SHRSP entwickeln eine arterielle Hypertonie und eine assoziierte vaskuläre Pathologie, allerdings ist in der SHRSP verglichen mit der SHR die vaskuläre Pathologie ausgeprägter. Zusätzlich wird in SHRSP eine gestörte myogene Autoregulation der Blutgefäße beschrieben, was eine erhöhte Blutungsneigung und Infarktanfälligkeit vermuten lässt (Arai et al. 1988; Izzard et al. 2003).

## **1.8 Hypothesen der vorliegenden Arbeit**

Die vorliegende Arbeit prüft die Hypothese, dass die 2PM auch an der SHRSP etabliert werden kann. Es wird dabei davon ausgegangen, dass die SHRSP im Vergleich zu Wistarratten unter der intravitalem Mikroskopie eine erhöhte Blutungsneigung zeigt und vermehrt Schlaganfälle entwickelt, was hypothetisch zu einer höheren Mortalitätsrate in diesen Tieren führen müsste. Zusätzlich wird hypothetisiert, dass sich intravital sowohl eine BHS-Störung als auch Thromben und Blutungen als Phänomene der HA detektieren lassen. Da sich die HA in der SHRSP anhand der Literatur als heterogene Erkrankung darstellt, ist anzunehmen, dass intravital nicht alle Tiere von den jeweiligen HA-Phänomenen mit gleicher Prävalenz und in gleicher Ausprägung betroffen sind. Demzufolge ist es das Ziel, die intravitale Prävalenz und Ausprägung der HA in Abhängigkeit des Lebensalters der Tiere zu beschreiben und zu untersuchen. Ein Abgleich zwischen intravitalem und postmortalen Gefäßpathologien sollte eine hohe Übereinstimmung der Funde liefern. Da vaskuläres A $\beta$  in Form einer CAA in den SHRSP bisher nicht beschrieben wurde, wird in dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob die SHRSP eine CAA entwickelt. Darüber hinaus wird die Annahme gemacht, dass eine HA und CAA im selben Tier und am selben Gefäß auftreten, und somit ein Zusammenhang zwischen beiden Gefäßpathologien postuliert.

Zusammenfassend ergaben sich somit folgende Fragestellungen für die vorliegende Arbeit:

- Ist die Etablierung der 2PM an der SHRSP möglich?
- Entwickelt die SHRSP im Vergleich zu Wistarratten mehr Blutungen während der Operation (OP) bzw. neigt die SHRSP während der OP zu Schlaganfällen?
- Gibt es eine erhöhte Mortalitätsrate in SHRSP verglichen mit Wistarratten?
- Lassen sich intravital Pathologien der zerebralen Mikroangiopathie in SHRSP und Wistarratten detektieren?
- Können die erwarteten HA-Phänomene (BHS-Störung, Thrombusbildung, perivaskuläre Blutungen) in der 2PM detektiert werden? Wenn ja, wie sind die intravitalen Prävalenzen der verschiedenen HA-Phänomene?
- Zeigen alle Tiere eine intravitale HA-Pathologie? Sind ältere Tiere häufiger betroffen als jüngere Tiere?
- Zeigen sich Gruppenunterschiede zwischen SHRSP und Wistar-Kontrolltieren?
- Sind die intravitalen Pathologien mit den postmortalen Pathologien zu vergleichen?
- Entwickelt die SHRSP eine CAA?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen HA und CAA, d.h. treten beide Pathologien im selben Tier oder sogar im selben Gefäß auf?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierhaltung**

Für die Experimente wurden Gruppen männlicher SHRSP (Lieferung im Alter von 6, 11 und 14 Wochen, Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, MA, USA) und normotensive Wistarratten (Lieferung im Alter von 8 und 11 Wochen, Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld) genutzt. Die Tiere wurden bei einem natürlichen Hell-Dunkel-Zyklus in Käfigen vom Typ IV (entspricht 1820 cm<sup>2</sup>, 2-4 Ratten pro Käfig) und mit freiem Zugang zu Futter (Futtermittel für Ratten und Mäuse, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Trinkwasser gehalten. Der Gesundheitsstatus der Tiere (Fellbeschaffenheit sowie der grobe neurologische Status inklusive Spontanmotorik, Aktivität, Fallneigung) wurde täglich überprüft. Die Tierversuche wurden gemäß der Genehmigung des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt durchgeführt.

### **2.2 Tierversuche**

Die Versuche für die vorliegende Arbeit wurden in verschiedenen Lebensaltern der Tiere (8-44 Wochen) durchgeführt. Zur Übung der Kraniotomie und dem Erlernen aller notwendigen Schritte für die OP sowie der intravitalem Bildgebung wurden zunächst 20 Wistarratten im Alter von 8-24 Wochen (Wo) genutzt (8 Wo - n = 1, 9 Wo - n = 6, 10 Wo - n = 3, 11 Wo - n = 3, 16 Wo - n = 2, 20 Wo - n = 2, 21 Wo - n = 1, 22 Wo - n = 1, 24 Wo - n = 1). Für die intravitale Bildgebung

sollten 35 SHRSP (17 Wo - n = 2, 18 Wo - n = 3, 28 Wo - n = 5, 30 Wo - n = 3, 31 Wo - n = 4, 32 Wo - n = 8, 33 Wo - n = 4, 39 Wo - n = 3, 44 Wo - n = 3) und 26 Wistarratten (17 Wo - n = 1, 18 Wo - n = 2, 20 Wo - n = 2, 28 Wo - n = 3, 30 Wo - n = 3, 31 Wo - n = 3, 32 Wo - n = 4, 33 Wo - n = 1, 34 Wo - n = 1, 35 Wo - n = 1, 36 Wo - n = 1, 39 Wo - n = 2, 44 Wo - n = 2) verwendet werden. Eine Übersicht der für die 2PM geplanten Tiere ist in **Tabelle 2** dargestellt.

**Tabelle 2: Anzahl der für die intravitale 2-Photonen-Mikroskopie geplanten SHRSP und Wistarratten pro Lebensalter.**

Tieralter	Wistarratten (Übung)	SHRSP für die 2PM	Wistarratten für die 2PM
8-16 Wochen	15	0	0
17-28 Wochen	5	10	8
30-32 Wochen	0	15	10
33-44 Wochen	0	10	8
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>	<b>35</b>	<b>26</b>

Durch bei der OP verstorbene Tiere sowie Probleme bei der intravitalem Bildgebung verringerte sich die finale Tieranzahl (Details siehe 3.1 & **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Für die intravitale Untersuchung der zerebralen Mikroangiopathie standen nach der 2PM die Daten von 28 SHRSP und 18 Wistarratten zur Verfügung. Für die intravitale Untersuchung der Amyloid-Pathologie konnten Daten von n = 13 SHRSP ausgewertet werden.

Nach der 2PM wurden die Tiere getötet und die Hirnschnitte histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Schnitte der für die intravitale Untersuchung der zerebralen Mikroangiopathie genutzten 28 SHRSP und 18 Wistar-Kontrolltiere wurden immunhistochemisch auf das Vorhandensein von Dextran-Akkumulationen,

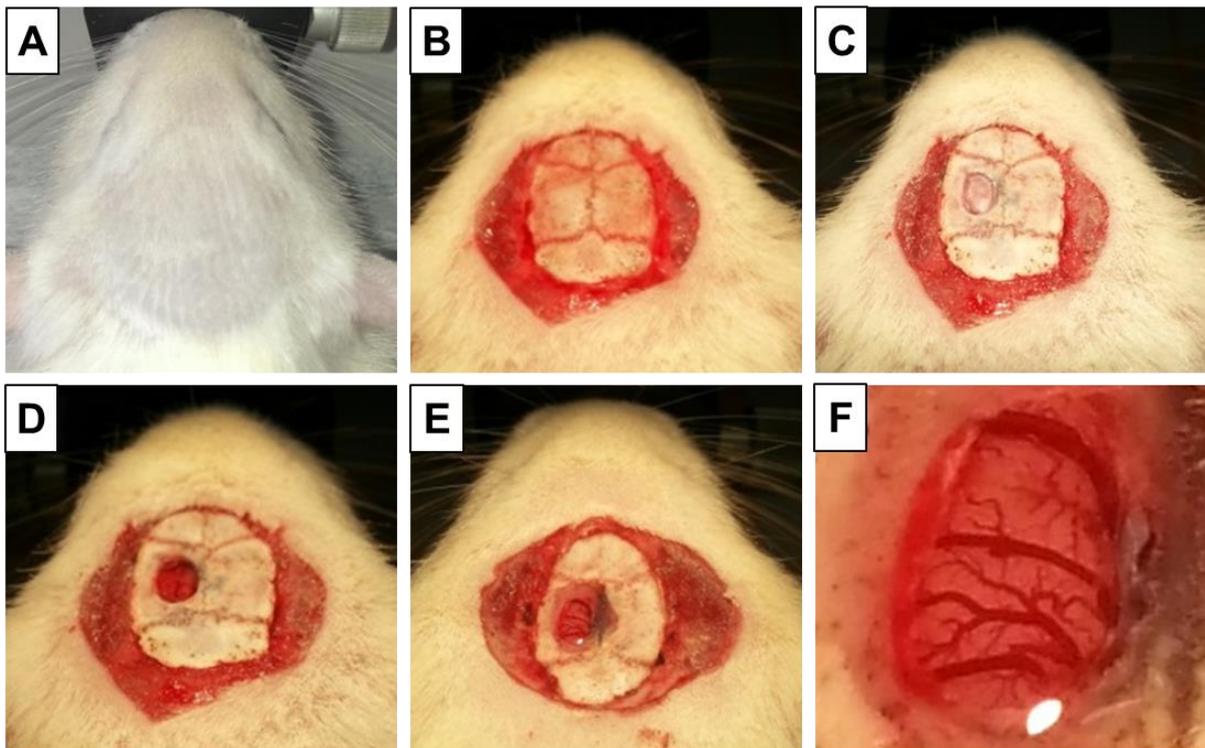
d.h. Ablagerungen des fluoreszierenden Farbstoffes in der Gefäßwand oder im umliegenden Parenchym untersucht. Des Weiteren wurden die Schnitte mittels einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung auf das Vorhandensein von nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben, d.h. Ablagerungen von Erythrozyten im Gefäßlumen, sowie kompletten Gefäßverschlüssen geprüft. Die Hirnschnitte der 13 für die intravitale Untersuchung der Amyloid-Pathologie genutzten SHRSP, wurden histologisch (Kongorot (KR)- und Thioflavin-T (ThioT)-Färbung) und immunhistochemisch (A $\beta$ -Färbung) auf die Existenz von vaskulären Amyloid-Akkumulationen untersucht.

## **2.3 2-Photonen-Mikroskopie**

### **2.3.1 Anästhesie und Präparation eines kranialen Fensters**

Vor Beginn der OP wurde das Körpergewicht (KG) der Ratten bestimmt und diese durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (1 ml auf 100 g KG) betäubt. Die Kontrolle der Narkose erfolgte über einen Test auf Schmerzfreiheit durch das Ausbleiben der Reflexe in Form des Zurückziehens der Pfote nach Setzen eines Schmerzreizes. Die Körpertemperatur der Tiere wurde während der Präparation des kranialen Fensters durch eine homöotherme Heizdecke konstant bei 37 °C gehalten. Nach Rasur und stereotaktischer Fixierung des Schädels (**Abbildung 6A**) sowie der Entfernung der Haut und des Periost über dem OP-Bereich (**Abbildung 6B**) wurden blutende Gefäße mit einem Kauter verschlossen und der Schädel mit einer 3%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung gereinigt und desinfiziert. Das kraniale Fenster wurde zwischen -2 mm und -8 mm relativ zu Bregma und 1 mm und 5 mm lateral von der Pfeilnaht des Schädels entfernt präpariert. Dazu wurde der Schädelknochen mit

einem Dremel ausgedünnt (**Abbildung 6C**), ein Loch gebohrt und ein Stück der Schädelplatte mit einer Größe von etwa  $4 \times 6 \text{ mm}^2$  im Bereich des linken parietalen Kortex abgenommen. Eine regelmäßige Reinigung des Schädels mit Druckluft verhinderte die Verschmutzung des OP-Bereiches. Nach Entfernen des Schädelknochens (**Abbildung 6D**) wurde die *Dura mater*, die äußerste Hirnhaut, sehr vorsichtig mit einer Federschere entfernt (**Abbildung 6E**). Da die intravitale Mikroskopie in Mäusen durch die intakte *Dura mater* durchgeführt wird (Sigler und Murphy 2010), wurde für 2 Wistarratten zusätzlich eine Präparation ohne Entfernung der *Dura mater* versucht. Nach der OP wurde das kraniale Fenster mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt (**Abbildung 6F**), ein 7 mm großes Deckgläschen mit dem Kleber Roti-coll 1 am Schädel befestigt und so das kraniale Fenster verschlossen.



**Abbildung 6: Präparation eines kranialen Fensters für die 2-Photonen-Mikroskopie.**

Schritte der Präparation eines kranialen Fensters über dem linken parietalen Kortex: nach der Fixierung des Schädels in einem Stereotaxie-Rahmen (A), wurde die Kopfhaut geöffnet (B) und der Schädel ausgedünnt (C). Ein Stück der Schädelplatte und die *Dura mater* wurden entfernt (D) und das kraniale Fenster mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt (E). (F) ist die Vergrößerung von (E) und zeigt die sichtbaren Gefäße im kranialen Fenster.

### **2.3.2 *In-vivo* Untersuchungen der zerebralen Blutgefäße**

Zur *in vivo* Untersuchung der zerebralen Blutgefäße wurde der Schädel der Ratten in einem Kopfhalter fixiert und die Tiere auf einem Heizkissen platziert, um eine konstante Körpertemperatur zu gewährleisten. Um die Darstellung der zerebralen Blutgefäße am 2PM zu ermöglichen, erfolgte die intraorbitale Injektion des fluoreszenzmarkierten Farbstoffes Dextran (70 kDa, 10 mg/ml), der das Blutplasma markiert. Die Anregung des Dextrans erfolgte mit einer Wellenlänge von 850 nm, das Emissionsmaximum lag bei 615 nm. Die Erythrozyten im Blut schließen den fluoreszenzmarkierten Farbstoff aus und stellen sich somit als dunkle Schatten vor dem hell fluoreszierenden Hintergrund, dem Blutplasma, dar. Leukozyten dagegen würden in der 2PM Autofluoreszenz zeigen und sich als leuchtende Zellen im Gefäßlumen darstellen (Li et al. 2010). Die bekannte maximal erreichbare Eindringtiefe für *in vivo* Untersuchungen in Ratten liegt bei bis zu 500 µm (Oheim et al. 2001; Shih et al. 2012) (entspricht Schicht II-III des Kortex (Defelipe 2011)), was durch unsere Messungen mit einer maximalen Eindringtiefe von 300 µm bis 500 µm bestätigt wurde.

Dargestellt werden konnten Kapillaren (luminaler Durchmesser  $\leq 10$  µm), Arteriolen (luminaler Durchmesser 11 µm bis 75 µm) sowie kleine Arterien (luminaler Durchmesser  $\geq 75$  µm). Die quantitativen Auswertungen wurden der Konsistenz halber jedoch auf Arteriolen mit einem luminalen Durchmesser von 11 µm bis 60 µm beschränkt.

### **2.3.2.1 Blutfluss-Messungen**

Die Strömungsgeschwindigkeit der roten Blutzellen (RBZ) wurde in  $n = 8$  SHRSP (18 Wo -  $n = 2$ , 28-30 Wo -  $n = 3$ , 32-33 Wo -  $n = 3$ ) und  $n = 5$  Wistarratten (18 Wo -  $n = 2$ , 32 Wo -  $n = 3$ ) durchschnittlich in 9 Arteriolen (mittlerer Gefäßdurchmesser 30  $\mu\text{m}$ ) pro Tier bestimmt. Für die Messungen erfolgte die intraorbitale Injektion des fluoreszenzmarkierten Farbstoffs Dextran (70 kDa, 10 mg/ml) zur Markierung des Blutplasmas. Die RBZ, die den Farbstoff ausschließen, stellten sich dabei als dunkle Schatten vor dem hell fluoreszierenden Hintergrund dar. Durch wiederholte Scans entlang der zentralen Gefäßachse wurden sogenannte Linescans aufgenommen. Durch die Bewegung der RBZ im Blutgefäß (Veränderung der räumlichen Position  $\Delta x$  in einer bestimmten Zeitspanne  $\Delta t$ ) entstanden dunkle Streifen, deren Anstieg ( $\Delta t/\Delta x$ ) umgekehrt proportional zu der Strömungsgeschwindigkeit der RBZ ( $\Delta x/\Delta t$ ) ist (Kleinfeld et al. 1998; Schaffer et al. 2006; Chhatbar und Kara 2013). Mit Hilfe der Radon Transformation (Radon Funktion in der MATLAB Image Processing Toolbox) konnten die Linescans in MATLAB R2013a ausgewertet und die Strömungsgeschwindigkeit der RBZ bestimmt werden (Drew et al. 2010). Unterschieden wurden dabei Linescans von Arteriolen mit luminaler Dextran-Akkumulationen, Arteriolen mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben und Linescans von Arteriolen ohne intravitale HA-Phänomene.

### **2.3.2.2 Methoxy-X04**

Zur intravitalem Detektion von A $\beta$  erfolgte die 2PM des parietalen Kortex nach intraorbitaler Injektion des fluoreszierenden KR-Derivats Methoxy-X04 (2 mg/ml (Klunk et al. 2002; Dong et al. 2010)) zusammen mit Dextran (70 kDa, 10 mg/ml) in  $n = 13$  SHRSP (17 Wo -  $n = 1$ , 28 Wo -  $n = 2$ , 32-33 Wo -  $n = 7$ , 39 Wo -  $n = 1$ ,

44 Wo - n = 2). Eine Gegenüberstellung der beiden Farbstoffe findet sich in **Tabelle 3**. Die Anregung des Farbstoffes Methoxy-X04 erfolgte mit einer Wellenlänge von 750 nm, das Emissionsmaximum lag bei 460 nm; für Dextran erfolgte die Anregung wie oben beschrieben bei 850 nm und die Emission bei 615 nm. Die gleichzeitige Nutzung der beiden Farbstoffe ermöglichte die Detektion von vaskulärem A $\beta$  / einer CAA sowie die parallele Untersuchung der Struktur und Integrität der kortikalen Mikrovaskulatur. Methoxy-X04 wurde 80 min vor der 2PM und Dextran unmittelbar vor der Bildgebung injiziert. Nach dem Durchqueren der BHS bindet Methoxy-X04 fibrilläres parenchymales und vaskuläres A $\beta$  und ist hier bis zu 3 Tage nach der Injektion nachweisbar (Bacskai et al. 2002). Aus dem Gewebe, das kein A $\beta$  enthält, wird es jedoch innerhalb von Sekunden entfernt (Klunk et al. 2002). Für Wistarratten wurde auf die intravitale Bildgebung mit Methoxy-X04 verzichtet, da unsere vorherigen Arbeiten gezeigt haben, dass die gleichaltrigen Kontrollen keine A $\beta$ -Akkumulationen aufwiesen (Bueche et al. 2014; Schreiber et al. 2014).

**Tabelle 3: Vergleich der für die intravitale Bildgebung genutzten Fluoreszenzfarbstoffe Dextran und Methoxy-X04.**

	<b>Dextran</b>	<b>Methoxy-X04</b>
<b>Markierung von</b>	Blutgefäßen	vaskulärem A $\beta$ / CAA
<b>Injektionsart</b>	intraorbital	intraorbital
<b>Injektionsvolumen</b>	300 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
<b>Injektionszeitpunkt</b>	unmittelbar vor der 2PM	80 min vor der 2PM
<b>Konzentration</b>	10 mg/ml	2 mg/ml
<b>Anregungswellenlänge</b>	850 nm	750 nm
<b>Emissionsmaximum</b>	615 nm	460 nm
<b>Hersteller</b>	ThermoFisher Scientific, D1818	Tocris Bioscience, 4920

## **2.4 Tötung der Tiere und Gewebeaufbereitung**

Die Tiere, die zuvor für die 2PM genutzt wurden, wurden ohne Wiedererwachen direkt nach der Messung perfundiert. Dazu wurde der Thorax geöffnet, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und der rechte Vorhof angeschnitten. Die Spülung des arteriellen Blutkreislaufes erfolgte mit 120 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS; 0,1 M; Zusammensetzung aus 2,73 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, 1,82 g Natriumchlorid, Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim auf 200 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) und 14,25 g Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, 7,26 g Natriumchlorid auf 800 ml Aqua dest.; Titration bis pH 7,4) gefolgt von der Fixierung des Gewebes durch erneutes Durchspülen des Kreislaufs mit 120 ml 4%-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt in 0,1 M PBS). Die Dauer der Perfusion betrug insgesamt 8 Minuten. Im Anschluss wurden die Ratten dekapitiert und das Gehirn der Tiere entnommen. Die Gehirne wurden für 48 Stunden in 4%-iger PFA-Lösung nachfixiert, zur Kryoprotektion für 6 Tage in 30%-iger Saccharose (30 g Saccharose, ad 100 ml Aqua dest.) gelagert, anschließend mit Hilfe von -80 °C kaltem Methylbutan schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

24 Stunden vor dem Gefrierschneiden wurden die Gehirne bei -20 °C gelagert und mittels Gefriermedium auf den Objekthalter aufgefroren. Mit Hilfe eines Kryotoms (Objekt- und Kammertemperatur -16 °C) wurden koronare Hirnschnitte mit einer Dicke von 30 µm hergestellt. Im Abstand von je ca. 1 mm wurden 10 bis 11

Schnittebenen (frontaler bis okzipitaler Pol) angefertigt; der OP-Bereich befand sich zwischen der fünften und neunten Schnittebene und bedeckte eine Fläche von ca. 4 x 6 mm<sup>2</sup> des parietalen Kortex. Pro Schnittebene wurden jeweils 6 Schnitte in mit 0,1 M PBS gefüllte 12-Well-Platten 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.

Für die histologischen Färbungen wurden die Schnitte mit Hilfe einer Mischung aus 0,1 M PBS, Aqua dest. und Triton auf Objektträger gezogen und an der Luft getrocknet.

#### **2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung für Gewebeschnitte. Hämatoxylin nach Mayer färbt basophile Strukturen (u.a. Zellkerne durch die enthaltene Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA)) blau an; Eosin färbt das Zytoplasma, die extrazelluläre Matrix und Blutzellen durch eine unspezifische Färbung der Proteine in unterschiedlichen Abstufungen rot an (Fischer et al. 2008).

Im Detail wurden die Objektträger nach kurzem Spülen in Aqua dest. für 5 min in eine Hämatoxylin-Lösung getaucht und anschließend nach erneutem Spülen mit Aqua dest. für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dadurch erfolgt eine Erhöhung des pH-Wertes (pH > 3), sodass ein Farbumschlag von rot zu blau erfolgt. Nach der Färbung der Objektträger mit Eosin für 40 Sekunden und erneutem Spülen mit Aqua dest. erfolgte die Entwässerung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger kurz in 70% und 80% Rotisol und

anschließend zweimal für etwa 1 Minute in 100% Rotisol eingetaucht. Nach zweimaligem Eintauchen für je 5 Minuten in Xylol wurden die Objektträger mittels Histomount eingedeckelt und getrocknet.

Von allen in dieser Arbeit untersuchten Tieren wurden jeweils 30 bis 33 Hirnschnitte aus 10 bis 11 Schnittebenen (3 Schnitte pro Ebene) für die HE-Färbung genutzt. Der OP-Bereich erstreckte sich – wie oben beschrieben – über fünf Schnittebenen, wodurch 15 Schnitte pro Tier (3 Schnitte pro Ebene) zur Analyse des OP-Bereiches zur Verfügung standen.

## **2.4.2 Histologische Amyloid-Färbungen**

Die histologischen Färbungen mit den Farbstoffen (i) KR und (ii) ThioT wurden zur Darstellung von Amyloid-Ablagerungen durchgeführt; KR und ThioT dienen dabei als Farbstoffe zur Detektion von Amyloid in Gewebeschnitten (LeVine 1999). KR zeigt eine starke Orangerot- und ThioT eine kräftige Rotfärbung von Amyloid. Kernechtrot dient dabei als Gegenfärbelösung und färbt die Zellkerne rot an.

### **2.4.2.1 Kongorot-Färbung**

24 Stunden vor der KR-Färbung erfolgte die Herstellung der Stammlösung (30 g Natriumchlorid in 200 ml Aqua dest. + 800 ml Rotisol). Für die Färbung wurden die Objektträger nach kurzem Spülen mit Aqua dest. für 5 Minuten mit Kernechtrot gefärbt, anschließend 10 Minuten mit Leitungswasser und daraufhin kurz mit Aqua dest. gespült. Daraufhin wurden die Objektträger für 20 Minuten in Gebrauchslösung 1 (100 ml Stammlösung + 1 ml 1% Natriumhydroxid) und für 10 Minuten in Gebrauchslösung 2 (2,5 g KR + 500 ml Stammlösung; Zugabe von 1 ml 1% Natriumhydroxid zu 100 ml dieser Lösung unmittelbar vor Gebrauch) getaucht.

Zur Entwässerung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Objektträger kurz in 80% Rotisol und anschließend zweimal für etwa 1 Minute in 100% Rotisol eingetaucht. Nach zweimaligem Eintauchen für je 5 Minuten in Xylol wurden die Objektträger mittels Histomount eingedeckelt und getrocknet.

Für die KR-Färbung wurden pro Tier jeweils 10 bis 11 Hirnschnitte aus 10 bis 11 Schnittebenen (1 Schnitt pro Ebene) genutzt; im OP-Bereich konnten folglich 5 Schnitte aus 5 Schnittebenen ausgewertet werden.

#### **2.4.2.2 Thioflavin-T-Färbung**

Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die Objektträger für 5 Minuten mit Kernechtrot gefärbt, anschließend 10 Minuten mit Leitungswasser und daraufhin kurz mit Aqua dest. gespült. Nach Färbung der Objektträger für 8 Minuten mit einer 1%-igen ThioT-Lösung, erfolgte die Entwässerung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger kurz in 80% Rotisol und anschließend zweimal für etwa 1 Minute in 100% Rotisol eingetaucht. Nach zweimaligem Eintauchen für je 5 Minuten in Xylol wurden die Objektträger mittels Histomount eingedeckelt und getrocknet.

Für die ThioT-Färbung wurden pro Tier jeweils 10 bis 11 Hirnschnitte aus 10 bis 11 Schnittebenen (1 Schnitt pro Ebene) genutzt; auch hier konnten im OP-Bereich 5 Schnitte aus 5 Schnittebenen ausgewertet werden.

#### **2.4.3 Immunhistochemische Färbungen**

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden pro Tier jeweils 5 Hirnschnitte aus den unterschiedlichen Schnittebenen innerhalb des OP-Bereiches genutzt. Die in CPS gelagerten Schnitte wurden in mit 0,1 M PBS gefüllte 24-Well-Platten überführt,

in denen die Färbung durchgeführt wurde. Als Stammlösung für die Färbungen diente eine Lösung aus 0,5% Triton X-100 in 0,1 M PBS. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in 0,1 M PBS wurden die Schnitte für eine Stunde in 10% Eselnormals Serum (engl. *Donkey normal serum*, DNS; 800 µl Blocklösung pro Well) gegeben, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern (600 µl pro Well: Stammlösung + 5% DNS + fluoreszenzmarkiertes Solanum tuberosum Lektin (STL; Verdünnung 1:500) + Kaninchen-gegen-Aß Primärantikörper (Verdünnung 1:500)) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen für je 5 Minuten in 0,1 M PBS wurden die Schnitte für 2 Stunden mit dem Sekundärantikörper (600 µl pro Well: Stammlösung + 5% DNS + Indodicarbocyanin (Cy5)-gekoppelte Esel-gegen-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:500)) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der IgG-Färbung wurde anstatt des Sekundärantikörpers ein Cy5-gekoppelter Esel-gegen-Ratte IgG Antikörper (Verdünnung 1:200) genutzt. Nach einem erneuten Waschschrift (3x 5 Minuten in 0,1 M PBS) wurden die Schnitte für die Färbung der Zellkerne für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt und erneut gewaschen (3x 5 Minuten in 0,1 M PBS). Mit Hilfe einer Seifenlösung (250 ml 0,1 M PBS + 250 ml Aqua dest. + 2 ml Triton X-100) wurden die Schnitte anschließend auf Objektträger gezogen und an der Luft getrocknet. Die Entwässerung der Schnitte erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger jeweils 5 Minuten in Alkohol aufsteigender Konzentration (50%, 70%, 90%, 100% Rotisol) und 5 Minuten in Optal eingetaucht. Nach zweimaligem Eintauchen für je 5 Minuten in Xylol wurden die Objektträger mittels Histomount eingedeckelt und getrocknet.

### **2.4.3.1 Fluoreszeinisothiozyanat-gekoppeltes Solanum tuberosum Lektin**

Fluoreszeinisothiozyanat-gekoppeltes STL (STL-FITC) ist ein aus der Kartoffel isoliertes fluoreszenzmarkiertes Glykoprotein, das zu 50% aus den Monosacchariden Arabinose und Galaktose besteht (van Damme et al. 2004). Es bindet spezifisch an N-Acetylglucosamin auf der Oberfläche von Endothelzellen und Mikroglia (siehe Produktinformation Axxora, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach (Härtig et al. 2009; Michalski et al. 2010)) und kann zur Färbung der zerebralen Blutgefäße im Gehirn von Nagetieren verwendet werden (Betz et al. 2005). STL-FITC wurde für die immunhistochemischen Färbungen in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Das Anregungsmaximum liegt bei 495 nm und das Emissionsmaximum bei 515 nm. Dadurch ist eine Kombinationsfärbung mit Indocarbocyanin (Cy3)- und Cy5-gekoppelten Antikörpern sowie mit DAPI möglich (Vierfachfärbung). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde STL in allen immunhistochemischen Färbungen zur Darstellung der Gefäßwände der zerebralen Blutgefäße verwendet.

### **2.4.3.2 Dextran**

Das für die 2PM genutzte Dextran ist an den Fluoreszenz-Farbstoff Tetramethylrhodamin gekoppelt und kann dadurch in der Immunhistochemie mit einem Absorptionsmaximum von 555 nm und einem Emissionsmaximum von 580 nm detektiert werden. Da sich diese Wellenlängen mit denen der Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (Absorptionsmaximum 550 nm und Emissionsmaximum 570 nm, siehe Produktinformation Dianova, Hamburg) überschneiden, ist eine Färbung der 2PM-Tiere mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern ausgeschlossen. Somit kann für diese Tiere nur eine immunhistochemische Dreifachfärbung aus STL, einem

Primärantikörper und DAPI erfolgen, wobei der Primärantikörper mit einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert werden muss.

### **2.4.3.3 Immunglobulin G**

Immunglobuline sind Glykoproteine und werden während der Immunantwort von B-Zellen als Antikörper nach Kontakt mit einem Antigen produziert (Alberts 2002). Immunglobulin G (IgG) hat eine molare Masse von ~150 kDa (Sandin et al. 2004) und kann als Marker für eine geschädigte, d.h. pathologisch durchlässige BHS genutzt werden (Chen et al. 2009; Michalski et al. 2010). Für die IgG-Färbung wurde ein Cy5-gekoppelter Esel-gegen-Ratte IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 genutzt.

### **2.4.3.4 Amyloid- $\beta$**

Die Ablagerung des A $\beta$ -Peptides im Gehirn ist eine kennzeichnende Pathologie der Alzheimer'schen Erkrankung. Charakteristisch ist die Detektion von aus dem A $\beta$ -Peptid aufgebauten extrazellulären A $\beta$ -Plaques im Parenchym (Murphy und LeVine 2010; Gilbert 2013). Eine CAA kann über die Ablagerung des A $\beta$ -Peptides in der Gefäßwand detektiert werden (Attems et al. 2011; Viswanathan und Greenberg 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, der spezifisch das A $\beta$ -Peptid im Gehirn von Nagetieren anfärbt.

### **2.4.3.5 4',6-Diamidin-2-Phenylindol**

Das fluoreszenzmarkierte DAPI ist ein Farbstoff, der sich an die DNA anlagert und dadurch zur Färbung der Zellkerne benutzt wird (Kapuscinski 1995). Dieser Komplex aus DAPI und DNA hat sein Anregungsmaximum bei 358 nm und sein

Emissionsmaximum bei 461 nm. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde DAPI in allen immunhistochemischen Färbungen zur Detektion der Zellkerne in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet.

#### **2.4.3.6 Indodicarbocyanin-gekoppelte Sekundärantikörper**

Als Sekundärantikörper wurden Cy5-gekoppelte Antikörper aus dem Esel verwendet, die bei 650 nm eine maximale Anregung zeigen und bei 670 nm emittieren (siehe Produktinformation Dianova, Hamburg). Zur Detektion des A $\beta$ -Primärantikörpers wurde das Cy5-gekoppelte Esel-gegen-Kaninchen IgG als Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Für die Detektion von BHS-Störungen erfolgte eine direkte Färbung mit einem Cy5-gekoppelten Esel-gegen-Ratte IgG Antikörper, der spezifisch IgG aus der Ratte erkennt (siehe 2.4.3.3).

## **2.5 Datenanalyse**

### **2.5.1 2PM-Datenanalyse**

Zur Datenanalyse wurden die 2PM-Daten mit der ZEN 2010 Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) aufgenommen und als lsm-Dateien zur späteren Datenauswertung gespeichert.

#### **2.5.1.1 Phänomene, Kaskade und Stadien der hypertensiven Arteriopathie**

Die lsm-Dateien aller  $n = 28$  SHRSP und  $n = 18$  Wistarratten wurden auf das Vorhandensein verschiedener HA-Phänomene untersucht. Dazu zählen die Akkumulation von Erythrozyten in der Gefäßwand von Arteriolen (luminaler Durchmesser 11  $\mu\text{m}$  bis 60  $\mu\text{m}$ ), die Akkumulation von Dextran in der Gefäßwand

oder im Gefäßlumen, nicht-okkludierende oder okkludierende Erythrozyten-Thromben sowie komplett verschlossene Gefäßabschnitte. Die in der Gefäßwand akkumulierten Erythrozyten wurden als sich nicht bewegende dunkle Punkte in der Gefäßwand, Dextran-Akkumulationen als besonders hell fluoreszierende Gefäßwände oder Abschnitte des Gefäßlumens definiert. Sich sehr langsam bis gar nicht bewegende RBZ im Gefäßlumen waren kennzeichnend für nicht-okkludierende oder okkludierende Thromben, wohingegen Gefäße mit großflächigen Aussparungen des fluoreszierenden Farbstoffs Dextran komplette Gefäßverschlüsse darstellten (siehe **Abbildung 8**).

Die Auswertung der einzelnen Phänomene erfolgte semi-quantitativ (vorhanden oder nicht vorhanden) in allen verfügbaren Gefäßen in durchschnittlich 8 Blickfeldern pro Tier. Die verschiedenen HA-Phänomene wurden anschließend genutzt, um eine intravitale HA-Kaskade zu definieren. Basierend auf der Kaskade erfolgte die Unterteilung in 5 HA-Stadien. Die Zuordnung der Ratten zu einem bestimmten HA-Stadium erfolgte basierend auf der am weitesten fortgeschrittenen HA-Pathologie, die in den jeweiligen Tieren nachweisbar war.

Sowohl für die SHRSP als auch für Wistarratten wurde zusätzlich eine Quantifizierung der HA-Phänomene und HA-Stadien für junge (17-28 Wochen), mittel-alte (30-32 Wochen) und alte (33-44 Wochen) Tiere durchgeführt.

#### **2.5.1.2 Messung der Strömungsgeschwindigkeit der roten Blutzellen**

In die Auswertung der Blutflussmessungen sind durchschnittlich 9 Linescans pro Tier eingeflossen, wobei jeder Linescan für die Messung der Strömungsgeschwindigkeit

der RBZ in einer Arteriole mit einem durchschnittlichen Gefäßdurchmesser von 30 µm steht. Alle vorhandenen Messungen wurden einer der folgenden Gruppen zugeordnet: (i) Arteriolen ohne HA-Phänomene, (ii) Arteriolen mit luminaler Dextran-Akkumulation oder (iii) Arteriolen mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben. Die Strömungsgeschwindigkeit der RBZ wurde dabei in allen verfügbaren Arteriolen in den Blickfeldern, die zufällig im OP-Bereich gewählt wurden, beurteilt. Zur statistischen Analyse wurde pro Tier für jede der 3 Gruppen die Strömungsgeschwindigkeit der RBZ über alle Linienscans der Gefäße, die dieser Gruppe zugeordnet werden konnten, gemittelt.

### **2.5.1.3 Vaskuläre Amyloid-Akkumulationen**

In den n = 13 SHRSP, die für die intravitale Bildgebung mit dem Farbstoff Methoxy-X04 genutzt wurden, wurden 3 Blickfelder pro Tier semi-quantitativ (vorhanden oder nicht vorhanden) auf das Vorhandensein von (peri-)vaskulären Amyloid-Ablagerungen in Form einer CAA untersucht. Dabei wurde in perivaskuläre und wandständige Akkumulationen von Methoxy-X04 unterschieden. Darüber hinaus wurde in allen CAA-positiven SHRSP die Anzahl der CAA-positiven Arteriolen gezählt und innerhalb dieser Gruppe der CAA-positiven Arteriolen zusätzlich das Vorhandensein / das Fehlen von HA-Phänomenen quantifiziert.

### **2.5.2 Histologische und immunhistochemische Analyse**

Innerhalb jedes Schnittes des OP-Bereiches wurde (für alle für die 2PM genutzten SHRSP und Wistarratten) das Auftreten verschiedener HA-Phänomene, d.h. BHS-Störungen, nicht-okkludierende Thromben sowie okkludierende Thromben / vollständig verschlossene Gefäßabschnitte semi-quantitativ (vorhanden oder nicht

vorhanden) in allen verfügbaren Gefäßen untersucht. Zusätzlich wurde (nur für die SHRSP) ebenfalls semi-quantitativ nach dem Vorhandensein von (peri)vaskulären Amyloid-Ablagerungen in Form einer CAA geschaut.

Um den prozentualen Anteil der Arteriolen mit einer HA- / CAA-Pathologie zu bestimmen, wurde die Gesamtanzahl aller Arteriolen (luminaler Durchmesser 11-60 µm) pro Blickfeld sowie die Anzahl (i) aller HA-positiven Arteriolen und (ii) aller CAA-positiven Arteriolen bestimmt. Innerhalb der Gruppe der CAA-positiven Arteriolen wurde zusätzlich das gleichzeitige Auftreten von BHS-Störungen, nicht-okkludierenden Thromben sowie okkludierenden Thromben / vollständig verschlossene Gefäßabschnitten ausgewertet. Diese Analyse berücksichtigte 27 Blickfelder innerhalb von 9 Hirnschnitten pro Ratte mit 3 Blickfeldern pro Schnitt (HE-Färbung); 20 Blickfelder, 5 Hirnschnitte, 3 Blickfelder pro Schnitt (für Dextran-Immunhistochemie); 15 Blickfelder, 5 Hirnschnitte, 3 Blickfelder pro Schnitt (für KR- und ThioT-Färbung). Die Mittelwerte aus allen Blickfeldern wurden zur statistischen Analyse herangezogen.

## **2.6 Statistische Auswertungen**

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Statistikprogramm „IBM SPSS Statistics 24“. Es wurden drei verschiedene statistische Tests durchgeführt: (i) der Chi-Quadrat-Test, (ii) der Kruskal-Wallis-Test sowie (iii) der t-Test für abhängige Stichproben.

Der Chi-Quadrat-Test wurde für alle binären Variablen angewendet; dazu gehörten diverse Gruppenvergleiche zwischen SHRSP und Wistar-Kontrolltieren (Mortalitätsrate während der OP, intravitale und postmortale Phänomene der zerebralen Mikroangiopathie, intravitale Stadien der zerebralen Mikroangiopathie, OP-Schaden) sowie der intravitale und postmortale Zusammenhang zwischen HA-positiven und -negativen sowie CAA-positiven und -negativen Gefäßen. Berechnet wurde jeweils die Teststatistik  $\chi^2$  in Bezug auf die Freiheitsgrade (engl. *degrees of freedom*, df), d.h.  $\chi^2(df)$  sowie der Signifikanzwert p.

Der Kruskal-Wallis-Test wurde genutzt, um die verschiedenen Altersgruppen (jung, mittel, alt) innerhalb der SHRSP oder Wistarratten miteinander zu vergleichen. Berechnet wurde jeweils die Teststatistik H, ebenfalls in Bezug auf die Freiheitsgrade, d.h. H(df) sowie der Signifikanzwert p.

Mit Hilfe des t-Tests für abhängige Stichproben wurden die Mittelwerte der Strömungsgeschwindigkeiten der RBZ zwischen (a) Arteriolen mit luminaler Dextran-Akkumulation und Arteriolen ohne HA-Phänomene sowie (b) Arteriolen mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben und Arteriolen ohne HA-Phänomene

verglichen. Berechnet wurde jeweils die Teststatistik  $t$ , erneut in Bezug auf die Freiheitsgrade, d.h.  $t(df)$  sowie der Signifikanzwert  $p$ .

Für alle statistischen Tests wurden  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  als signifikant und  $p$ -Werte von  $0,05 < p < 0,1$  als statistische Tendenz definiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der 2-Photonen-Mikroskopie

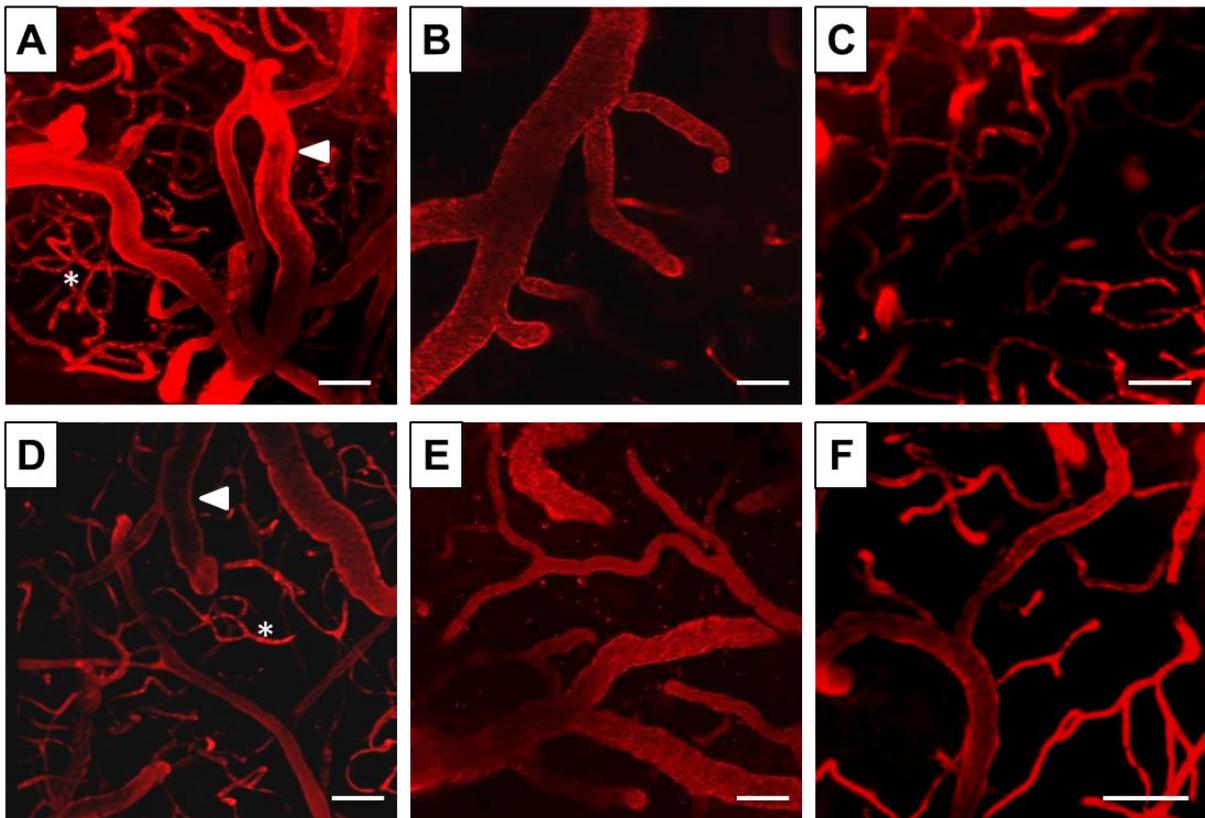
Zur Realisierung dieser Arbeit war die Durchführung der bisher nicht etablierten 2PM an der SHRSP und Wistar-Kontrolltieren erforderlich. Die dafür notwendige Kraniotomie wurde an 20 Wistarratten im Alter von acht bis 24 Wochen geübt. Für die 2PM an der Maus sind in der Literatur zwei Ansätze beschrieben: (i) die 2PM durch einen ausgedünnten Schädelknochen und (ii) die 2PM nach Entfernung des Schädelknochens durch die intakte *Dura mater* (Shih et al. 2012; Dorand et al. 2014). Durch die erhöhte Dicke und Undurchlässigkeit der *Dura mater* musste diese äußerste Hirnhaut für die 2PM an der Ratte zusätzlich zum Schädelknochen entfernt werden (Sigler und Murphy 2010; Shih et al. 2012). Dieser Operationsschritt erwies sich als der schwierigste Schritt während der Generierung des kranialen Fensters, da die *Dura mater* teilweise fest mit den darunter liegenden Blutgefäßen verwachsen war. Nach einer festen Etablierung der notwendigen Arbeitsschritte wurden 35 SHRSP und 26 Wistarratten für die Experimente genutzt. Bei diesen Tieren zeigten sich während der Entfernung der *Dura mater* teilweise starke Blutungen, die zum Tod von  $n = 7$  (20%) der SHRSP und  $n = 4$  (15%) der Wistarratten während der OP führten. Die Anzahl an verstorbenen Tieren ergab dabei keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen SHRSP und Wistar-Kontrolltieren ( $\chi^2(1) = 0,2$ ,  $p = 0,64$ ). Somit standen nach den erfolgreich durchgeführten Kraniotomien insgesamt 28 SHRSP und 22 Wistarratten für die Experimente zur Verfügung (Tabelle 4).

Tabelle 4: OP-Schaden bei der Kraniotomie in SHRSP und Wistarratten.

	SHRSP	Wistar
Anzahl der operierten Tiere	35	26
Anzahl der bei der OP verstorbenen Tiere	7	4
Mortalitätsrate (Kraniotomie)	20%	15%
Für die 2PM verbliebene Tiere	28	22

### 3.2 Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie

Für die 2PM wurde den Tieren vor der Bildgebung der fluoreszenzmarkierte Farbstoff Dextran gespritzt. Wie zuvor beschrieben, schließen die RBZ den Farbstoff aus und zeigen sich als dunkle Punkte vor dem hell fluoreszierenden Hintergrund. Die Darstellung der kortikalen Mikrovaskulatur konnte sowohl für SHRSP (**Abbildung 7A-C**) als auch für Wistarratten (**Abbildung 7D-F**) realisiert werden und zeigte eine exzellente Darstellbarkeit der kleinen Arterien, Arteriolen und Kapillaren. Die Eindringtiefe lag nach Entfernung der *Dura mater* bei bis zu 300-500 µm (dritte Kortex-Schicht (Defelipe 2011)). Bei dem Versuch der Präparation des kranialen Fensters ohne Entfernung der *Dura mater* konnten überwiegend die Blutgefäße der intakten *Dura mater* sichtbar gemacht werden; des Weiteren war die Eindringtiefe auf etwa 70 µm (erste Kortex-Schicht (Defelipe 2011)) beschränkt. Daher wurde für diese Arbeit die Präparation mit Entfernung der *Dura mater* gewählt und die zwei Kontrolltiere ohne *Dura mater* Entfernung von den Auswertungen ausgeschlossen. In zwei weiteren Kontrolltieren war die Bildgebung durch technische Probleme nicht erfolgreich, weshalb am Ende die Daten von 18 Wistar-Kontrolltieren zur Auswertung vorlagen. Für die SHRSP ist hingegen die komplette Fallzahl von n = 28 Tieren in die Datenauswertung eingeflossen.



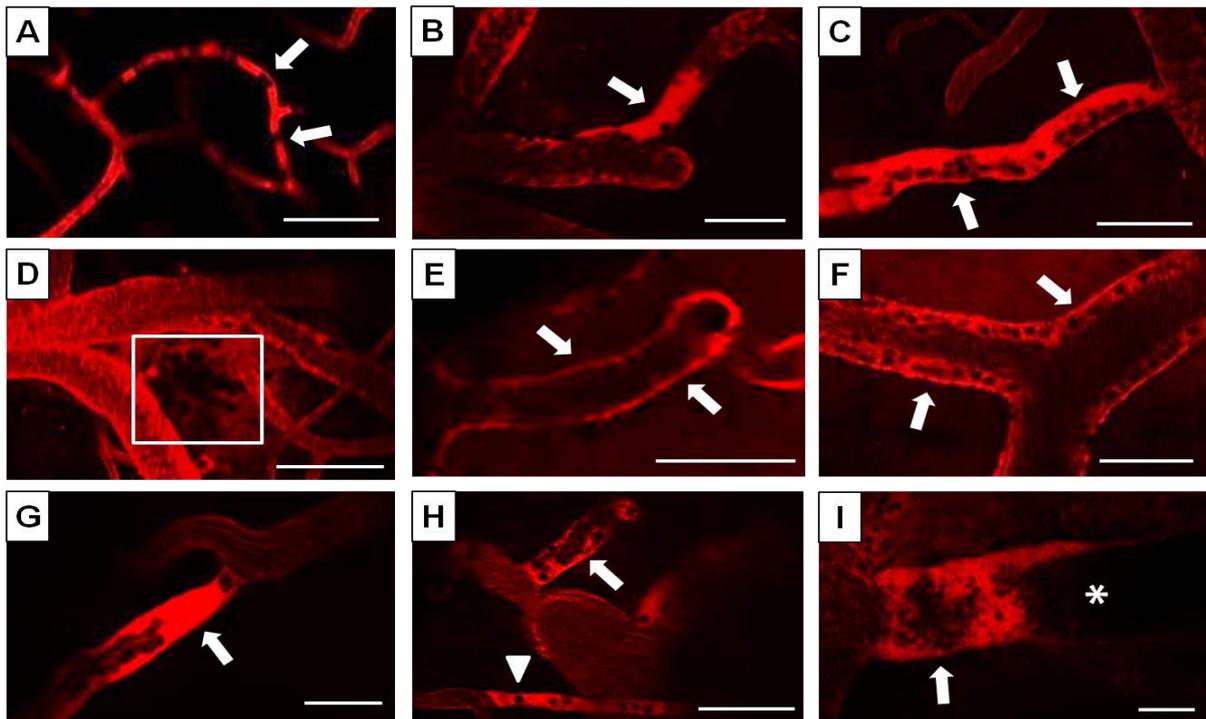
**Abbildung 7: 2-Photonen-Mikroskopie der zerebralen kortikalen Mikrovaskulatur.**

Durch die Markierung des Blutplasmas mit dem fluoreszenzmarkierten Farbstoff Dextran wird die exzellente Darstellung der kortikalen Mikrovaskulatur, vornehmlich von Arteriolen (Pfeilköpfe) und Kapillaren (Sterne) in SHRSP (A-C) und Wistarratten (D-F) ermöglicht.

SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten; Alter der Tiere: D & E - 18 Wochen, A-C - 30 Wochen, F - 31 Wochen; Maßbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.1 Pathologien der zerebralen Blutgefäße und intravitale Phänomene der hypertensiven Arteriopathie

Erste Versuche der intravitale 2PM zeigten diverse Pathologien der kortikalen Mikrovaskulatur. So konnten Akkumulationen von RBZ in Kapillaren (**Abbildung 8A**), die sich als nicht bewegende, dunkle Punkte im Gefäßlumen darstellten, detektiert werden. Dies gelang jedoch nur, wenn sich die Erythrozyten erst nach Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff stauten; anderenfalls würden die RBZ das Gefäßlumen der Kapillaren aufgrund des geringen Gefäßdurchmessers dieser kleinsten Hirngefäße komplett verschließen und eine Markierung mit Dextran verhindern. Als weitere Pathologie zeigte sich die Akkumulation von Dextran sowie die gemeinsame Akkumulation von Dextran und Erythrozyten im Gefäßlumen von Arteriolen (**Abbildung 8B&C**). Diese Stauungen des fluoreszenzmarkierten Farbstoffes und der Erythrozyten werden weiterführend als nicht-okkludierende Erythrozyten-Thromben bezeichnet. Zudem konnte der Austritt von Dextran und Erythrozyten aus dem Gefäßlumen, der eine perivaskuläre Blutung vermuten lässt, dargestellt werden (**Abbildung 8D**). Da sich diese Pathologie jedoch nur einmalig detektieren ließ, wurde der Fokus für die fortführenden Experimente auf die Gefäßpathologien und nicht auf die Untersuchung von zerebralen Blutungen gesetzt. Auf die Quantifizierung der HA-Phänomene in Kapillaren wurde aufgrund der oben beschriebenen Gründe verzichtet und alle folgenden Auswertungen auf die Arteriolen beschränkt.

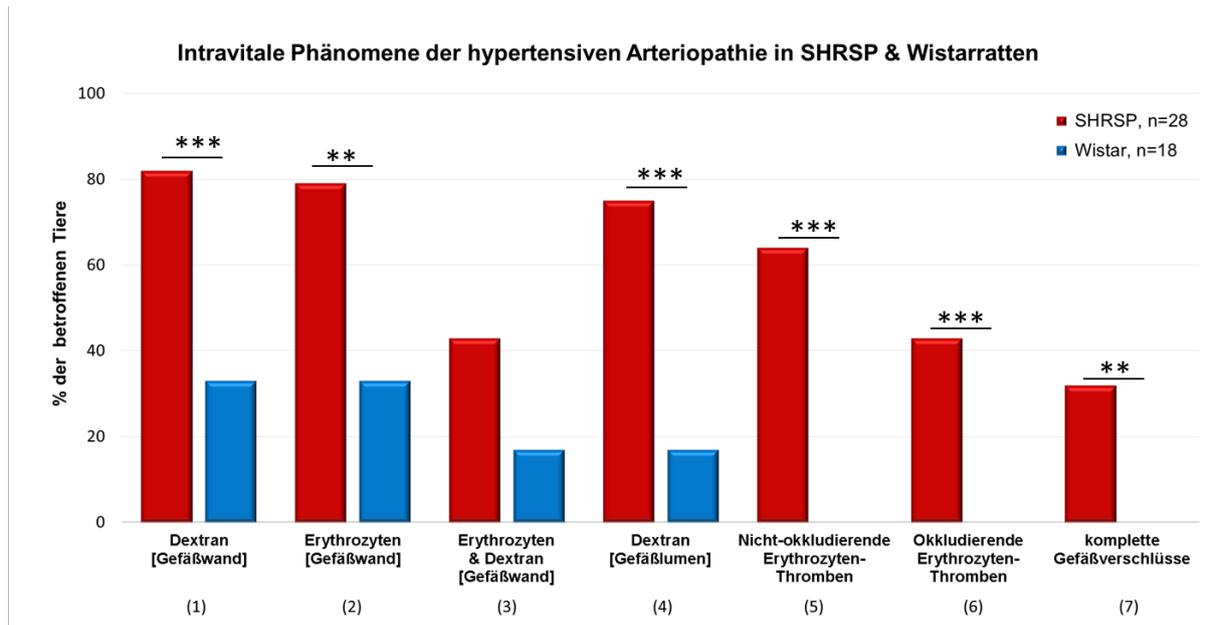


**Abbildung 8: Pathologien der zerebralen Blutgefäße und Phänomene der zerebralen hypertensiven Arteriopathie detektiert in der intravitalen 2-Photonen-Mikroskopie.**

Mit Hilfe der intravitalen Bildgebung konnten Akkumulationen von RBZ in Kapillaren (A, Pfeile) detektiert werden, die sich als sich nicht bewegend dunkle Punkte im Gefäßlumen darstellten. Stauungen von Dextran (B, Pfeil) sowie von Dextran und RBZ (C, Pfeile) zeigten sich ebenso wie das Austreten von Dextran und RBZ aus einer Arteriole (D, Kasten), welches einen Gefäßwandschaden mit einer vermuteten perivaskulären Blutung anzeigt. Als Phänomene der HA definiert wurden der in E dargestellte Gefäßwandschaden, der durch die Akkumulation von Dextran in der Gefäßwand (Pfeile) charakterisiert wird, sowie die Akkumulation von Dextran und Erythrozyten in der Gefäßwand (F, Pfeile) und die Akkumulation von Dextran im Gefäßlumen (G, Pfeil). Weiterhin ist in H die Bildung eines nicht okkludierenden Erythrozyten-Thrombus beginnend mit der Akkumulation einzelner Erythrozyten im Gefäßlumen (Pfeilspitze) dargestellt. Nicht-okkludierende Erythrozyten-Thromben (H, Pfeil) können sich zu okkludierenden Erythrozyten-Thromben (I, Pfeil) und später zu komplett verschlossenen Gefäßabschnitten (I, Stern) entwickeln.

RBZ - rote Blutzellen; Alter der Tiere: E - 18 Wochen, B, D - 30 Wochen, A, C, G, H - 31 Wochen, F, I - 33 Wochen; Maßbalken = 50 µm.

In SHRSP und Wistarratten zeigten sich unter Nutzung des fluoreszenzmarkierten Farbstoffes Dextran Arteriolen sowohl mit als auch ohne Phänomene der HA. Insgesamt wurden in n = 1 (4%) der SHRSP keine Pathologien der zerebralen Blutgefäße gefunden, wohingegen signifikant mehr Wistarratten (n = 6 (33%)) keine HA-Phänomene zeigten ( $\chi^2(1) = 7,52$ ,  $p = 0,006$ ). In den restlichen Tieren konnte umgekehrt eine signifikant höhere Prävalenz nahezu aller folgender Phänomene der HA in SHRSP verglichen mit den Wistar-Kontrolltieren detektiert werden: (1) die Akkumulation von Dextran in der Gefäßwand in n = 23 (82%) der SHRSP vs. n = 6 (33%) der Wistarratten ( $\chi^2(1) = 11,20$ ,  $p = 0,001$ ) (**Abbildung 8E**); (2) die Akkumulation von Erythrozyten in der Gefäßwand in n = 22 (79%) vs. n = 6 (33%) ( $\chi^2(1) = 9,41$ ,  $p = 0,002$ ); (3) eine Kombination aus (1) & (2) in n = 12 (43%) vs. n = 3 (17%) ( $\chi^2(1) = 2,06$ ,  $p = 0,152$ ) (**Abbildung 8F**); (4) die Akkumulation von Dextran im Gefäßlumen in n = 21 (75%) vs. n = 3 (17%) ( $\chi^2(1) = 14,94$ ,  $p < 0,001$ ) (**Abbildung 8G**); (5) die Akkumulation von Dextran und Erythrozyten beginnend mit der Akkumulation einzelner Erythrozyten (**Abbildung 8H**, Pfeilspitze) und später daraus folgend die Ausbildung nicht-okkludierender Erythrozyten-Thromben in n = 18 (64%) vs. n = 0 (0%); ( $\chi^2(1) = 19,01$ ,  $p < 0,001$ ) (**Abbildung 8H**, Pfeil); (6) okkludierende Erythrozyten-Thromben in n = 12 (43%) vs. n = 0 (0%) ( $\chi^2(1) = 10,44$ ,  $p = 0,001$ ) (**Abbildung 8I**, Pfeil) und (7) komplett verschlossene Gefäßabschnitte, angedeutet durch das Fehlen der Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dextran in n = 9 (32%) vs. n = 0 (0%) ( $\chi^2(1) = 7,19$ ,  $p = 0,007$ ) (**Abbildung 8I**, Stern). Eine Gegenüberstellung der Frequenzen der intravitalen HA-Phänomene in SHRSP und Wistarratten findet sich in **Abbildung 9**.



**Abbildung 9: Frequenzen der intravitralen Phänomene der hypertensiven Arteriopathie in SHRSP und Wistaratten.**

Die Phänomene (1) bis (7) der HA wurden mittels intravitraler Bildgebung in SHRSP (rote Balken) und Wistaratten (blaue Balken) detektiert. Die Balken stellen dar, in wie viel Prozent der untersuchten Tiere das jeweilige HA-Phänomen detektiert wurde.

HA - hypertensive Arteriopathie, SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten. \*\*  $p \leq 0,01$ ,

\*\*\*  $p \leq 0,001$

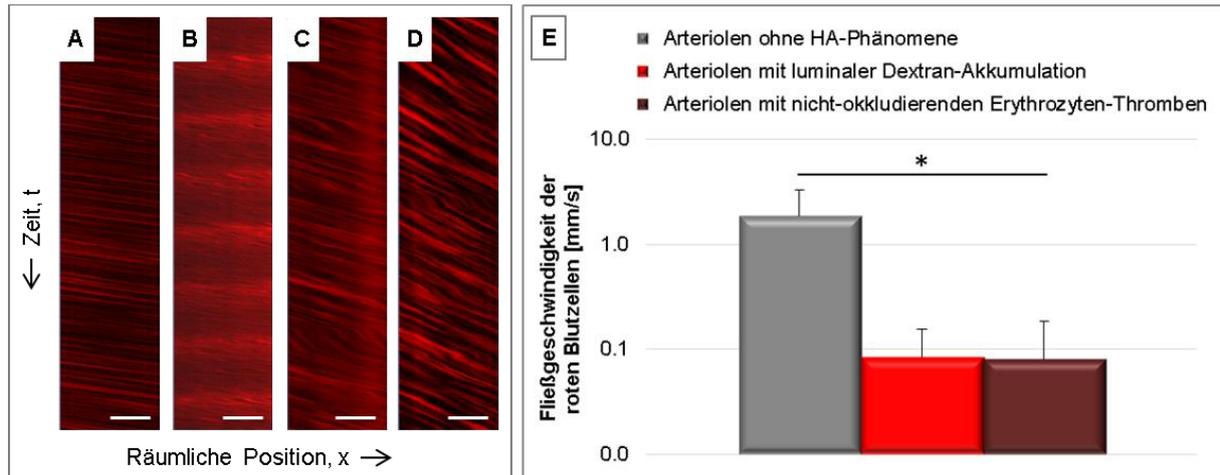
Um den Einfluss des Alters zu untersuchen, wurden SHRSP und Wistar-Kontrolltiere in junge (17-28 Wochen), mittel-alte (30-32 Wochen) und alte (33-44 Wochen) Tiere unterteilt. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Phänomene (1) bis (5) für die SHRSP (jeweils  $p > 0,05$ ). So war beispielsweise Phänomen (1) in 71% der jungen, in 86% der mittel-alten und ebenfalls 86% der alten SHRSP zu finden. Für die Prävalenz der okkludierenden Thromben (Phänomen (6)) ergab sich ein signifikanter Anstieg mit dem Lebensalter der Tiere von 14% (17-28 Wochen) über 43% (30-32 Wochen) auf 71% (33-44 Wochen) ( $H(2) = 4,33$ ,  $p = 0,037$ ); für die Prävalenz der komplett verschlossenen Gefäßabschnitte (Phänomen (7)) erfolgte ein altersabhängiger Anstieg von 14% (17-28 Wochen) über 21% (30-32 Wochen) auf 71% (33-44 Wochen) ( $H(2) = 6,47$ ,  $p = 0,039$ ). Wistarratten zeigten dagegen für keines der HA-Phänomene einen Alterseffekt.

### 3.2.2 Intravitale Kaskade der hypertensiven Arteriopathie in SHRSP

Anhand der intravital detektierten HA-Phänomene ließ sich in den SHRSP eine zeitliche Abfolge der Pathologien vermuten, die durch die Akkumulation von Dextran sowie Erythrozyten in der Gefäßwand (Phänomene (1) bis (3)) als Zeichen eines Gefäßwandschadens initiiert wird. Dieser Schaden der kleinen Gefäßwände geht mit einer Reduktion der Fließgeschwindigkeit der RBZ einher, die durch die luminale Akkumulationen von Dextran (Phänomen (4)) charakterisiert ist. Diese Vermutung unterstützend, zeigte sich in Arteriolen mit luminaler Dextran-Akkumulation im Vergleich zu Arteriolen ohne HA-Phänomene eine geringere Fließgeschwindigkeit der RBZ (Mittelwert [Standardabweichung] 0,08 [0,10] mm/s im Vergleich zu 1,83 [1,36] mm/s,  $t(2) = 2,40$ ,  $p = 0,139$ , **Abbildung 10E**). Durch diese Blutfluss-Reduktion

wird vermutlich die Ausbildung von nicht-okkludierenden, d.h. das Gefäß nicht vollständig verschließende Erythrozyten-Thromben (Phänomen (5)) in Gang gesetzt. Diese Annahme wird gestützt durch den Fund, dass Arteriolen mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben eine signifikant erniedrigte Fließgeschwindigkeit der RBZ zeigen, wenn man diese mit Arteriolen ohne HA-Phänomene vergleicht (Mittelwert [Standardabweichung] 0,08 [0,07] mm/s im Vergleich zu 1,83 [1,36] mm/s,  $t(4) = 3,17$ ,  $p = 0,034$ , **Abbildung 10E**). Unvollständige Thromben entwickeln sich dann weiter zu okkludierenden Thromben, d.h. vollständigen Gefäßverschlüssen (Phänomen (6) & (7)) und stellen das Endstadium der intravitale HA-Kaskade dar.

In Wistarratten zeigte sich der Gefäßwandschaden (Phänomene (1) bis (3)) als vordergründig auftretendes HA-Phänomen. Zusätzlich fanden sich in den Kontrolltieren luminale Dextran-Akkumulationen (Phänomen (4)) als am weitesten fortgeschrittene Pathologie, wohingegen keine der Wistarratten Gefäße mit Thrombusbildung (Phänomene (5) bis (7)) aufwies. Daher konnte die Messung der Fließgeschwindigkeit der RBZ in den Wistarratten nicht durchgeführt werden. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die oben beschriebene Kaskade einzigartig für die SHRSP ist bzw. einen deutlich langsameren Verlauf in den Kontrolltieren zeigt.



**Abbildung 10: Intravitale Messung der Fließgeschwindigkeit der roten Blutzellen mittels 2-Photonen-Mikroskopie in SHRSP.**

**A** zeigt einen exemplarischen Linescan einer Arteriole ohne HA-Phänomene, der einen ungehinderten Fluss der RBZ darstellt. Im Gegensatz dazu zeigen **B** bis **D** Linescans von Arteriolen, die Störungen des Flusses der RBZ aufweisen. In **B** ist ein exemplarischer Linescan einer Arteriole mit luminaler Dextran-Akkumulation dargestellt, wohingegen **C** und **D** Linescans von Arteriolen mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben zeigen. Im Vergleich zu Arteriolen ohne HA-Phänomene (**E**, grauer Balken) zeigten Messungen des Blutflusses (bzw. der Fließgeschwindigkeit der RBZ) einen erniedrigten Fluss in Arteriolen mit luminaler Dextran-Akkumulation (**E**, roter Balken) und einen signifikant erniedrigten Fluss in Arteriolen mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben (**E**, brauner Balken).

HA - hypertensive Arteriopathie, RBZ - rote Blutzellen, SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten; Maßbalken: **A-D** = 20µm; **A-D**: x-Achse - räumliche Position x, y-Achse - Zeit t (10.000 Millisekunden vom oberen zum unteren Ende des Linescans); **E**: y-Achse - logarithmische Skalierung; \*  $p \leq 0,05$ ; Fehlerbalken = Standardabweichung; die Blutflussmessungen beziehen sich auf die Untersuchung von 8 männlichen SHRSP im Alter von 18-33 Wochen.

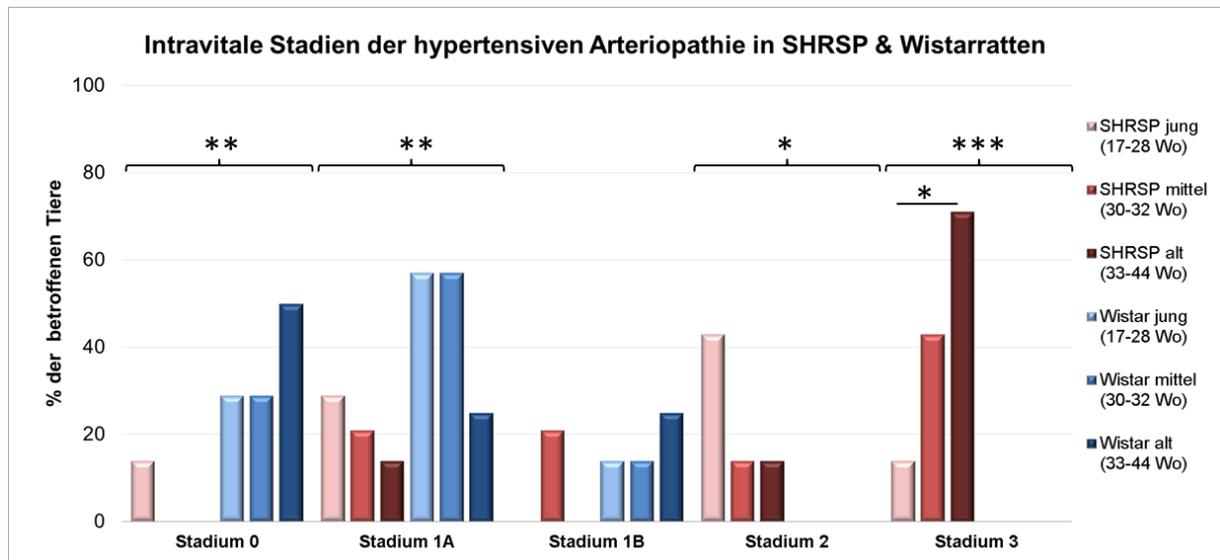
### 3.2.3 Intravitale Stadien der hypertensiven Arteriopathie

Anhand der oben zusammengestellten HA-Kaskade wurden fortführend fünf HA-Stadien definiert: Stadium 0 – keine HA-Phänomene, Stadium 1A – Gefäßwandschaden, Stadium 1B – Blutfluss-Reduktion, Stadium 2 – Bildung nicht-okkludierender / unvollständiger Thromben, Stadium 3 – Bildung okkludierender / vollständiger Thromben. Von allen 28 untersuchten SHRSP wurden  $n = 1$  (4%) vs.  $n = 6$  (33%) der Wistarratten ( $\chi^2(1) = 7,52$ ,  $p = 0,006$ ) Stadium 0 zugeordnet,  $n = 6$  (21%) vs.  $n = 9$  (50%) ( $\chi^2(1) = 7,09$ ,  $p = 0,008$ ) befanden sich in Stadium 1A,  $n = 3$  (11%) vs.  $n = 3$  (17%) ( $\chi^2(1) = 0,002$ ,  $p = 0,966$ ) dagegen in Stadium 1B;  $n = 6$  (21%) vs.  $n = 0$  (0%) ( $\chi^2(1) = 4,44$ ,  $p = 0,035$ ) wurden Stadium 2 und  $n = 12$  (43%) vs.  $n = 0$  (0%) ( $\chi^2(1) = 10,44$ ,  $p = 0,001$ ) wurden Stadium 3 zugeordnet. Die Zuordnung der einzelnen Tiere zu einem bestimmten HA-Stadium erfolgte anhand der schwersten im Tier detektierten Pathologie.

Zusammenfassend war somit eine signifikant höhere Anzahl an Wistar-Kontrolltieren verglichen mit den SHRSP in Stadium 0 und Stadium 1A zu finden. Passend hierzu war die Prävalenz von Stadium 2 und Stadium 3 in SHRSP im Vergleich zu Wistarratten signifikant höher.

Bei der Unterteilung von SHRSP und Wistar-Kontrolltieren in junge (17-28 Wochen), mittel-alte (30-32 Wochen) und alte (33-44 Wochen) Tiere zeigte sich nur für Stadium 3 ein Alterseffekt für die SHRSP. So waren mit 71% der alten SHRSP signifikant mehr Tiere in Stadium 3 zu finden als die 14% der jungen oder 43% der mittel-alten SHRSP ( $H(2) = 4,33$ ,  $p = 0,037$ ). Somit kann geschlussfolgert werden, dass je älter die SHRSP ist, desto fortgeschrittener ist ihre HA-Pathologie. Für Wistarratten zeigte

sich dagegen kein Alterseffekt bei der Zuordnung der Tiere zu einem bestimmten Stadium (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11: Frequenzen der intravitralen Stadien der hypertensiven Arteriopathie in SHRSP und Wistarratten.**

Die verschiedenen HA-Stadien (Stadium 0 – keine HA-Phänomene, Stadium 1A – Gefäßwandschaden, Stadium 1B – Blutfluss-Reduktion, Stadium 2 – Bildung nicht-okkludierender / unvollständiger Thromben, Stadium 3 – Bildung okkludierender / vollständiger Thromben) wurden mittels intravitraler Bildgebung in SHRSP (rote Balken) und Wistarratten (blaue Balken) detektiert. Die Balken stellen dar, wie viel Prozent der Tiere anhand der schwersten im Tier detektierten Pathologie dem jeweiligen HA-Stadium zugeordnet wurden. Dabei zeigte sich, dass eine signifikant höhere Anzahl an Wistarratten im Vergleich zu SHRSP in Stadium 0 und Stadium 1A zu finden war. Passend hierzu war in SHRSP im Vergleich zu Wistar-Kontrolltieren die Prävalenz von Stadium 2 und Stadium 3 signifikant höher.

HA - hypertensive Arteriopathie, SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten. \*  $p \leq 0,05$ ,

\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

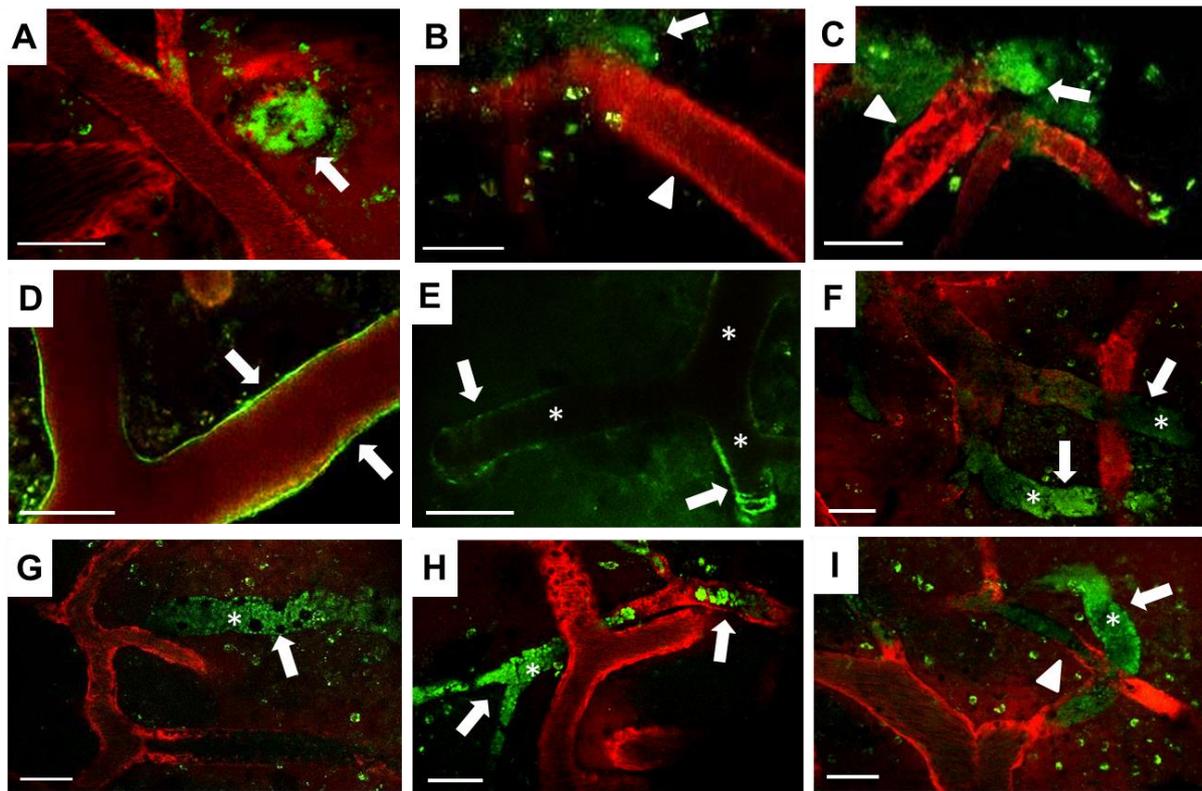
### 3.2.4 Intravitale vaskuläre Amyloid-Pathologie in SHRSP

Für eine weitere Studie wurde in 13 SHRSP im Alter von 17 bis 44 Wochen der Farbstoff Dextran zur Markierung der Gefäße und zusätzlich Methoxy-X04 als Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von vaskulärem A $\beta$  verwendet. Auf eine Untersuchung der Amyloid-Pathologie in Wistarratten wurde verzichtet, da unsere Vorarbeiten gezeigt haben, dass gleichaltrige Kontrollen kein A $\beta$  ausbilden (Bueche et al. 2014; Schreiber et al. 2014; Held et al. 2017).

Von den 13 auf intravitale Amyloid-Ablagerungen untersuchten SHRSP zeigten n = 6 (46%) der Tiere eine vaskuläre A $\beta$ -Positivität der Gefäßwände von Arteriolen, die einer CAA entspricht. Die Hälfte dieser Methoxy-positiven SHRSP (n = 3) zeigte perivaskuläre Amyloid-Ablagerungen (**Abbildung 12A-C**, Pfeile) und zusätzlich zeigten alle Methoxy-positiven SHRSP (n = 6) hell fluoreszierende Amyloid-Akkumulationen in den Gefäßwänden von Arteriolen (**Abbildung 12D-I**, Pfeile). Insgesamt konnten jedoch nur n = 3 Gefäße in n = 3 verschiedenen SHRSP detektiert werden, die perivaskuläre A $\beta$ -Ablagerungen zeigten: eines dieser Gefäße zeigte keine mikroangiopathischen Veränderungen (**Abbildung 12A**), eines wies einen Gefäßwandschaden auf (**Abbildung 12B**, Pfeilspitze) und eines war mit nicht-okkludierenden Thromben gefüllt (**Abbildung 12C**, Pfeilspitze). Die wandständigen Amyloid-Ablagerungen in Form einer CAA konnten dagegen in insgesamt n = 41 Gefäßen aus n = 6 SHRSP detektiert werden: in n = 14 (34%) der Fälle an Gefäßen ohne mikroangiopathische Veränderungen (**Abbildung 12D**) und in n = 27 (66%) der Fälle an Gefäßen mit okkludierenden Thromben (**Abbildung 12E-I**, Sternchen). Hier zeigte sich, dass Gefäße mit okkludierenden Thromben signifikant häufiger von einer

wandständigen CAA betroffen waren als nicht pathologische Gefäße ( $\chi^2(1) = 39,86$ ,  $p < 0,001$ ).

An den komplett verschlossenen Gefäßen, die nicht durch den roten Fluoreszenzfarbstoff Dextran markiert wurden, zeigten sich einerseits kreisförmige Amyloid-Ablagerungen (**Abbildung 12E**, Pfeile) und andererseits eine großflächige CAA, gekennzeichnet durch grüne Gefäßabschnitte, die durch eine fehlende Markierung mit Dextran, aber eine vollständige Markierung mit Methoxy (**Abbildung 12F-I**, Pfeile), charakterisiert wurden. Eine Zuordnung der sechs Methoxy-positiven SHRSP anhand der schwersten im Tier detektierten Pathologie zu den HA-Stadien zeigte, dass sich keines der Tiere in Stadium 0, 1A oder 1B befand, während  $n = 1$  Tier (17%) Stadium 2 (nicht-okkludierende Thrombus-Bildung) und die restlichen  $n = 5$  Tiere (83%) Stadium 3 (okkludierende Thrombus-Bildung) zugeordnet werden konnten.



**Abbildung 12: Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie der vaskulären Amyloid-Pathologie in SHRSP.**

Die intravitale Bildgebung mittels Dextran (rot) zur Markierung der zerebralen Mikrovaskulatur und Methoxy-X04 (grün) zur Markierung von vaskulärem Amyloid in SHRSP zeigte eine CAA in Form von perivaskulären (**A-C**, Pfeile) und wandständigen (**D-I**, Pfeile) Amyloid-Akkumulationen. Die CAA betrifft nicht pathologische Gefäße (**A & D**; Stadium 0 der HA), solche mit einer durch die Akkumulation von Dextran markierten, geschädigten Gefäßwand (**B**, Stadium 1A der HA; Pfeilspitze), mit nicht okkludierenden Thromben (**C & I**, Pfeilspitzen; Stadium 2 der HA) sowie solche mit okkludierenden Thromben (**E-I**, Sterne; Stadium 3 der HA).

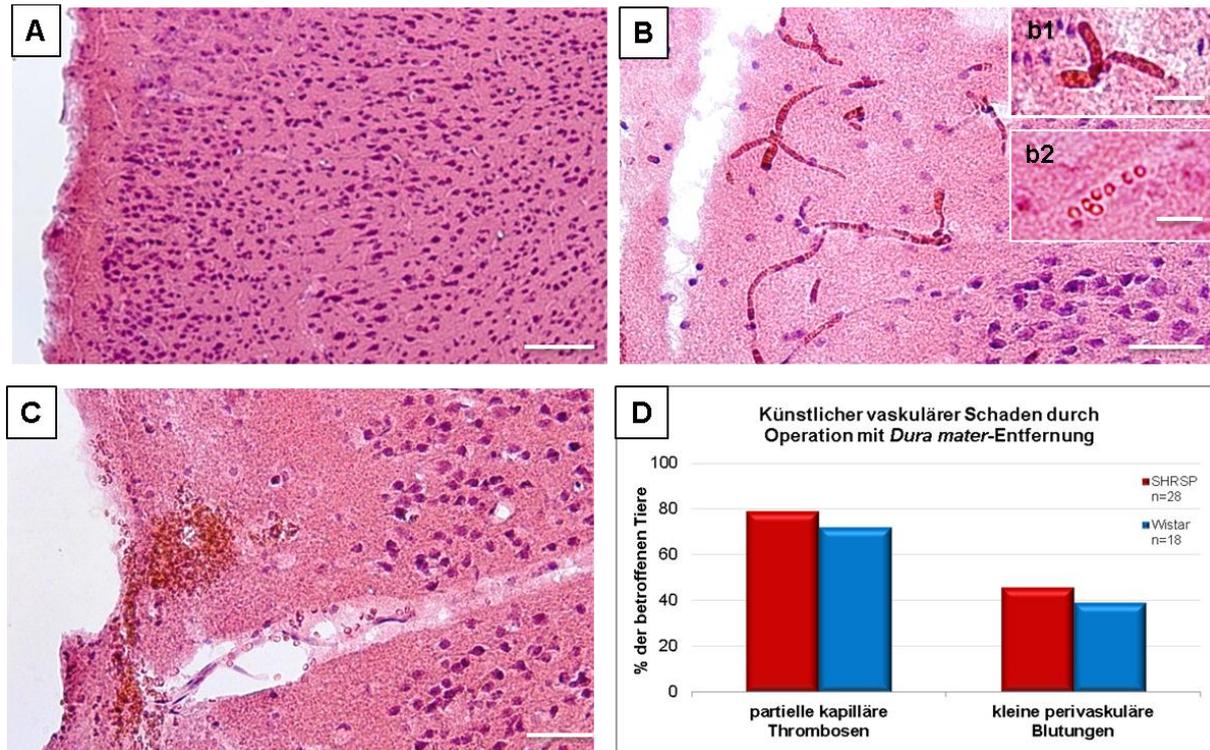
CAA - zerebrale Amyloidangiopathie, HA - hypertensive Arteriopathie, SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten. Alter der Tiere: **C-E** - 28 Wochen, **B & G** - 32 Wochen, **F, H, I** - 33 Wochen, **A** - 39 Wochen; Maßbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Postmortale histologische und immunhistochemische Auswertungen

#### 3.3.1 Künstliche vaskuläre Schäden

Die histologische Auswertung des OP-Bereiches von SHRSP und Wistar-Kontrolltieren zeigte qualitativ keine Unterschiede. Nach der Kraniotomie mit *Dura mater* Entfernung fanden sich in beiden Gruppen OP-Bereiche, die frei von künstlichen, d.h. durch die OP entstandene vaskuläre Schäden, waren (**Abbildung 13A**). Die künstlichen Schäden umfassten einerseits dicht gepackte, teils bereits stark verformte Erythrozyten in Kapillaren, die Ausdruck einer partiellen Thrombusbildung sind (partielle kapilläre Thrombosen, **Abbildung 13B**). Durch die dicht gepackten Erythrozyten behindern die kapillären Thrombosen in der intravitale Bildgebung das Dextran am Durchströmen der Gefäße, wodurch sie in der 2PM nicht visualisiert werden konnten. Im Gegensatz dazu, zeigten sich „normale“ Erythrozyten-Akkumulationen in Kapillaren (**Abbildung 8A**) histologisch durch die intravasale Stauung einzelner Erythrozyten im Gefäßlumen als Anzeichen eines Endothelschadens oder einer BHS-Störung (initiales Phänomen der HA-Pathologie in SHRSP (Schreiber et al. 2012)). In der Histologie sind diese Erythrozyten-Thromben durch intravasale Akkumulationen einzelner, gut voneinander unterscheidbarer und folglich nicht verformter Erythrozyten charakterisiert (**Abbildung 13b2**) (Braun et al. 2012; Schreiber et al. 2012). Somit ließen sich die Erythrozyten-Thromben und die künstlich induzierten partiellen Thrombosen histologisch klar voneinander trennen. Als zweite Form der künstlichen vaskulären Schäden zeigten sich kleine perivaskuläre Blutungen (**Abbildung 13C**), die durch die Kraniotomie vornehmlich nahe der Gehirnoberfläche auftraten. Keines der Tiere zeigte parenchymale

Makroblutungen oder Infarkte im OP-Bereich. Von allen 28 untersuchten SHRSP waren in n = 22 (79%) vs. n = 13 (78%) der Wistarratten ( $\chi^2(1) = 0,24$ , p = 0,622) künstliche kapilläre Thrombosen zu finden; künstliche, bei der OP induzierte Blutungen konnten in n = 13 (46%) der SHRSP und n = 7 (39%) der Wistarratten ( $\chi^2(1) = 0,25$ , p = 0,615) detektiert werden (**Abbildung 13D**). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es keine Gruppenunterschiede zwischen SHRSP und Wistarratten bezüglich der künstlichen vaskulären Schäden gab und beide Gruppen problemlos miteinander verglichen werden konnten.



**Abbildung 13: Künstliche vaskuläre Schäden in SHRSP und Wistarratten.**

(A-C): Der OP-Bereich von SHRSP und Wistar-Kontrolltieren kann nicht unterschieden werden. Beide Gruppen zeigen OP-Bereiche frei von künstlichen vaskulären Schäden (A), aber auch solche mit partiellen kapillären Thrombosen (B) und kleinen perivaskulären Blutungen (C). Die künstlich induzierten partiellen kapillären Thrombosen (b1) lassen sich sehr gut von „normalen“ Erythrozyten-Thromben, die durch die Akkumulation einzelner Erythrozyten im Gefäßlumen (b2) gekennzeichnet sind, abgrenzen.

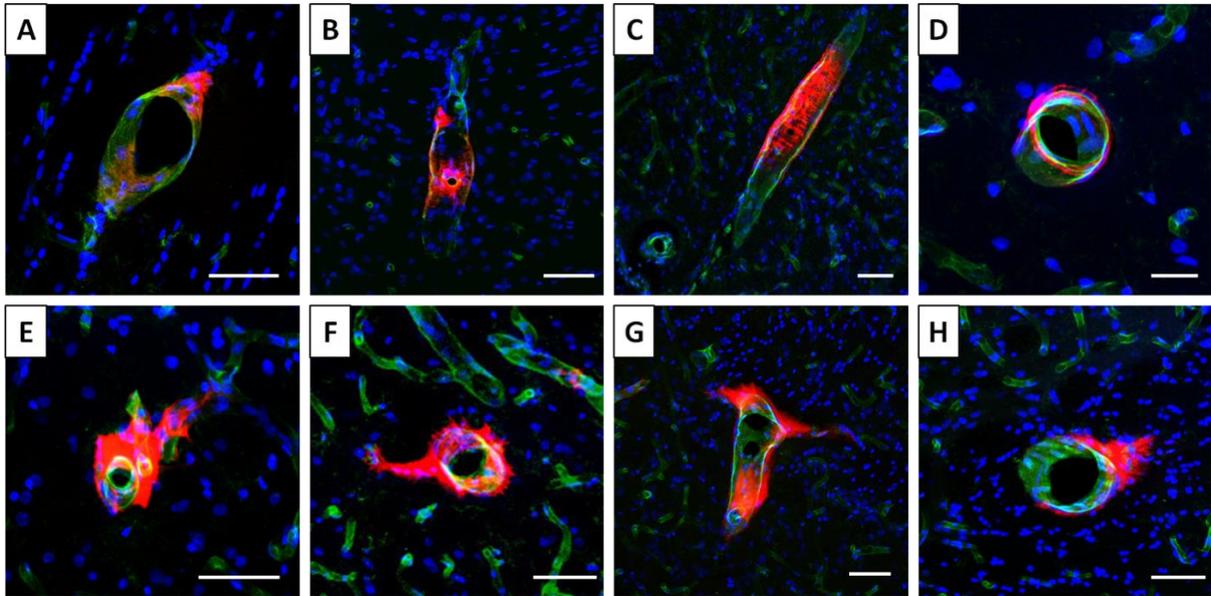
(D): Die Prävalenz der künstlichen vaskulären Schäden durch die OP beinhaltete partielle kapilläre Thrombosen (79% in SHRSP vs. 78% in Wistarratten) sowie kleine perivaskuläre Blutungen (46% vs. 39%) und zeigte keine signifikanten Unterschiede für SHRSP und Wistarratten.

SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten; Maßbalken: **b1** & **b2** = 20 µm, **B** & **C** = 50µm, **A** = 100µm.

### 3.3.2 Detektierbarkeit von Dextran in der Konfokalmikroskopie

Das für die 2PM genutzte Dextran ist an den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin gekoppelt. Dieser hat sein Absorptionsmaximum bei 555 nm und sein Emissionsmaximum bei 580 nm, was sich mit den Wellenlängen der Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (550 nm / 570 nm) überschneidet. Das intravital applizierte Dextran sollte somit postmortal mittels Konfokalmikroskopie sichtbar gemacht werden können. Exemplarische, nach intraorbitaler Injektion von Dextran für die 2PM genutzte SHRSP und Wistarratten, wurden für eine immunhistochemische Färbung mit STL zur Markierung der Blutgefäße und DAPI als Kernfarbstoff genutzt. Wie sich zeigte, konnte Dextran in der Gefäßwand der zerebralen Blutgefäße (**Abbildung 14A-D**) und ebenfalls dessen Austritt in das Parenchym (**Abbildung 14E-H**) detektiert werden. Beide Phänomene waren sowohl in SHRSP als auch in Wistar-Kontrolltieren zu finden. Nach dem Fund von Dextran in der Gefäßwand und Dextran-Austritten in das Parenchym, stellte sich die Frage, ob diese Akkumulationen von Dextran mit einer geschädigten Gefäßwand bzw. einer gestörten BHS in Verbindung gebracht werden können. Daher wurden Schnitte der mit Dextran injizierten Tiere ebenfalls mit IgG, einem Marker für BHS-Störungen, gefärbt. IgG zeigte sich ebenso wie Dextran (**Abbildung 15A-C**) sowohl innerhalb der Gefäßwände als auch perivaskulär bereits in das Parenchym ausgetreten (**Abbildung 15D-F**). Interessanterweise wurde für alle betroffenen Gefäße eine Kolo-kalisation von Dextran und IgG in der Mikrovaskulatur (**Abbildung 15A**) genauso wie beim Austritt in das Parenchym (**Abbildung 15F**) festgestellt, was die Fähigkeit von Dextran zur Detektierbarkeit von BHS-Störungen anzeigt.

STL Dextran DAPI

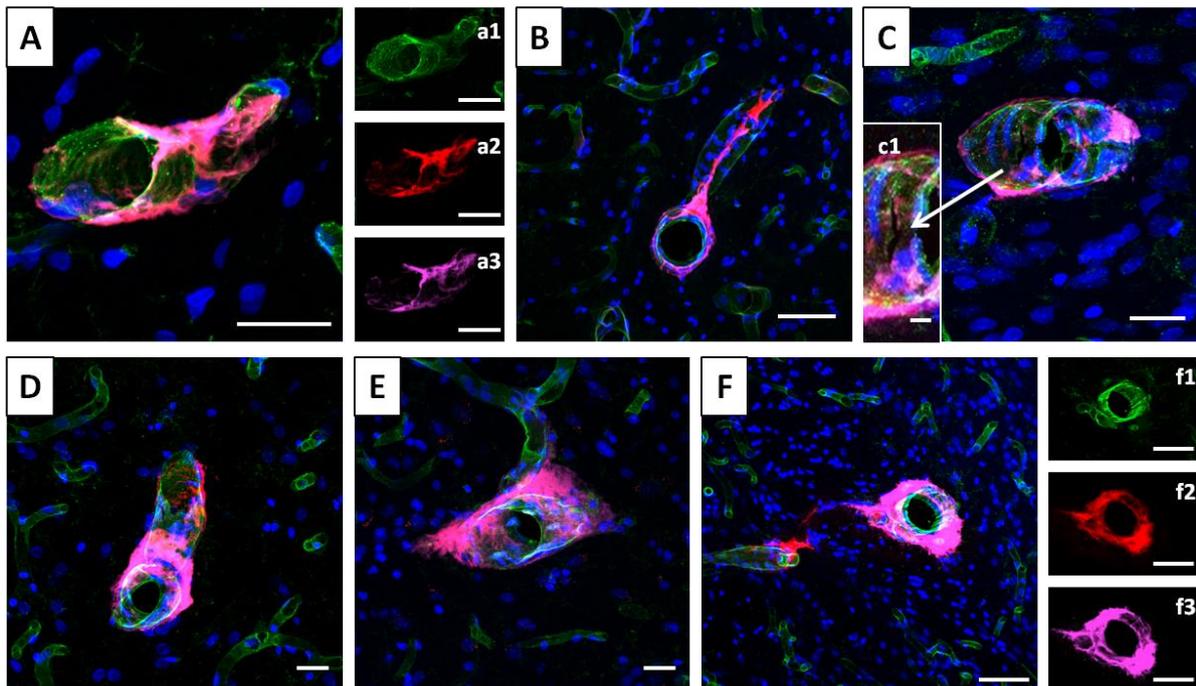


**Abbildung 14: Verteilung von Dextran in der Konfokalmikroskopie.**

Der fluoreszenzmarkierte Farbstoff Dextran konnte durch seine Kopplung an Tetramethylrhodamin in der Konfokalmikroskopie dargestellt werden. Er lagerte sich vorrangig in der Gefäßwand der zerebralen Blutgefäße ab (**A-D**), konnte aber auch vermehrt von der Gefäßwand in das Parenchym austretend (**E-H**) detektiert werden.

DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Markierung der Zellkerne), STL - Solanum Tuberosum Lektin (Endothelmarkierung); Alter der Tiere: **E** - 30 Wochen, **A-C, F** - 32 Wochen, **D, G, H** - 35 Wochen; **A** - Corpus callosum, **B & H** - Basalganglien, **C & G** - Thalamus, **D-F** - Hippokampus; Maßbalken: **D** = 20µm, **A-C, E-H** = 50 µm.

## STL Dextran IgG DAPI



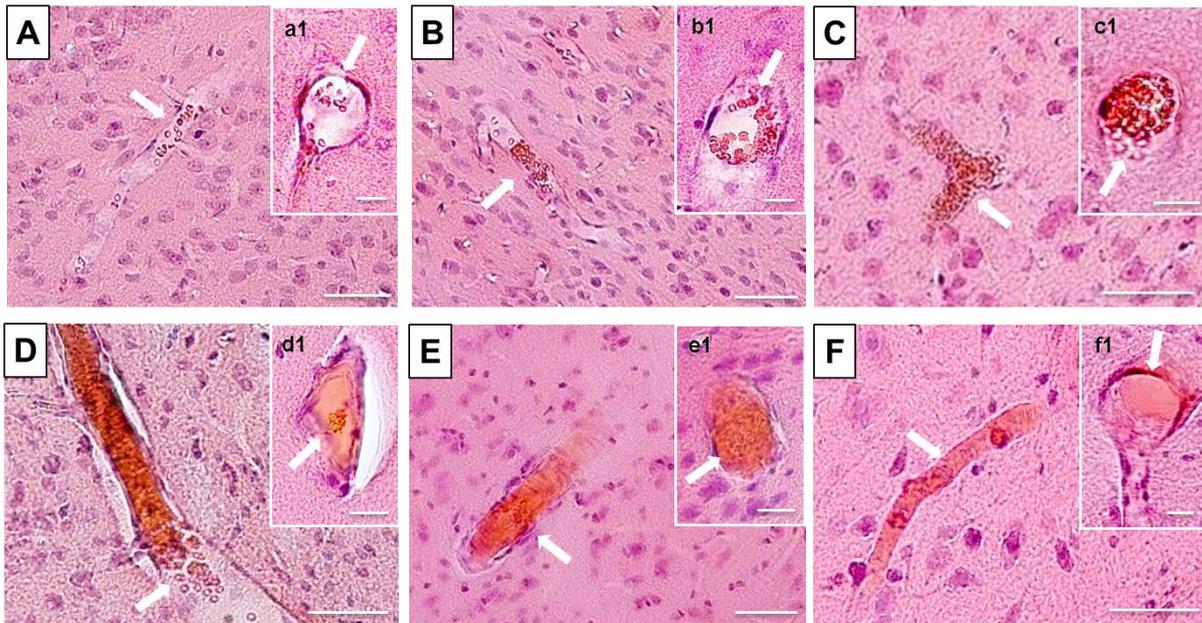
**Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung einer BHS-Störung.**

IgG als Marker für BHS-Störungen konnte in der Gefäßwand (**A-C**) und von der Gefäßwand in das Parenchym austretend (**D-F**) detektiert werden. Dextran und IgG erschienen dabei in beiden Fällen kolokalisiert (**A, a1-a3 & F, f1-f3**), was die Detektierbarkeit von BHS-Störungen durch Dextran anzeigt. **C** und **c1** (Pfeil) zeigen die Ruptur der Wand einer Arteriole, die ebenfalls durch Ablagerungen von Dextran und IgG gekennzeichnet ist.

STL - Solanum Tuberosum Lektin (Endothelmarkierung); IgG - Immunglobulin G (Markierung von BHS-Störungen); DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Markierung der Zellkerne). Alter der Tiere: **A-F, a1-f3** = 31 Wochen; **A, a1-a3, D, E, F, f1-f3** - Kortex, **B** - Hippokampus; **C, c1** - Thalamus; Maßbalken: **c1** = 5µm, **A, a1-a3, C, D, E** = 20µm, **B, F, f1-f3** = 50µm.

### 3.3.3 Hypertensive Arteriopathie

In der HE-Färbung zeigten sich im OP-Bereich von SHRSP und Wistarratten Ansammlungen einzelner Erythrozyten im Gefäßlumen (**Abbildung 16A&a1**, Pfeile) als Initialstadium der Ausbildung von nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben. Im weiteren Verlauf lagern sich diese einzelnen Erythrozyten zusammen, wodurch zunächst kurze Gefäßabschnitte von nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben betroffen sind (**Abbildung 16B&b1**, Pfeile) und sich das Gefäßlumen später vollständig mit Erythrozyten gefüllt darstellt (**Abbildung 16C&c1**, Pfeile). Aus derartigen nicht-okkludierenden Thromben, die durch das Vorhandensein gut voneinander zu unterscheidender, einzelner Erythrozyten charakterisiert sind (**Abbildung 16D&d1**, Pfeile), entwickeln sich vermutlich die okkludierenden Thromben (**Abbildung 16E&e1**, Pfeile), die sich final als komplette Gefäßverschlüsse darstellen (**Abbildung 16F&f1**, Pfeile).



**Abbildung 16: Erythrozyten-Thromben und komplett verschlossene Gefäßabschnitte.**

Im OP-Bereich von SHRSP und Wistarratten zeigten sich Ansammlungen einzelner Erythrozyten im Gefäßlumen (**A & a1**, Pfeile) sowie sich daraus entwickelnde nicht-okkludierende Erythrozyten-Thromben, die sowohl einzelne Gefäßabschnitte betreffen (**B & b1**, Pfeile) als auch das gesamte Gefäßlumen ausfüllen können (**C & c1**, Pfeile). Aus diesen nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben (**D & d1**, Pfeile) entstehen im Verlauf der Pathologie okkludierende Thromben – auch beschrieben als komplett verschlossene Gefäßabschnitte (**E, e1, F, f1**), die sich teilweise noch mit der Ansammlung einzelner Erythrozyten (**E & e1**, Pfeile) darstellen oder die Gefäße vollständig verschließen (**F & f1**, Pfeile).

SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten; **A-F, b1-f1** - SHRSP, **a1** - Wistarratte; Alter der Tiere: **b1, d1** - 18 Wochen, **B, E, F, f1** - 28 Wochen, **c1, e1** - 32 Wochen, **A, a1, C, D** - 33 Wochen; **A-F, a1-f1** - Kortex; Maßbalken: **D, a1-f1** = 20µm, **A-C, E, F** = 50µm.

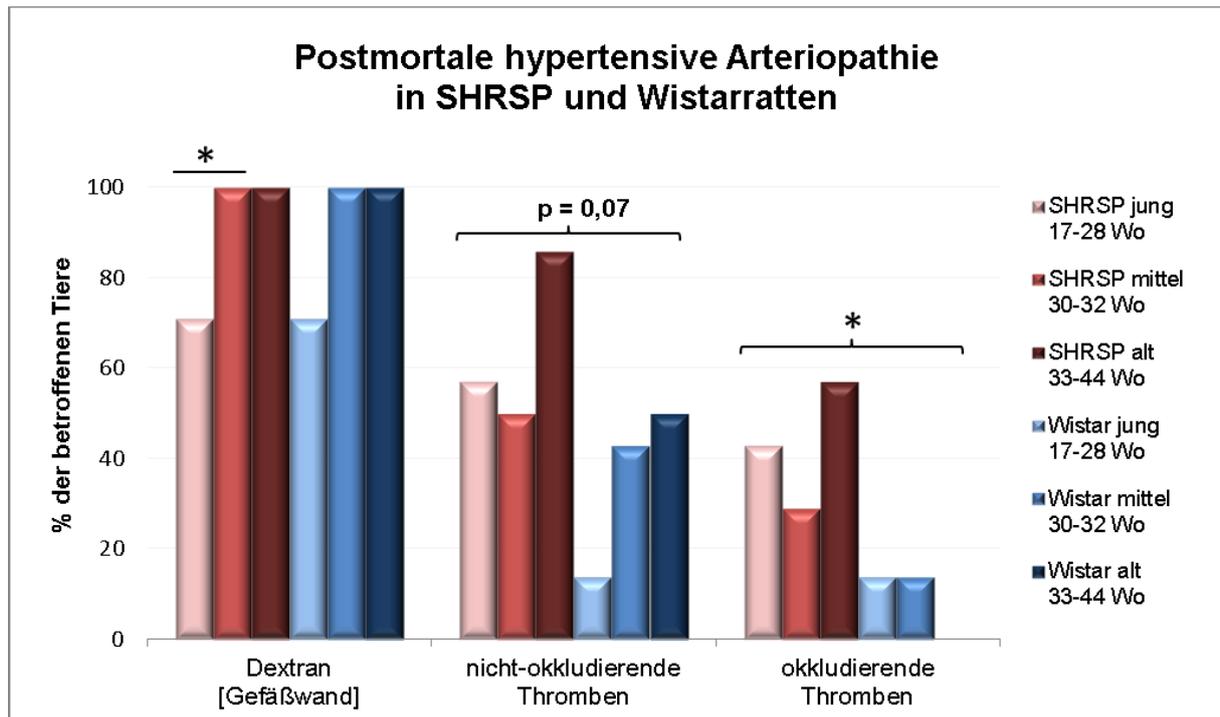
Die OP-Bereiche der für die intravitalen Untersuchungen der HA genutzten 28 SHRSP und 18 Wistar-Kontrolltiere wurden postmortal sowohl immunhistochemisch zur Detektion von Dextran in der Gefäßwand als auch histologisch mittels der HE-Färbung zur Detektion von nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben und okkludierenden Thromben bzw. vollständigen Gefäßverschlüssen untersucht.

Dabei konnte in der Immunhistochemie bei  $n = 26$  (93%) der SHRSP (vs.  $n = 16$  (89%) der Wistarratten) Dextran in der Gefäßwand detektiert werden. In diesem frühen HA-Stadium zeigten sich noch keine Unterschiede zwischen SHRSP und Wistar-Kontrolltieren ( $\chi^2(1) = 0,22$ ,  $p = 0,641$ ). Für die SHRSP stieg die Zahl der Tiere mit einem durch Dextran markierten Gefäßwandschaden von 71% bei den jungen Tieren (17-28 Wochen) auf 100% bei den mittel-alten (30-32 Wochen) und alten (33-44 Wochen) Tieren ( $H(2) = 6,23$ ,  $p = 0,044$ ) an. Wistarratten zeigten bei separater Betrachtung der drei Altersgruppen die gleichen Prävalenzen, aufgrund der geringeren Tieranzahl ergab sich jedoch kein Alterseffekt ( $H(2) = 3,34$ ,  $p = 0,188$ ).

Nicht-okkludierende Erythrozyten-Thromben waren in  $n = 17$  (61%) der SHRSP vs. in  $n = 6$  (33%) der Kontrolltiere ( $\chi^2(1) = 3,29$ ,  $p = 0,070$ , Trendlevel) zu finden. Auch hier konnten für beide Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen jungen, mittel-alten und alten Tieren festgestellt werden (SHRSP: 57% vs. 50% vs. 86%,  $H(2) = 2,5$ ,  $p = 0,293$ ; Wistarratten 14% vs. 43% vs. 50%,  $H(2) = 1,8$ ,  $p = 0,402$ ).

Okkludierende Thromben zeigten eine signifikant höhere Prävalenz in SHRSP im Vergleich zu den Wistar-Kontrolltieren ( $n = 11$  (39%) vs.  $n = 2$  (11%);  $\chi^2(1) = 4,29$ ,  $p = 0,038$ ). Auch hier konnten für beide Gruppen keine signifikanten Unterschiede

zwischen jungen, mittel-alten und alten Tieren festgestellt werden (SHRSP: 43% vs. 29% vs. 57%  $H(2) = 1,6$ ,  $p = 0,452$ ; Wistarratten 14% vs. 14% vs. 0%,  $H(2) = 0,6$ ,  $p = 0,738$ ). Die prozentuale Anzahl der betroffenen Tiere der jeweiligen Pathologien ist in **Abbildung 17** dargestellt.



**Abbildung 17: Postmortale hypertensive Arteriopathie in SHRSP und Wistaratten.**

Sowohl für SHRSP (rot) als auch Wistaratten (blau) lag der Anteil der Tiere mit Dextran in der Gefäßwand für die jungen Tiere bei 71%, für die mittel-alten Tiere bei 100% und für die alten Tiere bei 100%; aufgrund der größeren Tieranzahl ( $n = 28$  für SHRSP vs.  $n = 18$  für Wistaratten) zeigte sich bei gleichen Prävalenzen für SHRSP ein signifikanter Alterseffekt von Dextran in der Gefäßwand. Nicht-okkludierende Thromben konnten in 57% (jung), 50% (mittel-alt) und 86% (alt) der SHRSP und 14% (jung), 43% (mittel-alt) und 50% (alt) der Wistaratten detektiert werden. Signifikante Gruppen- und Alterseffekte gab es nicht, jedoch wurde eine klare Tendenz ( $p = 0,07$ ) gefunden, dass SHRSP mehr nicht-okkludierende Thromben entwickeln als Wistaratten. SHRSP (43% vs. 29% vs. 57%) waren zudem signifikant häufiger von okkludierenden Thromben betroffen als die Kontrolltiere (14% vs. 14% vs. 0%); signifikante Alterseffekte waren in beiden Gruppen nicht nachweisbar.

SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten; \*  $p \leq 0,05$ .

### 3.3.4 Amyloid-Pathologie

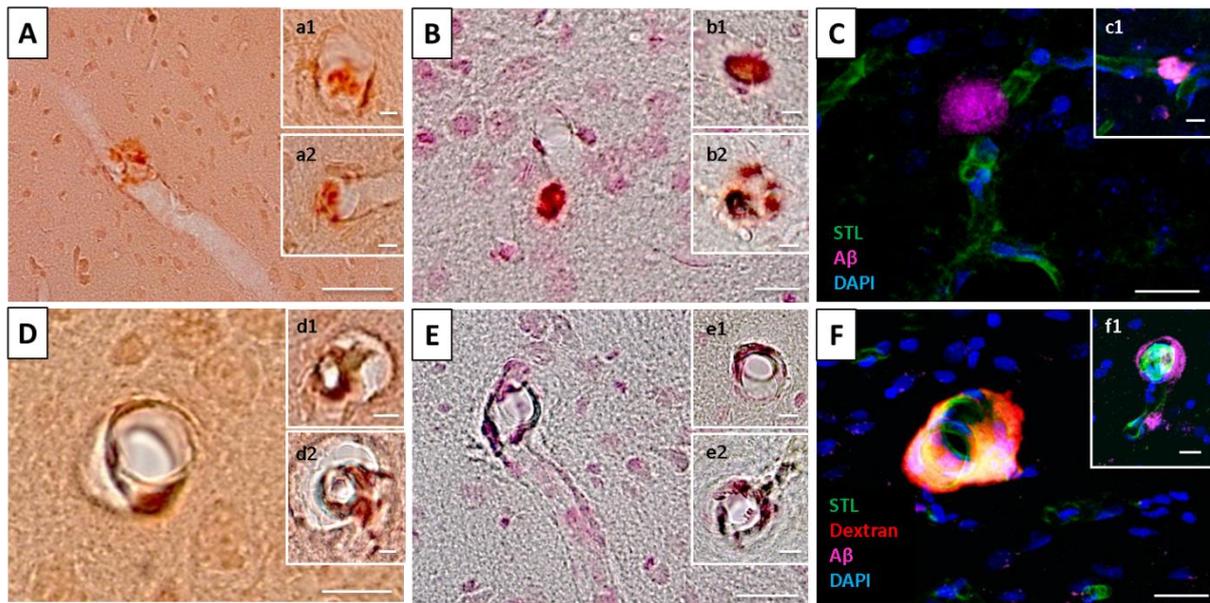
Die postmortale Analyse des OP-Bereiches der 13 SHRSP, die für die intravitale Methoxy-Bildgebung genutzt wurden, beinhaltete die KR- und ThioT-Färbung sowie die A $\beta$ -Immunhistochemie. Untersucht wurde das Vorhandensein von perivaskulären Amyloid-Ablagerungen und vaskulärem A $\beta$  in Form einer CAA. Auf die Untersuchung parenchymaler Amyloid-Ablagerungen wurde verzichtet, da diese in der 2PM nicht detektiert werden konnten.

Die Auswertung zeigte, dass n = 7 (54%) der SHRSP eine vaskuläre Amyloid-Pathologie in Form von perivaskulären Amyloid-Ablagerungen bzw. einer CAA (**Abbildung 18**) aufwiesen. Von diesen A $\beta$ -positiven Tieren zeigten n = 5 (71%) perivaskuläre Amyloid-Ablagerungen (**Abbildung 18A-C**) und n = 6 (86%) wandadhärente Amyloid-Akkumulationen (**Abbildung 18D-F**), die charakteristisch für eine CAA sind.

Betrachtet man den prozentualen Anteil der Arteriolen pro Blickfeld, die durch HA-Phänomene oder eine CAA charakterisiert sind, so zeigten insgesamt 22% der Arteriolen pro Blickfeld ein oder mehrere HA-Phänomen(e). Innerhalb dieser HA-positiven Arteriolen zeigten 95% einen Gefäßwandschaden, 82% enthielten nicht-okkludierende Erythrozyten-Thromben und 9% waren durch okkludierende Erythrozyten-Thromben bzw. vollständig verschlossene Gefäßabschnitte charakterisiert. Zusätzlich waren 9% aller Arteriolen pro Blickfeld von einer CAA betroffen. Innerhalb dieser CAA-positiven Gefäße wiesen in der Immunhistochemie 100% ebenfalls einen Gefäßwandschaden auf; in der Histologie waren die CAA-positiven Arteriolen in 24% der Fälle auch mit nicht-okkludierenden Erythrozyten-

Thromben gefüllt und 56% der Gefäße zeigten neben einer CAA ebenfalls okkludierende Erythrozyten-Thromben.

Da alle CAA-positiven Arteriolen ebenfalls HA-Phänomene zeigten, konnten beide Pathologien (HA und CAA) zusammen in 9% aller Arteriolen gefunden werden. Innerhalb der HA-positiven Gefäße konnte eine CAA mit einer Prävalenz von 41% detektiert werden. Innerhalb der HA-negativen Gefäße konnte eine CAA dagegen nicht festgestellt werden ( $\chi^2(1) = 150,88$ ,  $p < 0,001$ ), was darauf hinweist, dass das Vorhandensein einer HA die Ausbildung einer CAA begünstigt.



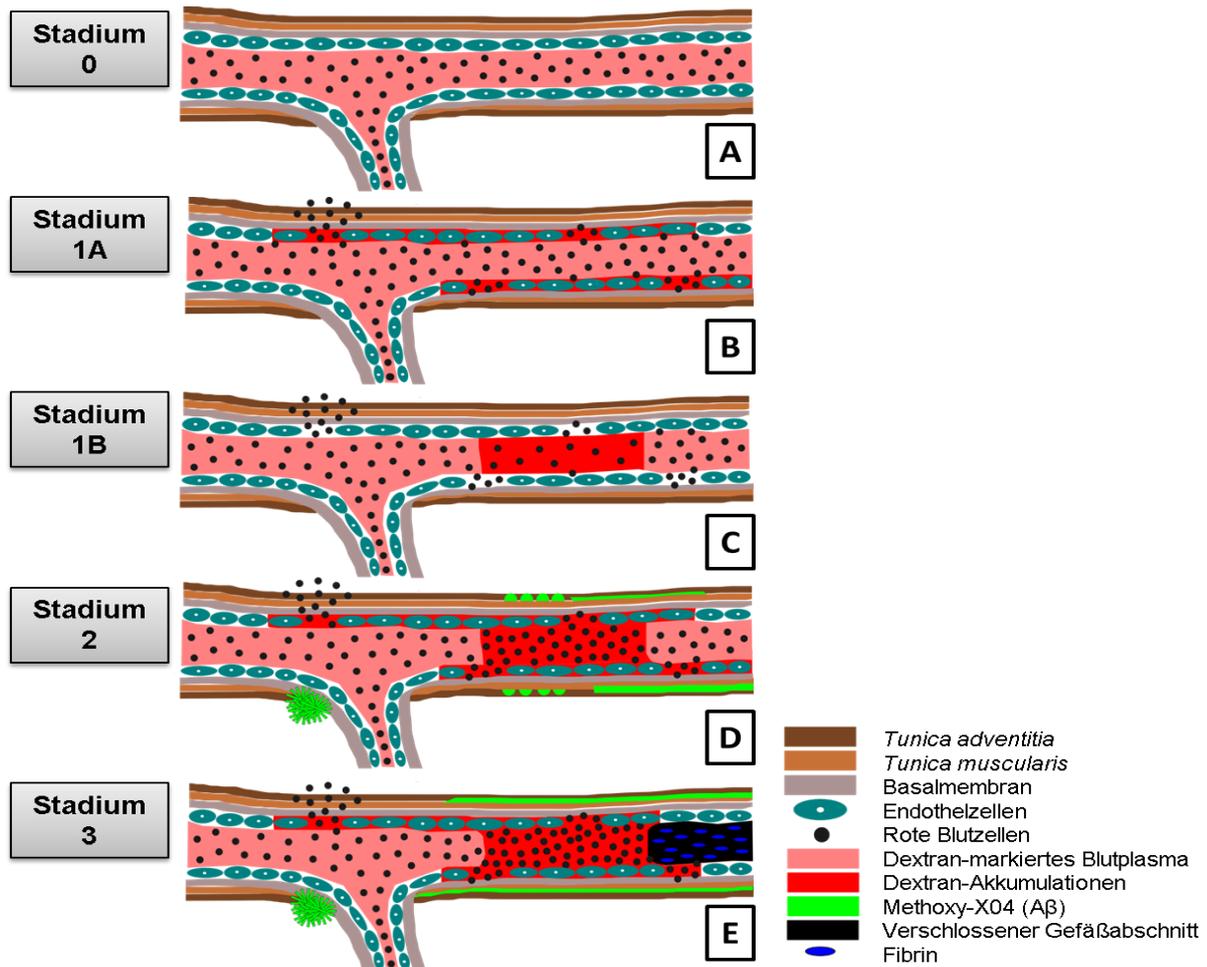
**Abbildung 18: Postmortale Amyloid-Pathologie in der SHRSP.**

**A, a1, a2, B, b1, b2, C** und **c1** zeigen perivaskuläre Amyloid-Ablagerungen, während **D, d1, d2, E, e1, e2, F** und **f1** eine CAA darstellen, die sich u.a. in Gefäßen mit einer durch Dextran markierten BHS-Störung (**F**) zeigt.

A $\beta$  - Amyloid- $\beta$  (Markierung von vaskulärem A $\beta$  / einer CAA), CAA - zerebrale Amyloidangiopathie, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Markierung der Zellkerne), SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten, STL - Solanum Tuberosum Lektin (Endothelmarkierung); **A, a1, a2, D, d1, d2** - Kongorot-Färbung, **B, b1, b2, E, e1, e2** - Thioflavin-T-Färbung, **C, c1, F, f1** - Immunhistochemie. Alter der Tiere: **B, D** - 18 Wochen, **A, a1, a2, b1, c1, d1, E, F** - 32 Wochen, **b2, e1, e2** - 33 Wochen, **C, d2** - 44 Wochen; **A-F, a1-f1** - Kortex; Maßbalken: **a1, a2, b1, b2, c1, d1, d2, e1, e2, f1** = 10 $\mu$ m, **B, C, D, E, F** = 20 $\mu$ m, **A** = 50 $\mu$ m.

### **3.4 Kaskade der hypertensiven Arteriopathie und zerebralen Amyloidangiopathie**

Anhand der für diese Arbeit erhobenen Daten ließ sich zusammenfassend eine intravitale Kaskade der HA und die damit verbundene CAA-Entwicklung beschreiben, die in **Abbildung 19** grafisch dargestellt ist. Beginnend in nicht pathologischen Gefäßen (**Abbildung 19A**) wird die HA durch einen Gefäßwandschaden (**Abbildung 19B**) und eine Blutfluss-Reduktion (**Abbildung 19C**) initiiert. Diese Stadien konnten intravital nicht mit einer CAA in Verbindung gebracht werden, postmortal zeigte sich jedoch bereits eine CAA in Gefäßen mit einem Gefäßwandschaden bzw. einer BHS-Störung. Die beiden Initialstadien der HA führten zu der Ausbildung nicht-okkludierender Erythrozyten-Thromben (**Abbildung 19D**), die final in okkludierenden Thromben / komplett verschlossenen Gefäßabschnitten (**Abbildung 19E**) resultierten. Die Ausbildung einer CAA war stark durch die fortgeschrittenen HA-Stadien beeinflusst und fand in signifikant höherem Maß in verschlossenen / pathologischen Gefäßabschnitten statt (**Abbildung 19D&E**).



**Abbildung 19: Intravitrale Kaskade der hypertensiven Arteriopathie und die damit verbundene Entwicklung der zerebralen Amyloidangiopathie in SHRSP.**

**A** zeigt ein nicht-pathologisches Gefäß ohne HA-Phänomene (Stadium 0). Die HA wird durch einen Gefäßwandschaden und eine Blutfluss-Reduktion initiiert, die durch die Akkumulation von Dextran in der Gefäßwand (**B**, Stadium 1A) oder von Dextran im Gefäßlumen (**C**, Stadium 1B) charakterisiert ist. Diese initiale Pathologie führt zur Ausbildung von nicht-okkludierenden Erythrozyten-Thromben (**D**, Stadium 2), die mit einer signifikanten Blutfluss-Reduktion einhergehen und die Ausbildung von perivaskulären Amyloid-Akkumulationen und einer CAA begünstigen. Diese vaskuläre Amyloid-Pathologie findet sich zudem vermehrt in Gefäßen mit okkludierenden Thromben (**E**, Stadium 3).

CAA - zerebrale Amyloidangiopathie, HA - hypertensive Arteriopathie, SHRSP - spontan hypertensive stroke-prone Ratten.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die 2PM an SHRSP und Wistar-Kontrolltieren etabliert, um diese Bildgebungsmethode zur Darstellung der HA-Pathologien *in vivo* zu nutzen. Ziel war es dabei, die frühen Krankheitsstadien der HA intravital darstellen zu können und mit den postmortalen Analysen in Verbindung zu setzen. Dabei konnte eine *in vivo* Kaskade der hypertensiven zerebralen Mikroangiopathie / HA in SHRSP, die mit einem Gefäßwandschaden beginnt und in okkludierenden Gefäßverschlüssen endet, beschrieben werden. Der Gefäßwandschaden, der die HA-Kaskade initiiert, wurde auch in den Wistar-Kontrollratten gefunden; die späteren Krankheitsstadien, die durch eine Thrombusbildung gekennzeichnet sind, waren jedoch einzigartig für die SHRSP. Vorarbeiten unserer Gruppe haben bereits eine mit zunehmendem Alter fortschreitende Ausbreitung der Erythrozyten-Thromben von den Kapillaren in die Arteriolen beschrieben (Schreiber et al. 2012), was auch durch die hier beschriebene altersabhängige Zunahme der Prävalenz der arteriolären Erythrozyten-Thromben gestützt wird. Bei etwa der Hälfte der SHRSP wurden mit einem fortgeschrittenen Gefäßschaden zusätzlich wandadhärente A $\beta$ -Akkumulationen in Form einer CAA detektiert. Die Ergebnisse aus den intravitalen Beobachtungen in SHRSP und Wistarratten stimmten mit den nachfolgenden postmortalen histologischen und immunhistochemischen Analysen der Rattenhirne überein, was das Potenzial der intravitalen Bildgebung zur Detektion beider Formen der zerebralen Mikroangiopathie darstellt. Die experimentellen Daten unterstützen die ursprüngliche Hypothese, dass es einen kontinuierlichen Übergang zwischen hypertensiver zerebraler Mikroangiopathie / HA und CAA gibt, was darauf hindeutet,

dass CAA-Initiierung und -Entwicklung in Anwesenheit einer (schweren) HA (schneller) stattfindet.

Innerhalb der vorliegenden Studie sollte zudem der künstliche, durch die Kraniotomie verursachte vaskuläre Schaden vor dem Hintergrund der Vulnerabilität der kleinen Blutgefäße der SHRSP untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser hauptsächlich die Entwicklung partieller kapillärer Thrombosen und kleiner perivaskulärer Blutungen beinhaltete und sich – vermutlich durch die kurze Zeitspanne zwischen intravitaler Bildgebung und anschließender Perfundierung – in keinem der Tiere parenchymale Makroblutungen oder Infarkte entwickelten. Nach bestem Wissen berichten andere 2PM-Studien weder über das Auftreten von künstlichen vaskulären Schäden noch deren Frequenz bei Mäusen oder Ratten nach Entfernung der *Dura mater* (Schaffer et al. 2006; Kim et al. 2010; Cho et al. 2011; Lecoq et al. 2011; Santisakultarm et al. 2012; Calcinaghi et al. 2013; Shih et al. 2013). Daher können diese Daten nicht in Bezug zu anderen Forschergruppen und deren Erkenntnissen diskutiert werden. Die vorgelegten Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass die künstlichen vaskulären Schäden im Rahmen der intravitalem Mikroskopie ausschließlich das kleine Gefäßsystem betreffen und keine signifikanten Unterschiede zwischen SHRSP und Wistar-Kontrolltieren zeigten. Die Gefahr eines durch die Kraniotomie entstandenen vaskulären Schadens ist somit nicht auf ein Rattenmodell mit intrinsischer vaskulärer Pathologie wie die SHRSP beschränkt. Da OP-Bereiche von SHRSP und Wistarratten keine Unterschiede zeigten, war für diese Arbeit der Vergleich sowohl der intravitalem als auch der postmortalen Daten beider Gruppen problemlos möglich. Die Entfernung der *Dura mater* mit der daraus resultierenden Schädigung der kortikalen Blutgefäße scheint sowohl für die SHRSP

als auch für die Wistarratten die Hauptursache der künstlichen vaskulären Schäden zu sein. Dennoch ist die Entfernung der *Dura mater* in der Ratte implizit notwendig (Sigler und Murphy 2010; Shih et al. 2012), um die Bildgebung der kortikalen Gefäße im Rattenhirn mit einer erhöhten Eindringtiefe von 300-500 µm zu gewährleisten.

Unter Einbeziehung der aktuellen Literatur gibt es keine anderen Arbeiten, die Details zur postmortalen Verteilung von Dextran bei Ratten liefern (Nishimura et al. 2010; Baraghis et al. 2011; Cho et al. 2011; Lecoq et al. 2011; Calcinaghi et al. 2013; Shih et al. 2013). Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass sich das intravital injizierte Dextran (Molekulargewicht 70 kDa) auch postmortal in den Gefäßwänden und zusätzlich austretend ins Parenchym detektieren lässt. Es ist daher potenziell mit dem Farbstoff „Evans Blue“ vergleichbar, der genutzt wird, um die Durchlässigkeit der BHS für Makromoleküle zu untersuchen (Hawkins und Egleton 2006; Ay et al. 2008; Yen et al. 2013). Die gezeigte Ko-Lokalisation von Dextran mit dem üblicherweise zur Markierung einer BHS-Störung genutzten Marker IgG, zeigt die Anwendbarkeit von Dextran zur Detektion der geschädigten BHS. Im Vergleich zu IgG, Fibrinogen oder Fibronectin – konventionellen Markern des Zusammenbruchs der BHS – kann Dextran durch sein deutlich geringeres Molekulargewicht (IgG - 150 kDa (Batra et al. 2002), Fibrinogen - 300 kDa (Willis et al. 2013), Fibronectin - 440 kDa (Vaheiri und Mosher 1978)) möglicherweise bereits sehr subtile Funktionsstörungen der BHS detektieren. Niedermolekulargewichtige Dextrane (z.B. 4 kDa, 40 kDa) könnten sogar noch vielversprechendere Marker für kleine endotheliale Verletzungen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HA vornehmlich durch einen initialen Gefäßwandschaden, eine Störung der BHS sowie die daraus resultierende Ausbildung (nicht-) okkludierender Thromben charakterisiert. Historisch gesehen wurde die HA eher mit fortgeschrittenen vaskulären Läsionen wie Arteriosklerose, Hyalinose oder Thrombosen der kleinen Hirngefäße in Verbindung gebracht (Fisher 1968). In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der HA jedoch grundlegend verändert: eine frühe endotheliale Dysfunktion und ein Zusammenbruch der BHS werden inzwischen als entscheidende Kennzeichen der hypertensiven Gefäßwandschädigung angesehen. Diese bereits sehr früh im Krankheitsverlauf detektierbaren Veränderungen beschleunigen die Entwicklung fortgeschrittener Gefäßpathologien, wie den Verlust der glatten Gefäßmuskulatur sowie Gefäßwandverdickungen (Pantoni 2010; Wardlaw 2010; Schreiber et al. 2012; Schreiber et al. 2013; Wardlaw et al. 2013a; Ihara und Yamamoto 2016; Shi und Wardlaw 2016; Wardlaw et al. 2017). Die Störung der BHS scheint darüber hinaus die Ablagerung von vaskulärem Fibrin und die Ausbildung von Gefäßverschlüssen zu begünstigen (Cortes-Canteli et al. 2015; Shi und Wardlaw 2016). Diese Sichtweise stimmt mit unserer zeitlichen HA-Kaskade überein, die insgesamt die Existenz einer Folge von Ereignissen unterstützt. Hypothetisch kommt es im Verlauf zu einem pro-inflammatorischen thrombotischen Zustand in Verbindung mit einer Blutflussreduktion und einer Hyperkoagulabilität, die die Basis für die nachgewiesenen Gefäßverschlüsse sein könnten (Esmon 2009; Kumar et al. 2010; Undas et al. 2010; Undas und Ariëns 2011; Undas 2014). Dieser Kreislauf scheint vom Alter abzuhängen, da eine fortschreitende Gefäßpathologie in Form von Gefäßverschlüssen häufiger in älteren SHRSP gefunden wurde. Auch der Aspekt,

dass altersangepasste Kontrolltiere ebenfalls eine HA, und zwar deren Initialstadien aufweisen, unterstreicht die Hypothese, dass Alter – auch unabhängig von vaskulären Risikofaktoren – einen akzelerierenden Faktor für die Ausbildung einer HA darstellt. Neben der arteriellen Hypertonie könnte der in der SHRSP beschriebene Nierenschaden ebenso das „normale Altern“ der Ratten und folglich auch die Entstehung der Gefäßpathologien beschleunigen, da eine Erkrankung der Niere mit der Ausbildung einer zerebralen Mikroangiopathie in Verbindung steht bzw. diese vorantreibt (Makin et al. 2015; Toyoda 2015). Hypothetisch führt die postulierte HA-Kaskade zur Degeneration der neurovaskulären Einheit, was eine entscheidende Ursache für kognitive Defizite / eine vaskuläre Demenz und / oder ischämische / hämorrhagische Schlaganfälle sein könnte (Zlokovic 2010; Stanimirovic und Friedman 2012; Zhang et al. 2012).

Kürzlich beschrieben Ihara und Yamamoto eine hypothetische HA-Kaskade, die anhand der Daten verschiedener Studien an SHR und SHRSP aufgestellt wurde. Diese Kaskade wird ebenfalls durch eine endotheliale Dysfunktion und den daraus resultierenden Zusammenbruch der BHS initiiert, resultiert jedoch in WMH, ZMB sowie PVR (Ihara und Yamamoto 2016). Die zuletzt genannten Phänomene wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da Pathologien der weißen Substanz und perivaskuläre Raumvergrößerungen durch die intravitale Bildgebung des Rattenkortex nicht nachweisbar sind. WMH, ZMB und PVR könnten jedoch in der Tat eine Störung der BHS und / oder das Versagen der perivaskulären Drainage anzeigen (Bailey et al. 2009; Wardlaw et al. 2009; Huisa et al. 2015; Weller et al. 2015; Wang et al. 2016). Die Ergebnisse von Ihara und Yamamoto stimmen mit unseren früheren postmortalen Studien in SHRSP, die eine BHS-Störung,

anschließende Gefäßwandrupturen und konsekutive kleine perivaskuläre Blutungen beschreiben, überein (Schreiber et al. 2012; Schreiber et al. 2014). Zukünftige Studien sollten die Verbindung zwischen den Pathologien der weißen Substanz, subkortikaler und kortikaler Regionen sowie thrombotischen und hämorrhagischen Pathologien bei der HA detaillierter untersuchen. Eine Kombination aus MRT-Messungen und intravitalem Mikroskopieverfahren wie der 2PM könnte genutzt werden, um derartige Fragestellungen zu lösen.

Die experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass die HA auch eine Erkrankung des Kortex ist, was der allgemeinen Lehrmeinung widerspricht, dass die humane HA nahezu ausschließlich auf subkortikale Regionen beschränkt sein soll (Pantoni 2010; Cai et al. 2015). Die vorgelegten Ergebnisse stimmen somit mit neueren (MRT-)Studien überein, die in HA-Patienten kortikale Atrophien, Mikroinfarkte und Blutflussreduktionen nachweisen können (van Veluw et al. 2014; Lambert et al. 2015; Peres et al. 2016; Shi et al. 2016).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass thrombotische Gefäßverschlüsse im Rahmen der HA die Akkumulation von perivaskulärem und wandadhärentem A $\beta$  begünstigen. Diese Daten bestätigen Ergebnisse aus früheren Tierstudien an APP-transgenen Mäusen sowie humanen Autopsiestudien an Alzheimer- oder Schlaganfall-Patienten, die das Auftreten einer CAA um durch vaskuläre Fibrin(ogen)-Akkumulationen charakterisierte Gefäßverschlüsse beschreiben (Reijmer et al. 2016; Charidimou et al. 2017a). In diesem Zuge wird vermutet, dass im Gefäßlumen angehäuften Fibrin(ogen) das A $\beta$  „einfängt“, was wiederum dessen vaskulären Abtransport behindert (Cortes-Canteli et al. 2010). Die

in Mäusen beschriebene intraluminale Akkumulation von A $\beta$  in den verschlossenen Gefäßabschnitten (Kucheryavykh et al. 2017) könnte auch in der SHRSP möglich sein. Dennoch zeigen die vorliegenden histologischen und immunhistochemischen Daten deutlich, dass das A $\beta$  in der SHRSP in der Tunica Media der Gefäßwand akkumuliert, was spezifisch auf eine CAA hinweist (Biffi und Greenberg 2011). Die intravital fehlende Thrombusbildung in Wistarratten könnte dabei das Fehlen jeglicher vaskulärer A $\beta$ -Pathologie / CAA bei den Kontrolltieren in den Vorarbeiten unserer Gruppe erklären (Bueche et al. 2014; Schreiber et al. 2014; Held et al. 2017).

Die HA selbst ist nur eine mögliche Ursache für die Entstehung einer CAA in der SHRSP; es können hypothetisch auch viele andere Mechanismen als Entstehungsursache angenommen werden. Die SHRSP ist eine nicht-transgene, aber genetisch hypertensive Ratte, die selektiv aus der SHR gezüchtet wurde, welche wiederum durch selektive Verpaarung von Wistar-Kyoto Ratten generiert wurde (OKAMOTO et al. 1974; Bailey et al. 2011; Krafft et al. 2012). Bereits im Alter von 12 Wochen zeigt die SHRSP eine maligne Hypertonie, die auf Veränderungen verschiedener Gene zurückzuführen ist. Diese Gene interagieren miteinander und sind beispielweise an der Blutdruckregulation, der Salz-induzierten Blutdruckveränderung, der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, adrenergen Mechanismen, dem Prostaglandin-Mechanismus oder einer Nierenpathologie beteiligt (McGiff und Quilley 1981; Nabika et al. 2012; Koh-Tan et al. 2017). Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die vaskuläre A $\beta$ -Pathologie der SHRSP in Zusammenhang mit den für den Bluthochdruck verantwortlichen genetischen Veränderungen steht. Tatsächlich steht bisher jedoch keine Studie zur Genomsequenzierung der SHRSP zur Verfügung, die ausschließen könnte, dass

(spontane) Mutationen oder spezifische Risiko-Allele von APP, der Beta-Sekretase, Presenilin-1 oder -2 oder ApoE zu einer veränderten A $\beta$ -Produktion in der SHRSP führen. In einer neuen Studie hat unsere Arbeitsgruppe erste vorläufige Analysen an der SHRSP durchgeführt, die jedoch bisher keine Veränderungen der neuronalen RNA-Expression von am A $\beta$ -Metabolismus beteiligten Proteinen zeigt (unpublizierte Daten). Allerdings finden wir in der SHRSP eine Hochregulation der Expression von neuronalem APP, was aber eher auf eine HA-bedingte chronische Hypoperfusion und eine daraus resultierende neuronale Schädigung als auf eine APP-Genmutation zurückzuführen sein sollte (Lin et al. 1999; Schreiber et al. 2014). Tatsächlich könnte es im Fall einer neuronalen APP-Überexpression ebenfalls zur Ausbildung einer CAA kommen. Als Folge eines gesteigerten Abtransportes von A $\beta$  über die perivaskulären Drainagekanäle ist eine Art "Erschöpfung" der Transportmechanismen von vaskulärem Amyloid (Calhoun et al. 1999; Herzig et al. 2004) und folglich die Akkumulation von A $\beta$  in der Gefäßwand denkbar. Fortführende Studien sollten untersuchen, inwieweit die CAA in der SHRSP (nur) im Zusammenhang mit einer HA entsteht oder inwiefern Pathologien der kleinen Hirngefäße und eine neuronale APP-Überexpression hinsichtlich der Ausbildung vaskulärer Amyloid-Ablagerungen zusammenwirken.

Auch Alter und arterielle Hypertone könnten jeweils für sich (und zusammen) Ursache für das Versagen von A $\beta$ -Transport- oder -Abbaumechanismen sein. In Übereinstimmung damit ist die arterielle Hypertonie recht häufig bei Menschen mit einer CAA zu finden; so sind etwa 30% bis annähernd 70% der CAA-Patienten ebenfalls von einer arteriellen Hypertonie betroffen (Boulouis et al. 2017; Charidimou et al. 2017b; Charidimou et al. 2017c; Jang et al. 2017). Experimentelle Daten

bringen zudem eine arterielle Hypertonie (und ein hohes Alter) in Verbindung mit (i) einer Hochregulation des Rezeptors RAGE (engl. *receptor for advanced glycation endproducts*), die einen erhöhten Einstrom von A $\beta$  ins Gehirn zur Folge hat und (ii) einer Herunterregulation des Rezeptors LRP1 (engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*), die in einem verminderten A $\beta$ -Abtransport aus dem Gehirn resultiert. Beide Prozesse könnten letztendlich zu einer vaskulären Akkumulation von A $\beta$  führen (Hawkes et al. 2011; Carnevale et al. 2012; Ramanathan et al. 2015; Tarasoff-Conway et al. 2015).

Man könnte weiter argumentieren, dass – sobald sich eine CAA entwickelt hat – das vaskuläre A $\beta$  zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des Endothels der kleinen Gefäße führt, was wiederum in (i) einem Versagen der vaskulären Autoregulation sowie (ii) einer Störung der BHS resultiert (Grinberg et al. 2012). In erster Instanz beeinträchtigt vaskuläres A $\beta$  die Beseitigung löslicher Stoffe sowie den endothelialen Proteintransport, was wiederum die Ansammlung potenziell toxischer Substanzen und eine damit einhergehende lokale Entzündung der kleinen Gefäßwände erleichtert. Letztere sollte ein daraus resultierendes Endothelversagen und letztendlich die – typischerweise bei einer HA gefundene – Reorganisation der Gefäßwand begünstigen. Somit könnte theoretisch auch eine CAA die weitere Progression der HA an gleichen Gefäße beschleunigen; beide Erkrankungen scheinen sich also gegenseitig zu begünstigen.

Des Weiteren fördert eine arterielle Hypertonie das Austreten von Plasmaproteinen in die Gefäßwand, was wiederum die Dysfunktion der BHS beschleunigen und die perivaskuläre A $\beta$ -Drainage beeinträchtigen könnte (Jang et al. 2018). Eine gestörte

BHS wird nicht nur als Risikofaktor für eine CAA-Entwicklung diskutiert, sondern soll zusätzlich die Ausbildung CAA-bedingter Blutungen erleichtern (Grinberg und Thal 2010; Passos et al. 2015). Tatsächlich ist die Unterscheidung in "Bluthochdruckbedingte" und "HA-bedingte" CAA-Entwicklung eher künstlich, da beide Formen untrennbar miteinander verbunden sind. Insgesamt bleibt – wie bei der HA – die ungelöste Frage, ob zwischen CAA und Hypertonie nur eine gewisse Koexistenz besteht oder ob man davon ausgehen kann, dass es zwischen beiden Pathologien einen kausalen Zusammenhang gibt (Yamada 2015; Charidimou et al. 2017b). Da es bisher keine direkte Behandlung der CAA gibt, wäre es von großem Vorteil, wenn eine indirekte Behandlung derselben über Blutdruckmanagement und Therapie einer HA möglich wäre. Während in transgenen Alzheimer-Mäusen der Einsatz von Antihypertensiva bereits erfolgreich zur Senkung der Anzahl an Amyloid-Plaques beigetragen hat (Wang et al. 2007; Paris et al. 2011), fehlt es an Studien, die sich mit der Frage befassen, ob eine Verbesserung der HA (beispielsweise durch eine blutdrucksenkende Behandlung) zur Reduzierung von vaskulären A $\beta$ -Ablagerungen führt.

Humane Autopsiestudien konzentrieren sich häufig nicht auf die Überlappungsprävalenzen von HA und CAA, sondern untersuchen entweder das Ausmaß hypertensiver mikroangiopathischer Pathologien, den Schweregrad der CAA oder die voneinander unabhängigen HA- und CAA-Frequenzen im alternden menschlichen Gehirn (Ritter et al. 2005; Charidimou et al. 2016a; Kim et al. 2016; Arvanitakis et al. 2017; Shams et al. 2017). So wird beschrieben, dass 20% bis 40% der nicht-dementen älteren Personen im Alter von 75 Jahren und älter von einer CAA betroffen sind (Xuereb et al. 2000; Pfeifer et al. 2002; Tanskanen et al. 2005;

Charidimou et al. 2012; Charidimou et al. 2017a). Die Prävalenzen der HA liegen sogar bei 50% bis 70% bereits ab einem Alter von 65 Jahren (Jellinger und Attems 2012; Attems und Jellinger 2014). Nur wenige Autopsiestudien geben tatsächlich eine präzisere Überlappungsprävalenz beider mikroangiopathischer Entitäten in den gleichen Hirnarealen an. So beschreiben Ritter und Kollegen einen Zusammenhang zwischen tiefen Blutungen (indikativ für eine HA) und einer CAA in 18% der Patienten mit intrazerebralen Blutungen (Ritter et al. 2005). Darüber hinaus werden multiple vaskuläre Erkrankungen inklusive der HA und CAA in 7% bis 26% der nicht-dementen älteren Personen gefunden (Matthews et al. 2009; Arvanitakis et al. 2017). Eine kürzlich durchgeführte Autopsiestudie identifizierte dagegen viel höhere Überlappungsprävalenzen; hier zeigten 75% der Patienten mit einer pathologisch gesicherten CAA ebenfalls eine HA-assoziierte Arteriosklerose (Charidimou et al. 2016a). Zusammenfassend gibt es in den verschiedenen postmortalen Studien keine konsistenten Schätzungen der Überlappung von HA- und CAA-bezogenen Pathologien. Gleiches gilt für die intravitale Bildgebungsstudien. So berichten bisher nur zwei Studien über gemischte Muster von HA- und CAA-assoziierten Bildgebungsmarkern (sowohl tiefe als auch lobäre Blutungen) in 19% bis 23% der Patienten mit intrazerebralen Blutungen (Smith et al. 2010; Pasi et al. 2018). Basierend auf der Literatur kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass viele ältere Personen eine CAA ohne eine HA oder umgekehrt eine HA ohne eine CAA zeigen. Zusätzlich muss es jedoch einen bestimmten Anteil der alternden Bevölkerung geben, in dem beide Entitäten der zerebralen Mikroangiopathie überlappen; bisher ist allerdings wenig über die genaue Prävalenz dieser Patientengruppe bekannt. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen das

häufige gemeinsame Auftreten von HA und CAA und lassen vermuten, dass die Ausbildung und Progression einer CAA in Anwesenheit einer (schweren) HA (schneller) stattfinden könnte.

Die Stärke der vorliegenden Studie besteht in der Verwendung der SHRSP, welche sich durch die spontane Entwicklung einer HA ohne künstliche Induktion einer Gefäßpathologie (beispielsweise durch den Verschluss großer Hirngefäße) auszeichnet. Dies erlaubt die Untersuchung der mikrovaskulären Pathologie, die dem spontanen Verlauf der sporadischen humanen hypertensiven zerebralen Mikroangiopathie ähnelt. Es konnte die intravitale 2PM etabliert werden, die neben der Untersuchung HA-bedingter Gefäßpathologien auch die Darstellung einer vaskulären A $\beta$ -Pathologie in Form einer CAA durch den Farbstoff Methoxy-X04 ermöglichte. Bisherige Bildgebungsstudien unter Nutzung von Methoxy-X04 wurden lediglich in transgenen Alzheimer-Mäusen durchgeführt (Klunk et al. 2002; Yan et al. 2009; Dong et al. 2010; Burgold et al. 2011; Hefendehl et al. 2011; McCarter et al. 2013). Die vorliegende Arbeit beschreibt somit die bisher einzigartige *in vivo* Charakterisierung von gemischten vaskulären HA- und A $\beta$ -Pathologien in einem nicht-transgenen Rattenmodell der zerebralen Mikroangiopathie.

Grenzen der vorliegenden Arbeit sind das Fehlen der Untersuchung der der Interaktion beider mikrovaskulärer Pathologien zugrundeliegenden Mechanismen und die Verwendung nur eines Tiermodells der zerebralen Mikroangiopathie. Weiterführende Studien müssen zeigen, ob sich die vorliegenden Erkenntnisse auch in anderen HA-Modellen bestätigen lassen. Die bisher nicht durchgeführte

medikamentöse Behandlung der SHRSP, beispielweise mit Antihypertensiva, lässt die Frage offen, ob eine Verlangsamung der Progression der HA auch die Entwicklung / ein Fortschreiten der CAA verhindert.

Eine weitere Limitation ist, dass in einigen Wistar-Kontrolltieren in der Histologie vereinzelte nicht-okkludierende Erythrozyten-Thromben gefunden wurden, die zuvor in der intravitalen 2PM nicht detektiert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass die postmortale Analyse die intravitalen Befunde nicht vollständig replizieren kann und mit der intravitalen Bildgebung nicht alle subtilen HA-Pathologien gefunden werden.

In dieser Studie wurde eine HA am lebenden Tier anhand des Vorhandenseins kleiner Gefäß(wand)-Schäden definiert. Dies unterscheidet sich von humanen Autopsie- oder *in vivo* Bildgebungsstudien, in denen die HA durch schwere Gefäßwandschäden (wie eine Arteriosklerose (Skrobot et al. 2016)) oder fortgeschrittene Pathologien (z.B. WMH oder Lakunen (Wardlaw et al. 2013b)) gekennzeichnet ist. Diese Aspekte stellen eine weitere Einschränkung der vorliegenden Arbeit dar, da die Vergleichbarkeit der hier dargestellten experimentellen mit den vorhandenen Daten aus humanen Studien möglicherweise begrenzt ist.

## **5 Ausblick**

Zusammenfassend lassen die Daten der vorliegenden Arbeit, die in einem nicht-transgenen Tiermodell der zerebralen Mikroangiopathie (SHRSP) erhoben wurden, darauf schließen, dass Thrombosen der kleinen Hirngefäße eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer CAA spielen könnten. Dadurch wird ein Zusammenhang von HA und CAA beschrieben, der beide Formen der zerebralen Mikroangiopathie dem gleichen Krankheitsspektrum zuordnet. Die SHRSP könnte somit ein geeignetes Tiermodell für die Untersuchung des Zusammenspiels der verschiedenen Gefäßpathologien des alternden Gehirns darstellen. Weiterführende Studien an anderen Tiermodellen der zerebralen Mikroangiopathie / HA müssen die aktuellen Ergebnisse bestätigen.

Da es bisher keine Behandlung der CAA gibt, die zur Entwicklung schwerer hämorrhagischer Schlaganfälle und einer vaskulären Demenz beiträgt, könnte die vermutete Beteiligung der HA an der CAA-Entstehung neue therapeutische Möglichkeiten beispielsweise durch die Kontrolle vaskulärer Risikofaktoren eröffnen. Die Therapie der HA als Grunderkrankung mittels blutdrucksenkender Medikamente könnte so zur Reduktion einer CAA führen. Es wäre daher entscheidend, die SHRSP in zukünftigen Studien einer medikamentösen Behandlung – beispielweise mit Antihypertensiva – zu unterziehen, um zu prüfen, ob eine Verlangsamung der Progression der HA tatsächlich mit der verminderten Entwicklung einer CAA assoziiert ist.

Darüber hinaus bleiben die der mikrovaskulären Mischpathologien zugrunde liegenden Mechanismen zu klären, z.B. die Untersuchung einer veränderten Expression der vaskulären Rezeptoren RAGE und LRP1. Auch eine genaue Sequenzierung des Genoms der SHRSP könnte vielversprechende Daten bezüglich einer bisher nicht bekannten Genveränderung als Ursache einer veränderten A $\beta$ -Produktion liefern.

Zusätzlich könnte die Kombination aus MRT- und 2PM-Studien genutzt werden, um sowohl subkortikale als auch kortikale Pathologien im gleichen Tier darzustellen und so eine höhere Vergleichbarkeit der Daten der SHRSP mit den humanen Daten der Patienten mit zerebraler Mikroangiopathie zu erreichen.

Des Weiteren bietet die Durchführung von Verhaltenstests an der SHRSP die Möglichkeit, kognitive Verhaltensdefizite in Folge der Gefäßpathologien zu detektieren. Ein Vergleich von Tieren mit reiner HA mit solchen mit einer Mischpathologie aus HA und CAA könnte klären, inwiefern das gemeinsame Auftreten beider Entitäten der zerebralen Mikroangiopathie die kognitiven Funktionen noch stärker beeinträchtigt. Auch hier könnte anschließend über die Therapie mit blutdrucksenkenden Medikamenten untersucht werden, ob eine Milderung des Verlaufes der zerebralen Mikroangiopathie die kognitiven Funktionen verbessern könnte.

## **6 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich detailliert mit der zerebralen Mikroangiopathie, die sich in die hypertensive Arteriopathie (HA) und die zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) unterteilt. Die HA stellt degenerative Veränderungen der kleinen Hirngefäße inklusive Gefäßwandverdickungen und Verengung des Gefäßlumens dar, die CAA dagegen die Akkumulation von Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) in der Gefäßwand. An der spontan hypertensiven stroke-prone Ratte (SHRSP), einem Tiermodell der zerebralen Mikroangiopathie, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen HA und CAA untersucht werden. Die vorliegende Arbeit zeigt die Entwicklung der HA in der SHRSP als altersabhängige Kaskade, beginnend mit einem Gefäßwandschaden sowie einer Blutfluss-Reduktion, die in der Ausbildung nicht-okkludierender und okkludierender Thromben resultiert. Wistar-Kontrolltiere zeigen ebenfalls einen initialen Gefäßwandschaden, sind jedoch nicht durch die Ausbildung der späteren HA-Pathologien charakterisiert. Dies deutet darauf hin, dass sich die Gefäßpathologien auch im gesunden alternden Hirn entwickeln, durch eine Hypertonie aber deutlich beschleunigt / verschlimmert werden können. Einhergehend mit einem fortgeschrittenen Gefäßschaden / einer Thrombusbildung wurden in der SHRSP zusätzlich wandadhärente  $A\beta$ -Akkumulationen in Form einer CAA detektiert. Folglich scheint die Entstehung und Entwicklung einer CAA in Anwesenheit einer (schweren) HA (schneller) stattzufinden. Da aktuell keine krankheitsspezifische Therapie der CAA bekannt ist, bietet dieser Zusammenhang von HA und CAA die Möglichkeit neuer Therapieansätze für die Behandlung einer CAA.

## Summary

The present study focuses on the investigation of cerebral small vessel disease (CSVD) and its major forms hypertensive arteriopathy (HA) and cerebral amyloid angiopathy (CAA). HA comprises degenerative small vessel pathologies including vessel wall thickening and narrowing of the vessel lumen, whereas CAA is defined as the accumulation of amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) in the vessel wall. In spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHRSP), an animal model of CSVD, a possible association between HA and CAA was investigated. The results from the present work show that HA progresses in a temporal and age-dependent manner in SHRSP, starting from small vessel wall damage, proceeding to CBF reduction and resulting in non-occlusive and finally occlusive thrombus formation. Wistar control animals also showed initial vessel wall damage but were not characterized by the development of later HA pathologies. This indicates that the vessel pathologies also develop in the healthy aging brain but can be accelerated and aggravated, for example, by hypertension. In addition to an advanced vascular damage / thrombus formation wall-adherent  $A\beta$  accumulations in terms of CAA could be detected in SHRSP. Consequently, the formation and development of CAA seems to occur (faster) in the presence of a (severe) HA. Since there is currently no disease-specific treatment for patients suffering from CAA this relationship between HA and CAA offers the possibility of a new therapeutic approach for CAA treatment.

## 7 Literaturverzeichnis

Abbott, N. Joan (2013): Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. In: *Journal of inherited metabolic disease* 36 (3), S. 437–449. DOI: 10.1007/s10545-013-9608-0.

Akinyemi, Rufus O.; Mukaetova-Ladinska, Elizabeta B.; Attems, Johannes; Ihara, Masafumi; Kalaria, Raj N. (2013): Vascular risk factors and neurodegeneration in ageing related dementias. Alzheimer's disease and vascular dementia. In: *Current Alzheimer research* 10 (6), S. 642–653.

Alberts, Bruce (2002): *Molecular biology of the cell*. 4. ed. New York, NY: Garland Science.

Alzheimer's disease facts and figures (2018). In: *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 14 (3), S. 367–429.

Arai, H.; Nakao, K.; Saito, Y.; Morii, N.; Sugawara, A.; Yamada, T. et al. (1988): Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR-stroke prone. In: *Circulation Research* 62 (5), S. 926–930.

Arvanitakis, Zoe; Capuano, Ana W.; Leurgans, Sue E.; Buchman, Aron S.; Bennett, David A.; Schneider, Julie A. (2017): The Relationship of Cerebral Vessel Pathology to Brain Microinfarcts. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 27 (1), S. 77–85. DOI: 10.1111/bpa.12365.

Attems, J.; Jellinger, K.; Thal, D. R.; van Nostrand, W. (2011): Review: sporadic cerebral amyloid angiopathy. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 37 (1), S. 75–93. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2010.01137.x.

Attems, Johannes; Jellinger, Kurt A. (2014): The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease--lessons from pathology. In: *BMC medicine* 12, S. 206. DOI: 10.1186/s12916-014-0206-2.

Ay, Ilknur; Francis, Jonathan W.; Brown, Robert H. (2008): VEGF increases blood-brain barrier permeability to Evans blue dye and tetanus toxin fragment C but not adeno-associated virus in ALS mice. In: *Brain research* 1234, S. 198–205. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.07.121.

Bacsikai, Brian J.; Klunk, William E.; Mathis, Chester A.; Hyman, Bradley T. (2002): Imaging amyloid-beta deposits in vivo. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22 (9), S. 1035–1041. DOI: 10.1097/00004647-200209000-00001.

Bailey, Emma L.; McCulloch, James; Sudlow, Cathie; Wardlaw, Joanna M. (2009): Potential animal models of lacunar stroke. A systematic review. In: *Stroke* 40 (6), e451-8. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.528430.

Bailey, Emma L.; Smith, Colin; Sudlow, Cathie L. M.; Wardlaw, Joanna M. (2011): Is the spontaneously hypertensive stroke prone rat a pertinent model of sub cortical ischemic stroke? A systematic review. In: *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 6 (5), S. 434–444. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2011.00659.x.

Banerjee, Gargi; Wilson, Duncan; Jäger, Hans R.; Werring, David J. (2016): Novel imaging techniques in cerebral small vessel diseases and vascular cognitive impairment. In: *Biochimica et biophysica acta* 1862 (5), S. 926–938. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.12.010.

- Baraghis, Edward; Devor, Anna; Fang, Qianqian; Srinivasan, Vivek J.; Wu, Weicheng; Lesage, Frédéric et al. (2011): Two-photon microscopy of cortical NADH fluorescence intensity changes: correcting contamination from the hemodynamic response. In: *Journal of biomedical optics* 16 (10), S. 106003. DOI: 10.1117/1.3633339.
- Baron-Menguy, Celine; Domenga-Denier, Valérie; Ghezali, Lamia; Faraci, Frank M.; Joutel, Anne (2017): Increased Notch3 Activity Mediates Pathological Changes in Structure of Cerebral Arteries. In: *Hypertension* 69 (1), S. 60–70. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08015.
- Batra, Surinder K.; Jain, Maneesh; Wittel, Uwe A.; Chauhan, Subhash C.; Colcher, David (2002): Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. In: *Current opinion in biotechnology* 13 (6), S. 603–608.
- Baumann, Marcus; Megens, Remco; Bartholome, Roger; Doff, Sebastian; van Zandvoort, Marc A. J. M.; Smits, Jos F. M. et al. (2007): Prehypertensive renin-angiotensin-aldosterone system blockade in spontaneously hypertensive rats ameliorates the loss of long-term vascular function. In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 30 (9), S. 853–861. DOI: 10.1291/hypres.30.853.
- Baumbach, Gary L.; Sigmund, Curt D.; Faraci, Frank M. (2003): Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 41 (1), S. 50–55.
- Betz, Timo; Teipel, Jörn; Koch, Daniel; Härtig, Wolfgang; Guck, Jochen; Käs, Josef; Giessen, Harald (2005): Excitation beyond the monochromatic laser limit: simultaneous 3-D confocal and multiphoton microscopy with a tapered fiber as white-light laser source. In: *Journal of biomedical optics* 10 (5), S. 54009. DOI: 10.1117/1.2114788.
- Biffi, Alessandro; Greenberg, Steven M. (2011): Cerebral amyloid angiopathy. A systematic review. In: *Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)* 7 (1), S. 1–9. DOI: 10.3988/jcn.2011.7.1.1.
- Boulouis, Gregoire; Charidimou, Andreas; Pasi, Marco; Roongpiboonsopit, Duangnapa; Xiong, Li; Auriel, Eitan et al. (2017): Hemorrhage recurrence risk factors in cerebral amyloid angiopathy: Comparative analysis of the overall small vessel disease severity score versus individual neuroimaging markers. In: *Journal of the neurological sciences* 380, S. 64–67. DOI: 10.1016/j.jns.2017.07.015.
- Braun, Holger; Bueche, Celine Z.; Garz, Cornelia; Oldag, Andreas; Heinze, Hans-Jochen; Goertler, Michael et al. (2012): Stases are associated with blood-brain barrier damage and a restricted activation of coagulation in SHRSP. In: *Journal of the neurological sciences* 322 (1-2), S. 71–76. DOI: 10.1016/j.jns.2012.06.013.
- Bueche, Celine Z.; Hawkes, Cheryl; Garz, Cornelia; Vielhaber, Stefan; Attems, Johannes; Knight, Robert T. et al. (2014): Hypertension drives parenchymal  $\beta$ -amyloid accumulation in the brain parenchyma. In: *Annals of clinical and translational neurology* 1 (2), S. 124–129. DOI: 10.1002/acn3.27.
- Burgold, Steffen; Bittner, Tobias; Dorostkar, Mario M.; Kieser, Daniel; Fuhrmann, Martin; Mitteregger, Gerda et al. (2011): In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. In: *Acta neuropathologica* 121 (3), S. 327–335. DOI: 10.1007/s00401-010-0787-6.
- Busch, Markus (2011): Demenzerkrankungen: Epidemiologie und Bedeutung vaskulärer Risikofaktoren. In: *CardioVasc* (11 (5)), S. 32–38.

Cai, Zhiyou; Wang, Chuanling; He, Wenbo; Tu, Hanjun; Tang, Zhengang; Xiao, Ming; Yan, Liang-Jun (2015): Cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease. In: *Clinical interventions in aging* 10, S. 1695–1704. DOI: 10.2147/CIA.S90871.

Calcinaghi, Novella; Wyss, Matthias T.; Jolivet, Renaud; Singh, Anand; Keller, Anna L.; Winnik, Stephan et al. (2013): Multimodal imaging in rats reveals impaired neurovascular coupling in sustained hypertension. In: *Stroke* 44 (7), S. 1957–1964. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.000185.

Calhoun, M. E.; Burgermeister, P.; Phinney, A. L.; Stalder, M.; Tolnay, M.; Wiederhold, K. H. et al. (1999): Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24), S. 14088–14093.

Carnevale, Daniela; Mascio, Giada; D'Andrea, Ivana; Fardella, Valentina; Bell, Robert D.; Branchi, Igor et al. (2012): HYPERTENSION INDUCES BRAIN  $\beta$ -AMYLOID ACCUMULATION, COGNITIVE IMPAIRMENT AND MEMORY DETERIORATION THROUGH ACTIVATION OF RAGE IN BRAIN VASCULATURE. In: *Hypertension* 60 (1), S. 188–197. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.195511.

Charidimou, Andreas; Boulouis, Gregoire; Gurol, M. Edip; Ayata, Cenk; Bacskai, Brian J.; Frosch, Matthew P. et al. (2017a): Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. In: *Brain : a journal of neurology* 140 (7), S. 1829–1850. DOI: 10.1093/brain/awx047.

Charidimou, Andreas; Boulouis, Gregoire; Haley, Kellen; Auriel, Eitan; van Etten, Ellis S.; Fotiadis, Panagiotis et al. (2016a): White matter hyperintensity patterns in cerebral amyloid angiopathy and hypertensive arteriopathy. In: *Neurology* 86 (6), S. 505–511. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002362.

Charidimou, Andreas; Boulouis, Gregoire; Pasi, Marco; Auriel, Eitan; van Etten, Ellis S.; Haley, Kellen et al. (2017b): MRI-visible perivascular spaces in cerebral amyloid angiopathy and hypertensive arteriopathy. In: *Neurology* 88 (12), S. 1157–1164. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003746.

Charidimou, Andreas; Boulouis, Gregoire; Xiong, Li; Jessel, Michel J.; Roongpiboonsopit, Duangnapa; Ayres, Alison et al. (2017c): Cortical superficial siderosis and first-ever cerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. In: *Neurology* 88 (17), S. 1607–1614. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003866.

Charidimou, Andreas; Gang, Qiang; Werring, David J. (2012): Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited. Recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83 (2), S. 124–137. DOI: 10.1136/jnnp-2011-301308.

Charidimou, Andreas; Pantoni, Leonardo; Love, Seth (2016b): The concept of sporadic cerebral small vessel disease. A road map on key definitions and current concepts. In: *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 11 (1), S. 6–18. DOI: 10.1177/1747493015607485.

Chen, Bo; Friedman, Beth; Cheng, Qun; Tsai, Phil; Schim, Erica; Kleinfeld, David; Lyden, Patrick D. (2009): Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury. In: *Stroke* 40 (12), e666-74. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.551341.

Chhatbar, Pratik Y.; Kara, Prakash (2013): Improved blood velocity measurements with a hybrid image filtering and iterative Radon transform algorithm. In: *Frontiers in neuroscience* 7, S. 106. DOI: 10.3389/fnins.2013.00106.

- Cho, Eunice E.; Drazic, Jelena; Ganguly, Milan; Stefanovic, Bojana; Hynynen, Kullervo (2011): Two-photon fluorescence microscopy study of cerebrovascular dynamics in ultrasound-induced blood-brain barrier opening. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (9), S. 1852–1862. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.59.
- Cortes-Canteli, Marta; Mattei, Larissa; Richards, Allison T.; Norris, Erin H.; Strickland, Sidney (2015): Fibrin deposited in the Alzheimer's disease brain promotes neuronal degeneration. In: *Neurobiology of aging* 36 (2), S. 608–617. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.030.
- Cortes-Canteli, Marta; Paul, Justin; Norris, Erin H.; Bronstein, Robert; Ahn, Hyung Jin; Zamolodchikov, Daria et al. (2010): Fibrinogen and  $\beta$ -amyloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease. In: *Neuron* 66 (5), S. 695–709. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.05.014.
- Csiszar, Anna; Tucsek, Zsuzsanna; Toth, Peter; Sosnowska, Danuta; Gautam, Tripti; Koller, Akos et al. (2013): Synergistic effects of hypertension and aging on cognitive function and hippocampal expression of genes involved in  $\beta$ -amyloid generation and Alzheimer's disease. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 305 (8), H1120-30. DOI: 10.1152/ajpheart.00288.2013.
- Defelipe, Javier (2011): The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. In: *Frontiers in neuroanatomy* 5, S. 29. DOI: 10.3389/fnana.2011.00029.
- Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. In: *Science (New York, N. Y.)* 248 (4951), S. 73–76.
- Denk, W.; Svoboda, K. (1997): Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. In: *Neuron* 18 (3), S. 351–357.
- Derby, Carol A.; Katz, Mindy J.; Lipton, Richard B.; Hall, Charles B. (2017): Trends in Dementia Incidence in a Birth Cohort Analysis of the Einstein Aging Study. In: *JAMA neurology* 74 (11), S. 1345–1351. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.1964.
- Ding, Lingling; Hong, Yuehui; Peng, Bin (2017): Association between large artery atherosclerosis and cerebral microbleeds. A systematic review and meta-analysis. In: *Stroke and vascular neurology* 2 (1), S. 7–14. DOI: 10.1136/svn-2016-000049.
- Dong, Jinghui; Revilla-Sanchez, Raquel; Moss, Stephen; Haydon, Philip G. (2010): Multiphoton in vivo imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease. In: *Neuropharmacology* 59 (4-5), S. 268–275. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.04.007.
- Dorand, R. Dixon; Barkauskas, Deborah S.; Evans, Teresa A.; Petrosiute, Agne; Huang, Alex Y. (2014): Comparison of intravital thinned skull and cranial window approaches to study CNS immunobiology in the mouse cortex. In: *Intravital* 3 (2). DOI: 10.4161/intv.29728.
- Drew, Patrick J.; Blinder, Pablo; Cauwenberghs, Gert; Shih, Andy Y.; Kleinfeld, David (2010): Rapid determination of particle velocity from space-time images using the Radon transform. In: *Journal of computational neuroscience* 29 (1-2), S. 5–11. DOI: 10.1007/s10827-009-0159-1.
- Ellenbroek, Bart; Youn, Jiun (2016): Rodent models in neuroscience research. Is it a rat race? In: *Disease models & mechanisms* 9 (10), S. 1079–1087. DOI: 10.1242/dmm.026120.
- Esmon, Charles T. (2009): Basic Mechanisms and Pathogenesis of Venous Thrombosis. In: *Blood reviews* 23 (5), S. 225–229. DOI: 10.1016/j.blre.2009.07.002.

- Farkas, Eszter; Donka, Gergely; Vos, Rob A. I. de; Mihály, András; Bari, Ferenc; Luiten, Paul G. M. (2004): Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. In: *Acta neuropathologica* 108 (1), S. 57–64. DOI: 10.1007/s00401-004-0864-9.
- Fischer, Andrew H.; Jacobson, Kenneth A.; Rose, Jack; Zeller, Rolf (2008): Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. In: *CSH protocols* 2008, pdb.prot4986. DOI: 10.1101/pdb.prot4986.
- Fisher, C. M. (1968): The arterial lesions underlying lacunes. In: *Acta neuropathologica* 12 (1), S. 1–15.
- Fredriksson, K.; Auer, R. N.; Kalimo, H.; Nordborg, C.; Olsson, Y.; Johansson, B. B. (1985): Cerebrovascular lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In: *Acta neuropathologica* 68 (4), S. 284–294.
- Fredriksson, K.; Nordborg, C.; Kalimo, H.; Olsson, Y.; Johansson, B. B. (1988): Cerebral microangiopathy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. An immunohistochemical and ultrastructural study. In: *Acta neuropathologica* 75 (3), S. 241–252.
- Gentile, Maria Teresa; Poulet, Roberta; Di Pardo, Alba; Cifelli, Giuseppe; Maffei, Angelo; Vecchione, Carmine et al. (2009): Beta-amyloid deposition in brain is enhanced in mouse models of arterial hypertension. In: *Neurobiology of aging* 30 (2), S. 222–228. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.005.
- Gilbert, Barnabas James (2013): The role of amyloid  $\beta$  in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In: *Journal of clinical pathology* 66 (5), S. 362–366. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201515.
- Ginsberg, M. D.; Busto, R. (1989): Rodent models of cerebral ischemia. In: *Stroke* 20 (12), S. 1627–1642.
- Greenberg, S. M.; Vonsattel, J. P.; Segal, A. Z.; Chiu, R. I.; Clatworthy, A. E.; Liao, A. et al. (1998): Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. In: *Neurology* 50 (4), S. 961–965.
- Greenberg, Steven M.; Gurol, M. Edip; Rosand, Jonathan; Smith, Eric E. (2004): Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. In: *Stroke* 35 (11 Suppl 1), S. 2616–2619. DOI: 10.1161/01.STR.0000143224.36527.44.
- Grinberg, Lea Tenenholz; Korczyn, Amos D.; Heinsen, Helmut (2012): Cerebral amyloid angiopathy impact on endothelium. In: *Experimental gerontology* 47 (11), S. 838–842. DOI: 10.1016/j.exger.2012.08.005.
- Grinberg, Lea Tenenholz; Thal, Dietmar Rudolf (2010): Vascular pathology in the aged human brain. In: *Acta neuropathologica* 119 (3), S. 277–290. DOI: 10.1007/s00401-010-0652-7.
- Haffner, Christof; Malik, Rainer; Dichgans, Martin (2016): Genetic factors in cerebral small vessel disease and their impact on stroke and dementia. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (1), S. 158–171. DOI: 10.1038/jcbfm.2015.71.
- Hainsworth, Atticus H.; Brittain, John F.; Khatun, Halima (2012): Pre-clinical models of human cerebral small vessel disease. Utility for clinical application. In: *Journal of the neurological sciences* 322 (1-2), S. 237–240. DOI: 10.1016/j.jns.2012.05.046.

- Hainsworth, Atticus H.; Markus, Hugh S. (2008): Do in vivo experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (12), S. 1877–1891. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.91.
- Härtig, Wolfgang; Reichenbach, Andreas; Voigt, Cornelia; Boltze, Johannes; Bulavina, Larysa; Schuhmann, Martin U. et al. (2009): Triple fluorescence labelling of neuronal, glial and vascular markers revealing pathological alterations in various animal models. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 37 (2), S. 128–138. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2008.10.003.
- Hawkes, Cheryl A.; Härtig, Wolfgang; Kacza, Johannes; Schliebs, Reinhard; Weller, Roy O.; Nicoll, James A.; Carare, Roxana O. (2011): Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. In: *Acta neuropathologica* 121 (4), S. 431–443. DOI: 10.1007/s00401-011-0801-7.
- Hawkins, Brian T.; Egleton, Richard D. (2006): Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. In: *Journal of neuroscience methods* 151 (2), S. 262–267. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.08.006.
- Hefendehl, Jasmin K.; Wegenast-Braun, Bettina M.; Liebig, Christian; Eicke, Daniel; Milford, David; Calhoun, Michael E. et al. (2011): Long-term in vivo imaging of  $\beta$ -amyloid plaque appearance and growth in a mouse model of cerebral  $\beta$ -amyloidosis. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (2), S. 624–629. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5147-10.2011.
- Held, Friederike; Morris, Alan W. J.; Pirici, Daniel; Niklass, Solveig; Sharp, Matthew M. G.; Garz, Cornelia et al. (2017): Vascular basement membrane alterations and  $\beta$ -amyloid accumulations in an animal model of cerebral small vessel disease. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 131 (10), S. 1001–1013. DOI: 10.1042/CS20170004.
- Helmchen, Fritjof; Denk, Winfried (2005): Deep tissue two-photon microscopy. In: *Nature methods* 2 (12), S. 932–940. DOI: 10.1038/nmeth818.
- Henning, Erica C.; Warach, Steven; Spatz, Maria (2010): Hypertension-induced vascular remodeling contributes to reduced cerebral perfusion and the development of spontaneous stroke in aged SHRSP rats. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30 (4), S. 827–836. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.246.
- Herzig, Martin C.; Winkler, David T.; Burgermeister, Patrick; Pfeifer, Michelle; Kohler, Esther; Schmidt, Stephen D. et al. (2004): Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. In: *Nature neuroscience* 7 (9), S. 954–960. DOI: 10.1038/nn1302.
- Holland, Philip R.; Searcy, James L.; Salvadores, Natalia; Scullion, Gillian; Chen, Guiquan; Lawson, Greig et al. (2015): Gliovascular disruption and cognitive deficits in a mouse model with features of small vessel disease. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35 (6), S. 1005–1014. DOI: 10.1038/jcbfm.2015.12.
- Huisa, Branko N.; Caprihan, Arvind; Thompson, Jeffrey; Prestopnik, Jillian; Qualls, Clifford R.; Rosenberg, Gary A. (2015): Long-Term Blood-Brain Barrier Permeability Changes in Binswanger Disease. In: *Stroke* 46 (9), S. 2413–2418. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.009589.
- Iadecola, Costantino (2013): The pathobiology of vascular dementia. In: *Neuron* 80 (4), S. 844–866. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.008.

Iadecola, Costantino; Nedergaard, Maiken (2007): Glial regulation of the cerebral microvasculature. In: *Nature neuroscience* 10 (11), S. 1369–1376. DOI: 10.1038/nn2003.

Ihara, Masafumi; Yamamoto, Yumi (2016): Emerging Evidence for Pathogenesis of Sporadic Cerebral Small Vessel Disease. In: *Stroke* 47 (2), S. 554–560. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.009627.

Iida, Shinichiro; Baumbach, Gary L.; Lavoie, Julie L.; Faraci, Frank M.; Sigmund, Curt D.; Heistad, Donald D. (2005): Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice. In: *Stroke* 36 (6), S. 1253–1258. DOI: 10.1161/01.str.0000167694.58419.a2.

Itoh, Yoshiaki; Suzuki, Norihiro (2012): Control of brain capillary blood flow. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (7), S. 1167–1176. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.5.

Izzard, Ashley S.; Graham, Delyth; Burnham, Matthew P.; Heerkens, Egidius H.; Dominiczak, Anna F.; Heagerty, Anthony M. (2003): Myogenic and structural properties of cerebral arteries from the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285 (4), H1489-94. DOI: 10.1152/ajpheart.00352.2003.

Jang, Hyemin; Park, Jong-Yun; Jang, Young Kyoung; Kim, Hee Jin; Lee, Jin San; Na, Duk L. et al. (2018): Distinct amyloid distribution patterns in amyloid positive subcortical vascular cognitive impairment. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 16178. DOI: 10.1038/s41598-018-34032-3.

Jang, Young Kyoung; Kim, Hee Jin; Lee, Jin San; Kim, Yeo Jin; Kim, Ko Woon; Kim, Yeshin et al. (2017): Distinctive Clinical Effects of Haemorrhagic Markers in Cerebral Amyloid Angiopathy. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 15984. DOI: 10.1038/s41598-017-16298-1.

Jellinger, Kurt A.; Attems, Johannes (2012): Neuropathology and general autopsy findings in nondemented aged subjects. In: *Clinical neuropathology* 31 (2), S. 87–98.

Jesmin, Subrina; Maeda, Seiji; Mowa, Chishimba N.; Zaedi, Sohel; Togashi, Hiroko; Prodhan, Shamsul H. et al. (2007): Antagonism of endothelin action normalizes altered levels of VEGF and its signaling in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. In: *European journal of pharmacology* 574 (2-3), S. 158–171. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.07.023.

Joutel, Anne (2015): The NOTCH3 ECD cascade hypothesis of cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy disease. In: *Neurol Clin Neurosci* 3 (1), S. 1–6. DOI: 10.1111/ncn3.135.

Joutel, Anne; Monet-Leprêtre, Marie; Gosele, Claudia; Baron-Menguy, Céline; Hammes, Annette; Schmidt, Sabine et al. (2010): Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (2), S. 433–445. DOI: 10.1172/JCI39733.

Kalaria, Raj N.; Akinyemi, Rufus; Ihara, Masafumi (2016): Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. In: *Biochimica et biophysica acta* 1862 (5), S. 915–925. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.01.015.

Kapuscinski, J. (1995): DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. In: *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 70 (5), S. 220–233.

Kim, Jiyun V.; Jiang, Ning; Tadokoro, Carlos E.; Liu, Liping; Ransohoff, Richard M.; Lafaille, Juan J.; Dustin, Michael L. (2010): Two-photon laser scanning microscopy imaging of intact spinal cord and

cerebral cortex reveals requirement for CXCR6 and neuroinflammation in immune cell infiltration of cortical injury sites. In: *Journal of immunological methods* 352 (1-2), S. 89–100. DOI: 10.1016/j.jim.2009.09.007.

Kim, S.; Tokuyama, M.; Hosoi, M.; Yamamoto, K. (1992): Adrenal and circulating renin-angiotensin system in stroke-prone hypertensive rats. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 20 (3), S. 280–291.

Kim, Yeo Jin; Kim, Hee Jin; Park, Jae-Hyun; Kim, Seonwoo; Woo, Sook-Young; Kwak, Ki-Chang et al. (2016): Synergistic effects of longitudinal amyloid and vascular changes on lobar microbleeds. In: *Neurology* 87 (15), S. 1575–1582. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003220.

Kleinfeld, D.; Mitra, P. P.; Helmchen, F.; Denk, W. (1998): Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26), S. 15741–15746.

Klunk, William E.; Bacsikai, Brian J.; Mathis, Chester A.; Kajdasz, Stephen T.; McLellan, Megan E.; Frosch, Matthew P. et al. (2002): Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61 (9), S. 797–805.

Koh-Tan, H. CalineH.; Dashti, Mohammed; Wang, Ting; Beattie, Wendy; McClure, John; Young, Barbara et al. (2017): Dissecting the genetic components of a quantitative trait locus for blood pressure and renal pathology on rat chromosome 3. In: *Journal of hypertension* 35 (2), S. 319–329. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001155.

Krafft, Paul R.; Bailey, Emma L.; Lekic, Tim; Rolland, William B.; Altay, Orhan; Tang, Jiping et al. (2012): Etiology of stroke and choice of models. In: *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7 (5), S. 398–406. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2012.00838.x.

Kucheryavykh, Lilia Y.; Dávila-Rodríguez, Josué; Rivera-Aponte, David E.; Zueva, Lidia V.; Washington, A. Valance; Sanabria, Priscilla; Inyushin, Mikhail Y. (2017): Platelets are responsible for the accumulation of  $\beta$ -amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis. In: *Brain research bulletin* 128, S. 98–105. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.11.008.

Kudo, M.; Aoyama, A.; Ichimori, S.; Fukunaga, N. (1982): An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. In: *Stroke* 13 (4), S. 505–508.

Kumar, David R.; Hanlin, Erin; Glurich, Ingrid; Mazza, Joseph J.; Yale, Steven H. (2010): Virchow's Contribution to the Understanding of Thrombosis and Cellular Biology. In: *Clinical Medicine & Research* 8 (3-4), S. 168–172. DOI: 10.3121/cmr.2009.866.

Lacombe, Pierre; Oligo, Charleen; Domenga, Valérie; Tournier-Lasserre, Elisabeth; Joutel, Anne (2005): Impaired cerebral vasoreactivity in a transgenic mouse model of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy arteriopathy. In: *Stroke* 36 (5), S. 1053–1058. DOI: 10.1161/01.STR.0000163080.82766.eb.

Lambert, Christian; Sam Narean, Janakan; Benjamin, Philip; Zeestraten, Eva; Barrick, Thomas R.; Markus, Hugh S. (2015): Characterising the grey matter correlates of leukoaraiosis in cerebral small vessel disease. In: *NeuroImage. Clinical* 9, S. 194–205. DOI: 10.1016/j.nicl.2015.07.002.

Lecoq, Jérôme; Parpaleix, Alexandre; Roussakis, Emmanuel; Ducros, Mathieu; Goulam Houssen, Yannick; Vinogradov, Sergei A.; Charpak, Serge (2011): Simultaneous two-photon imaging of oxygen

and blood flow in deep cerebral vessels. In: *Nature medicine* 17 (7), S. 893–898. DOI: 10.1038/nm.2394.

Lee, Jin-Moo; Zhai, Guihua; Liu, Qingwei; Gonzales, Ernesto R.; Yin, Kejie; Yan, Ping et al. (2007): Vascular permeability precedes spontaneous intracerebral hemorrhage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In: *Stroke* 38 (12), S. 3289–3291. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.491621.

LeVine, H. (1999): Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. In: *Methods in enzymology* 309, S. 274–284.

Li, Chunqiang; Pastila, Riikka K.; Pitsillides, Costas; Runnels, Judith M.; Puoris'haag, Mehron; Côté, Daniel; Lin, Charles P. (2010): Imaging leukocyte trafficking in vivo with two-photon-excited endogenous tryptophan fluorescence. In: *Optics express* 18 (2), S. 988–999. DOI: 10.1364/OE.18.000988.

Lin, B.; Schmidt-Kastner, R.; Busto, R.; Ginsberg, M. D. (1999): Progressive parenchymal deposition of beta-amyloid precursor protein in rat brain following global cerebral ischemia. In: *Acta neuropathologica* 97 (4), S. 359–368.

Liu, Hong; Xing, Anfeng; Wang, Xiaojuan; Liu, Guozhen; Li, Liang (2012): Regulation of  $\beta$ -amyloid level in the brain of rats with cerebrovascular hypoperfusion. In: *Neurobiology of aging* 33 (4), 826.e31-42. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.027.

Makin, Stephen D. J.; Cook, F. A. B.; Dennis, Martin S.; Wardlaw, Joanna M. (2015): Cerebral small vessel disease and renal function: systematic review and meta-analysis. In: *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 39 (1), S. 39–52. DOI: 10.1159/000369777.

Matthews, Fiona E.; Brayne, Carol; Lowe, James; McKeith, Ian; Wharton, Stephen B.; Ince, Paul (2009): Epidemiological pathology of dementia: attributable-risks at death in the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. In: *PLoS medicine* 6 (11), e1000180. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000180.

Mattson, Mark P. (2004): Pathways towards and away from Alzheimer's disease. In: *Nature* 430 (7000), S. 631–639. DOI: 10.1038/nature02621.

McCarter, Joanna F.; Liebscher, Sabine; Bachhuber, Teresa; Abou-Ajram, Claudia; Hübener, Mark; Hyman, Bradley T. et al. (2013): Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Acta neuropathologica* 126 (2), S. 179–188. DOI: 10.1007/s00401-013-1137-2.

McGiff, J. C.; Quilley, C. P. (1981): The rat with spontaneous genetic hypertension is not a suitable model of human essential hypertension. In: *Circulation Research* 48 (4), S. 455–464.

Michalski, Dominik; Grosche, Jens; Pelz, Johann; Schneider, Dietmar; Weise, Christopher; Bauer, Ute et al. (2010): A novel quantification of blood-brain barrier damage and histochemical typing after embolic stroke in rats. In: *Brain research* 1359, S. 186–200. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.08.045.

Murphy, M. Paul; LeVine, Harry (2010): Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19 (1), S. 311–323. DOI: 10.3233/JAD-2010-1221.

Nabika, Toru; Ohara, Hiroki; Kato, Norihiro; Isomura, Minoru (2012): The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 35 (5), S. 477–484. DOI: 10.1038/hr.2012.30.

Ni, J.; Ohta, H.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. (1994): Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. In: *Brain research* 653 (1-2), S. 231–236.

Nishimura, Nozomi; Rosidi, Nathanael L.; Iadecola, Costantino; Schaffer, Chris B. (2010): Limitations of collateral flow after occlusion of a single cortical penetrating arteriole. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30 (12), S. 1914–1927. DOI: 10.1038/jcbfm.2010.157.

Nishimura, Nozomi; Schaffer, Chris B.; Friedman, Beth; Tsai, Philbert S.; Lyden, Patrick D.; Kleinfeld, David (2006): Targeted insult to subsurface cortical blood vessels using ultrashort laser pulses. Three models of stroke. In: *Nature methods* 3 (2), S. 99–108. DOI: 10.1038/nmeth844.

Obata, J.; Nakamura, T.; Takano, H.; Naito, A.; Kimura, H.; Yoshida, Y. et al. (2000): Increased gene expression of components of the renin-angiotensin system in glomeruli of genetically hypertensive rats. In: *Journal of hypertension* 18 (9), S. 1247–1255.

Ogata, J.; Fujishima, M.; Tamaki, K.; Nakatomi, Y.; Ishitsuka, T.; Omae, T. (1981): Vascular changes underlying cerebral lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. A serial section study. In: *Acta neuropathologica* 54 (3), S. 183–188.

Oheim, M.; Beaupaire, E.; Chaigneau, E.; Mertz, J.; Charpak, S. (2001): Two-photon microscopy in brain tissue. Parameters influencing the imaging depth. In: *Journal of neuroscience methods* 111 (1), S. 29–37.

Ohta, H.; Nishikawa, H.; Kimura, H.; Anayama, H.; Miyamoto, M. (1997): Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. In: *Neuroscience* 79 (4), S. 1039–1050.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. (1963): Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. In: *Japanese circulation journal* 27, S. 282–293.

OKAMOTO, K.; Yamori, Y.; Nagaoka, A. (1974): Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). In: *Circulation Research* (34 (Suppl I)), S. 143–153.

Overgaard, K.; Sereghy, T.; Boysen, G.; Pedersen, H.; Høyer, S.; Diemer, N. H. (1992): A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12 (3), S. 484–490. DOI: 10.1038/jcbfm.1992.66.

Pantoni, Leonardo (2010): Cerebral small vessel disease. From pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. In: *The Lancet. Neurology* 9 (7), S. 689–701. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70104-6.

Paris, Daniel; Bachmeier, Corbin; Patel, Nikunj; Quadros, Amita; Volmar, Claude-Henry; Laporte, Vincent et al. (2011): Selective antihypertensive dihydropyridines lower A $\beta$  accumulation by targeting both the production and the clearance of A $\beta$  across the blood-brain barrier. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17 (3-4), S. 149–162. DOI: 10.2119/molmed.2010.00180.

Pasi, Marco; Charidimou, Andreas; Boulouis, Gregoire; Auriel, Eitan; Ayres, Alison; Schwab, Kristin M. et al. (2018): Mixed-location cerebral hemorrhage/microbleeds. Underlying microangiopathy and recurrence risk. In: *Neurology* 90 (2), e119-e126. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004797.

Passos, Giselle F.; Kilday, Kelley; Gillen, Daniel L.; Cribbs, David H.; Vasilevko, Vitaly (2015): Experimental hypertension increases spontaneous intracerebral hemorrhages in a mouse model of cerebral amyloidosis. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36 (2), S. 399–404. DOI: 10.1177/0271678X15606720.

Peres, Roxane; Guio, François de; Chabriat, Hugues; Jouvent, Eric (2016): Alterations of the cerebral cortex in sporadic small vessel disease: A systematic review of in vivo MRI data. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (4), S. 681–695. DOI: 10.1177/0271678X15625352.

Pfeifer, L. A.; White, L. R.; Ross, G. W.; Petrovitch, H.; Launer, L. J. (2002): Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS autopsy study. In: *Neurology* 58 (11), S. 1629–1634.

Philipson, Ola; Lord, Anna; Gumucio, Astrid; O'Callaghan, Paul; Lannfelt, Lars; Nilsson, Lars N. G. (2010): Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. In: *The FEBS journal* 277 (6), S. 1389–1409. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07564.x.

Pinter, Daniela; Enzinger, Christian; Fazekas, Franz (2015): Cerebral small vessel disease, cognitive reserve and cognitive dysfunction. In: *Journal of neurology* 262 (11), S. 2411–2419. DOI: 10.1007/s00415-015-7776-6.

Prince, Martin; Ali, Gemma-Claire; Guerchet, Maëlen; Prina, A. Matthew; Albanese, Emiliano; Wu, Yu-Tzu (2016): Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. In: *Alzheimer's research & therapy* 8 (1), S. 23. DOI: 10.1186/s13195-016-0188-8.

Ramanathan, Anita; Nelson, Amy R.; Sagare, Abhay P.; Zlokovic, Berislav V. (2015): Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. In: *Frontiers in Aging Neuroscience* 7. DOI: 10.3389/fnagi.2015.00136.

Reijmer, Yael D.; van Veluw, Susanne J.; Greenberg, Steven M. (2016): Ischemic brain injury in cerebral amyloid angiopathy. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (1), S. 40–54. DOI: 10.1038/jcbfm.2015.88.

Ritter, M. A.; Droste, D. W.; Hegedüs, K.; Szepesi, R.; Nabavi, D. G.; Csiba, L.; Ringelstein, E. B. (2005): Role of cerebral amyloid angiopathy in intracerebral hemorrhage in hypertensive patients. In: *Neurology* 64 (7), S. 1233–1237. DOI: 10.1212/01.WNL.0000156522.93403.C3.

Romero, José R.; Preis, Sarah R.; Beiser, Alexa; DeCarli, Charles; D'Agostino, Ralph B.; Wolf, Philip A. et al. (2016): Carotid Atherosclerosis and Cerebral Microbleeds. The Framingham Heart Study. In: *Journal of the American Heart Association* 5 (3), e002377. DOI: 10.1161/JAHA.115.002377.

Ruchoux, Marie Magdeleine; Domenga, Valérie; Brulin, Peggy; Maciazek, Jacqueline; Limol, Sylvie; Tournier-Lasserre, Elisabeth; Joutel, Anne (2003): Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. In: *The American journal of pathology* 162 (1), S. 329–342. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63824-2.

Saito, H.; Togashi, H.; Yoshioka, M.; Nakamura, N.; Minami, M.; Parvez, H. (1995): Animal models of vascular dementia with emphasis on stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology. Supplement* 22 (1), S257-9.

Sandin, Sara; Ofverstedt, Lars-Göran; Wikström, Ann-Charlotte; Wrangé, Orjan; Skoglund, Ulf (2004): Structure and flexibility of individual immunoglobulin G molecules in solution. In: *Structure (London, England) : 1993* 12 (3), S. 409–415. DOI: 10.1016/j.str.2004.02.011.

Santisakultarm, Thom P.; Cornelius, Nathan R.; Nishimura, Nozomi; Schafer, Andrew I.; Silver, Richard T.; Doerschuk, Peter C. et al. (2012): In vivo two-photon excited fluorescence microscopy reveals cardiac- and respiration-dependent pulsatile blood flow in cortical blood vessels in mice. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302 (7), H1367-77. DOI: 10.1152/ajpheart.00417.2011.

Satizabal, Claudia L.; Beiser, Alexa S.; Chouraki, Vincent; Chêne, Geneviève; Dufouil, Carole; Seshadri, Sudha (2016): Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. In: *The New England journal of medicine* 374 (6), S. 523–532. DOI: 10.1056/NEJMoa1504327.

Schaffer, Chris B.; Friedman, Beth; Nishimura, Nozomi; Schroeder, Lee F.; Tsai, Philbert S.; Ebner, Ford F. et al. (2006): Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. In: *PLoS biology* 4 (2), e22. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040022.

Schilling, Sabrina; DeStefano, Anita L.; Sachdev, Perminder S.; Choi, Seung Hoan; Mather, Karen A.; DeCarli, Charles D. et al. (2013): APOE genotype and MRI markers of cerebrovascular disease. Systematic review and meta-analysis. In: *Neurology* 81 (3), S. 292–300. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31829bfda4.

Schley, D.; Carare-Nnadi, R.; Please, C. P.; Perry, V. H.; Weller, R. O. (2006): Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. In: *Journal of theoretical biology* 238 (4), S. 962–974. DOI: 10.1016/j.jtbi.2005.07.005.

Schreiber, Stefanie; Bueche, Celine Z.; Garz, Cornelia; Kropf, Siegfried; Angenstein, Frank; Goldschmidt, Juergen et al. (2012): The pathologic cascade of cerebrovascular lesions in SHRSP. Is erythrocyte accumulation an early phase? In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (2), S. 278–290. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.122.

Schreiber, Stefanie; Bueche, Celine Zoe; Garz, Cornelia; Braun, Holger (2013): Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model. In: *Experimental & translational stroke medicine* 5 (1), S. 4. DOI: 10.1186/2040-7378-5-4.

Schreiber, Stefanie; Drukarch, Benjamin; Garz, Cornelia; Niklass, Solveig; Stanaszek, Luiza; Kropf, Siegfried et al. (2014): Interplay between age, cerebral small vessel disease, parenchymal amyloid- $\beta$ , and tau pathology. Longitudinal studies in hypertensive stroke-prone rats. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 42 Suppl 3, S205-15. DOI: 10.3233/JAD-132618.

Selkoe, D. J. (1991): The molecular pathology of Alzheimer's disease. In: *Neuron* 6 (4), S. 487–498.

Seylaz, J.; Charbonné, R.; Nanri, K.; Euw, D. von; Borredon, J.; Kacem, K. et al. (1999): Dynamic in vivo measurement of erythrocyte velocity and flow in capillaries and of microvessel diameter in the rat brain by confocal laser microscopy. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19 (8), S. 863–870. DOI: 10.1097/00004647-199908000-00005.

Shams, Sara; Granberg, Tobias; Martola, Juha; Charidimou, Andreas; Li, Xiaozhen; Shams, Mana et al. (2017): Cerebral microbleeds topography and cerebrospinal fluid biomarkers in cognitive

impairment. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37 (3), S. 1006–1013. DOI: 10.1177/0271678X16649401.

Shi, Yulu; Thrippleton, Michael J.; Makin, Stephen D.; Marshall, Ian; Geerlings, Mirjam I.; Craen, Anton J. M. de et al. (2016): Cerebral blood flow in small vessel disease: A systematic review and meta-analysis. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (10), S. 1653–1667. DOI: 10.1177/0271678X16662891.

Shi, Yulu; Wardlaw, Joanna M. (2016): Update on cerebral small vessel disease: a dynamic whole-brain disease. In: *Stroke and vascular neurology* 1 (3), S. 83–92. DOI: 10.1136/svn-2016-000035.

Shih, Andy Y.; Blinder, Pablo; Tsai, Philbert S.; Friedman, Beth; Stanley, Geoffrey; Lyden, Patrick D.; Kleinfeld, David (2013): The smallest stroke: occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit. In: *Nature neuroscience* 16 (1), S. 55–63. DOI: 10.1038/nn.3278.

Shih, Andy Y.; Driscoll, Jonathan D.; Drew, Patrick J.; Nishimura, Nozomi; Schaffer, Chris B.; Kleinfeld, David (2012): Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (7), S. 1277–1309. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.196.

Shimamura, K.; Shimada, T.; Yamamoto, K.; Sunano, S.; OKAMOTO, K. (1987): Noradrenaline content and release in the mesenteric artery of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) and a new strain of SHRSP (M-SHRSP). In: *Blood vessels* 24 (6), S. 334–338.

Sigler, Albrecht; Murphy, Timothy H. (2010): In vivo 2-photon imaging of fine structure in the rodent brain: before, during, and after stroke. In: *Stroke* 41 (10 Suppl), S117-23. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.594648.

Skrobot, Olivia A.; Attems, Johannes; Esiri, Margaret; Hortobágyi, Tibor; Ironside, James W.; Kalaria, Rajesh N. et al. (2016): Vascular cognitive impairment neuropathology guidelines (VCING): the contribution of cerebrovascular pathology to cognitive impairment. In: *Brain : a journal of neurology* 139 (11), S. 2957–2969. DOI: 10.1093/brain/aww214.

Smeda, J.; Vasdev, S.; King, S. R. (1999): Effect of poststroke captopril treatment on mortality associated with hemorrhagic stroke in stroke-prone rats. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 291 (2), S. 569–575.

Smith, Eric E. (2017): Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 131 (11), S. 1059–1068. DOI: 10.1042/CS20160607.

Smith, Eric E.; Nandigam, Kaveer R. N.; Chen, Yu-Wei; Jeng, Jed; Salat, David; Halpin, Amy et al. (2010): MRI markers of small vessel disease in lobar and deep hemispheric intracerebral hemorrhage. In: *Stroke* 41 (9), S. 1933–1938. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.579078.

Smith, Eric E.; Schneider, Julie A.; Wardlaw, Joanna M.; Greenberg, Steven M. (2012): Cerebral microinfarcts. The invisible lesions. In: *The Lancet. Neurology* 11 (3), S. 272–282. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70307-6.

Stanimirovic, Danica B.; Friedman, Alon (2012): Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32 (7), S. 1207–1221. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.25.

Suganami, Takayoshi; Mori, Kiyoshi; Tanaka, Issei; Mukoyama, Masashi; Sugawara, Akira; Makino, Hisashi et al. (2003): Role of prostaglandin E receptor EP1 subtype in the development of renal injury in genetically hypertensive rats. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 42 (6), S. 1183–1190. DOI: 10.1161/01.HYP.0000101689.64849.97.

Svoboda, Karel; Yasuda, Ryohei (2006): Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. In: *Neuron* 50 (6), S. 823–839. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.05.019.

Tagami, M.; Nara, Y.; Kubota, A.; Sunaga, T.; Maezawa, H.; Fujino, H.; Yamori, Y. (1987): Ultrastructural characteristics of occluded perforating arteries in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In: *Stroke* 18 (4), S. 733–740.

Takiguchi, Kenro (1983): Experimental Hypertension: Pathological Study of the Cerebrovascular Lesions of Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHR-SP). In: *Acta medica Nagasakiensia* (28(1-4)), S. 46–63.

Tanskanen, M.; Lindsberg, P. J.; Tienari, P. J.; Polvikoski, T.; Sulkava, R.; Verkkoniemi, A. et al. (2005): Cerebral amyloid angiopathy in a 95+ cohort: complement activation and apolipoprotein E (ApoE) genotype. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 31 (6), S. 589–599. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2005.00652.x.

Tarasoff-Conway, Jenna M.; Carare, Roxana O.; Osorio, Ricardo S.; Glodzik, Lidia; Butler, Tracy; Fieremans, Els et al. (2015): Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. In: *Nature reviews. Neurology* 11 (8), S. 457–470. DOI: 10.1038/nrneurol.2015.119.

Thanprasertsuk, Sekh; Martinez-Ramirez, Sergi; Pontes-Neto, Octavio Marques; Ni, Jun; Ayres, Alison; Reed, Anne et al. (2014): Posterior white matter disease distribution as a predictor of amyloid angiopathy. In: *Neurology* 83 (9), S. 794–800. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000732.

Toyoda, Kazunori (2015): Cerebral Small Vessel Disease and Chronic Kidney Disease. In: *Journal of stroke* 17 (1), S. 31–37. DOI: 10.5853/jos.2015.17.1.31.

Trepel, Martin (2015): Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 6. Aufl.: Urban & Fischer.

Tsai, Hsin-Hsi; Tsai, Li-Kai; Chen, Ya-Fang; Tang, Sung-Chun; Lee, Bo-Ching; Yen, Ruoh-Fang; Jeng, Jiann-Shing (2017): Correlation of Cerebral Microbleed Distribution to Amyloid Burden in Patients with Primary Intracerebral Hemorrhage. In: *Scientific reports* 7, S. 44715. DOI: 10.1038/srep44715.

Ueno, Masaki; Chiba, Yoichi; Matsumoto, Koichi; Murakami, Ryuta; Fujihara, Ryuji; Kawauchi, Machi et al. (2016): Blood-brain barrier damage in vascular dementia. In: *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 36 (2), S. 115–124. DOI: 10.1111/neup.12262.

Ueno, Masaki; Tomimoto, Hidekazu; Akiguchi, Ichiro; Wakita, Hideaki; Sakamoto, Haruhiko (2002): Blood-brain barrier disruption in white matter lesions in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22 (1), S. 97–104. DOI: 10.1097/00004647-200201000-00012.

Undas, A. (2014): Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders. In: *Thrombosis and haemostasis* 112 (1), S. 32–42. DOI: 10.1160/TH14-01-0032.

- Undas, Anetta; Ariëns, Robert A. S. (2011): Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (12), e88-99. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.230631.
- Undas, Anetta; Slowik, Agnieszka; Wolkow, Pawel; Szczudlik, Andrzej; Tracz, Wiesława (2010): Fibrin clot properties in acute ischemic stroke: relation to neurological deficit. In: *Thrombosis research* 125 (4), S. 357–361. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.11.013.
- Vaheri, A.; Mosher, D. F. (1978): High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. In: *Biochimica et biophysica acta* 516 (1), S. 1–25.
- van Damme, Els J. M.; Barre, Annick; Rougé, Pierre; Peumans, Willy J. (2004): Potato lectin: an updated model of a unique chimeric plant protein. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37 (1), S. 34–45.
- van Veluw, Susanne J.; Jolink, Wilmar M. T.; Hendrikse, Jeroen; Geerlings, Mirjam I.; Luijten, Peter R.; Biessels, Geert Jan; Klijn, Catharina J. M. (2014): Cortical microinfarcts on 7T MRI in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34 (7), S. 1104–1106. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.73.
- Viswanathan, Anand; Greenberg, Steven M. (2011): Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. In: *Annals of neurology* 70 (6), S. 871–880. DOI: 10.1002/ana.22516.
- Wakisaka, Yoshinobu; Miller, Jordan D.; Chu, Yi; Baumbach, Gary L.; Wilson, Saul; Faraci, Frank M. et al. (2008): Oxidative stress through activation of NAD(P)H oxidase in hypertensive mice with spontaneous intracranial hemorrhage. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (6), S. 1175–1185. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.7.
- Wakita, H.; Tomimoto, H.; Akiguchi, I.; Kimura, J. (1995): Protective effect of cyclosporin A on white matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion. In: *Stroke* 26 (8), S. 1415–1422.
- Wang, Jun; Ho, Lap; Chen, Linghong; Zhao, Zhong; Zhao, Wei; Qian, Xianjuan et al. (2007): Valsartan lowers brain  $\beta$ -amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (11), S. 3393–3402. DOI: 10.1172/JCI31547.
- Wang, Xin; Chappell, Francesca M.; Valdes Hernandez, Maria; Lowe, Gordon; Rumley, Ann; Shuler, Kirsten et al. (2016): Endothelial Function, Inflammation, Thrombosis, and Basal Ganglia Perivascular Spaces in Patients with Stroke. In: *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 25 (12), S. 2925–2931. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.007.
- Wardlaw, J. M. (2010): Blood-brain barrier and cerebral small vessel disease. In: *Journal of the neurological sciences* 299 (1-2), S. 66–71. DOI: 10.1016/j.jns.2010.08.042.
- Wardlaw, J. M.; Sandercock, P. A. G.; Dennis, M. S.; Starr, J. (2003): Is breakdown of the blood-brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? In: *Stroke* 34 (3), S. 806–812. DOI: 10.1161/01.STR.0000058480.77236.B3.
- Wardlaw, Joanna M.; Doubal, Fergus; Armitage, Paul; Chappell, Francesca; Carpenter, Trevor; Muñoz Maniega, Susana et al. (2009): Lacunar stroke is associated with diffuse blood-brain barrier dysfunction. In: *Annals of neurology* 65 (2), S. 194–202. DOI: 10.1002/ana.21549.

- Wardlaw, Joanna M.; Makin, Stephen J.; Valdés Hernández, Maria C.; Armitage, Paul A.; Heye, Anna K.; Chappell, Francesca M. et al. (2017): Blood-brain barrier failure as a core mechanism in cerebral small vessel disease and dementia: evidence from a cohort study. In: *Alzheimer's & Dementia* 13 (6), S. 634–643. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.09.006.
- Wardlaw, Joanna M.; Smith, Colin; Dichgans, Martin (2013a): Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease. Insights from neuroimaging. In: *The Lancet. Neurology* 12 (5), S. 483–497. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70060-7.
- Wardlaw, Joanna M.; Smith, Eric E.; Biessels, Geert J.; Cordonnier, Charlotte; Fazekas, Franz; Frayne, Richard et al. (2013b): Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. In: *The Lancet. Neurology* 12 (8), S. 822–838. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70124-8.
- Watson, B. D.; Dietrich, W. D.; Busto, R.; Wachtel, M. S.; Ginsberg, M. D. (1985): Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. In: *Annals of neurology* 17 (5), S. 497–504. DOI: 10.1002/ana.410170513.
- Weller, Roy O.; Hawkes, Cheryl A.; Kalara, Raj N.; Werring, David J.; Carare, Roxana O. (2015): White matter changes in dementia: role of impaired drainage of interstitial fluid. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 25 (1), S. 63–78. DOI: 10.1111/bpa.12218.
- Willis, C. L.; Camire, R. B.; Brule, S. A.; Ray, D. E. (2013): Partial recovery of the damaged rat blood-brain barrier is mediated by adherens junction complexes, extracellular matrix remodeling and macrophage infiltration following focal astrocyte loss. In: *Neuroscience* 250, S. 773–785. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.061.
- Wilson, Duncan; Charidimou, Andreas; Werring, David J. (2014): Advances in understanding spontaneous intracerebral hemorrhage. Insights from neuroimaging. In: *Expert review of neurotherapeutics* 14 (6), S. 661–678. DOI: 10.1586/14737175.2014.918506.
- Wimo, Anders; Guerchet, Maëlen; Ali, Gemma-Claire; Wu, Yu-Tzu; Prina, A. Matthew; Winblad, Bengt et al. (2017): The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. In: *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 13 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.07.150.
- Winblad, Bengt; Amouyel, Philippe; Andrieu, Sandrine; Ballard, Clive; Brayne, Carol; Brodaty, Henry et al. (2016): Defeating Alzheimer's disease and other dementias. A priority for European science and society. In: *The Lancet. Neurology* 15 (5), S. 455–532. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)00062-4.
- Wu, Yu-Tzu; Beiser, Alexa S.; Breteler, Monique M. B.; Fratiglioni, Laura; Helmer, Catherine; Hendrie, Hugh C. et al. (2017): The changing prevalence and incidence of dementia over time - current evidence. In: *Nature reviews. Neurology* 13 (6), S. 327–339. DOI: 10.1038/nrneurol.2017.63.
- Xuereb, J. H.; Brayne, C.; Dufouil, C.; Gertz, H.; Wischik, C.; Harrington, C. et al. (2000): Neuropathological findings in the very old. Results from the first 101 brains of a population-based longitudinal study of dementing disorders. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 903, S. 490–496.
- Yakushiji, Yusuke; Yokota, Chiaki; Yamada, Naoaki; Kuroda, Yasuo; Minematsu, Kazuo (2011): Clinical characteristics by topographical distribution of brain microbleeds, with a particular emphasis on diffuse microbleeds. In: *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 20 (3), S. 214–221. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.12.001.

Yamada, Masahito (2015): Cerebral amyloid angiopathy. Emerging concepts. In: *Journal of stroke* 17 (1), S. 17–30. DOI: 10.5853/jos.2015.17.1.17.

Yamaguchi, M.; Sugimachi, K.; Nakano, K.; Fujimoto, M.; Takahashi, M.; Chikugo, T.; Ogawa, H. (1994): Memory deficit accompanying cerebral neurodegeneration after stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). In: *Acta neurochirurgica. Supplementum* 60, S. 200–202.

Yamori, Y.; Horie, R. (1977): Developmental course of hypertension and regional cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In: *Stroke* 8 (4), S. 456–461.

Yamori, Y.; Horie, R.; Handa, H.; Sato, M.; Fukase, M. (1976): Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. In: *Stroke* 7 (1), S. 46–53.

Yan, Ping; Bero, Adam W.; Cirrito, John R.; Xiao, Qingli; Hu, Xiaoyan; Wang, Yan et al. (2009): Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (34), S. 10706–10714. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2637-09.2009.

Yen, Lola Fenghuei; Wei, Vivi Chiali; Kuo, Eva Yuhua; Lai, Ted Weita (2013): Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats. In: *PloS one* 8 (7), e68595. DOI: 10.1371/journal.pone.0068595.

Zhang, Li; Zhang, Zheng Gang; Chopp, Michael (2012): The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. In: *Trends in pharmacological sciences* 33 (8), S. 415–422. DOI: 10.1016/j.tips.2012.04.006.

Zhang, Liying; Zheng, Haiqing; Luo, Jing; Li, Lili; Pan, Xiaona; Jiang, Ting et al. (2018): Inhibition of endothelial nitric oxide synthase reverses the effect of exercise on improving cognitive function in hypertensive rats. In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 41 (6), S. 414–425. DOI: 10.1038/s41440-018-0033-5.

Zlokovic, Berislav V. (2008): The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. In: *Neuron* 57 (2), S. 178–201. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.

Zlokovic, Berislav V. (2010): Neurodegeneration and the neurovascular unit. In: *Nature medicine* 16 (12), S. 1370–1371. DOI: 10.1038/nm1210-1370.

## **Ehrenerklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchlich Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.