

# **Funktionelle Untersuchung des Einflusses von Hämabbauprodukten auf die neurovaskuläre Reaktion im Hirnschnittmodell der Maus in Abhängigkeit vom Alter**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Katharina Janina Sophie Holzmüller  
geboren am 18.05.1998 in Landsberg am Lech

Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. Prof. Dr. Knut Holthoff, Universitätsklinikum Jena
2. apl. Prof. Dr. Ignacio Rubio, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Christine Rose, Universität Düsseldorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.11.2023

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Einheitenverzeichnis.....	9
Zusammenfassung .....	10
1 Einleitung .....	12
1.1 Subarachnoidalblutung .....	12
1.1.1 Definition.....	12
1.1.2 Epidemiologie.....	13
1.1.3 Ätiologie.....	13
1.1.4 Aneurysma .....	14
1.1.4.1 Definition.....	14
1.1.4.2 Epidemiologie und Ätiologie intrakranieller Aneurysmen.....	14
1.1.4.3 Symptomatik intrakranieller Aneurysmen.....	15
1.1.4.4 Risikofaktoren einer Aneurysmaruptur .....	15
1.1.5 Symptomatik.....	15
1.1.6 Diagnostik.....	16
1.1.7 Therapie.....	17
1.1.8 Komplikationen und Early Brain Injury.....	18
1.2 Verzögerte zerebrale Ischämie.....	19
1.2.1 Definition.....	19
1.2.2 Epidemiologie.....	19
1.2.3 Pathophysiologie .....	19
1.2.4 Therapie.....	21
1.3 Hämoglobinabbauprodukte.....	22
1.4 Neurovaskuläre Kopplung .....	25
1.5 BK-Kanäle .....	26
1.5.1 Definition.....	26
1.5.2 Struktur .....	27
1.5.3 Variabilität.....	28
1.5.4 Funktion.....	29
2 Zielsetzung der Arbeit.....	30
3 Material und Methoden .....	32
3.1 Versuchstiere .....	32

3.2 Genotypisierung .....	32
3.3 Lösungen.....	35
3.3.1 aCSF-Lösung .....	35
3.3.2 Noradrenalin .....	39
3.4 Substanzen .....	39
3.4.1 TTX .....	39
3.4.2 PDP .....	39
3.4.3 BOX .....	40
3.4.4 NS1619.....	41
3.5 Teilprojekt 1 und 2.....	41
3.5.1 Hirnschnittpräparation .....	41
3.5.2 Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie .....	43
3.5.3 Versuchsdesign und –ablauf.....	44
3.5.4 Elektrische Stimulation.....	46
3.5.5 Prüfung der Gefäßvitalität .....	47
3.5.6 Auswertung des Gefäßdurchmessers .....	47
3.5.7 Statistik .....	48
3.6 Teilprojekt 3.....	51
3.6.1 Versuchstiere.....	51
3.6.2 Versuchsdesign und –ablauf.....	51
3.6.3 Operative Freilegung der Cisterna magna – intrathekale Applikation .....	52
3.6.4 Hirnpräparation.....	53
3.6.5 Kryokonservierung und Hirnschnittverfahren .....	53
3.6.6 Hirnschnittfärbung .....	56
3.6.7 Laser-Scan-Mikroskopie .....	58
3.6.8 Auswertung.....	60
3.6.9 Statistik .....	61
4 Ergebnisse .....	62
4.1 Teilprojekt 1.....	62
4.1.1 aCSF.....	62
4.1.2 TTX.....	63
4.1.3 Gefäßreaktionen unter verschiedenen Hämoglobinabbauprodukten.....	65
4.1.4 Zeitpunkt der maximalen Kontraktion.....	68
4.1.5 Amplitude.....	69

4.1.6	Zeitkonstante tau	70
4.1.7	A1 – Aufweitung der Gefäße	71
4.1.8	AUC – area under the curve	72
4.1.9	Vergleich PDP A + BOX A juvenil und adult	73
4.2	Teilprojekt 2	76
4.2.1	NS1619-Wirkung	79
4.2.2	Zeitpunkt der maximalen Kontraktion	80
4.2.3	Amplitude	82
4.2.4	Zeitkonstante tau	84
4.2.5	A1 – Aufweitung der Gefäße	84
4.2.6	AUC – area under the curve	84
4.3	Teilprojekt 3	85
4.3.1	Tag der Dekapitation	86
4.3.2	Intervention	87
4.3.3	Gefäßtyp	88
4.3.4	Zeitlicher Verlauf der relativen Gefäßwanddicke innerhalb der Interventionsgruppen	89
5	Diskussion	92
5.1	Aufgaben der Arbeit	92
5.2	Teilprojekt 1 und 2	94
5.2.1	Methodik Teilprojekt 1 und 2	94
5.2.1.1	Auswahl der Versuchstiere	94
5.2.1.2	Methode der Hirnpräparation	96
5.2.1.3	Perfusionsdruck	96
5.2.1.4	Substanzen	97
5.2.1.5	Stimulationsstärken und Elektrodenposition	97
5.2.1.6	Auswertung und Statistik	100
5.2.2	Ergebnisse Teilprojekt 1	101
5.2.2.1	Interpretation der dynamischen Gefäßreaktion der aCSF-Kohorte	101
5.2.2.2	Interpretation der TTX-Reaktion	102
5.2.2.3	Interpretation der Auswertungsparameter	102
5.2.2.4	Altersvergleich zwischen PDP A und BOX A	104
5.2.3	Ergebnisse Teilprojekt 2	105
5.2.3.1	Interpretation der NS1619-Wirkung	105

5.2.3.2 Interpretation der Auswertungsparameter .....	106
5.3 Teilprojekt 3.....	109
5.3.1 Methodik Teilprojekt 3 .....	110
5.3.1.1 Injektion von Eigenblut – Induktion einer SAB.....	110
5.3.1.2 Methode der Hirnpräparation/Fixierung .....	111
5.3.1.3 Färbung.....	112
5.3.1.4 Auswahl der Gefäße.....	113
5.3.1.5 Auswertung der relativen Gefäßwanddicke .....	113
5.3.2 Ergebnisse Teilprojekt 3.....	114
5.3.2.1 Interpretation der einzelnen Auswertungsparameter .....	114
5.3.2.2 Interpretation des zeitlichen Verlaufs der relativen Gefäßwanddicke der Interventionsgruppen.....	116
5.4 Ausblick .....	118
6 Schlussfolgerung .....	120
Literaturverzeichnis.....	122
Abbildungsverzeichnis .....	132
Ehrenwörtliche Erklärung.....	133
Danksagung .....	134

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> (Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit)
APA	<i>Arteria azygos pericallosa</i>
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unterhalb der Kurve)
BA	<i>Arteria basilaris</i>
BK	Big Kalium (K <sup>+</sup> ) ( <i>big conductance calcium and voltage gated potassium channels</i> )
BOX	<i>bilirubin oxidation end product</i>
CBF	<i>cerebral blood flow</i> (zerebraler Blutfluss)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CPP	<i>cerebral perfusion pressure</i> (zerebraler Perfusionsdruck)
CSD	<i>cortical spreading depolarisation</i> (kortikale Depolarisationswelle)
CT	Computertomographie
CTA	Computertomographie-Angiographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DCI	<i>delayed cerebral ischemia</i> (verzögerte zerebrale Ischämie)
DIC	<i>differential interference contrast microscopy</i> (Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie)
DIND	<i>delayed ischemic neurological deficit</i> (verzögertes ischämisches neurologisches Defizit)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
EBI	<i>early brain injury</i> (frühe Hirnschädigung)
EKG	Elektrokardiographie
HDP	<i>heme degradation product</i> (Hämoglobinabbauprodukt)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICP	<i>intracranial pressure</i> (intrakranieller Druck)
KO	<i>knockout</i>
L-NAME	L-Arginin-Methyl Ester
LSM	<i>laser scan microscopy</i> (Laser-Scan-Mikroskopie)

miRNA	<i>micro-ribonucleid acid</i> (Mikro-Ribonukleinsäure)
MRA	Magnetresonanzangiographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	Noradrenalin
NOS	NO-Synthase
PCA	<i>Arteria communicans posterior</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDP	<i>Propentdyopents</i>
RCK	<i>regulator of K<sup>+</sup> conductance</i> (Regulatoren der Kaliumleitfähigkeit)
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
Slo	<i>slowpoke</i> (Genabschnitt für den BK-Kanal)
Slo 1 +/+	Homozygote Expression des Slo 1-Gens (Wildtyp)
Slo 1 +/-	Heterozygote Expression des Slo 1-Gens
Slo 1 -/-	Homozygoter Knockout des Slo 1-Gens
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TLV	Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz
TTX	Tetrodotoxin
WT	Wildtyp

## Einheitenverzeichnis

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit	
a	Beschleunigung	m/s <sup>2</sup>	
c	Stoffmengenkonzentration	mol * m <sup>-3</sup>	
f	Frequenz	Hertz	1 s <sup>-1</sup>
G	Elektrischer Leitwert	S	1S = $\frac{1}{\Omega}$ (Siemens)
I	Elektrische Stromstärke	A	(Ampere)
l	Länge	m	(Meter)
m	Masse	g	(Gramm)
M	Molare Masse	kg * mol <sup>-1</sup>	
n	Stoffmenge	mol	
p	Druck	mmHG	
t	Zeit	s	(Sekunde)
U	Spannung	V	$1 \frac{kg*m^2}{A*s^2}$
V	Volumen	l	Liter = 0,001m <sup>3</sup>
Θ	Temperatur	°C	(Grad Celsius)

## Zusammenfassung

Die Subarachnoidalblutung als Unterform des hämorrhagischen Schlaganfalls ist mit einer ausgeprägten Beeinträchtigung der neurologischen Funktion assoziiert. Neben früh einsetzenden Komplikationen, wie dem Anstieg des intrakraniellen Drucks, spielt vor allem die verzögerte zerebrale Ischämie eine wesentliche Rolle (Engl. *delayed cerebral ischemia*, DCI). Diese tritt in der Regel 3-14 Tage nach der initialen Blutung auf und kann progredient zu einem sekundären ischämischen Schlaganfall führen. Der genaue Pathomechanismus dieser Komplikation ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Neben einem Vasospasmus großer zerebraler Gefäße werden mikrovaskuläre Veränderungen, Entzündungsreaktionen und Mikrothrombosierungen vermutet. Abbauprodukte des durch die Blutung freigesetzten Hämoglobins stehen dabei im Verdacht, einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung der DCI zu nehmen. Diese als Hämoglobinabbauprodukte bezeichneten Spaltprodukte entfalten ihre Wirkung unter anderem an spezifischen Kaliumkanälen (BK-Kanäle), die eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Vasotonus zerebraler Gefäße spielen. Die Hämoglobinabbauprodukte führen zu einer Hemmung dieser Kanäle und begünstigen dadurch die Vasokonstriktion zerebraler Gefäße, die mit einer Minderperfusion des Hirnparenchyms einhergehen kann.

Um die genaue Auswirkung der Hämoglobinabbauprodukte im Zusammenhang mit der DCI zu verstehen und den Pathomechanismus dieser Komplikation zu entschlüsseln, wurden in dieser Promotionsarbeit drei Teilprojekte mit unterschiedlichen Schwerpunkten und Zielsetzungen durchgeführt.

Das erste und zweite Teilprojekt beruhte hierbei auf Experimenten an akuten Hirnschnitten von Mäusen. Von besonderem Interesse war die Auswirkung der Hämoglobinabbauprodukte auf die neurovaskuläre Kopplung, also die Änderung des Gefäßdurchmessers von Arteriolen durch neuronale Erregung in ihrer Umgebung. Hierzu wurden Hirnschnitte elektrisch stimuliert und die Durchmesser von penetrierenden Arteriolen mithilfe eines Differentialinterferenzkontrast-Mikroskops über die Zeit registriert.

Im ersten Teilprojekt wurden verschiedene Abbauprodukte des Hämoglobins in diesem experimentellen Aufbau untersucht. Die Ergebnisse zeigten hierbei keine Unterschiede der neurovaskulären Kopplung. Es konnte allerdings eine

Altersabhängigkeit der Gefäßreaktion festgestellt werden; die Vasokonstriktion juveniler Tiere fiel deutlich größer aus als die beobachtete Reaktion adulter Tiere.

Im zweiten Teilprojekt stand die Untersuchung des BK-Kanal-Aktivators NS1619 im Fokus. Dieser hochpotente Öffner der BK-Kanäle sollte der Hemmung der Kanäle und der Vasokonstriktion durch Hämoglobinabbauprodukte entgegenwirken. Diese Wirkung konnte in allen Experimenten des zweiten Teilprojekts bestätigt werden. Ebenso konnte die Altersabhängigkeit der Gefäßreaktion entsprechend des ersten Teilprojekts bestätigt werden.

Das dritte Teilprojekt betrachtete die langfristigen Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf zerebrale Gefäße. Hierzu wurden den Versuchstieren *in vivo* definierte Volumina entweder von Hämoglobinabbauprodukten oder von Eigenblut intrathekal injiziert. Nach Fluoreszenzfärbung wurden morphologische Veränderungen der Gefäßwände untersucht und zwischen verschiedenen Arterien des Gehirns und den verschiedenen Interventionen verglichen. Zur Vervollständigung des Gesamtbildes der langfristigen Auswirkungen wurden zur Auswertung bereits erhobene Daten der Tage 3, 7 und 14 *post interventionem* hinzugezogen. Zusammenfassend konnte bei einem Arterientyp mit direktem Liquorkontakt eine Zunahme der relativen Gefäßwanddicke an Tag 14 gemessen werden, die gefolgt wurde von einer Reduktion der Wanddicke an Tag 28. Ein intraparenchymal gelegenes Kontrollgefäß wies konträr dazu eine signifikante Wanddickenzunahme an Tag 28 auf.

Die Betrachtung sowohl der kurzfristigen Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf die neurovaskuläre Kopplung als auch der langfristigen morphologischen Veränderungen der Gefäßwände geben wichtige Hinweise für das Verständnis der Pathophysiologie der verzögerten zerebralen Ischämie, sorgen allerdings nicht für eine ausreichende Erklärung dieser neurologischen Erscheinung. Weitergehende Untersuchungen auf Grundlage der hier erfassten Ergebnisse sind wünschenswert und von großem klinischen Interesse.

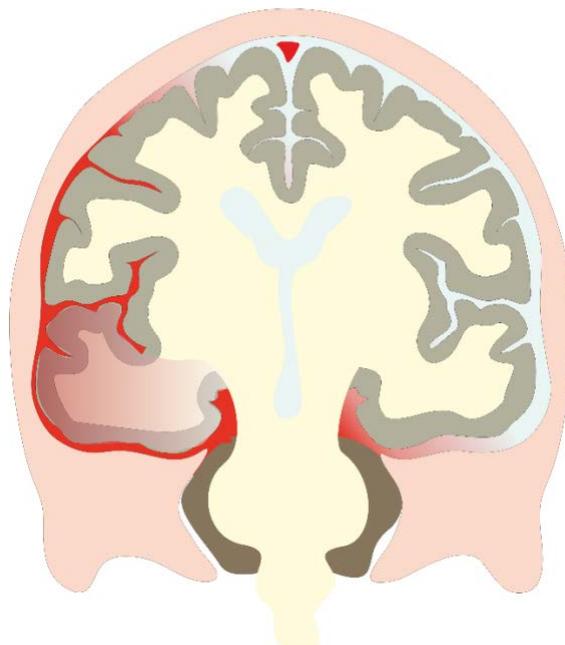
## 1 Einleitung

### 1.1 Subarachnoidalblutung

#### 1.1.1 Definition

Schlaganfälle sind ein gefürchtetes und weit verbreitetes neurologisches Krankheitsbild mit einer Inzidenz zwischen 95-290 pro 100.000 Personen pro Jahr in Europa (Béjot et al. 2016). Entsprechend ihrer Ätiologie können sie in ischämische und hämorrhagische Ereignisse unterteilt werden. Etwa 87% der Schlaganfälle sind ischämischer Genese, während die restlichen 13% durch intrazerebrale oder subarachnoidale Blutungen hervorgerufen werden (Yew und Cheng 2015).

Von diesen hämorrhagischen Ereignissen wird ein Anteil von 5% durch Subarachnoidalblutungen (SAB) verursacht. Es handelt sich hierbei um eine Blutung in den anatomischen Raum zwischen *Arachnoidea mater* und *Pia mater*, die das Gehirn und Rückenmark umgeben (Abbildung 1). Diese Art des hämorrhagischen Schlaganfalls geht häufig mit sehr starken Kopfschmerzen und/oder neurologischen Defiziten einher (Sacco et al. 2013).



*Abbildung 1: Schematische Darstellung eines koronaren Schnittbildes durch den menschlichen Schädel mit Einblutung in den Subarachnoidalraum.*

Trotz des geringen Anteils im Verhältnis zu ischämischen Schlaganfällen, ist die SAB mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert und geht dadurch mit einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität einher (Macdonald und Schweizer 2017).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Die Inzidenz der Subarachnoidalblutung liegt weltweit bei etwa 9 pro 100.000 Personen pro Jahr. Jedoch weist die Verteilung dieser Häufigkeit große regionale Unterschiede auf. Während die Inzidenzen in Japan und Finnland mit 22,7 bzw. 19,7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr im Vergleich zum Durchschnittswert ungefähr doppelt so hoch ausfallen, zeigt sich in Zentral- und Südamerika eine deutlich geringere Häufigkeit von 4,2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Verteilung der beiden Geschlechter ist altersabhängig. Während Männer in jüngeren Jahren häufiger von einer SAB betroffen sind als Frauen, dreht sich diese Verteilung ab dem 55. Lebensjahr zu Lasten des weiblichen Geschlechts um (de Rooij et al. 2007). Vermutlich ist dieses Phänomen durch eine Abnahme des Östrogenspiegels während und nach der Menopause zu erklären, welche zu einer erhöhten Gefahr für die Ausbildung und Ruptur intrakranieller Aneurysmen führt (Harrod et al. 2006).

Die beträchtliche Mortalitätsrate der SAB hat in den letzten Jahren zwar deutlich abgenommen, erreicht jedoch immer noch hohe Werte von 35-50% (Petridis et al. 2017, Balbi et al. 2017, Geraghty und Testai 2017). 10-15% der Patient:innen versterben dabei bereits vor Erreichen des Krankenhauses und dem Erhalt medizinischer Versorgung (Suzuki et al. 2020). Lediglich ein Viertel bis ein Drittel der Überlebenden erholt sich vollständig von der Blutung und kann in ein selbstständiges Leben zurückkehren (Etminan et al. 2020, van Gijn et al. 2007).

### **1.1.3 Ätiologie**

Subarachnoidalblutungen können durch traumatische oder nicht-traumatische Ursachen hervorgerufen werden (Sacco et al. 2013). Unter den nicht-traumatischen Blutungen sind etwa 85% auf die spontane Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas zurückzuführen (Kundra et al. 2014, Macdonald und Schweizer 2017). Die verbleibenden 15% werden als nicht-aneurysmale SABs bezeichnet. Sie können entsprechend ihrer Blutverteilung in der Computertomographie (CT) in perimesenzephal und nicht-perimesenzephal Blutungen eingeteilt werden (van Gijn et al. 1985, Kim et al. 2012). Perimesenzephal Blutungen – charakterisiert durch freies Blut in der perimesenzephalen Zisterne unmittelbar vor dem Hirnstamm (Coelho et al. 2016) – machen dabei einen Anteil von etwa 10% aus, der übrige Anteil wird durch eine Vielzahl an Gefäßveränderungen verursacht, wie beispielsweise

arteriovenöse Malformationen, Dissektion einer Arterie, Tumore oder Vaskulitis (Al-Shahi et al. 2006, Kim et al. 2012).

Zur Differenzierung der unterschiedlichen Ätiologien der Blutung sind bildgebende Verfahren notwendig, die nachstehend beleuchtet werden. Aufgrund der prozentualen Dominanz der aneurysmalen Subarachnoidalblutung, wird in dieser Arbeit Bezug auf diese Form der Blutungsquelle genommen.

#### **1.1.4 Aneurysma**

##### **1.1.4.1 Definition**

Aneurysmen sind erworbene Aussackungen der Gefäßwand, die typischerweise an Bifurkationen großer Gefäße nahe des oder am *Circulus arteriosus Willisii* auftreten und hierbei zu 85% bevorzugt das vordere Stromgebiet betreffen (Etminan et al. 2020, Brown und Broderick 2014, Wang et al. 2018). Als Ursache wird ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischen und Umweltfaktoren angenommen, bei dem es unter anderem durch hämodynamische Reize zu einer Veränderung der *Membrana elastica interna* kommt. Zudem werden molekulare Mechanismen der Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen vermutet, die eine entscheidende Rolle für die Kollagenproduktion und Ausbildung des Aneurysmas spielen (Etminan und Rinkel 2016, Petridis et al. 2017, Macdonald und Schweizer 2017).

##### **1.1.4.2 Epidemiologie und Ätiologie intrakranieller Aneurysmen**

Die Prävalenz intrakranieller Aneurysmen liegt in der erwachsenen Bevölkerung zwischen 1-3%, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer (Etminan et al. 2020, Brown und Broderick 2014, Vlcek et al. 2011). Genetische Prädispositionen, wie das Ehlers-Danlos-Syndrom, das Marfan-Syndrom, die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung oder kongenitale kardiovaskuläre Malformationen sind mit einem häufigeren Auftreten intrakranieller Aneurysmen assoziiert (Olubajo et al. 2020, Chapman et al. 1992, Sanchis et al. 2019, Brown et al. 1990, Kim et al. 2021). Zusätzlich findet sich ein erhöhtes Risiko bei arterieller Hypertonie, Nikotin- und Alkoholabusus (D'Souza 2015, Caranci et al. 2013). Es tritt außerdem eine familiäre Häufung intrakranieller Aneurysmen bei Verwandten ersten oder zweiten Grades auf, die bereits eine SAB erlitten haben. Familiäre Aneurysmen sind dabei im Vergleich zu

nicht-familiären Gefäßausstülpungen tendenziell größer, treten multiple auf und sind mit einem höheren Rupturrisiko assoziiert (Juvola et al. 2013, Vlak et al. 2011).

#### **1.1.4.3 Symptomatik intrakranieller Aneurysmen**

Der Großteil intrakranieller Aneurysmen ist über lange Zeit asymptomatisch und manifestiert sich am häufigsten durch die Ruptur und Entwicklung einer SAB. In seltenen Fällen finden sich Symptome wie Schmerzen über oder hinter dem Auge, Hirnnervenausfälle oder Kopfschmerzen, als Folge einer sogenannten „Warnungsblutung“ (Grobely 2011). Dementsprechend werden die meisten Aneurysmen (80-90% der unrupturierten Aneurysmen) als Zufallsbefunde durch den verstärkten Einsatz von CT- und Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen diagnostiziert (Juvola et al. 2013).

#### **1.1.4.4 Risikofaktoren einer Aneurysmaruptur**

Die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Zu den wichtigsten Prädiktoren einer Ruptur zählen ein höheres Alter, arterielle Hypertonie, eine bereits stattgehabte Subarachnoidalblutung, die Aneurysmagröße und -lokalisierung sowie die geografische Herkunft der Person (Greving et al. 2014). Auch Nikotin- und ausgeprägter Alkoholabusus sind mit einer erhöhten Rupturgefahr assoziiert (Juvola et al. 2013). Aneurysmen können über lange Zeit größenstabil bleiben und episodenhaft wachsen. Eine deutliche Größenzunahme ist dabei mit einem 12-fach erhöhten Rupturrisiko im Vergleich zu wachstumsstabilen Aneurysmen verbunden (Etminan et al. 2020, Etminan und Rinkel 2016).

#### **1.1.5 Symptomatik**

Die klinische Manifestation einer Subarachnoidalblutung besteht typischerweise in einem hyperakut einsetzenden Vernichtungskopfschmerz, der sich innerhalb weniger Sekunden entwickelt (Petridis et al. 2017). Weitere Symptome sind Nackensteifigkeit sowie Übelkeit und Erbrechen als Folgen des intrakraniellen Druckerhöhungs. Auch neurologische Auffälligkeiten wie epileptische Anfälle, fokale-neurologische Defizite, Hirnnervenausfälle und Bewusstseinsstörungen können mit einer SAB assoziiert sein (Kundra et al. 2014). Eine(r) von sieben Patient:innen entwickelt außerdem intraokuläre Einblutungen, die wiederum durch die intrakranielle Druckerhöhung verursacht werden (van Gijn et al. 2007).

In etwa 50% der Fälle tritt im Zeitraum einiger Tage bis Monate vor der massiven Subarachnoidalblutung eine frühe „Warnblutung“ kleinerer Dimension auf, die meist mit starken und atypischen Kopfschmerzen assoziiert ist und durch einen geringen Blutaustritt aus dem Aneurysma hervorgerufen wird (Ostergaard 1991).

Neben diesen typischen intrakraniellen und neurologischen Symptomen sind außerdem systemische Effekte zu nennen, die zu Fehlinterpretationen und Fehldiagnosen führen können. Hierzu zählen vor allem kardiale, pulmonale und endokrine Veränderungen. Als kardiale Komplikationen treten häufig elektrokardiographische (EKG) Veränderungen und Arrhythmien auf sowie eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion und ein Anstieg des kardialen Troponinspiegels bei 20-40% der Betroffenen (Ramappa et al. 2008, Naidech et al. 2005). Es kann zur Entstehung eines neurogenen Lungenödems kommen, zu metabolischen Störungen – insbesondere in Form von Hyponatriämien – und bei 70% der Patient:innen zu Fieber (Rose 2011). Als Ursache dieser extrazerebralen Symptome wird ein akuter Anstieg des Katecholaminspiegels vermutet, der eine systemische und pulmonale Hypertonie begünstigt und in Kombination mit Entzündungskaskaden und Permeabilitätsveränderungen der Membran zu den beschriebenen systemischen Symptomen führen kann (Ramappa et al. 2008, Rose 2011).

### **1.1.6 Diagnostik**

Bei Verdacht auf eine Subarachnoidalblutung ist die kraniale Computertomographie das diagnostische Mittel der Wahl. Zunächst wird hierbei eine Bildgebung ohne Kontrastmittel durchgeführt. Die Sensitivität der CT-Untersuchung ist sehr hoch, jedoch von der Menge des freigesetzten Blutes sowie dem zeitlichen Intervall seit Blutungsbeginn abhängig. Während die Sensitivität innerhalb der ersten 6 Stunden nach Blutungsbeginn noch bei 100% liegt, nimmt diese kontinuierlich über die Zeit ab und beträgt nach einer Woche weniger als 60%. Daher ist es dringend erforderlich, dass sich einem negativen CT-Befund die Durchführung einer Lumbalpunktion anschließt (Perry et al. 2011). Der entnommene Liquor wird dabei auf rote Blutzellen und Xanthochromie untersucht und ermöglicht die Diagnosestellung einer SAB auch bei unauffälligem CT-Befund (Meurer et al. 2016, Tulla et al. 2019). Bei einer negativen CT-Bildgebung und negativem Liquorbefund kann eine SAB mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden (Perry et al. 2008).

Nach Diagnosestellung einer SAB sollte eine Evaluation der Blutungsursache mittels einer Bildgebung des Gefäßsystems erfolgen. Als Goldstandard dient hierbei die digitale Subtraktionsangiografie, die allerdings einer invasiven Durchführung bedarf, kostspielig und zeitintensiv ist und ein hohes Maß an Expertise verlangt. Die digitale Subtraktionsangiografie wird aufgrund dieser ungünstigen Eigenschaften zunehmend durch die CT-Angiographie (CTA) abgelöst. Diese zeigt eine vergleichbare Sensitivität zur digitalen Subtraktionsangiografie (vor allem bei Aneurysmen > 3mm Durchmesser) und ermöglicht eine nicht-invasive Diagnostik und Therapieplanung. Auch die Magnetresonanztomografie (MRT) und MR-Angiografie (MRA) dienen als weitere diagnostische Möglichkeiten, die eine Evaluation ohne ionisierende Strahlung ermöglichen (de Oliveira Manoel et al. 2014).

### **1.1.7 Therapie**

Die medizinische Versorgung von Patient:innen mit Subarachnoidalblutung sollte stets in speziellen Zentren mit intensivmedizinischer und neurochirurgischer Fachabteilung erfolgen. Hierbei ist ein rascher Transport in ein geeignetes Zentrum ausschlaggebend für die Prognose und die Mortalität der Betroffenen (van Lieshout et al. 2017). Die akute Therapie eines rupturierten Aneurysmas besteht in dessen Verschluss, entweder durch mikrochirurgisches Clipping oder endovaskuläre Verfahren, vorzugsweise durch Coiling-Embolisation, seltener Ballon- oder Stent-basiertes Coiling oder durch den Einsatz von *Flow Divertern* (Etminan et al. 2020). Das Coiling-Verfahren besteht aus einer endovaskulären Einbringung eines Platin-Coils zur Okklusion des Aneurysmas. Dieses Verfahren hat die chirurgische Verschließung des Aneurysmas mittels Clipping weitgehend ersetzt (van Gijn et al. 2007). Bei beiden Verfahren ist eine frühzeitige Intervention (innerhalb der ersten 24 Stunden) anzustreben, da diese mit einer deutlichen Verbesserung des klinischen Ergebnisses assoziiert ist (Phillips et al. 2011). Die Entscheidung über die Intervention sollte dabei individuell durch Spezialist:innen getroffen werden. Die Tendenz heute geht allerdings zur endovaskulären Intervention, die eine Verbesserung der klinischen Prognose im Vergleich zum neurochirurgischen Clipping aufweist (Molyneux et al. 2005).

Als generelle Maßnahmen sollten eine regelmäßige Kontrolle der Vitalparameter (Blutdruck, EKG) sowie des neurologischen Status (*Glasgow Coma Scale*, Pupillenreaktion, fokale neurologische Defizite) erfolgen. Der Blutdruck ist hierbei

streng zu kontrollieren und eine Hypertonie ist zu vermeiden (systolisch < 140mmHG) (Petridis et al. 2017).

### **1.1.8 Komplikationen und Early Brain Injury**

Zahlreiche gefürchtete Komplikationen nach einer Subarachnoidalblutung begünstigen das hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko dieses Krankheitsbildes. In Assoziation zu SABs kommt es nicht selten zur Ausbildung eines Hydrozephalus, zu fokalen oder generalisierten epileptischen Anfällen oder zu erneuten Blutungen (Chen et al. 2017, Macdonald und Schweizer 2017). Aneurysmale Nachblutungen stellen dabei die Hauptursache für Morbidität und Mortalität nach der initialen Blutung dar und sind mit einer Mortalitätsrate von bis zu 80% assoziiert. Sie ereignen sich meist innerhalb der ersten 24 Stunden nach der initialen Aneurysmaruptur (Phillips et al. 2011, Starke und Connolly 2011, van Gijn et al. 2007).

Weitere Folgeerscheinungen werden in zwei Phasen entsprechend ihres zeitlichen Auftretens unterteilt. Früheinsetzende Komplikationen treten innerhalb von 72 Stunden nach Blutungsbeginn auf und werden unter dem Begriff *Early Brain Injury* (EBI) zusammengefasst. Hierbei kommt es aufgrund der Blutung zu einem Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) (Ciurea et al. 2013, Zoerle et al. 2015). Dieser Druckanstieg führt in der Folge zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses (CBF) und Perfusionsdrucks (CPP), was zu transienten globalen oder fokalen Ischämien führen kann. Daneben können metabolische Veränderungen, Störungen des Elektrolythaushalts, Hirnödem und Zelluntergang von Neuronen auftreten (van Lieshout et al. 2018) sowie pathophysiologische Reaktionen, die zu kapillärer Thrombose, kortikalen Depolarisationswellen (Engl. *Cortical Spreading Depolarisations*; CSDs) und Dysfunktionen der Blut-Hirn-Schranke führen (Findlay et al. 2016, Suzuki et al. 2020). Die späteinsetzenden Komplikationen sowie der Begriff der *Cortical Spreading Depolarisations* werden im nachfolgenden Kapitel beleuchtet. Zahlreiche residuelle Defizite nach einer Subarachnoidalblutung führen zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität. Hierbei klagen Patient:innen neben funktionellen Defiziten nicht selten über kognitive Dysfunktionen, wie zum Beispiel Gedächtnis- oder Sprachstörungen, Anosmie (25-33%) oder affektive Störungen, unter anderem mit Angstzuständen und Depressionen (bis zu 50%) (Rinkel und Algra 2011, Al-Khindi et al. 2010).

## **1.2 Verzögerte zerebrale Ischämie**

### **1.2.1 Definition**

Die verzögerte zerebrale Ischämie (Engl. *Delayed Cerebral Ischemia*; DCI) beschreibt das Auftreten eines fokal neurologischen Defizits oder eine Abnahme von mindestens zwei Punkten auf der *Glasgow Coma Scale* für einen Zeitraum von mindestens einer Stunde. Diese neurologische Verschlechterung darf dabei nicht unmittelbar nach Verschluss des Aneurysmas auftreten und kann anhand der klinischen Beurteilung (CT, MRT, Labordiagnostik) nicht auf andere Ursachen zurückgeführt werden (Vergouwen et al. 2010).

### **1.2.2 Epidemiologie**

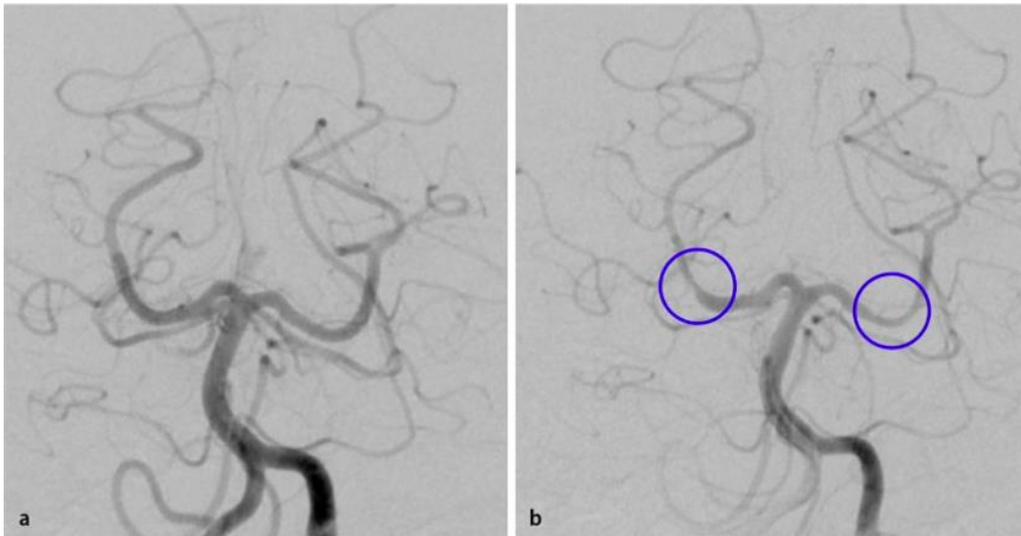
Die DCI – auch als *Delayed Ischemic Neurological Deficit* (DIND) bezeichnet – tritt bei ca. 30% der Patient:innen nach einer SAB, in der Regel innerhalb der ersten 3-14 Tage nach dem hämorrhagischen Ereignis auf (Geraghty und Testai 2017, Suzuki et al. 2020). Es handelt sich um eine gefürchtete Komplikation, die als Hauptursache für eine spätere soziale, funktionelle, kognitive und emotionale Morbidität zählt (Foreman 2016).

### **1.2.3 Pathophysiologie**

Als pathophysiologische Erklärung wurde lange Zeit ein angiographischer Vasospasmus zerebraler Hirnarterien angenommen, der in ca. 70% der Fälle nachgewiesen werden kann (van Lieshout et al. 2018). Dabei handelt es sich um eine Gefäßverengung großer Arterien, die in der vaskulären Bildgebung sichtbar wird (Abbildung 2). Als Folge dieser arteriellen Einengung kann es zu einer zerebralen Ischämie mit neurologischen Defiziten kommen, was als klinisch symptomatischer Vasospasmus bezeichnet wird und eine DCI beschreibt (Findlay et al. 2016).

Ein solches verspätetes neurologisches Defizit tritt allerdings lediglich bei 30% der Patient:innen auf, obwohl – wie bereits erwähnt – bei 70% ein angiografischer Vasospasmus nachweisbar ist. Nicht zuletzt wegen dieser Diskrepanz, sondern auch wegen einer oft erfolglosen pharmakologischen Therapie des Vasospasmus, lassen neue Erkenntnisse auf einen weitaus komplexeren pathophysiologischen Mechanismus schließen (Rass und Helbok 2021). Eine pharmakologische Studie des Endothelinantagonisten Clazosentan zeigte beispielsweise eine signifikante Reduktion des arteriellen Vasospasmus, jedoch keine Verbesserung des klinischen

Outcomes der Patient:innen nach SAB (Hansen-Schwartz et al. 2007, Vajkoczy et al. 2005, Macdonald et al. 2008).



*Abbildung 2: Digitale Subtraktionsangiografie mit Kontrastmittel nach Subarachnoidalblutung (a); Ausbildung eines angiographischen Vasospasmus nach 10 Tagen (b; blaue Markierung); Bild und Beschreibung (Kellner et al. 2012).*

Die aktuellen pathophysiologischen Hypothesen umfassen unter anderem mikrovaskuläre Dysfunktionen, Entzündungsreaktionen, Mikrothrombosierung und *Cortical Spreading Depolarisations* (van Lieshout et al. 2018). Des Weiteren können Exzitotoxizität, Veränderungen der zerebralen Autoregulation, eine Reduktion des venösen Abflusses und Kompression der kleinen Gefäße durch ein Hirnödem die Entstehung der DCI fördern (Rass und Helbok 2021).

Mikrovaskuläre Dysfunktionen beschreiben einen Vasospasmus kleinerer Arteriolen, der durch vasoaktive Substanzen, Schwellung astrozytärer Endfüße in der Nachbarschaft der Arteriolen und Kontraktion von umgebenden Perizyten begünstigt wird. Zu den vasoaktiven Substanzen zählen dabei unter anderem Abbauprodukte des Hämoglobins, die im Rahmen der Blutung freigesetzt werden. Auch mikroskopische Thromben konnten bei Betroffenen einer DCI vermehrt festgestellt werden. Die Thrombusbildung wird hierbei durch endotheliale Dysfunktion und Dysbalancen der Gerinnungskaskade begünstigt (van Lieshout et al. 2018, Naraoka et al. 2014). Einen weiteren Einfluss auf die Entwicklung einer DCI können kortikale Depolarisationswellen (CSDs) nehmen. Es handelt sich dabei um langsam ausbreitende Depolarisationswellen in der grauen Substanz, die durch Anschwellen

der Neurone und Veränderungen der dendritischen Dornenfortsätze gekennzeichnet sind. Durch eine Schädigung der Ionenhomöostase durch die SAB kommt es zu einer anhaltenden Depolarisation der Neurone mit Verlust ihrer elektrischen Aktivität, welcher auch als *Spreading Depression* bezeichnet wird. Als Reaktion auf diese CSDs findet sich im gesunden Gewebe eine induzierte Hyperperfusion. Im geschädigten Hirnparenchym – beispielsweise nach SAB – kommt es dagegen zu einer konträren Reaktion mit einer Vasokonstriktion der Arteriolen. Hierdurch wird eine Minderperfusion des Parenchyms und folglich ein ischämischer Zelluntergang begünstigt (Dreier 2011). Die Inversion der hämodynamischen Reaktion wird zu einem späteren Zeitpunkt eingehender erläutert.

Die Freisetzung des Blutes in den Subarachnoidalraum kann zur Entstehung einer Entzündungsreaktion führen. Durch eine Störung der Blut-Hirnschranke können dann periphere Immunzellen wie Neutrophile, Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten einwandern und residente Mikrogliazellen in ihrer Entzündungsaktivität unterstützen (Geraghty und Testai 2017).

Alle beschriebenen pathophysiologischen Phänomene verlaufen entweder transient oder können progredient zu einem zerebralen Infarkt führen. Dieser wird als abgestorbenes Hirnparenchym in der Bildgebung (CT/MRT) innerhalb von 6 Wochen nach SAB sichtbar oder kann *post mortem* autoptisch nachgewiesen werden. Entscheidend ist hierbei die zeitliche Einordnung dieser Läsion. Innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden nach Aneurysmaverschluss sind diese Läsionen in der Bildgebung nicht zu sehen und eine Rückführung auf andere Ursachen, wie chirurgische oder endovaskuläre Verfahren, ist ebenfalls nicht möglich (Geraghty und Testai 2017, Vergouwen et al. 2010).

#### **1.2.4 Therapie**

Trotz des medizinischen Fortschritts sind die Therapiemöglichkeiten der DCI sehr begrenzt. Allgemeine therapeutische Maßnahmen beinhalten die Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes und damit die Verhinderung eines Volumendefizits des/der Patienten/in. Zudem werden eine regelmäßige klinische Beurteilung des neurologischen Status und tägliche sonografische Untersuchungen mittels eines transkraniellen Dopplers zur Früherkennung eines möglichen Vasospasmus empfohlen (Findlay et al. 2016). Als pharmakologische Therapiemöglichkeit zeigte lediglich der L-Typ-Kalziumkanalantagonist Nimodipin eine Verbesserung der

klinischen Prognose der Betroffenen und eine Reduktion der DCI. Nimodipin wird in einer Konzentration von 60mg oral oder über eine nasogastrale Sonde in einem 4-stündigen Intervall für 21 Tage verabreicht (Dorhout Mees et al. 2007). Neben dem primären vasodilatativen Effekt des Pharmakons werden außerdem neuroprotektive Mechanismen vermutet, die durch Inhibition der *Cortical Spreading Depolarisations*, Verringerung der Mikrothrombosierung sowie Steigerung der fibrinolytischen Aktivität eine klinische Verbesserung ermöglichen (Rass und Helbok 2021). Eine begleitende sogenannte *Triple-H*-Therapie, bestehend aus Hypervolämie, Hypertension und Blutverdünnung (Hämodilution), ist aus heutiger Sicht obsolet und wurde durch die Empfehlung einer Euvolämie/Normovolämie abgelöst (Kundra et al. 2014, Anetsberger et al. 2020). Eine evidenzbasierte Empfehlung zur Induktion einer Hypertonie bei DCI kann aus aktuellem Stand ebenfalls nicht gegeben werden, da diese Therapie mit ernsthaften Komplikationen verbunden sein kann (Gathier et al. 2018). Eine Normothermie der Patient:innen sollte angestrebt und ein Ausgleich jeglicher Elektrolytstörungen – vor allem auftretender Dysnatriämien – durchgeführt werden (Rass und Helbok 2021, Park et al. 2018).

Neben dieser allgemeinen und pharmakologischen Therapie besteht ferner die Möglichkeit für endovaskuläre Interventionen in Form einer transluminalen Ballonangioplastie oder der intraarteriellen Infusion von Vasodilatoren. Diese invasiven Optionen streben eine dauerhafte Aufweitung der vasospastischen Gefäße an, sind allerdings mit erheblichen Risiken wie Gefäßverschluss, Dissektion oder Ruptur des Blutgefäßes, Anstieg des intrakraniellen Drucks oder epileptischen Anfällen assoziiert und bedürfen daher einer strengen Indikationsstellung (Athar und Levine 2012).

### **1.3 Hämoglobinabbauprodukte**

Bislang besteht keine vollständige Erklärung für die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung einer DCI und zu verspäteten neurologischen Defiziten führen. Neben den bereits beschriebenen Erklärungsansätzen müssen die Auswirkungen von Hämoglobinabbauprodukten betrachtet werden.

Bereits im Jahr 2000 beobachteten Kranc et al., dass durch einen oxidativen Abbau von Bilirubin vasoaktive Produkte entstehen, die einen möglichen Einfluss auf die Pathogenese eines zerebralen Vasospasmus als Folge einer Subarachnoidalblutung nehmen können. Neben einer gesteigerten Aktivität des Enzyms Hämoxxygenase 1,

welches den Abbau von Häm zu Biliverdin katalysiert, konnten sie zeigen, dass eine oxidative Umgebung zu einem Zerfall des Bilirubins führt und die resultierenden Komponenten eine vasokonstriktorische Wirkung auf Gefäße entwickeln (Kranc et al. 2000, Wagner und Dwyer 2004). Diese Hypothese konnte dadurch bestärkt werden, dass der zeitliche Verlauf des verzögerten Vasospasmus mit dem Auftreten des Bilirubins im Liquor der Betroffenen korrelierte (Clark et al. 2002).

Das durch die Blutung freigesetzte Hämoglobin kann auf zwei Wegen abgebaut werden. Zunächst katalysiert die Hämoxigenase den enzymatischen Abbau von Hämoglobin zu freien Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin. Dieses wird wiederum durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert (siehe Abbildung 3).

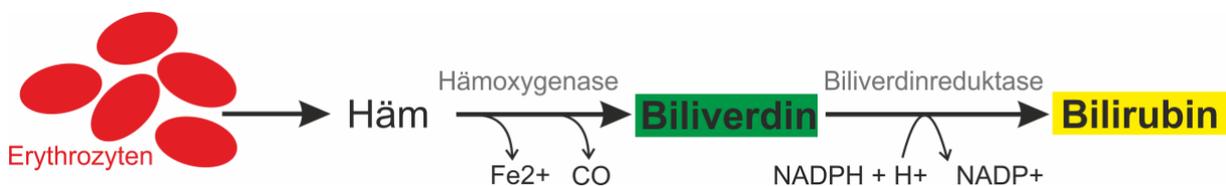


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Abbaus von Häm zu Bilirubin in Folge einer Freisetzung von Häm aus Erythrozyten.

Diesem enzymatischen Abbau folgt ein nicht-enzymatischer Anteil, der vor allem durch reaktive Sauerstoffspezies in einem oxidativen Milieu gefördert wird. Als Endprodukte entstehen hierbei *Bilirubin Oxidation End Products* (BOXes), die in zwei Isomeren auftreten, Z-BOX A und Z-BOX B (Ritter et al. 2016, Joerk et al. 2014). Neben diesen Endprodukten finden sich zudem *Propentdyopents* (PDPs) als Zwischenprodukte des Bilirubinzerfalls. Ebenso wie BOXes treten PDPs in zwei Isomeren auf, PDP A und B, die sich in der Position ihrer Vinyl- und Methylgruppen unterscheiden (siehe Abbildung 4). Jede dieser Formen hat ebenfalls zwei Isomere, PDP A1/A2 bzw. PDP B1/B2 (Joerk et al. 2019).

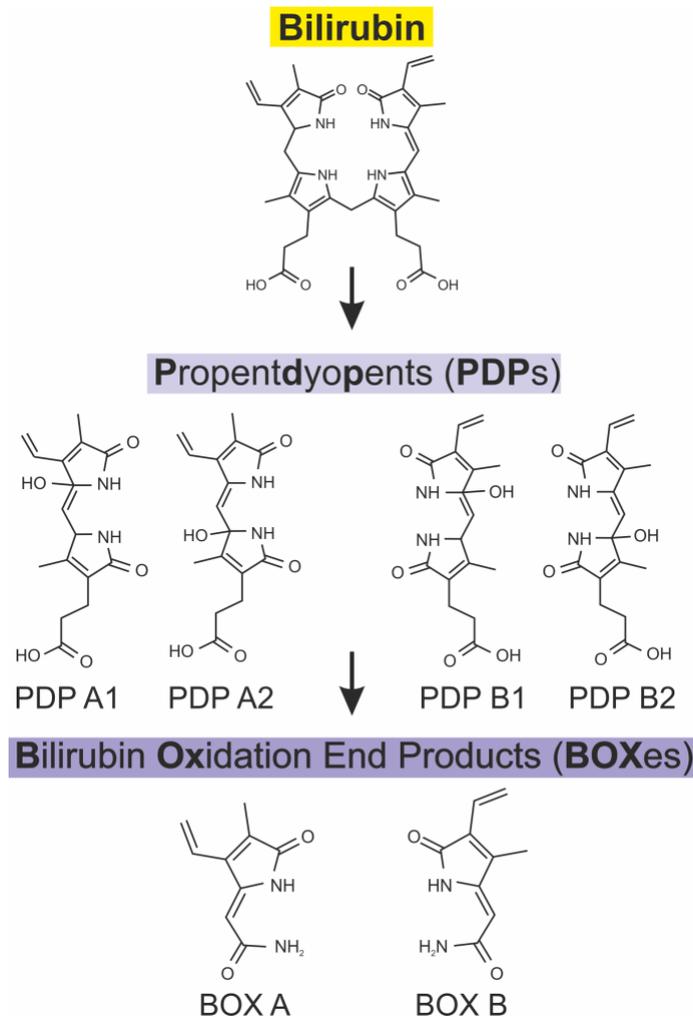


Abbildung 4: Oxidativer Abbau des Bilirubins über Propentdyopents (PDPs) zu Bilirubin Oxidation End Products (BOXes).

Im Liquor von Patient:innen nach Subarachnoidalblutung konnten beide Produkte des Bilirubinzerfalls nachgewiesen werden, wobei die Konzentration der PDPs 20-fach höher war als die BOX-Konzentration. *In Vitro*-Studien belegten zudem, dass PDPs in der gemessenen Konzentration einen vasokonstriktorisches Effekt auf Arteriolen hervorrufen, während die BOX-Konzentration zu keiner signifikanten Gefäßverengung führte. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die Rolle der PDPs für die Entstehung der DCI entscheidender ist als die der BOXes (Joerk et al. 2019).

Insgesamt konnte für beide Substanzen ein vasospastischer Effekt auf zerebrale Gefäße *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Zudem zeigten BOXes eine direkte Wirkung auf die Struktur glatter Gefäßmuskelzellen, was eine dauerhafte Vasokonstriktion und das Therapieversagen von Vasodilatoren erklären könnte (Clark und Sharp 2006).

## 1.4 Neurovaskuläre Kopplung

Obwohl das Gehirn einen extrem hohen Energieverbrauch aufweist, sind die energetischen Speicherkapazitäten des Organs eher gering ausgeprägt. Aus diesem Grund ist eine ausgeklügelte zeitliche und räumliche Kopplung des zerebralen Blutflusses an die neuronale Aktivität notwendig. Diese Kopplung wird durch eine Triade aus glatter Gefäßmuskulatur, Neuronen und Astrozyten ermöglicht, die als neurovaskuläre Einheit bezeichnet wird (Abbildung 5) (Phillips et al. 2016). Das Konzept dieser Triade wird aufgrund seiner Simplifizierung in Frage gestellt und durch neue Konzepte, beispielsweise ein vaskuläres neuronales Netzwerk, ergänzt, welches auch vor- und nachgeschaltete Abschnitte des Gefäßsystems und spezifische Zellfunktionen berücksichtigt (Zhang et al. 2012). Komplexere Auffassungen der neurovaskulären Kopplung beinhalten neben Neuronen und Astrozyten auch Endothelzellen, perivaskuläre Nerven und größere zerebrale Arterien sowie weitere morphologische Strukturen (Tso und Macdonald 2014). In dieser Arbeit wird allerdings die konventionelle Triade der neurovaskulären Einheit und ihre Funktion betrachtet.

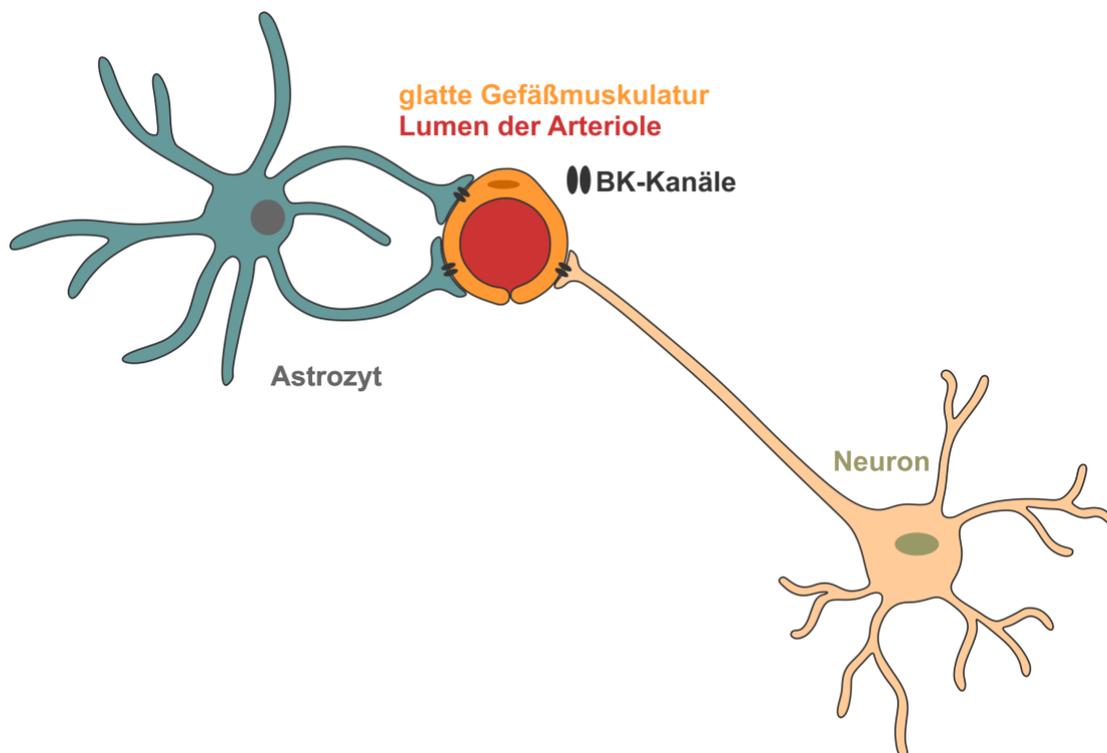


Abbildung 5: Schema einer neurovaskulären Einheit bestehend aus Neuron, glatter Gefäßmuskulatur einer intraparenchymalen Arteriole und Astrozyt (basierend auf einer Abbildung von Dr. med. Alexander Jörk).

Durch neuronale Aktivität wird eine Steigerung des lokalen Blutflusses und damit eine sogenannte funktionelle Hyperämie hervorgerufen (Suzuki et al. 2020).

Ausschlaggebend hierfür ist die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat, der an metabotrope Glutamatrezeptoren der astrozytären Endfüße bindet. Hierauf folgt eine intrazelluläre Aktivierung des Inositoltriphosphats und ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dieser Anstieg begünstigt die Freisetzung vasodilatatorischer Signale, beispielsweise Metabolite der Arachidonsäure. Außerdem kommt es zur Aktivierung spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanäle (BK-Kanäle), die zu einem Ausstrom von Kaliumionen führen. Der folglich milde Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration in Kombination mit vasodilatatorischen Substanzen führt zu einer Hyperpolarisation und Dilatation der Gefäßmuskulatur (Koide et al. 2012, Tso und Macdonald 2014). Die genauere Funktion und Wirkungsweise der BK-Kanäle werden im folgenden Kapitel erläutert.

Der beschriebene Mechanismus der neurovaskulären Kopplung zeigt nach Hirnparenchymschädigung eine funktionelle Umkehr und spielt damit eine wichtige Rolle für das pathophysiologische Verständnis der DCI. Anstelle der erwarteten Vasodilatation nach neuronaler Aktivierung konnte eine Vasokonstriktion beobachtet werden (Koide et al. 2013). Zugrunde liegen vermutlich eine höhere perivaskuläre Kaliumkonzentration ( $> 20\text{mM}$ ) und eine größere Amplitude von Kalziumoszillationen in den astrozytären Endfüßen, die eine Inversion der Gefäßreaktion hin zu einer Vasokonstriktion ermöglichen (Koide et al. 2012). Das Resümee dieser Hypothese ist, dass die Anpassung des zerebralen Blutflusses an neuronale Aktivität nach einer SAB grundlegend geschädigt ist und jegliche neuronale Stimulation zu einem erheblichen Ungleichgewicht zwischen Blutversorgung und Energiebedarf des Hirnparenchyms führt (Balbi et al. 2017).

## **1.5 BK-Kanäle**

### **1.5.1 Definition**

BK-Kanäle (*Big K<sup>+</sup>*) sind hochleitfähige kalzium- und spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die auch unter den Namen Slo-Kanäle oder Maxi K-Kanäle bekannt sind und in zahlreichen Geweben exprimiert werden (Contet et al. 2016). Wie der Name der Kanäle bereits vermuten lässt, besitzen die BK-Kanäle eine außergewöhnlich hohe Leitfähigkeit, also einen hohen Ionenfluss durch einen einzigen geöffneten Kanal bei einem definierten Membranpotential. Die Leitfähigkeit liegt bei ca. 250-330pS (pico Siemens) bei einer symmetrischen Konzentration von Kaliumchlorid (KCl) von 150mM. Betrachtet man einen einzelnen offenen Kanal, bedeutet dies, dass bei einer Triebkraft

von 100mV ein Strom von 25-30mA ermöglicht wird. Diese hohe Leitfähigkeit wird vermutlich durch einen elektrostatischen Mechanismus durch negative Ladung an der Pore sowie durch einen größeren Durchmesser der Pore im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen ermöglicht (Salkoff et al. 2006).

### 1.5.2 Struktur

Insgesamt existieren 4 unterschiedliche Slo-Gene (auch *Slowpoke* oder *KCNMA* genannt), die für die 4 verschiedenen Slo-Proteine – auch als alpha-Untereinheiten bezeichnet – der Slo-Kanäle 1-4 codieren. Jeweils vier dieser alpha-Untereinheiten bilden ein Homotetramer und damit einen funktionsfähigen Kanal, der spezifische Öffnungseigenschaften und eine hohe Kaliumselektivität besitzt (Salkoff et al. 2006, Magleby 2003, Dopico et al. 2018). In dieser Arbeit wird insbesondere der Slo 1-Kanal betrachtet, der durch sein Expressionsmuster und seine Eigenschaften einen möglichen Einfluss auf die Komplikationen nach SAB nehmen kann.

Neben der hohen Leitfähigkeit der Kanäle besteht ein weiteres Charakteristikum in der synergistischen Aktivierung, sowohl durch intrazelluläre Kalziumionen und andere Liganden, als auch durch Depolarisation der Zellmembran (Cui et al. 2009, Salkoff et al. 2006, Horrigan et al. 2005, Magleby 2003).

Das Slo1-Protein umfasst 7 transmembranöse Domänen und ein zytoplasmatisches Carboxyl-Ende (C-Terminus) (siehe Abbildung 6). Der aminoterminal Abschnitt (N-Terminus) zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu den 6 Transmembransegmenten spannungsabhängiger Kaliumkanäle (S1-S6), jedoch mit einem zusätzlichen S0-Segment, welches den N-Terminus des Proteins auf die extrazelluläre Seite verlagert und eine Interaktion mit assoziierten beta-Untereinheiten ermöglicht. Die Segmente S5-S6 bilden die Pore des BK-Kanals (Cui et al. 2009, Meera et al. 1997). Die S4-Domäne besitzt positiv-geladene Reste auf der extrazellulären Seite und fungiert als primärer Spannungssensor (Lee und Cui 2010).

Ein weiteres einzigartiges Merkmal stellt der verlängerte Carboxyl-Terminus (S7-S10) dar. Während sich der Spannungssensor an der sogenannten Kernregion des Kanals befindet (S1-S6), ist der Kalziumsensor am zytosolischen C-Terminus lokalisiert. Die Segmente S7-S10 bilden dabei sogenannte „Regulatoren der Kaliumleitfähigkeit“ (*Regulator of K<sup>+</sup> conductance*, RCK 1 und 2), die zwei hochaffine Bindungsstellen für Kalziumionen besitzen, sowie eine niedrigaffine Bindungsstelle, vor allem für Magnesiumionen (Dopico et al. 2018). S9-S10 (RCK2) stellen die am stärksten

konservierten Regionen des Proteins dar und beinhalten eine der hochaffinen Kalziumbindungsstellen (auch als *calcium bowl* bezeichnet) (Salkoff et al. 2006). Neben der kalziumselektiven *calcium bowl* findet sich außerdem ein weiterer hochaffiner Kalziumsensor an der RCK1, der unter anderem auch durch Cadmium aktiviert werden kann (Magleby 2003).

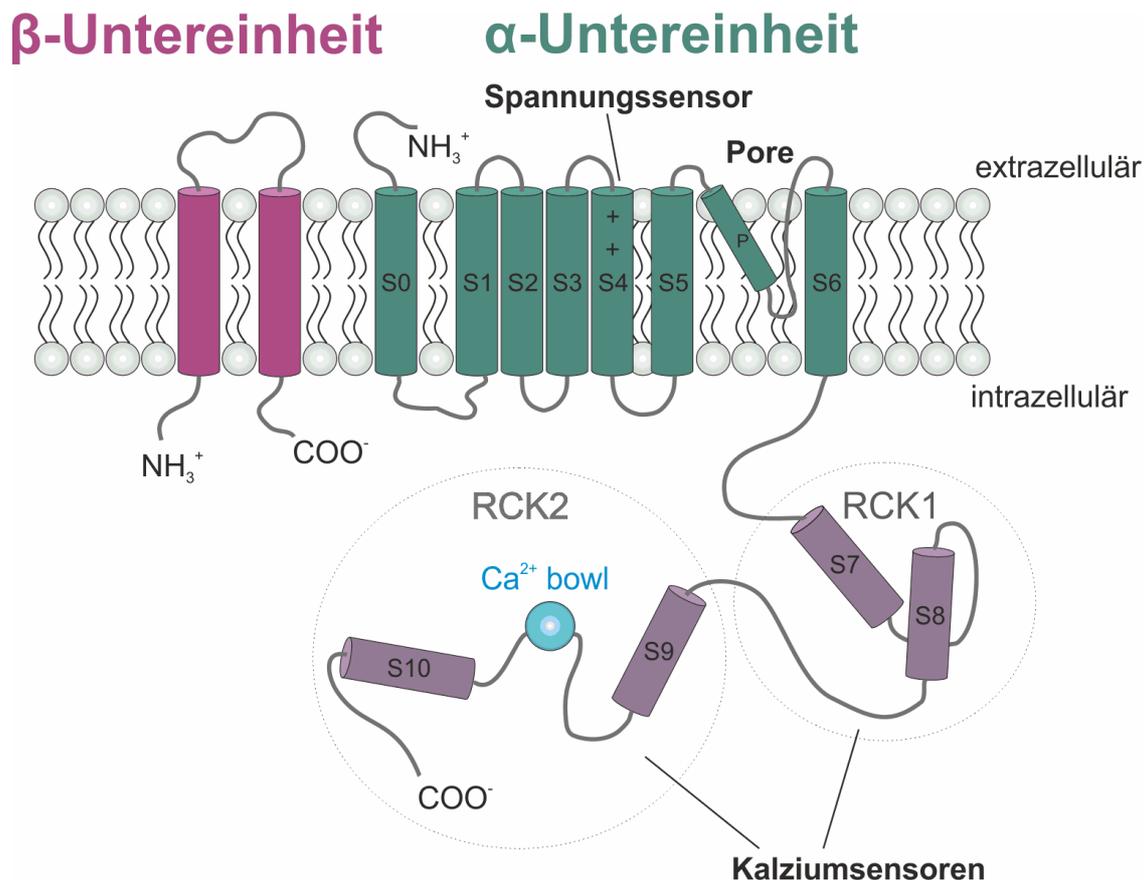


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur eines BK-Kanals; alpha- und beta-Untereinheiten inklusive Spannungs- und Kalziumsensoren (basierend auf einer Abbildung von Dr. med. Alexander Jörk).

### 1.5.3 Variabilität

Obwohl die Slo1-Untereinheit nur durch ein einziges Gen transkribiert wird, kann eine funktionelle Variabilität der Kanäle entsprechend ihrer physiologischen Funktionen durch verschiedene Mechanismen gewährleistet werden. Hierzu zählen sowohl prätranslationale Modifikationen durch alternatives *Splicing* oder Regulationen durch miRNA, als auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung (Dopico et al. 2018). Außerdem wird vermutet, dass die vier

verschiedenen alpha-Untereinheiten Slo 1-4 miteinander assoziieren und so ein funktionell diverses Heterotetramer ausbilden können (Salkoff et al. 2006).

Zusätzlich finden sich verschiedene beta-Untereinheiten, die mit den alpha-Untereinheiten der Slo-Kanäle assoziiert sein können. Die vier verschiedenen beta-Untereinheiten werden typischerweise in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Im zentralen Nervensystem befindet sich überwiegend die  $\beta_4$ -Untereinheit, während  $\beta_1$  vor allem in glatter Muskulatur exprimiert wird (Lee und Cui 2010). Die  $\beta_1$ -Untereinheit in glatten Muskelzellen erhöht die Kalziumsensitivität und Offenwahrscheinlichkeit der BK-Kanäle und ermöglicht somit eine niedrigschwellige Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskulatur. Jede der vier  $\beta$ -Untereinheiten wird durch ein spezifisches Gen (*KCNMB 1-4*) codiert (Dopico et al. 2018).

#### **1.5.4 Funktion**

BK-Kanäle sind im zentralen Nervensystem weit verbreitet und finden sich unter anderem in der neuronalen Zellmembran. Dort können sie sowohl die Form, Frequenz und Weiterleitung von Aktionspotentialen beeinflussen als auch in die Neurotransmitterfreisetzung der Präsynapse eingreifen. Zusätzlich finden sich die BK-Kanäle auch in Zellorganellen, beispielsweise der Kernhülle, wo unter anderem ein Einfluss auf die Gentranskription vermutet wird. Entscheidend ist außerdem das Vorkommen der Kanäle an Astrozyten – insbesondere den astrozytären Endfüßen, in der Umgebung zerebraler Gefäße – und in glatten Gefäßmuskelzellen. Hier haben die BK-Kanäle eine wichtige Funktion für die Kontrolle des zerebralen Blutflusses und der Hirnfunktion (Contet et al. 2016). Die Kopplung der Hirnaktivität und des Blutflusses wurde bereits unter dem Begriff der neurovaskulären Kopplung beleuchtet. Durch die Aktivierung der BK-Kanäle entsteht ein negativer Feedbackmechanismus auf die Membrandepolarisation und den intrazellulären Kalziumanstieg durch spannungsabhängige Kalziumkanäle. Der Ausstrom von Kaliumionen durch die BK-Kanäle begünstigt eine Repolarisation der Membran sowie eine Unterbrechung des Aktionspotentials und des Kalziumeinstroms (Lee und Cui 2010). Auf diese Weise wird eine Vasodilatation begünstigt und eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Energie gewährleistet.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Subarachnoidalblutungen zählen zu den hämorrhagischen Schlaganfällen und stellen ein gefürchtetes neurologisches Krankheitsbild dar, nicht zuletzt, weil sie mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate im Vergleich zu ischämischen Schlaganfällen assoziiert sind.

Eine schwere Komplikation der SAB ist die verzögerte zerebrale Ischämie mit dem Auftreten neurologischer Defizite. Der exakte pathophysiologische Mechanismus dieser Folgeerscheinung ist nicht vollständig erfasst. Neben einem Vasospasmus großer basaler Hirnarterien begünstigen vermutlich mikrozirkulatorische Veränderungen die Entstehung einer DCI. Abbauprodukte des Hämoglobins, die in Folge der Blutung entstehen, stehen dabei in Verdacht, eine konstriktorische Wirkung auf zerebrale Arteriolen zu entfalten. Durch den enzymatischen und oxidativen Zerfall des Bilirubins entstehen Produkte, die direkt mit spezifischen Kaliumkanälen (BK-Kanälen) interagieren können. Diese Kanäle sind entscheidend an der Regulation des zerebralen Blutflusses beteiligt.

Die Wirkung der Hämoglobinabbauprodukte an BK-Kanälen beeinflusst dabei die neurovaskuläre Kopplung, die unter physiologischen Bedingungen eine Mehrdurchblutung des Hirnparenchyms in Abhängigkeit von der Hirnaktivität gewährleistet. Diese ausreichende Versorgung des Parenchyms mit Sauerstoff und Energie ist durch eine Inversion der funktionellen Mehrdurchblutung in Folge einer Subarachnoidalblutung gestört und begünstigt die Entstehung einer zerebralen Ischämie.

Um den Aspekt der neurovaskulären Kopplung im Hinblick auf die Pathophysiologie der verzögerten zerebralen Ischämie eingehender zu beleuchten, wurden *in vitro*-Experimente an akuten Hirnschnitten der Maus durchgeführt. Zur Analyse wurde ein Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop verwendet, mit welchem die dynamische Gefäßantwort der Arteriole auf unterschiedliche Stimulationsstärken von 2 V bis 8 V beobachtet wurde. Im experimentellen Setup wurden hierzu verschiedene Hämoglobinabbauprodukte isoliert oder in Kombination getestet. Außerdem erfolgte eine weitere Untersuchung mit der Fragestellung langfristiger Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf morphologische Veränderungen zerebraler Gefäßwände.

Zentrale Fragestellungen dieser Arbeit sind im Folgenden aufgeführt:

- Veränderungen der dynamischen Gefäßantwort als Folge einer neuronalen Stimulation in Abhängigkeit unterschiedlicher Hämoglobinabbauprodukte
- Altersabhängigkeit der dynamischen Gefäßreaktion
- Veränderungen der dynamischen Gefäßreaktion durch Applikation des BK-Kanal-Aktivators NS1619
- Veränderungen der dynamischen Gefäßreaktion bei Kombination des BK-Kanal-Aktivators NS1619 mit Hämoglobinabbauprodukten als mögliche therapeutische Intervention
- Langfristige morphologische Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf zerebrale Gefäßwände

Die durchgeführten Experimente sollen ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse einer verzögerten zerebralen Ischämie ermöglichen. Sie sollen außerdem mögliche therapeutische Überlegungen anstoßen, die das Auftreten dieser Komplikation minimieren oder gänzlich verhindern können.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Die experimentelle Arbeit erfolgte ausschließlich mit Slo 1-Wildtyp-Mäusen (Slo 1 +/+). Für alle Versuchsreihen wurden sowohl weibliche als auch männliche Versuchstiere verwendet. Die Kohorten ließen sich in juvenile und adulte Tiere unterscheiden, wobei juvenil mit einem Alter von mindestens 20 und maximal 30 Tagen definiert war. Als adulte Tiere galten alle Mäuse mit einem Mindestalter von 365 Tagen. Die Slo 1-Wildtyp-Mäuse wurden als unbelastet eingestuft.

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgte in der Zentralen Experimentellen Tierhaltung des Universitätsklinikums Jena (Forschungszentrum Lobeda, Haus 4, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena). Die Tiere wurden in offener Käfighaltung bei einem definierten Hell-/Dunkelrhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Die Lichtintensität betrug hierbei maximal 60 Lux. Die Versorgung der Tiere war durch Wasser und Trockenfutter *ad libitum* gewährleistet.

Die Zucht der Mäuse war durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV) über den Zuchtrahmenantrag mit der Registernummer ZRA UKJ-17-013 legitimiert. Zur Generierung der homozygoten Slo 1-Wildtyp-Mäuse wurden sowohl homozygote Verpaarungen (beide Zuchttiere: Slo 1 +/+) als auch heterozygote Verpaarungen (beide Zuchttiere: Slo 1 +/-) angesetzt. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte mithilfe von Ohrstanzungen und Zuweisung einer Tier-ID; die Erfassung der Bestände wurde durch die elektronische Datenbank PyRAT (Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden) sichergestellt. Die Anästhesie und Organentnahme war entsprechend der Bestimmungen §1 und §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes (TierSchG), Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken, genehmigt und durch die Tötungsanzeige TWZ-030-2017 beim TLV gemeldet. Diese Tätigkeiten wurden ausschließlich von qualifiziertem Personal mit entsprechendem Sachkundenachweis (FELASA B, EU-Tätigkeitsgebiet A) durchgeführt.

#### **3.2 Genotypisierung**

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte um den 14. Lebenstag. Hierzu wurde das Material der – zur Kennzeichnung der Tiere vorgenommenen – Ohrstanzen verwendet. Die Genotypisierung war notwendig, um ausschließlich Tiere eines homozygoten Genotyps (Slo 1 +/+) in die Experimente einzuschließen.

Darüber hinaus wurde nach jedem Experiment eine anschließende Genotypisierung einer *post mortem* gewonnenen Schwanzbiopsie durchgeführt, um das vorliegende Ergebnis der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu verifizieren. Diskrepanzen in den PCR-Ergebnissen hätten zu einem Ausschluss des Versuchstieres aus der Auswertung geführt.

Als erster Schritt der Genotypisierung erfolgte die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus dem Stanzmaterial. Hierzu wurde die Ohrstanze zunächst mit Gewebe-Lyse-Puffer (180µl) und Prokinase K (20µl) versetzt und bei einer Temperatur von 56°C bei 550 Umdrehungen pro Minute für einen Zeitraum von 1 bis 3 Stunden inkubiert. Die Unterbrechung der Lysereaktion wurde durch das Hinzufügen eines Lysepuffers (200µl) und Ethanol (200µl) erreicht. Der Überstand (Lysat) konnte im Folgenden auf eine Trennsäule (DNA Isolation Kit, DNeasy Blood & Tissue Kit (250), Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgetragen und für eine Minute bei  $8000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$  zentrifugiert werden. Um die Reinheit der DNA-Probe zu gewährleisten, wurde eine zweimalige Waschung (1. Waschpuffer 500µl mit  $8000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$ ; 2. Waschpuffer 500µl mit  $1600 \times 9,81 \text{ m/s}^2$ ) durchgeführt, wobei diese Durchspülungen verworfen wurden. Anschließend musste die DNA aus der Säule mithilfe eines Elutionspuffers (35µl) und Zentrifugalkraft ( $8000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$  für 1 Minute) gewonnen werden. Das Eluat wurde schließlich bei 4°C gelagert.

Es erfolgte die Aufteilung der Proben in zwei Ansätze, um eine Interaktion der verwendeten Primer der Wildtyp- und KO-Sequenzen zu verhindern (Tabelle 1).

Die PCR wurde mit einem Thermozykler (Biometra TRIO 48, Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt, wobei der PCR-Ansatz 3µl der ausgewaschenen DNA beinhaltete (Tabelle 2). Die Ergebnisse der PCR konnten mithilfe einer Gelelektrophorese mit QIAxcel Advanced (Qiagen, Hilden) mit der Kartusche QIAxcel DNA-Screening Kit 2400 (Qiagen, Hilden) visualisiert werden (Abbildung 7). Die Trennung der Ansätze wurde hierbei aufgelöst und eine Wiederholung der PCR bei Unklarheit der Ergebnisse vorgenommen.

DNA-Primer	
Bezeichnung	Sequenz
Neo	5'-ATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'
RA 14025	3'-CCTCAAGAAGGGGACTCTAAAC-5'
Exon 1	5'-TTCATCATCTTGCTCTGGCGGACG-3'
WT	3'-CCATAGTCACCAATAGCCC-5'

Tabelle 1: DNA-Primer-Sequenzen für die Genotypisierung der Slo 1-Mäuse.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze für Wildtyp und Knockout-Tiere		
Stoff	Wildtyp (WT)	Knockout (KO)
Gibco Wasser (Qiagen)	2,7	2,7
5 x Q-Buffer (Qiagen)	2	2
10 x Puffer (Qiagen)	1	1
2,5 mM dNTPs (Qiagen)	0,2	0,2
Primer Neo 5'		0,5
Primer RA 14025 3'		0,5
Primer Exon 1 5'	0,5	
Primer WT 3'	0,5	
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,1	0,1

Tabelle 2: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die Genotypisierung der Slo 1-Mäuse; Ansatz für die Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Genotypisierung.

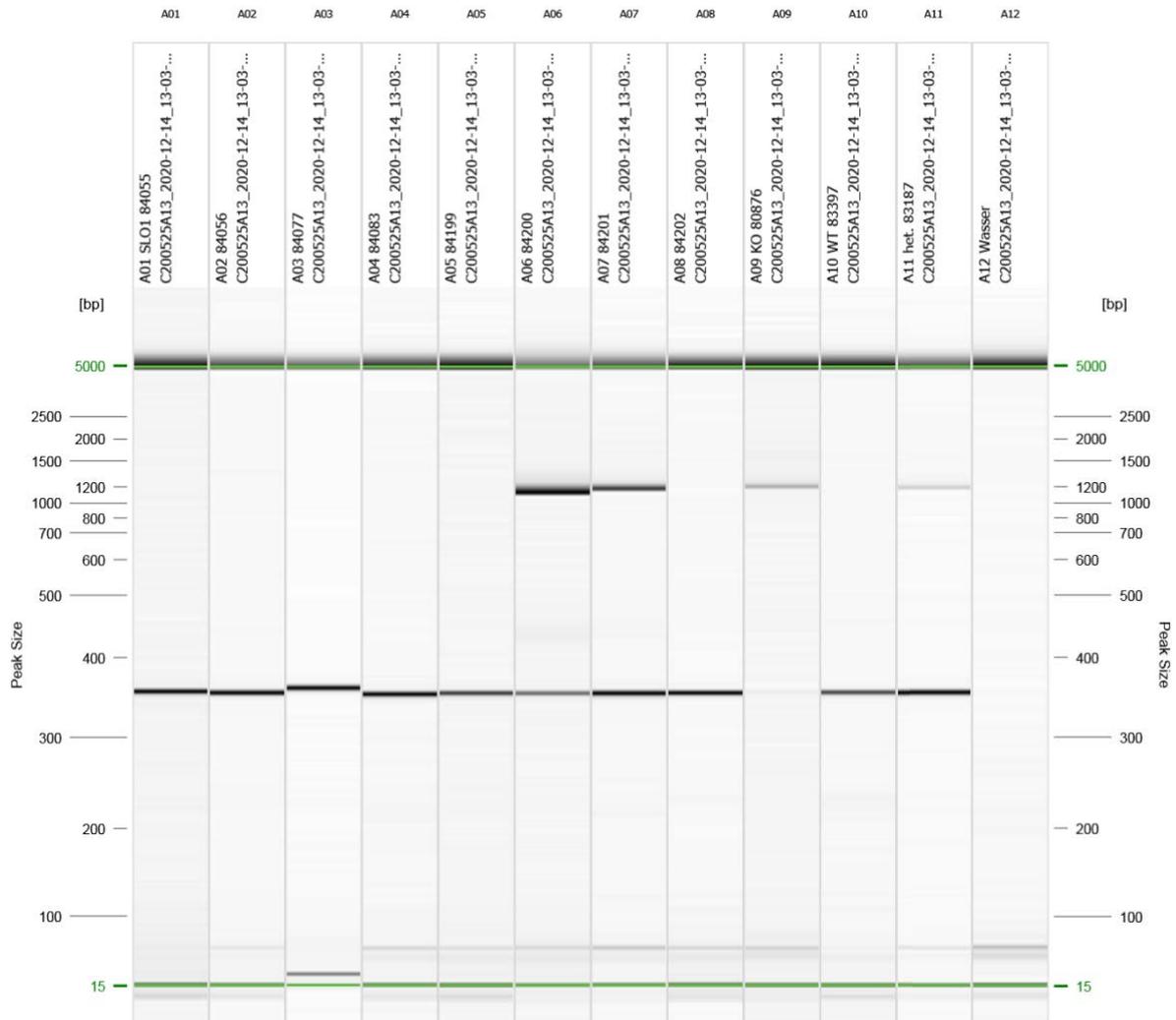


Abbildung 7: Gelelektrophorese einer Genotypisierung von acht Tieren (A01-A08). Vier Kontrollbanden (rechts) zur Einordnung der Ergebnisse (von links nach rechts: A09 Knock-Out (Slo 1 -/-), A10 Slo 1-WT (Slo 1 +/+), A11 Slo 1 heterozygot (Slo 1 +/-), A12 Wasser); Slo 1-WT: A01-A05, A08; Slo 1 heterozygot: A06, A07.

### 3.3 Lösungen

#### 3.3.1 aCSF-Lösung

Als Grundlage des experimentellen Versuchsaufbaus diene eine sogenannte artifizielle Liquorlösung, im Folgenden aCSF genannt (Engl. *artificial cerebrospinal fluid*). Diese Lösung imitierte die Ionenzusammensetzung des physiologischen Liquors und gewährleistete über den gesamten Versuchsablauf eine ausreichende Versorgung des Gehirns bzw. der Hirnschnitte und den Erhalt der Integrität dieser.

Die Herstellung der aCSF-Lösung vollzog sich wiederum aus der Kombination vier verschiedener Stammlösungen, welche in Vorratsgläsern bei 4°- 6°C gelagert wurden.

Als Grundlage diene hierzu die aCSF-Stammlösung, welche entsprechend der Angaben in Tabelle 3 vorbereitet und ebenfalls bei 4°- 6°C in einem Vorratsgefäß gelagert wurde. Die Stammlösung wurde stets auf 1000ml angesetzt und bis zum Erreichen dieses Volumens mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aufgefüllt.

<b>aCSF-Stammlösung auf 1000ml</b>			
<b>Substanz</b> (Hersteller)	<b>Konzentration</b> [mM]	<b>Molekulargewicht</b> [g/mol]	<b>Masse</b> [g]
<b>NaCl</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1250	58,44	73,05
<b>KCl</b> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	40	74,55	2,98
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland)	250	84,01	21,00
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	12,5	137,99	1,72

*Tabelle 3: Zusammensetzung der aCSF-Stammlösung für ein Zielvolumen von 1000ml.*

Bei den drei weiteren Stammlösungen handelte es sich um Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) und Glukose. Jeweils 100ml dieser Lösungen wurden, wie in Tabelle 4 gezeigt, hergestellt und wiederum in doppelt destilliertem Wasser bis zum Erreichen des gewünschten Volumens gelöst. Die Lagerung erfolge äquivalent zur aCSF-Stammlösung.

<b>CaCl<sub>2</sub>-, MgCl<sub>2</sub>-, Glukose-Stammlösung auf 100ml</b>			
<b>Substanz</b> (Hersteller)	<b>Konzentration</b> [mM]	<b>Molekulargewicht</b> [g/mol]	<b>Masse</b> [g]
<b>CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat</b> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1000	147,02	14,70
<b>MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1000	203,30	20,33
<b>Glukose-Monohydrat</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	2000	198,17	39,63

*Tabelle 4: Zusammensetzung der CaCl<sub>2</sub>-, MgCl<sub>2</sub>- und Glukose-Stammlösungen auf ein Zielvolumen von 100ml.*

Tagesaktuell, zu Beginn eines jeden Versuchstages, wurden auf Grundlage der beschriebenen Stammlösungen zwei aCSF-Lösungen hergestellt. Die beiden Lösungen unterschieden sich hierbei in der Ionenzusammensetzung sowie in der Temperatur. Dabei erfolgte die Herstellung von 500ml einer Präparationslösung entsprechend Tabelle 5. Diese wurde in einem Eisbad auf eine Temperatur von 2 bis maximal 5°C gekühlt. Eine Begasung der Lösung mit Carbogen (95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid) wurde über den gesamten Zeitraum ab der Herstellung gewährleistet. Nach mindestens 30 Minuten Kühlung und Begasung erfolgte die Adjustierung des pH-Wertes.

aCSF-Präparationslösung auf 500ml		
Substanz	Konzentration [mM]	Volumen [ml]
NaCl	125	
KCl	4	50
NaHCO <sub>3</sub>	25	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	
CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat	0,5	0,25
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	6	3
Glukose-Monohydrat	10	2,5

Substanz	Konzentration [mM]	Volumen [ml]
NaCl	125	
KCl	4	50
NaHCO <sub>3</sub>	25	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	
CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat	0,5	0,25
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	6	3
Glukose-Monohydrat	10	2,5

Tabelle 5: Zusammensetzung der aCSF-Präparationslösung auf ein Zielvolumen von 500ml.

Als zweite Lösung für das Experiment erfolgte die Herstellung von 1000ml einer aCSF-Messlösung (siehe Tabelle 6). 2 x 200ml dieser Lösung wurden in zwei Bechergläser (à 250ml) gefüllt und bei Raumtemperatur mit Carbogen begast. Sie dienten für die spätere Adaptation der Hirnschnitte. Die verbliebenen 600ml der aCSF-Messlösung wurden in einem Wasserbad (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) von 37°C erwärmt und ebenso mit Carbogen begast. Auch hier erfolgte eine Erwärmung und Begasung der Lösungen von mindestens 30 Minuten vor der pH-Wert-Einstellung.

aCSF-Messlösung auf 1000ml		
Substanz	Konzentration [mM]	Volumen [ml]
NaCl	125	
KCl	4	100
NaHCO <sub>3</sub>	25	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	
CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat	2	2
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	1	1
Glukose-Monohydrat	10	5

Substanz	Konzentration [mM]	Volumen [ml]
NaCl	125	
KCl	4	100
NaHCO <sub>3</sub>	25	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	
CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat	2	2
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	1	1
Glukose-Monohydrat	10	5

Tabelle 6: Zusammensetzung der aCSF-Messlösung auf ein Zielvolumen von 1000ml.

Zur Adjustierung des pH-Wertes wurde eine pH-Elektrode verwendet (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Der angestrebte pH-Wert aller Lösungen lag bei 7,4, um eine Anpassung an den physiologischen pH *in vivo* zu erzielen. Zum Erreichen des Zielwertes wurden die starke Säure HCl [2M] (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) sowie NaOH [1M] als Base (Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland) verwendet.

### 3.3.2 Noradrenalin

Zur Durchführung einer Vitalitätskontrolle am Ende jedes Experiments wurde eine Noradrenalin-Lösung verwendet. Die Herstellung der Lösung erfolgte aus pulverförmigem Noradrenalin (NA) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA/Steinheim, Deutschland), das gekühlt bei 4°- 6°C gelagert wurde. 2mg dieses NA-Feststoffes wurden abgewogen und mit 2ml NaCl (0,9%) zur Lösung gebracht. Anschließend erfolgte die Lagerung der NA-Lösung in einem entsprechenden Aliquot bei 4°- 6°C.

## 3.4 Substanzen

### 3.4.1 TTX

Tetrodotoxin (TTX) ist ein bekannter Hemmstoff spannungsgesteuerter Natriumkanäle und verhindert durch Bindung an die entsprechenden Kanäle eine Depolarisation und Verbreitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen, was zu einem Verlust der Erregbarkeit führt (Bane et al. 2014). Auf Grundlage des Feststoffes Tetrodotoxin citrate (M=319,27 g/mol; Biotrend Chemicals AG, Wangen/Zürich, Schweiz) wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2mM hergestellt. Hierzu wurde das hydrophile TTX in 1,556ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösung wurde anschließend zu jeweils 100µl in 0,5ml Eppendorf-Tubes aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Um im Experiment die Endkonzentration von 1µM zu erreichen, wurden die 100µl der TTX-Lösung mit 200ml der aCSF-Messlösung versetzt.

### 3.4.2 PDP

*Propentdyopents* (PDPs, M=319,13 g/mol) sind Zwischenprodukte der oxidativen Bilirubin-Spaltung und damit direkte Vorstufen der *Bilirubin Oxidation End Products* (BOXes). Sie liegen in unterschiedlichen Isomeren vor. In dieser Arbeit wurden sowohl die Isomere Z-PDP A1/A2 (nachfolgend als PDP A bezeichnet) als auch Z-PDP B1/B2

(nachfolgend als PDP B bezeichnet) untersucht. Zum Einsatz kamen die isolierten Formen von PDP A und PDP B.

Die Herstellung der PDPs erfolgte durch Herrn Marcel Ritter in Zusammenarbeit mit Herrn Hannes Richter vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena (IAAC).

Als Ausgangssubstanz der PDP-Gewinnung diente Bilirubin. 5g des Bilirubins (8,6 mmol) wurden zunächst für 24 Stunden in Natronlauge von 5M (2,5l) gelöst. Es folgte eine Adjustierung des pH auf 7,5 mithilfe von HCl [2M]. In einem Zeitraum von 4 Stunden wurde eine 50%ige Wasserstoffperoxid-Lösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 1% zu erreichen. Anschließend wurde das Gemisch über 20 Stunden gerührt. Die PDPs konnten mithilfe einer Festphasenextraktion (*hydrophilic lipophilic balanced* Kartuschen) aus der wässrigen Phase extrahiert werden. Daraufhin folgte die Trocknung der Einzelisomere in einer Vakuumzentrifuge. Die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde mit einer HTEC C18-Säule (5µm, 250 x 16mm, Macherey Nagel) und SPD-10AV UV/Vis-Detektion bei 280nm durchgeführt. Im direkten Anschluss an die Chromatographie erfolgte ein Gefrieren der HPLC-Fractionen mit flüssigem Stickstoff (-196°C). Somit sollte eine Isomerisierung der Einzelisomere zu ihren jeweiligen Konstitutionsisomeren verhindert werden. Zur Gewährleistung der Reinheit der Einzelisomere erfolgte eine erneute Trocknung. Die stabilen Einzelisomere wurden folglich in den gewünschten Mengen und Konzentrationen in Falcon-Tubes aufgeteilt. Hierbei wurde die Menge pro Falcon-Tube so gewählt, dass im Experiment nach Lösung des PDP-Feststoffes in 30ml aCSF-Messlösung eine Endkonzentration von 0,5µM erreicht war. Die Lagerung der lichtgeschützten Falcon-Tubes erfolgte gekühlt bei 4°- 6°C.

### 3.4.3 BOX

*Bilirubin Oxidation End Products* (BOXes, M=179,2 g/mol) stellen das endgültige Abbauprodukt des oxidativen Bilirubinabbaus dar. Die Unterscheidung der BOXes erfolgt anhand verschiedener Isomere Z-BOX A1/A2 (nachfolgend BOX A genannt) und Z-BOX B1/B2 (nachfolgend BOX B genannt).

Die beginnenden Schritte der Herstellung von BOXes verliefen äquivalent zum oben beschriebenen Pfad der PDP-Gewinnung. Nach dem 20-stündigen Rühren des Gemisches wurden BOXes durch die Zugabe von Chloroform vom Hämoglobin extrahiert. Nach Auftragen der wässrigen Phase der Chloroform-Extraktion erfolgte

eine Waschung mit Wasser. Für die anschließende Auswaschung der Intermediate wurde ein Gemisch von Acetonitril und Wasser im Verhältnis von 1:4 verwendet. Die folgenden Schritte der Herstellung und Trocknungsprozesse entsprachen wiederum der bereits beschriebenen PDP-Herstellung.

Die Menge an BOX A oder B pro Falcon-Tube ermöglichte nach Lösung in 30ml aCSF-Messlösung eine Endkonzentration von 5 $\mu$ M. Äquivalent zu den PDPs wurden BOXes ebenfalls in lichtgeschützten Falcon-Tubes bei einer Temperatur von 4°- 6°C gelagert. Neben den Versuchsansätzen mit isolierten PDP oder BOX-Isomeren erfolgten außerdem Experimente mit einer Kombination der Substanzen PDP A und BOX A. Hierbei ist zu beachten, dass die Konzentration von PDP A und BOX A im Falcon Tube so gewählt wurde, dass nach Lösung in 30ml aCSF-Messlösung Endkonzentrationen von PDP A (0,5 $\mu$ M) und BOX A (5,0 $\mu$ M) erreicht wurden.

#### **3.4.4 NS1619**

Das Benzimidazolone NS1619 ist ein Öffner der BK-Kanäle (Tang et al. 2003). Zur Herstellung einer 10mM NS1619-Stammlösung wurden 5mg des pulverförmigen NS1619 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA/Steinheim, Deutschland) in 1,380ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA/Steinheim, Deutschland) gelöst. Die Stammlösung wurde in 90 $\mu$ l Aliquots aufgeteilt und diese lichtgeschützt bei einer Temperatur von 4°- 6°C aufbewahrt. Durch die Lösung eines Aliquots der NS1619-Stammlösung in 30ml der aCSF-Messlösung ergab sich eine Endkonzentration von 30 $\mu$ M NS1619 im Experiment.

### **3.5 Teilprojekt 1 und 2**

#### **3.5.1 Hirnschnittpräparation**

Zunächst wurde das Versuchstier in einer Glasglocke mittels 0,3ml Isofluran (1 ml/ml, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) inhalativ anästhesiert. Nach Einsetzen der Schnappatmung wurde das Tier entnommen und Erfolg und Tiefe der Anästhesie mittels eines negativen Zehenzwischenreflexes bestätigt. Es folgte die Dekapitation des Tieres mithilfe einer Schere. Im Anschluss wurden Haut und Fell vom Schädel der Maus mithilfe einer kleinen Schere entfernt. Bei juvenilen Tieren erfolgte die Entfernung unter Raumluft. Bei den adulten Tieren wurde dies bereits in einer Petrischale vorgenommen, welche mit eiskalter aCSF-Präparationslösung gefüllt war, um das Gehirn schneller abzukühlen und damit der höheren Ischämiegefahr der

adulten Tiere vorzubeugen. Nach vollständiger Entfernung des Fells und der Kopfhaut wurde der Schädel in eine Präparationsschale mit kalter aCSF-Präparationslösung transferiert und mithilfe einer spitzen Pinzette durch beide *Orbitae* fixiert. Die weitere Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Auflicht-Stereo-Mikroskops (Kaps SOM 82, Karl Kaps GmbH & Co. KG, Aßlar, Deutschland). Zunächst wurde die intakte Schädelkalotte mithilfe einer Federschere über dem okzipitalen Teil des Schädels, am Übergang der *Sutura lambdoidea* zur *Sutura sagittalis* eröffnet (Abbildung 8, Nr. 1). Daraufhin erfolgte ein Schnitt entlang der *Sutura sagittalis* nach frontal bis auf Höhe der *Sutura coronaris* (Nr. 2). Es folgten vier Schnittführungen nach lateral entlang der *Suturæ coronaris* (Nr. 3) und *lambdoidea* (Nr. 4) in beide Richtungen bis zur Schädelbasis. Nun konnte die Schädelkalotte beidseitig nach lateral abgeklappt und gänzlich entfernt werden (Nr. 5), um eine Verletzung des Hirnparenchyms durch die scharfen Schnittkanten zu vermeiden. Auch der verbliebene okzipitale Anteil des Schädelknochens wurde nach kaudal geklappt, sodass das Gehirn vollständig freigelegt war. Mithilfe eines Skalpells (Präzisa Fig. 20, Dahlhausen Medizintechnik GmbH) wurde das Gehirn nach okzipital vom Kleinhirn und nach frontal vom frontalen Pol durch eine gerade Schnittführung abgetrennt.

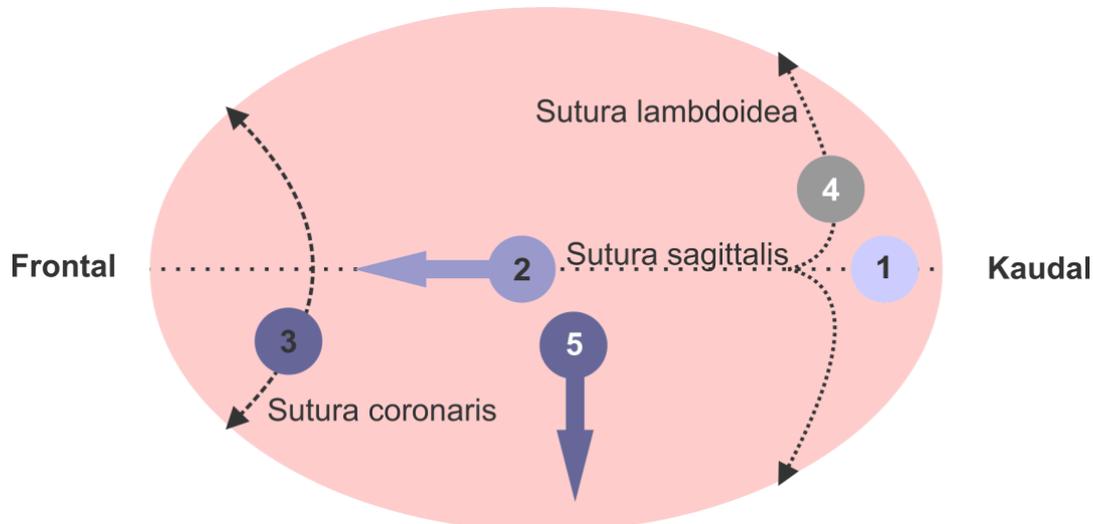


Abbildung 8: Präparationsschritte des Mausschädels: Eröffnung der Schädelkalotte (1), Längsschnitt entlang der *Sutura sagittalis* (2), laterale Schnitte entlang der *Sutura coronaris* (3) und *Sutura lambdoidea* (4) beidseits, Abklappen der Kalottenhälften nach lateral (5).

Das separierte Gehirn konnte mit einem Spatel aus dem verbliebenen Schädelknochen befreit und auf die Präparate-Platte des Vibrotoms (Leica VT1200 S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Deutschland) transferiert werden. Die Fixierung auf dieser Platte erfolgte mit handelsüblichem Sekundenkleber (UHU GmbH

& Co. KG; Bühl, Deutschland). Zur Optimierung der Fixation wurde das Gehirn zuvor mithilfe von Filterpapier von überschüssiger Präparationslösung befreit. Die Fixation erfolgte frontalseitig, sodass der Hirnstamm nach oben zeigte. Die Platte wurde anschließend unverzüglich in die Kammer des Vibrotoms eingebracht und diese mit eiskalter Präparationslösung befüllt.

Das Vibrotom wurde stets vor Beginn der Präparation mit einer neuen Schnittklinge (Superior Stainless Steel Double Edge, Astra) ausgestattet und adjustiert. Die Parameter wurden auf eine Vorschubgeschwindigkeit von 0,12mm/s, eine Schnittdicke von 350µm und eine Amplitude von 1mm eingestellt.

Nach Verwerfung des ersten Hirnschnitts, aufgrund unbekannter Dicke, wurden in der Regel acht Hirnschnitte angefertigt, die sofort in ein Becherglas transferiert wurden (zwei Bechergläser à 4 Hirnschnitte). Die Bechergläser waren hierbei mit raumtemperierter aCSF-Messlösung gefüllt und dauerhaft mit Carbogen begast und ermöglichten somit eine Adaptation der Hirnschnitte an die Temperatur bzw. die geänderte Ionenzusammensetzung im Vergleich zur Präparationslösung. Die Zeitdauer der Adaptation umfasste mindestens 30 Minuten.

### **3.5.2 Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie**

Nach Ablauf der Adaptationszeit erfolgte die mikroskopische Betrachtung der Hirnschnitte. Hierzu wurde ein Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop (DIC) (Eclipse FN 1, Nikon Instruments, Tokio, Japan) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Nikon LWD 16x/0.80W DIC N2, Nikon Instruments, Tokio, Japan) verwendet.

Das mikroskopische Bild wurde mit einer Kamera (C7500-11, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) mit Videoverstärker und Vergrößerungsfaktor aufgenommen. Mittels eines Analog-Digital-Wandlers (C2400-60, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) wurde das analoge Bild auf einen herkömmlichen Computer übertragen und über das Computerprogramm View Creator Pro (Version 1.7.3.0401, AdLink, Neu-Taipeh, Taiwan) auf dem Bildschirm betrachtet.

Nach Ablauf der Adaptationszeit der Hirnschnitte in den Bechergläsern wurde jeweils ein Hirnschnitt in die Messkammer des DIC-Mikroskops überführt. Die Messkammer wurde hierbei kontinuierlich mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Modell: PLP380, Behr Laborschlauchpumpe, Seriennummer 160100011, Düsseldorf, Deutschland) mit warmer aCSF-Messlösung von ca. 35°C mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min (27rpm) perfundiert. Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wurde das

Schlauchsystem zusätzlich über ein Wärmesystem/Temperaturregler (Badcontroller V, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland) auf 32,5°C adjustiert.

Es erfolgte die Suche nach einem geeigneten Gefäßanschnitt einer penetrierenden Arteriole in Schicht II/III des zerebralen Kortex. Die Arteriolen mit einem Durchmesser von mindestens 15µm verliefen im besten Fall senkrecht zur Kortexoberfläche und ließen sich bis in Kortexschicht VI nachverfolgen (Abbildung 9). Sowohl Vorder- als auch Rückseite des Hirnschnitts wurden bei der Gefäßsuche berücksichtigt.

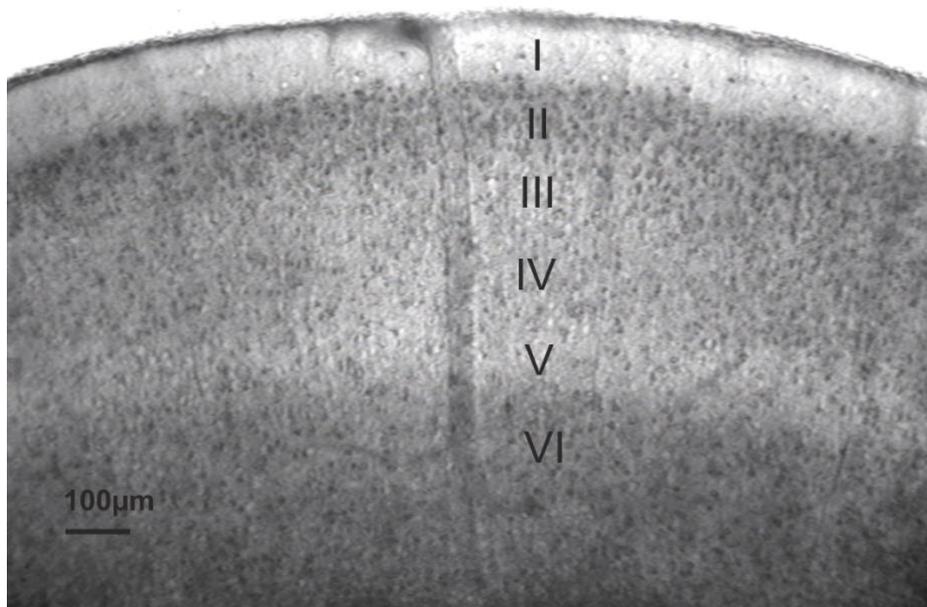


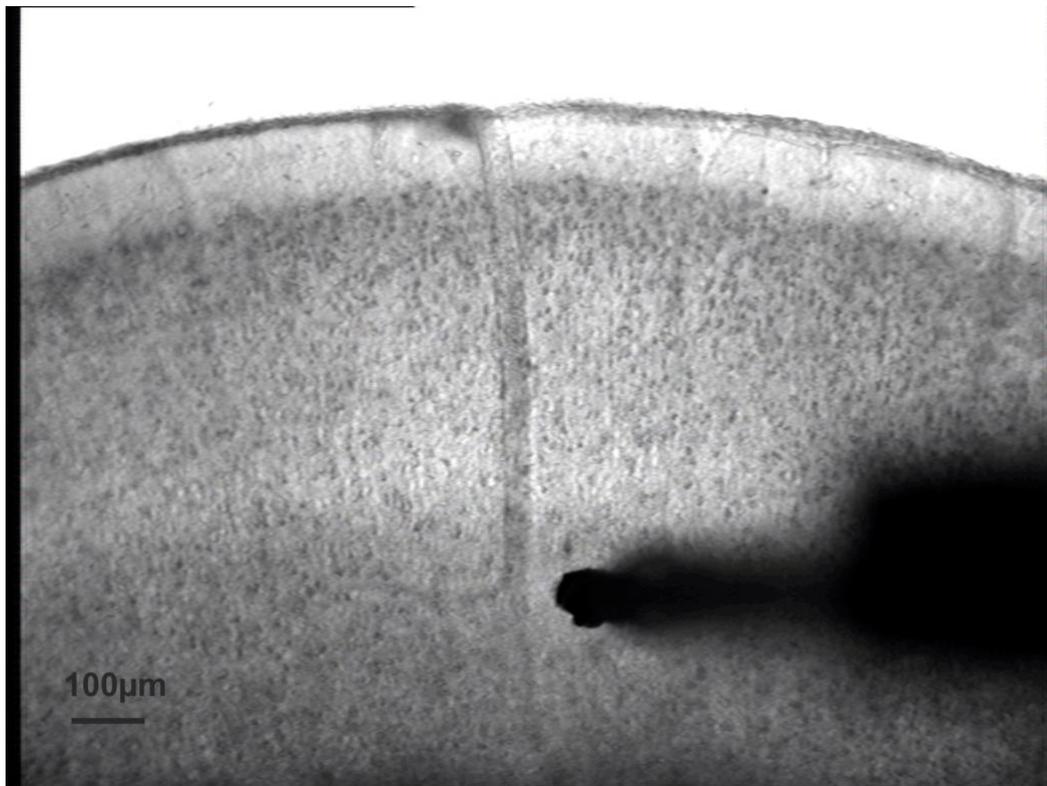
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Kortexschichten I-VI des Maushirns.

### 3.5.3 Versuchsdesign und -ablauf

Zur elektrischen Stimulation wurde eine extrazelluläre konzentrische Stimulationselektrode (Mini 25, ZR, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) verwendet. Die Elektrodenspitze wurde im Vorfeld in einem Winkel von etwa 90° gebogen, sodass die Elektrode senkrecht von oben in das Hirnparenchym an der ausgewählten Stelle eingestochen werden konnte.

Hierzu wurde der Hirnschnitt optimal unter dem Mikroskop ausgerichtet, sodass die Arteriole möglichst senkrecht im Bild verlief. Anschließend konnte die extrazelluläre konzentrische Stimulationselektrode in der nahen Umgebung des Gefäßes positioniert werden. Hierzu wurde die Arteriole bis in Schicht VI des zerebralen Kortex nachverfolgt und eine Positionierung der Elektrode in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gefäß angestrebt, wobei ein direkter Kontakt zum jeweiligen Gefäß oder möglichen

Gefäßabgängen vermieden wurde. Die Elektrode wurde schrittweise mit langsamer Geschwindigkeit in das Hirnschnittgewebe abgesenkt, bis ein Einstich der Elektrodenspitze unter dem Mikroskop zu erkennen war (Abbildung 10).



*Abbildung 10: Aufnahme der Elektrodenpositionierung in Kortexschicht VI in Nachbarschaft zu einer intraparenchymalen Arteriole.*

Die Funktionsfähigkeit der Elektrode wurde an jedem Versuchstag vor Beginn des Experiments überprüft. Nach Positionierung der Elektrode wurde eine Übersichtsaufnahme angefertigt, um den Zustand des Hirnschnitts zu Beginn des Experiments festzuhalten.

Der ausgewählte Gefäßabschnitt in Schicht II/III wurde wieder aufgesucht und mit einer 16-fachen Vergrößerung für den Ablauf des Experiments eingestellt.

Es begann ein 100-minütiger Zeitabschnitt, der zur Einwaschung der Hämoglobinabbauprodukte bzw. der zu untersuchenden Substanz (ab Minute 10) genutzt wurde und gleichzeitig eine Überprüfung der Stabilität des Versuchsaufbaus gewährleistete (Baseline) (Abbildung 11). In dieser Zeit wurden in fünfminütigen Zeitabständen Einzelbilder der Arteriole aufgenommen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Hämoglobinabbauprodukte wurden alle Experimente unter weitgehender Verdunkelung durchgeführt und die Lichtquelle des Mikroskops lediglich für den kurzen Zeitraum der Aufnahmen aktiviert.

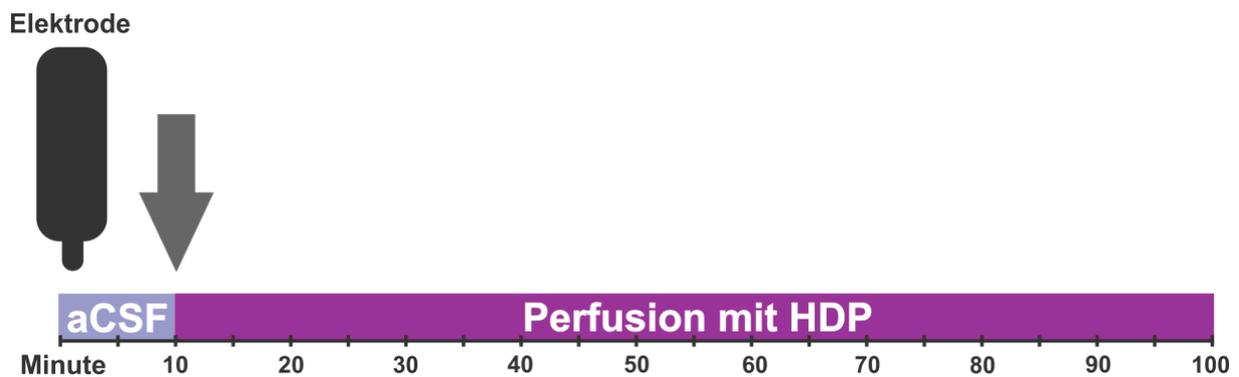


Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf der Baseline: 100-minütige Baseline nach Elektrodenpositionierung mit Einzelbildern des Gefäßes in Intervallen von 5 Minuten; ab Minute 10 (Pfeil) Perfusion des Hirnschnitts mit Hämoglobinabbauprodukt (HDP).

### 3.5.4 Elektrische Stimulation

Die elektrische Stimulation erfolgte mit vier Stimulationsstärken von 2V, 4V, 6V und 8V, die in aufsteigender Intensität appliziert wurden. Der elektrische Stimulus wurde durch einen Pulsstimulator (Isolated pulse stimulator [Modell 2100], A-M-Systems, Sequim, USA) durch eine Pulsfolge von 100 Einzelimpulsen erzeugt. Diese hatten jeweils eine Länge von 200 $\mu$ s bei einer Frequenz von 50Hz, wodurch eine Gesamtlänge der Pulsfolge von 2 Sekunden erreicht wurde.

Vor Beginn jeder Stimulation (definiert als Zeitpunkt 0s) wurden drei Einzelaufnahmen der Arteriole im Abstand von 10 Sekunden zu den Zeitpunkten -30s, -20s und -10s generiert. Somit konnte die Ausgangssituation der Arteriole vor jeder Stimulation bestimmt und eine Baseline für die jeweilige Stimulationsstärke hervorgebracht werden.

Auf die elektrische Stimulation folgte ein Zeitintervall von 10 Minuten zur Beobachtung der dynamischen Gefäßreaktion (Abbildung 12). Hierzu wurden innerhalb der ersten 5 Minuten Einzelbilder im Abstand von 10 Sekunden angefertigt, in den darauffolgenden 5 Minuten vergrößerte sich das Zeitintervall auf 15 Sekunden. Am Ende jeder Stimulationsstärke lagen 54 Aufnahmen des Gefäßes vor.

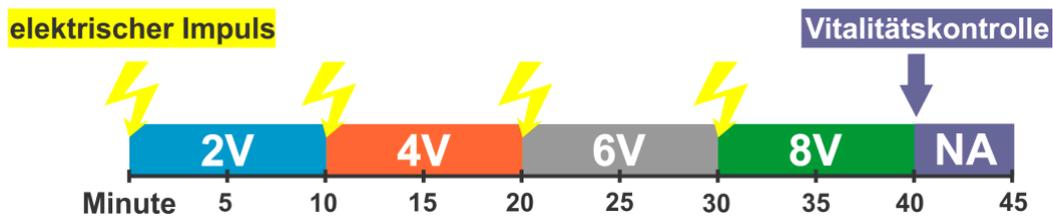


Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der elektrischen Stimulation: elektrischer Impuls in aufsteigenden Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V und 8V), nach jeder Stimulation 10-minütige Beobachtungsphase; Abschluss des Experiments: Vitalitätskontrolle des Gefäßes durch Applikation von 10µl Noradrenalin (NA).

### 3.5.5 Prüfung der Gefäßvitalität

Zum Ende jedes Experiments wurde eine Prüfung der Vitalität der Arteriole vorgenommen. Die Perfusion der Messkammer wurde unterbrochen und 10µl einer Noradrenalin-Lösung hinzugefügt. Es folgte ein 5-minütiger Beobachtungszeitraum, in dem minütlich eine Aufnahme des Gefäßabschnitts erfolgte. Eine positive Vitalitätskontrolle kennzeichnete sich durch eine deutliche Vasokonstriktion. Erfolgte bei der Prüfung keinerlei Gefäßreaktion oder eine Vasodilatation, wurde das jeweilige Experiment aus der Auswertung ausgeschlossen.

### 3.5.6 Auswertung des Gefäßdurchmessers

Die Auswertung der dynamischen Gefäßreaktion auf die elektrische Stimulation wurde mithilfe des Programms Image J (1.52q, Java 1.8.0\_172, 64 bit, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) vorgenommen. Alle aufgenommenen Einzelbilder einer Stimulationsstärke wurden hierzu in das Programm eingefügt und chronologisch entsprechend der zeitlichen Abfolge sortiert. Die Bildqualität konnte durch Anpassung der Kontraststärke verbessert und somit die Auswertung erleichtert werden.

Die Veränderungen des Gefäßdurchmessers wurden anhand eines Gefäßabschnitts von 50µm Länge analysiert. Hierzu wurde die innere Gefäßwand auf drei definierten Messhöhen bestimmt („Point A“ der Werkzeugleiste in Image J) (Abbildung 13).

Die erhobenen Daten wurden in eine Excel-Tabelle überführt. Aus den Werten einer Messhöhe wurde der innere Gefäßdurchmesser an dieser Stelle bestimmt und schließlich die Werte der drei Messhöhen zu einem Gesamtdurchmesser für jedes Bild gemittelt. Somit konnte für jeden Messzeitpunkt ein mittlerer Gefäßdurchmesser bestimmt werden. Durch die Beobachtungsdauer von 600 Sekunden wurde somit die dynamische Gefäßreaktion analysiert.

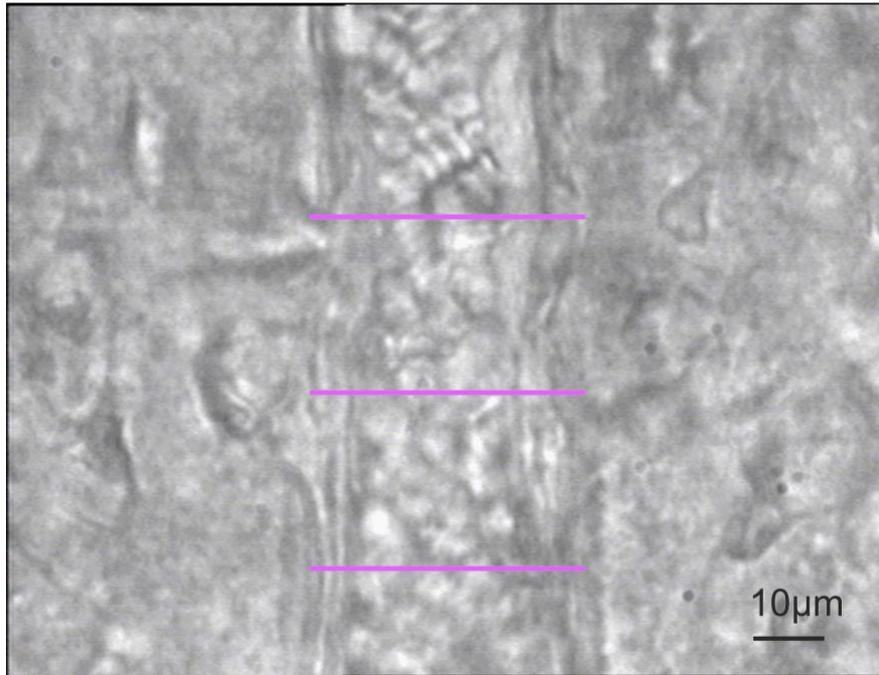


Abbildung 13: Auswertung des inneren Gefäßdurchmessers einer intraparenchymalen Arteriole in Kortexschicht II/III auf drei definierten Messhöhen (violette Querstriche) über einen Abschnitt von 50 µm.

### 3.5.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung und Generierung der Grafiken wurde das Programm OriginPro 2021 verwendet.

Zur Evaluation der Ergebnisse wurden im Vorfeld bestimmte Ein- und Ausschlusskriterien definiert, die für eine möglichst hohe Validität der Ergebnisse sorgen und statistische Verzerrungen verhindern sollten. Ein Einschluss der experimentell erhobenen Daten in die Auswertung fand nur statt, wenn der Gefäßdurchmesser der Arteriole im Mittel größer als 15µm maß. Außerdem wurden alle Tiere ausgeschlossen, die zum Ende des Experiments keine positive Vitalitätskontrolle auf Noradrenalin zeigten. Diskrepanzen der Nachgenotypisierung zum initial bestimmten Genotyp hätten zu einem Ausschluss des jeweiligen Versuchstieres geführt, kamen aber in diesen Experimenten nicht vor.

Zur statistischen Auswertung wurde initial betrachtet, ob bei der jeweiligen Stimulationsstärke von 2V, 4V, 6V oder 8V eine Vasokonstriktion über 5% stattgefunden hat. Nur wenn diese Bedingung erfüllt war, wurden die Parameter der dynamischen Gefäßantwort  $\tau$ ,  $A1$  und  $AUC$  eingeschlossen. Die Amplitude der Gefäßreaktion wurde auch bei einer geringeren Kontraktion (< 5%) eingeschlossen,

um eine Überschätzung der Vasokonstriktion einer Versuchsgruppe zu vermeiden. Der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation (Sekunde 0) wurde bestimmt, konnte allerdings nur in die Auswertung einfließen, wenn dieser >70s und <350s maß. Bei dieser Grenzwertsetzung wurde davon ausgegangen, dass Kontraktionen außerhalb dieses Zeitraums nicht durch die elektrische Stimulation verursacht wurden, sondern vielmehr als Artefakte anderer Einflussfaktoren galten. Ein weiteres Ausschlusskriterium für die Parameter der Zeitkonstante  $\tau$ ,  $A1$  und  $AUC$  stellte eine Zeitkonstante  $\tau$  von >2500s dar. Die Berechnung von  $\tau$  erfolgte über die Ermittlung einer exponentiellen Kurve (fit), die möglichst eng an den Verlauf der Gefäßaufweitung nach Kontraktion angepasst wurde:  $y = y_0 + A1 \times \left(1 - e^{\left(-\frac{(x-x_0)}{\tau}\right)}\right)$ . Bei extrem hohen Werten für die Zeitkonstante  $\tau > 2500s$  war diese Art der Berechnung nicht mehr geeignet, da es sich augenscheinlich nicht mehr um einen exponentiellen Verlauf der Gefäßaufweitung, sondern vielmehr um eine annähernd lineare Kurve handelte.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse umfasste verschiedene definierte Parameter, um die Charakteristiken der dynamischen Gefäßreaktion möglichst ganzheitlich abzubilden (Abbildung 14). Betrachtet wurden hierbei die Amplitude der maximalen Gefäßkontraktion nach elektrischer Stimulation und der Zeitpunkt dieser maximalen Kontraktion. Außerdem erfolgte eine Berechnung der Zeitkonstante  $\tau$  (wie bereits beschrieben), welche den zeitlichen Verlauf der Gefäßaufweitung nach stattgefundenener Kontraktion erfasst. Um zu evaluieren, in welchem Umfang die Gefäßrelaxation nach der Kontraktion stattfindet, wurde der Parameter  $A1$  berücksichtigt.

Um die genannten Parameter durch einen einzelnen Wert zu erfassen, wurde die *area under the curve* ( $AUC$ ) berechnet:  $\frac{1}{2} \times (x_1 + x_2) \times (t_2 - t_1)$ .

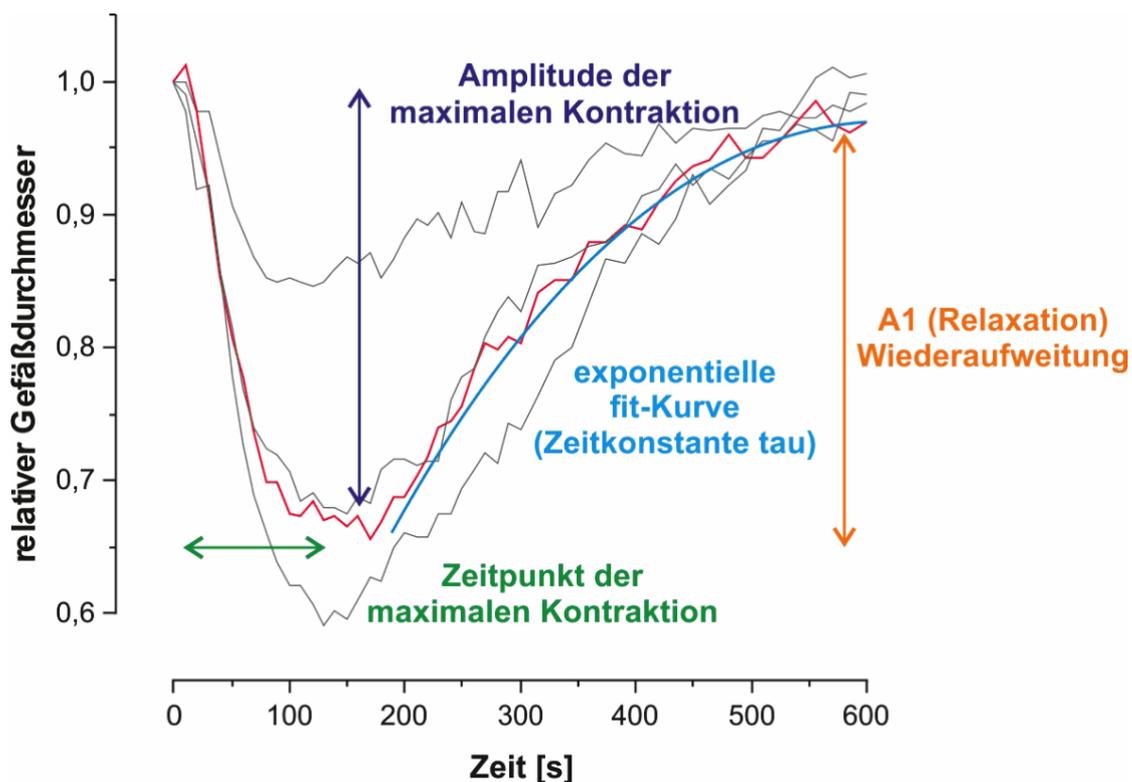


Abbildung 14: Schematische Erläuterung der Auswertungsparameter der Teilprojekte 1 und 2 anhand einer exemplarischen Gefäßreaktion (rote Kurve): Zeitpunkt der maximalen Kontraktion (grün), Amplitude der maximalen Kontraktion (violett), exponentielle Fit-Kurve zur Berechnung der Zeitkonstante tau (cyanblau), A1 – Aufweitung des Gefäßes nach Kontraktion (orange).

Zur Signifikanztestung wurde das Programm SPSS Statistics (Version 27.0.0.0) verwendet. Es erfolgte die statistische Analyse mittels verallgemeinerter Schätzungsgleichungen in einem linearen Modell. Hierbei wurde der zu untersuchende Parameter im Hinblick auf die Prädiktoren Alter, Interventionsgruppe und Spannung betrachtet. Es wurden entweder einfache Vergleiche vorgenommen (bei Interventionen und Alter) mit Bezug auf eine Referenzgruppe bzw. einen Referenzparameter oder paarweise Vergleiche (Stimulationsstärken), um alle Variablen der Betrachtung gegeneinander zu vergleichen. Die Auswertung des zweiten Teilprojekts umfasste für die Parameter *tau*, *AUC* und *A1* explorative Datenanalysen, die eine rein deskriptive Beschreibung der erhobenen Daten ermöglichten. Aufgrund des eingeschränkten Datenumfangs wurde hierbei auf eine statistische Auswertung der genannten Parameter verzichtet.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Alle Werte, die unterhalb dieses Niveaus lagen, wurden damit als statistisch signifikant gewertet. Die Angabe der Anzahl *n* der eingeflossenen Daten erfolgte in zwei verschiedenen Formen. Die Größe

$n_a$  = *animals* (Dt. Tiere) gab demnach die Anzahl der Tiere der entsprechenden Versuchsgruppe an. Die Bezeichnung  $n_s$  = *stimulation* (Dt. Stimulation) bezog sich auf die Anzahl der Stimulationen, die in die Auswertung eingeflossen sind. Diese entspricht allerdings nicht der Anzahl der Tiere, da pro Versuchstier mehrere Stimulationen (max. 4) in die Auswertung eingeflossen sind.

Die Ergebnisdarstellung erfolgte stets unter Angabe der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die Diagramme wurden mithilfe des Programms OriginPro 2021 erstellt und anschließend mit CorelDRAW X7 bearbeitet.

### **3.6 Teilprojekt 3**

#### **3.6.1 Versuchstiere**

Wie bereits bei Teilprojekt 1 und 2 dienten Slo 1-Wildtyp-Mäuse als Versuchstiere (Slo 1 +/+). Zu Verwendung kamen in diesem Fall ausschließlich adulte Tiere, die ein Alter von mindestens 60 Tagen erreicht hatten. Die Haltung der Versuchstiere und Rahmenbedingungen entsprachen den bereits beschriebenen Gegebenheiten. Die Versuchsreihe war mittels eines Tierversuchsantrags (Kurztitel: Zerebrale und retinale Gefäßregulation) genehmigt und durch die Lizenznummer UKJ19-029 legitimiert.

#### **3.6.2 Versuchsdesign und –ablauf**

Die eingeschlossenen 20 Tiere wurden in vier Kohorten à 5 Tiere aufgeteilt und mit verschiedenen Interventionen behandelt. Es erfolgte bei allen Tieren zunächst ein operativer Eingriff zur Freilegung der *Cisterna magna* und intrathekalen Applikation der zu untersuchenden Substanzen PDP A+B, BOX A+B oder venöses Eigenblut mit jeweils 30 $\mu$ l. Als Kontrolle diente eine *sham*-Kohorte. Die Tiere dieser Gruppe erhielten die gesamte Prozedur des operativen Eingriffs inklusive Punktion der *Cisterna magna*, allerdings ohne Injektion einer Substanz. Auf die Operation folgte eine 28-tägige Beobachtungszeit, in der das Verhalten und die Belastung der Tiere täglich anhand eines erstellten *Score-Sheets* (gemäß der Vorgaben des Tierversuchsantrags UKJ-19-029) beurteilt wurden. Zusätzlich erfolgte eine tägliche Gewichtskontrolle. An den postinterventionellen Tagen 1 und 2 erhielten alle Tiere das Analgetikum Meloxicam (cp-pharma, 0,5 mg/ml Suspension, Burgdorf, Deutschland) in gewichtsadaptierter Konzentration und die Wundheilung der Inzisionsstelle wurde kontrolliert. An Tag 28 *post interventionem* erfolgte, nach abschließender Gewichtskontrolle und Scoring, die Tötung der Tiere mit dem Ziel der Organentnahme des Gehirns. Dieses wurde fixiert

und kryokonserviert, bevor Hirnschnitte angefertigt wurden. Die Hirnschnitte wurden durch ein Färbeverfahren mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und anschließend unter einem Laser-Scan-Mikroskop betrachtet und ausgewertet.

### **3.6.3 Operative Freilegung der Cisterna magna – intrathekale Applikation**

60 Minuten vor der Durchführung des operativen Eingriffs wurde das Verhalten aller Tiere eingestuft, das Gewicht ermittelt und eine perorale analgetische Prämedikation mit Meloxicam vorgenommen. In einer Inhalationskammer erfolgte die fünfminütige Einleitung der Anästhesie mittels eines Verdampfers (Vapor 19.3, Abbott, Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland) mit 3%igem Isofluran (1 ml/ml, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland). Im Anschluss wurde die Konzentration des Anästhetikums auf 2,5% für weitere 3 Minuten reduziert. Das anästhesierte Tier wurde daraufhin in den OP-Bereich transferiert und die Anästhesie dort inhalativ mit 2%igem Isofluran aufrechterhalten. Die Sauerstoffflussrate und Raumluffflussrate betrug jeweils 150 ml/min (Gasgemischeinheit FMI, Föhr Medical Instruments GmbH, Serien-Nr. 150222). Auf dem gewärmten OP-Tisch wurde die Maus anschließend fixiert und mit Viscophthal-Augensalbe (2mg Carbomer pro 1g Augensalbe, Bausch, Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin) versorgt, um ein Austrocknen der Bulbi während der OP zu verhindern. Anschließend erfolgte die Rasur des OP-Gebietes am Hinterhaupt zwischen Ohren und Nacken mit anschließender Desinfektion. Zur Sicherstellung der Anästhesiequalität erfolgte vor Beginn des invasiven Eingriffs die negative Kontrolle des Zehenzwischenreflexes am Hinterlauf. Bei erloschenem Reflex wurde daraufhin die Inzisionsstelle mit Lidocain (Lidocainhydrochlorid 2%, 20,0 mg/ml Injektionslösung, bela-pharm) subkutan unterspritzt.

Der operative Eingriff erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (ZEISS Stemi 305 trino, ZEISS, Serien-Nr. 3947000499). Zunächst erfolgte eine Mittellinieninzision von nasal nach okzipital durch Fell und Haut des Tieres und daraufhin die Freilegung und Präparation der *Cisterna magna*. Zu diesem Zweck wurde mithilfe von 3-0-Ethicon-Fäden die oberflächliche Nackenmuskulatur lateral fixiert, um einen freien Zugang zur *Cisterna magna* zu ermöglichen. Zum Erhalt der Gewebsfeuchtigkeit im OP-Gebiet wurde dieses mit 0,9% NaCl befeuchtet. Im weiteren Verlauf erfolgte die Punktion der *Cisterna magna* mit einer 30G-Kanüle und 30µl des entsprechenden Hämoglobinabbauprodukts bzw. des Eigenbluts wurden

mithilfe einer Injektionspumpe (Aladdin single syringe pump 220V, World Precision Instruments Germany GmbH, AL-1000, Serien-Nr. 302740) in einer Geschwindigkeit von 15 µl/min linksseitig injiziert.

Die Eigenblutentnahme erfolgte intraoperativ vor der Injektion durch Punktion der lateralen Schwanzvenen.

Nach erfolgreicher Injektion konnte die Anästhesie auf 1,5% reduziert werden und es folgte eine fünfminütige Wartezeit, um eine adäquate Verteilung der injizierten Flüssigkeit im Liquorraum zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Kanüle vorsichtig aus der *Cisterna magna* entfernt, die Nackenmuskeln wurden von ihrer lateralen Fadenfixierung befreit und die anatomischen Verhältnisse wiederhergestellt. Die Wundränder wurden adaptiert und mittels eines 5-0-Ethicon-Fadens mit Einzelknopfnähten verschlossen. In der Regel waren hierzu fünf Stiche notwendig. Nach Beendigung des operativen Eingriffs wurden die Tiere gewogen und zur Regeneration in den Heimatkäfig versetzt sowie mit Nassfutter *ad libitum* versorgt.

### **3.6.4 Hirnpräparation**

Die Tötung der Versuchstiere und Präparation der Gehirne erfolgte am postoperativen Tag 28. Dabei entsprach das Vorgehen bei Freilegung des Gehirns weitgehend der Beschreibung des Teilprojekts 1 und 2.

In einer Glasglocke wurde das Tier zunächst mittels 0,3ml Isofluran (1 ml/ml, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) *per inhalationem* anästhesiert. Nach Einsetzen der Schnappatmung und negativer Kontrolle des Zehenzwischenreflexes erfolgte die Dekapitation des Tieres mithilfe einer Schere. Anschließend wurde die Schädelkalotte eröffnet und die *Dura mater* entfernt, sodass das Gehirn schließlich frei lag. Das Gehirn konnte daraufhin herausgeholt und für das weitere Vorgehen fixiert werden.

### **3.6.5 Kryokonservierung und Hirnschnittverfahren**

#### Lösungen für die Fixierung und Kryokonservierung

Verschiedene Lösungen waren für die Fixierung und Kryokonservierung der Hirne notwendig und wurden im Vorfeld vorbereitet.

Die PBS-Lösung wurde auf der Basis von 2500ml einfach destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) hergestellt. Zu diesem wurden 87,5ml der Stock 2-Säure gegeben. Anschließend erfolgte die Titration der Lösung auf einen pH von 7,4. Hierzu wurden ca. 400ml der Stock 1-Base verwendet. Im letzten Schritt wurde die Lösung mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt bis

ein Zielvolumen von 5000ml erreicht war. Die Zusammensetzung der Stock 1-Base und Stock 2-Säure können der Tabelle 7 entnommen werden.

<b>PBS-Lösung</b>		
<b>Stammlösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Stock 1-Base</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhyd	42,588g
	NaCl	238,435g
	dH <sub>2</sub> O	Ca. 3000ml
<b>Stock 2-Säure</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	41,397g
	NaCl	238,434g
	dH <sub>2</sub> O	Ca. 3000ml

*Tabelle 7: Zusammensetzung der PBS-Lösung.*

Für die Herstellung der Saccharose-Lösung wurde die entsprechende Menge an Saccharose (D(+)-Saccharose, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 50ml PBS gelöst und anschließend durch Hinzugabe weiterer PBS-Lösung auf ein Volumen von 100ml aufgefüllt (Tabelle 8).

<b>Saccharose-Lösung</b>		
<b>Konzentration</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>10%-Lösung</b>	Saccharose	10g
	PBS	100ml
<b>30%-Lösung</b>	Saccharose	30g
	PBS	100ml

*Tabelle 8: Zusammensetzung der Saccharose-Lösung.*

Die Antifreeze-Lösung wurde aus 300ml Ethylglycol (99,5%, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA/Steinheim, Deutschland), 500ml Phosphatpuffer und 0,2g Natriumacid hergestellt. Portionsweise wurden anschließend 150g Glukose (Glucose Monohydrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingerührt und die Lösung mit ca. 200ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt, bis ein Zielvolumen von 1000ml erreicht war (Tabelle 9).

Die Herstellung des Phosphatpuffers erfolgte entsprechend der Mengenangaben in Tabelle 10.

<b>Antifreeze-Lösung (1000ml)</b>	
<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Ethylglycol	300ml
Phosphatpuffer	500ml
Natriumacid	0,2g
Glukose	150g
dH <sub>2</sub> O	Ca. 200ml

*Tabelle 9: Zusammensetzung der Antifreeze-Lösung.*

<b>Phosphatpuffer für Antifreezelösung (1000ml)</b>		
<b>Stammlösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Stock 1 (Base, 500ml)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,098g
	dH <sub>2</sub> O	Ca. 500ml
Stock 2 (Säure, 1000ml)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	13,799g
	dH <sub>2</sub> O	Ca. 1000ml

*Tabelle 10: Zusammensetzung des Phosphatpuffers für die Antifreeze-Lösung.*

### Ablauf der Fixierung und Kryokonservierung

Nach erfolgreicher Entnahme des Maushirns folgte die Fixierung und Kryokonservierung des Organs. Dies wurde in aufeinanderfolgenden Teilschritten durchgeführt. Zunächst wurde das Gehirn direkt nach der Entnahme in ein Falcon-Tube (15ml) transferiert, welches mit 4%igem Formalin (SAV Liquid, F04- 0004%, pH 7,4) befüllt war. Nach 2-3 Tagen wurde das Gehirn in ein weiteres Falcon-Tube mit 10%iger Saccharose-Lösung umgelagert. In der Saccharose-Lösung sanken die Gehirne regelhaft auf den Boden des Tubes ab und konnten anschließend kryokonserviert werden. Dies erfolgte spätestens nach 3 Tagen. Zur Kryokonservierung der Gehirne wurde Methylbutan in Trockeneis auf eine Temperatur von -25°C bis -30°C gekühlt und in dieser Lösung die Gehirne unter Bewegung konserviert. Dieser Schritt dauerte in etwa eine Minute und wurde gefolgt von dem Verpacken der Gehirne und Lagerung dieser bei -80°C.

Zur Anfertigung der Hirnschnitte wurde ein Mikrotom (Microtom HM 450, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) mit einer speziellen Kühleinheit (Microtom KS 34, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) verwendet. Das gefrorene Gehirn wurde

zunächst auf eine Platte geeist, wofür Auffriergel (Tissue-Tek®, Paraform® Tissue Orientation Gels, Sakura Finetek Europe B.V, Alphen aan den Rijn, Niederlande) bei -40°C verwendet wurde. Nach dem Einspannen und Adjustieren der Klinge wurde die Präparateplatte mit dem Gehirn korrekt im Mikrotom positioniert. Anschließend konnten manuell koronare Hirnschnitte einer Dicke von 40µm angefertigt werden. Die Hirnschnitte wurden mit einer Antifreeze-Lösung behandelt. Hierzu wurde eine Zellkulturplatte (TC-Platte 24 Well Standard, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Jede Vertiefung der Platte wurde mit 1ml der Antifreeze-Lösung befüllt und daraufhin die Hirnschnitte mithilfe eines Pinsels in die Vertiefung gesetzt. Pro Vertiefung konnten jeweils 7 Schnitte behandelt werden. Nach Abdeckung der Platte mit Parafilm, erfolgte die Lagerung bei -20°C.

### **3.6.6 Hirnschnittfärbung**

#### Lösungen für die immunhistochemische Färbung

Für den Färbeprozess waren verschiedene Lösungen notwendig, die im Vorfeld vorbereitet wurden (Tabelle 11).

Zunächst erfolgte die Herstellung der TBS 10x – Lösung (engl. *tris-buffered-saline*). Hierfür wurden 264,4g Tris-Hydrochlorid (HCl, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 38,8g der Base Tris-Ultra (Tris Ultra Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 180g NaCl gemischt und mittels HCl auf einen pH von 7,4 titriert. Bis zum Erreichen des Zielvolumens von 2000ml wurde diese Lösung mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die TBS 10x-Lösung konnte mit dH<sub>2</sub>O schließlich für die notwendigen Arbeitsschritte der Färbung verdünnt werden. Hierzu wurde 1 Anteil TBS 10x mit 9 Anteilen dH<sub>2</sub>O vermischt, sodass die Konzentration des TBS auf 1:10 reduziert wurde.

Die TBS-Plus-Lösung wurde aus 100ml TBS, sowie 0,1ml Triton und 3ml Serum hergestellt.

<b>TBS-Lösungen</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>TBS 10x</b>	Tris-Hydrochlorid (HCl)	264,4g
	Tris-Ultra (Base)	38,8g
	NaCl	180g
	dH <sub>2</sub> O	1000ml
<b>TBS (1:10)</b>	TBS 10x	500ml
	dH <sub>2</sub> O	4500ml
<b>TBS Plus</b>	TBS	100ml
	Triton	0,1ml
	Serum	3ml

*Tabelle 11: Zusammensetzung der TBS-Lösungen (TBS 10x, TBS 1:10, TBS Plus).*

Die Gelatine für die Fixierung der Gehirne auf den Objektträger bestand aus 1g Gelatine, 0,1g Chrom-III Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 200ml dH<sub>2</sub>O (Tabelle 12). Diese Substanzen wurden gemischt und nach einer 10minütigen Ruhephase unter ständigem Rühren auf 40°C erhitzt. Anschließend wurde die Gelatine durch ein Sieb in ein Vorratsgefäß transferiert und bei 4°C gelagert.

<b>Gelatine</b>	
<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
dH <sub>2</sub> O	200ml
Gelatine	1g
Chrom-III Kaliumsulfat	0,1g

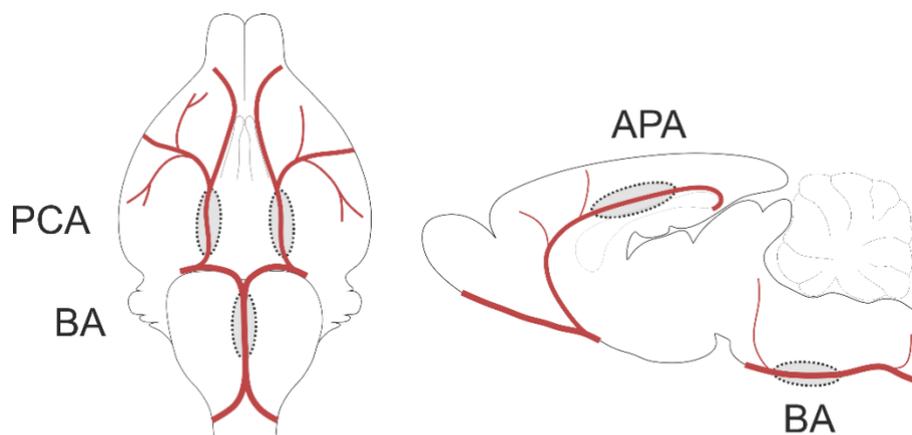
*Tabelle 12: Zusammensetzung der Gelatine*

Zur Färbung und mikroskopischen Auswertung der Gehirnschnitte wurde jeder 6. Schnitt ausgewählt und in ein Sieb transferiert. Durch diese Auswahl konnte ein Überblick über das gesamte Gehirn ermöglicht werden. Zur Entfernung der Antifreeze-Lösung erfolgte zunächst eine Waschung der Hirnschnitte für 6 x 15 Minuten mit TBS-Puffer. Anschließend wurden die Gehirnschnitte für 30 Minuten in TBS Plus inkubiert. Zur immunhistochemischen Färbung wurde der primäre Antikörper anti-SMA rabbit (*anti-alpha smooth muscle actin antibody*, Abcam, ab5694) zu den Hirnschnitten hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Dieser Antikörper wurde zuvor in einer Konzentration von 1:250 in TBS Plus gelöst. Am folgenden Tag erfolgte eine erneute Waschung der Hirnschnitte mit TBS-Puffer für 3 x 10 Minuten zur Entfernung des ungebundenen primären Antikörpers. Äquivalent zum ersten Tag folgte eine 30minütige Inkubation mit TBS Plus, bevor der sekundäre Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit hinzugegeben werden konnte. Als sekundärer Antikörper diente Alexa Fluor 647 *donkey anti rabbit* (Dianova, Jackson ImmunoResearch, 711-606-152), der in einer Konzentration von 1:500 in TBS Plus gelöst wurde. Es folgte eine finale Waschung mittels TBS-Puffer für 6 x 10 Minuten. Die Hirnschnitte wurden entsprechend ihrer anatomischen Anordnung in 0,5% Gelatine auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Zuletzt erfolgte eine Waschung der Objektträger mit PBS-Puffer für 5 Minuten und eine Inkubation in DAPI (D9542, 10MG, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA/Steinheim, Deutschland) für weitere 5 Minuten. Zur Entfernung der überschüssigen DAPI-Färbung wurden die Objektträger erneut für 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen und schließlich mit Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100-01) eingedeckt.

### **3.6.7 Laser-Scan-Mikroskopie**

Zur Analyse der langfristigen morphologischen Auswirkungen unterschiedlicher Hämoglobinabbauprodukte auf die Gefäßwände wurde ein Laser-Scan-Mikroskop (LSM 710, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Zur Beurteilung wurden unterschiedliche Gefäßtypen in jedem Gehirn betrachtet. Hierzu zählten die *Arteria basilaris* (BA) und *Arteria communicans posterior* (PCA), die beide in direktem Kontakt zum Subarachnoidalraum, dem Liquor und den darin enthaltenen Substanzen standen. Als Kontrollgefäß wurde die *Arteria azygos pericallosa* (APA) aufgesucht (Abbildung 15). Es wurde angestrebt, von jeder Gefäßart pro Versuchstier 6 Scan-Aufnahmen anzufertigen, um die Validität der Messwerte zu erhöhen.



BA - Basilar artery  
 PCA - Posterior communicating artery  
 APA - Azygos pericallosal artery

Abbildung 15: Darstellung der untersuchten Arterien des Teilprojekts 3 (Abbildung: Dr. med. Alexander Jörk).

Die koronaren Hirnschnitte wurden von frontal nach okzipital auf geeignete Gefäßanschnitte durchsucht und bei Erfolg die entsprechenden Aufnahmen durchgeführt. Zum Auffinden der Gefäße wurde zunächst ein Objektiv der 10fachen Vergrößerung verwendet (EC Plan-NEOFLUAR, 10x/0,3, ZEISS). Die Scans erfolgten schließlich in 20facher Vergrößerung (Plan-APOCHROMAT, 20x/0,75, ZEISS). Der Atlas „*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*“ (Keith Franklin, George Paxinos, Academic Press, 2008) diente dabei der anatomischen Orientierung.

Mithilfe des Computerprogramms ZEN 2009 (Version 6.0, 6,0,0,303, Carl Zeiss) konnten alle Einstellungen am Mikroskop vorgenommen werden. Um die korrekte Ebene des Gefäßanschnitts zu finden, wurde zunächst ein Scan des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI vorgenommen. Dieser Farbstoff konnte mit einer Wellenlänge von 364nm angeregt werden und emittierte Lichtquanten mit einer Wellenlänge von 454nm. Die angefärbten Zellkerne konnten auf dem Computer blau dargestellt werden. Anschließend wurde die Exzitationswellenlänge so geändert, dass der Sekundärfluoreszenzstoff Alexa 647 angeregt werden konnte. Dieser Sekundärfarbstoff band hierbei an den zuvor inkubierten Primärfarbstoff anti-SMA (*smooth muscle actin antigen*) und ermöglichte somit die Erfassung der Aktinfasern der glatten Gefäßmuskulatur. Alexa 647 wurde mit einer Wellenlänge von 650nm angeregt und sendete Lichtquanten einer Wellenlänge von 670nm aus. Die Darstellung im Computerprogramm erfolgte in einer roten Einfärbung.

Um die Qualität der Aufnahmen zu verbessern, wurden Einzelbilder verschiedener Ebenen als Bilderstapel (Engl. *stack*) aufgenommen. Hierbei wurde manuell die Höhe dieser Ebenen eingestellt und zugleich das Bild möglichst exakt auf das entsprechende Gefäß zugeschnitten, um die Belichtungszeit des Hirnschnitts so gering wie möglich zu halten.

### 3.6.8 Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Scans erfolgte mithilfe des Programms Image J (1.52q, Java 1.8.0\_172, 64 bit, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Alle Einzelbilder eines Bilderstapels wurden addiert (Funktion: Z-Stack), um ein vollständiges Bild des jeweiligen Gefäßanschnitts zu erhalten. Im Folgenden wurde zunächst die innere Gefäßfläche (definiert bis zur Innenwand des Endothels) bestimmt (Funktion: Selection Brush, 70-150 Pixel) und berechnet sowie auch der Umfang der ermittelten Fläche (Abbildung 16 A). Dasselbe erfolgte daraufhin für die Gesamtfläche des Gefäßanschnitts inklusive Gefäßwand (Abbildung 16 B). Die erhobenen Daten konnten in eine Excel-Tabelle übernommen und aus diesen die Berechnung der relativen Gefäßwandfläche vorgenommen werden. Hierzu wurde aus dem gemessenen Außenumfang des Gefäßes eine idealisierte Kreisfläche errechnet und mithilfe der gemessenen Gefäßinnenfläche schließlich der prozentuale Anteil der Gefäßwand ermittelt. Die Werte jedes einzelnen Tieres wurden jeweils innerhalb der drei unterschiedlichen Gefäßtypen gemittelt und aus diesen Werten wurde wiederum ein interindividueller Mittelwert pro Gefäßtyp bestimmt, der den Parameter der gesamten Interventionsgruppe repräsentierte.

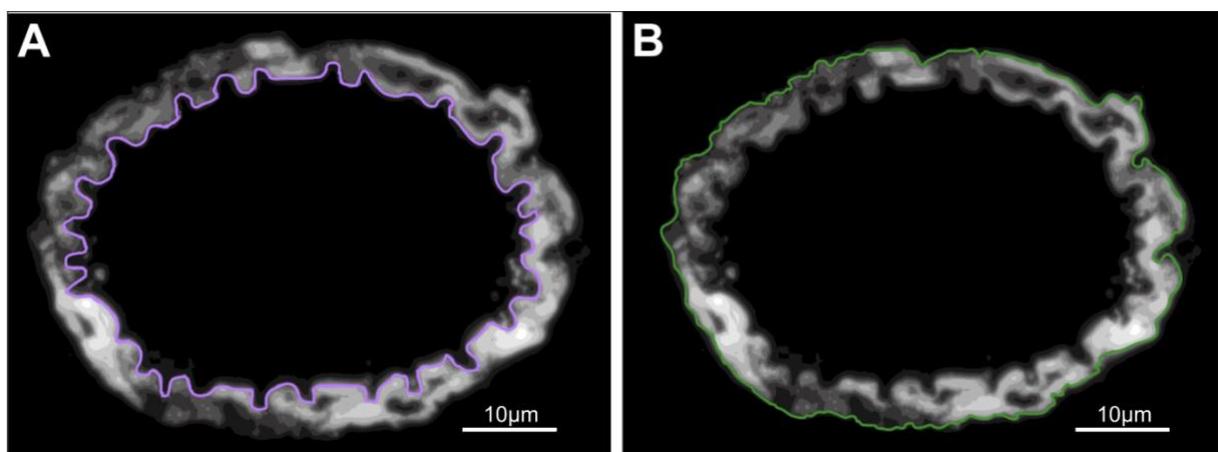


Abbildung 16: Auswertung der LSM-Scans mithilfe des Programms ImageJ; A: Querschnitt der Arteria communicans posterior (PCA) im Stapelbild mit Auswertung der inneren Gefäßfläche (violette Linie); B: Auswertung der äußeren Gefäßfläche der PCA (grüne Linie).

### 3.6.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde äquivalent zu den Teilprojekten 1 und 2 das Programm SPSS Statistics (Version 27.0.0.0) verwendet. Auch hier erfolgte die Berechnung über verallgemeinerte Schätzungsgleichungen in einem linearen Modell. Als Auswertungsparameter diente der relative Wandanteil an der Gesamtfläche des Gefäßes, im Folgenden als relative Wanddicke bezeichnet. Dieser prozentuale Anteil konnte durch die oben beschriebene Auswertungsmethode berechnet und dem statistischen Vergleich unterzogen werden. Es wurden hierbei drei Einflussfaktoren berücksichtigt: der Tag der Dekapitation nach Intervention (Tag 3, 7, 14 und 28), die durchgeführte Intervention (Injektion von BOX, PDP, Eigenblut, *sham*-Operation) sowie der Gefäßtyp (APA, BA, PCA). Alle Parameter wurden hierbei einem paarweisen Vergleich unterzogen, wobei allerdings die übrigen Parameter außer Acht gelassen wurden. Es erfolgte daher ein paarweiser Vergleich der Dekapitationstage ohne Berücksichtigung der Interventionsgruppen und Gefäßtypen, ein Vergleich der verschiedenen Interventionen ohne Berücksichtigung der Dekapitationstage und Gefäßtypen und ein Vergleich der verschiedenen Gefäßtypen gemittelt über alle untersuchten Tiere.

Zur erweiterten Aussagefähigkeit wurde ein weiteres statistisches Modell verwendet, um die Veränderungen der relativen Wandfläche innerhalb der einzelnen Interventionsgruppen in Abhängigkeit vom Tag der Dekapitation analysieren zu können. Hierzu wurde ein nicht-parametrischer Vergleich mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests vorgenommen, um die unabhängigen Stichproben untereinander zu vergleichen.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

Die Daten der postinterventionellen Tage 3, 7 und 14 stammten dabei nicht aus eigenen Experimenten dieser Arbeit, sondern wurden mit großem Dank aus Vorarbeiten ergänzt, um eine vollständige statistische Analyse zu ermöglichen und einen zeitlichen Verlauf der morphologischen Gefäßveränderungen zu erfassen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Teilprojekt 1

#### 4.1.1 aCSF

Zur Erfassung und zum Verständnis der dynamischen Gefäßantwort auf die elektrische Stimulation des Hirnschnitts wurden zunächst (Kontroll-)Experimente mit artifizieller Liquorlösung (aCSF) durchgeführt (Abbildung 17).

Hierzu erfolgte eine Untersuchung der dynamischen Gefäßreaktion als Antwort auf die unterschiedlichen Stimulationsstärken von 2V, 4V, 6V und 8V.

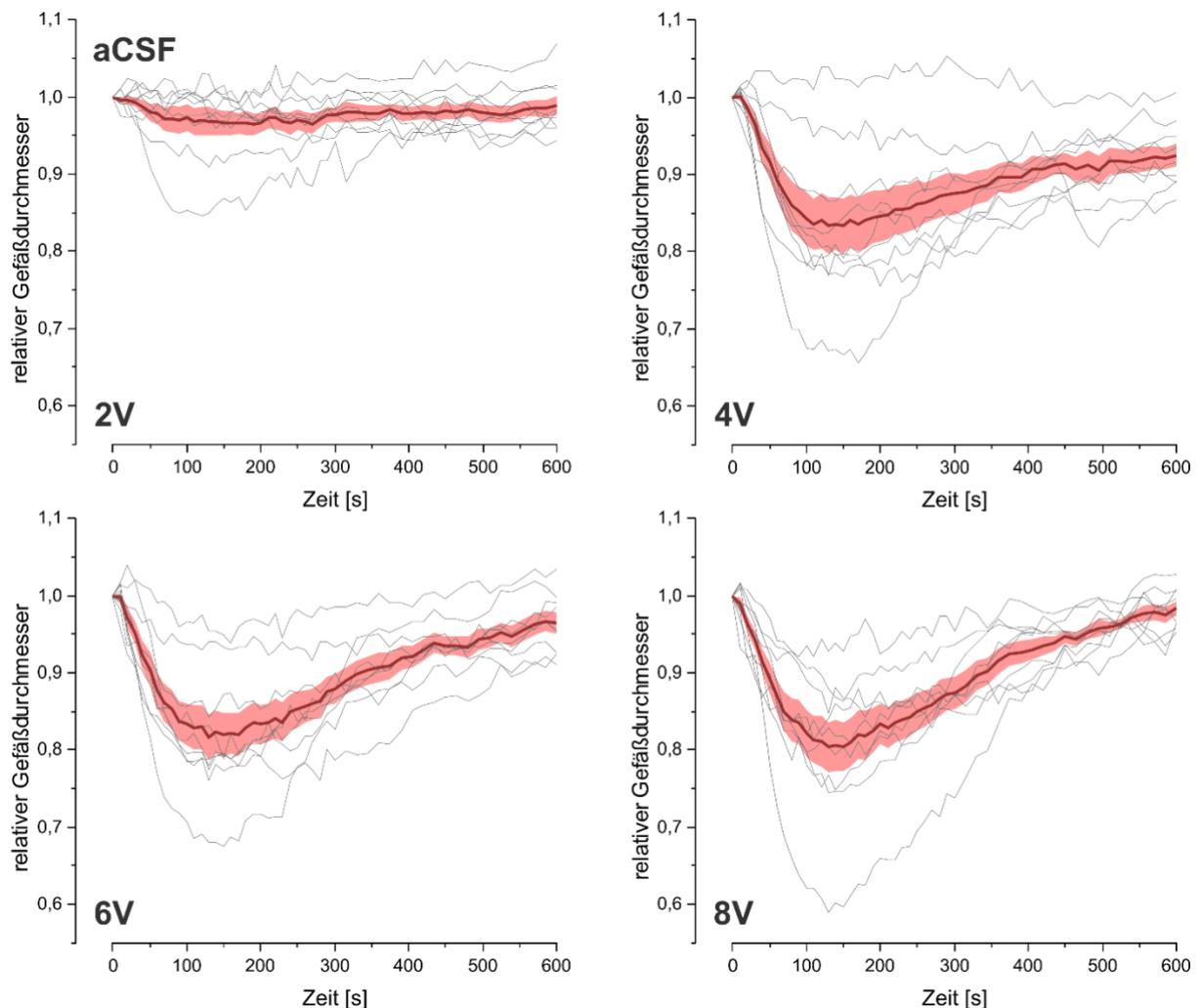


Abbildung 17: Rohdaten der dynamischen Gefäßreaktion der juvenilen aCSF-Kohorte ( $n_a=9$ ) im zeitlichen Verlauf (600s) für die vier Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V): Reaktion der einzelnen Versuchstiere (grau), Mittelwert (dicke Kurve) und Standardfehler des Mittelwertes (Fläche).

In Abbildung 17 wird die Veränderung des Gefäßdurchmessers der Arteriolen der juvenilen aCSF-Kohorte ( $n_a=9$ ) als Antwort auf die elektrische Stimulation in den vier definierten Stimulationsstärken von 2V, 4V, 6V und 8V graphisch dargestellt. Im

zeitlichen Verlauf wird hierbei zunächst eine Vasokonstriktion und damit eine Abnahme des relativen Gefäßdurchmessers sichtbar (Abfall der Graphen von 4V, 6V, und 8V). Darauf folgt eine langsam progrediente Aufweitung der Gefäße im Anschluss an diese Kontraktion. Eine deutliche Kontraktion bei der Stimulationsstärke von 2V war typischerweise in den meisten Fällen nicht zu erkennen.

#### 4.1.2 TTX

Um auszuschließen, dass die extrazelluläre elektrische Stimulation zu einer direkten Stimulation des Synzytiums glatter Gefäßmuskelzellen der penetrierenden Arteriolen führt, wurden Experimente mit dem Natriumkanalblocker Tetrodotoxin (TTX) durchgeführt (Abbildung 18). Die Hypothese war, dass die Blockade der Natriumkanäle zu einer Unterdrückung der elektrischen Aktivität der Neurone führt und damit die Auslösung der neurovaskulären Kopplung verhindert. Bei einer direkten elektrischen Stimulation der Gefäße bliebe allerdings eine Vasoreaktion erhalten. Zur Einordnung der Ergebnisse der TTX-Experimente wurden diese mit den Ergebnissen der aCSF-Kontrollgruppe verglichen.

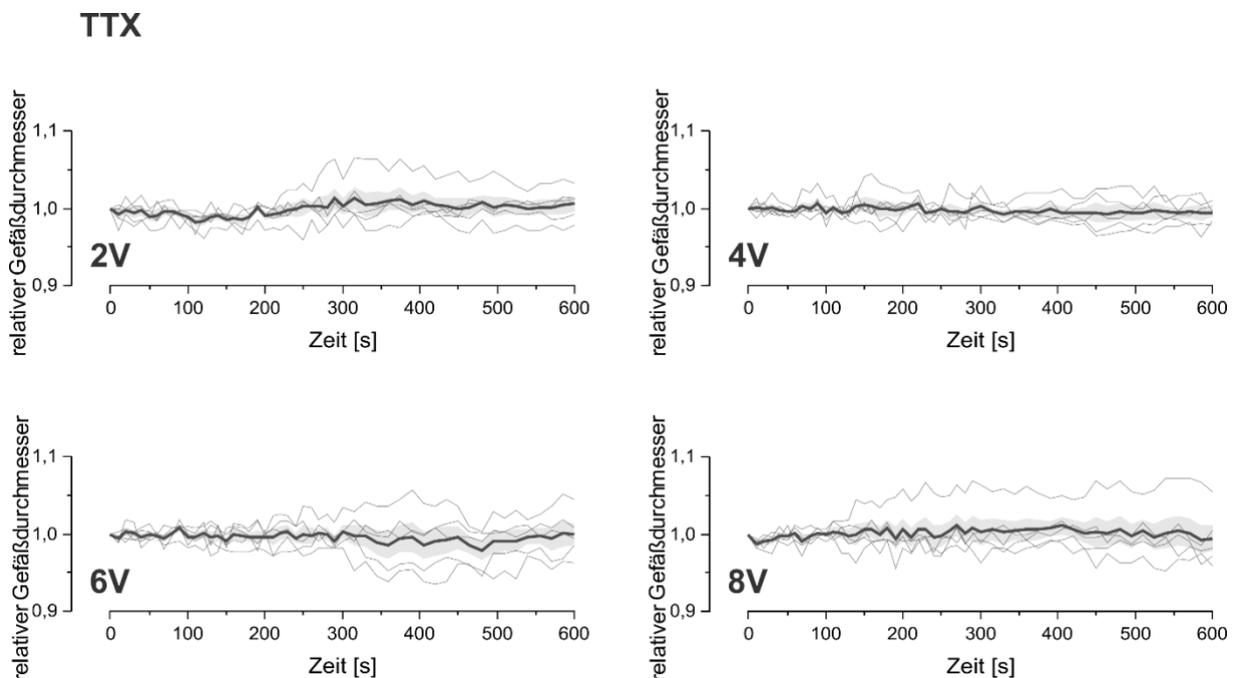


Abbildung 18: Rohdaten der dynamischen Gefäßreaktion der TTX-Kohorte ( $n_a=5$ ) im zeitlichen Verlauf (600s) für die vier Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V): Reaktion der einzelnen Versuchstiere (grau), Mittelwert (dicke Kurve) und Standardfehler des Mittelwertes (Fläche).

Die Amplitude der stärksten Gefäßkontraktion nach Stimulation in der TTX-Kohorte ( $n_s=20$ ) zeigte über alle Stimulationsstärken gemittelt einen signifikanten Unterschied zur Gefäßkontraktion der aCSF-Kontrollgruppe ( $n_s=31$ ) (Abbildung 19). Beide Kohorten beinhalteten ausschließlich juvenile Tiere. Während der Mittelwert des minimalen relativen Gefäßdurchmessers zum Zeitpunkt der stärksten Kontraktion nach Stimulation in der TTX-Gruppe bei  $0,95 \pm 0,02$  des Ruhewertes lag, fand sich in der aCSF-Kontrollgruppe ein statistisch signifikant geringerer Wert von  $0,84 \pm 0,02$  ( $p<0,01$ ). Durch diese Ergebnisse konnte eine direkte Stimulation der Gefäße durch die Elektrode ausgeschlossen werden.

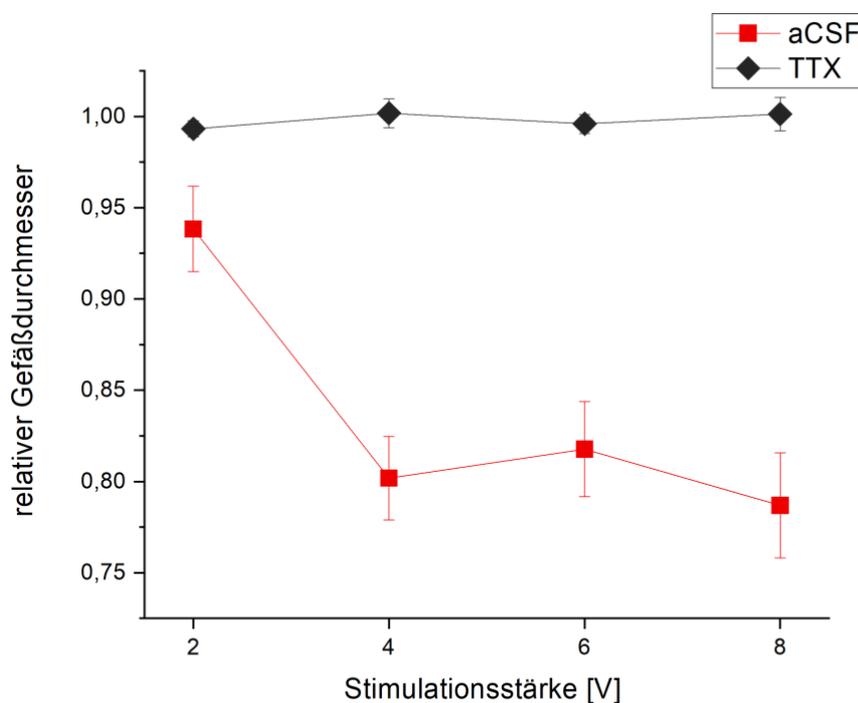


Abbildung 19: Mittelwerte und Standardfehler des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation der aCSF-Kontrollgruppe (rot) und TTX-Gruppe (schwarz); Darstellung in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V).

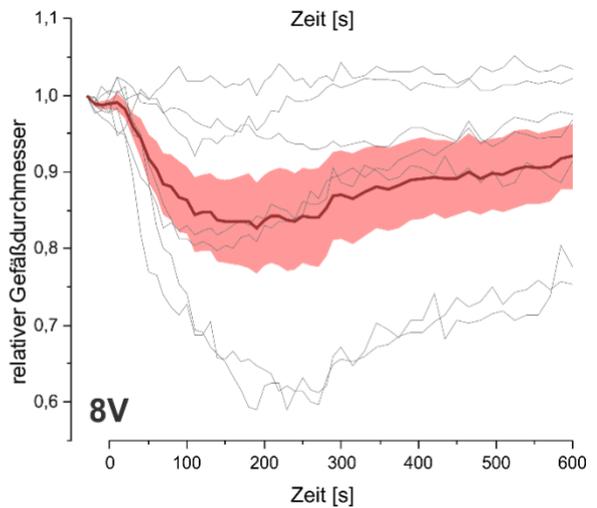
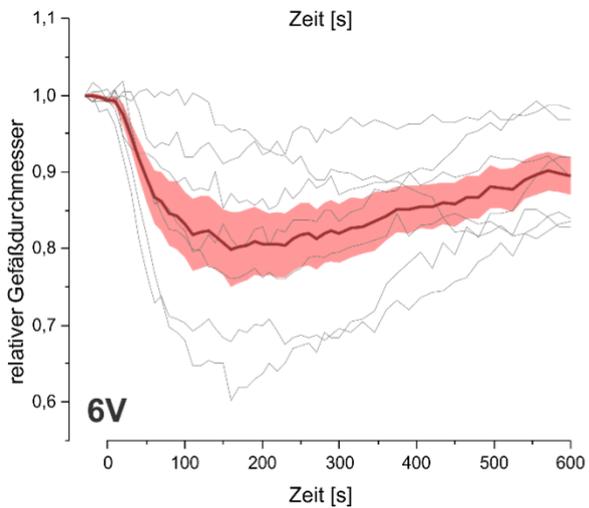
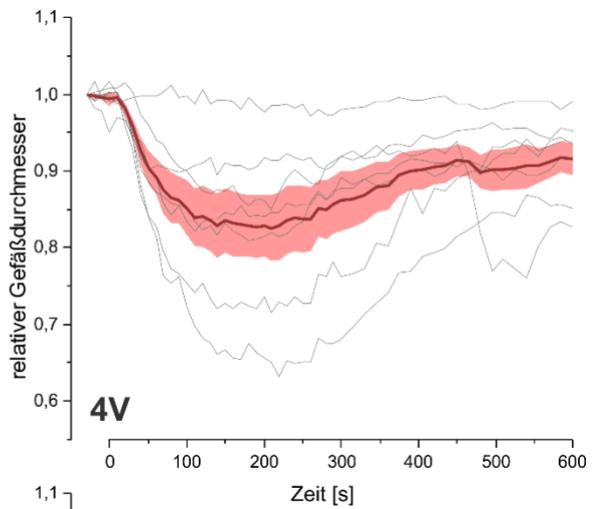
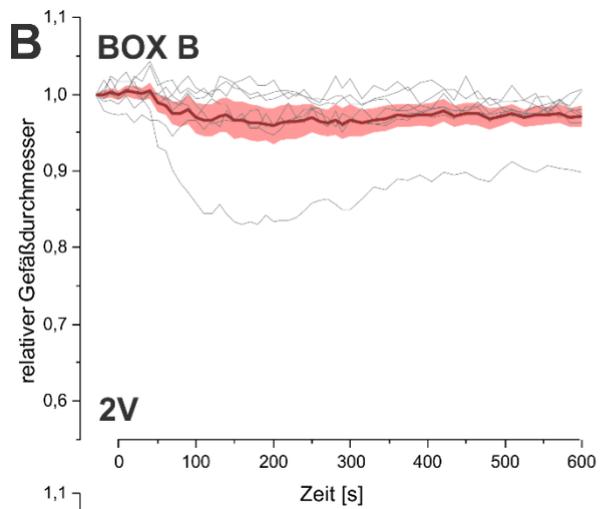
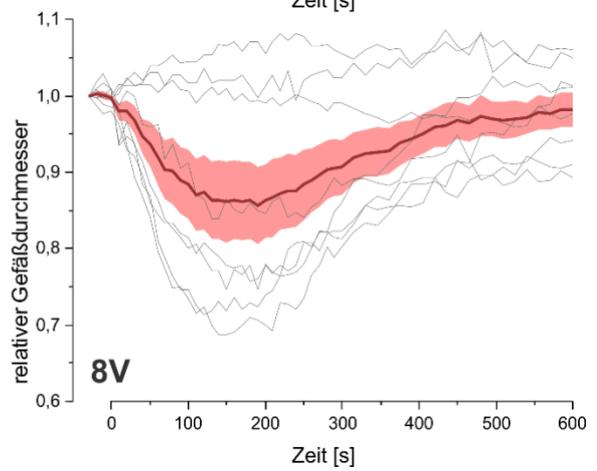
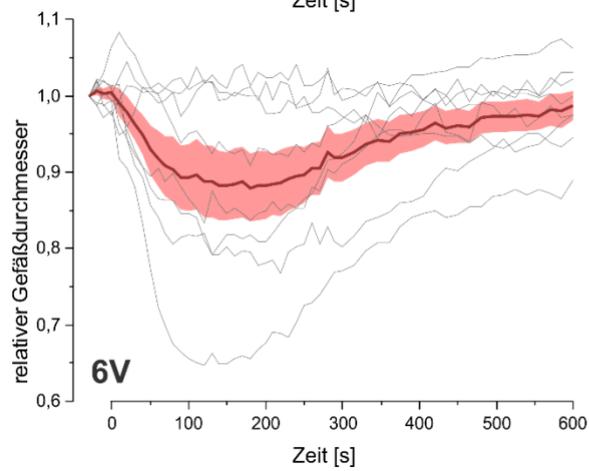
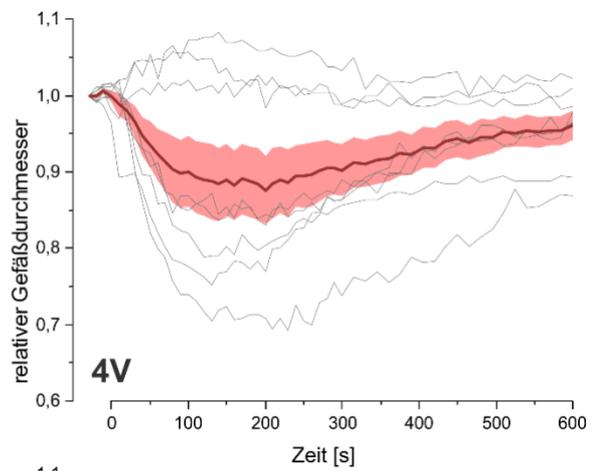
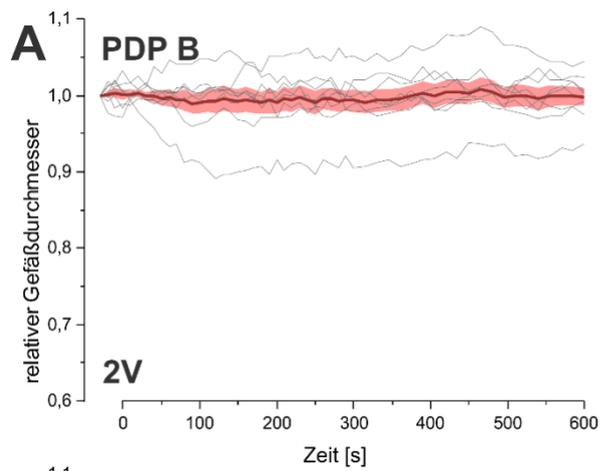
### 4.1.3 Gefäßreaktionen unter verschiedenen Hämoglobinabbauprodukten

Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Hämoglobinabbauprodukte auf die dynamische Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation untersucht. Hierzu erfolgten Experimente mit den Substanzen PDP B oder BOX B sowie einer Substanzkombination aus PDP A + BOX A.

Um die Wirkung der Hämoglobinabbauprodukte zu erfassen und untereinander zu vergleichen, wurden verschiedene Parameter quantifiziert, um ein möglichst umfassendes Bild der dynamischen Gefäßreaktion zu erfassen.

Die statistische Auswertung beinhaltete hierbei vier Parameter: die Amplitude der maximalen Gefäßkontraktion (bzw. minimaler relativer Gefäßdurchmesser nach elektrischer Stimulation), der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion, die Zeitkonstante  $\tau$  der Wiederaufweitung nach Kontraktion und das Ausmaß der Wiederaufweitung  $A1$ . Darüber hinaus wurde die *area under the curve* (AUC) als übergreifender Parameter analysiert, der die zuvor genannten Auswertungsparameter als Gesamtwert abbilden sollte. Die Parameter wurden bereits im Abschnitt „Material und Methoden“ genauer erläutert.

Die nachfolgenden Graphiken (Abbildung 20 A-C) zeigen die Rohdaten der juvenilen Kohorten des ersten Teilprojekts.



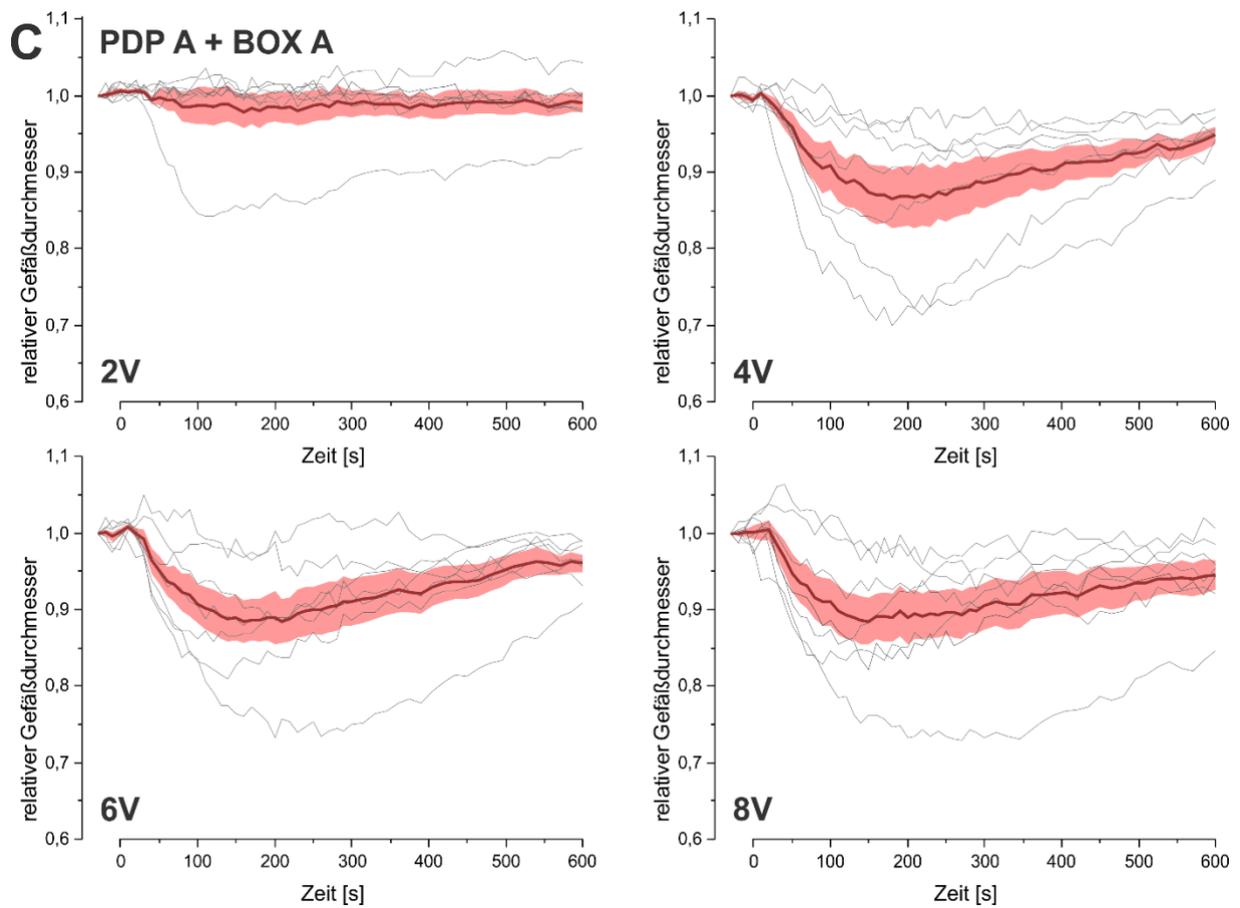


Abbildung 20: Rohdaten der dynamischen Gefäßreaktion der juvenilen PDP B-Kohorte ( $n_a=8$ ) (A), BOX B-Kohorte ( $n_a=7$ ) (B) und PDP A-BOX A-Kohorte ( $n_a=7$ ) (C) im zeitlichen Verlauf (600s) für die vier Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V): Gefäßantwort der einzelnen Versuchstiere (grau), Mittelwert (dicke Kurve) und Standardfehler des Mittelwertes (Fläche).

#### 4.1.4 Zeitpunkt der maximalen Kontraktion

Um die Reaktionsfähigkeit der Arteriolen auf die unterschiedlichen Interventionen und Stimulationsstärken zu untersuchen, wurde der Zeitpunkt in Sekunden bestimmt, an dem die maximale Kontraktion des Gefäßes nach der elektrischen Stimulation zu beobachten war. Der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion wurde für die juvenilen Kohorten mit den Interventionen aCSF ( $n_a=9$ ), PDP B ( $n_a=8$ ), BOX B ( $n_a=7$ ) und PDP A + BOX A ( $n_a=7$ ) bestimmt.

Ein statistisch signifikanter Unterschied dieses Zeitpunkts der maximalen Kontraktion konnte weder zwischen den unterschiedlichen Interventionen noch zwischen den verschiedenen Stimulationsstärken festgestellt werden (Abbildung 21).

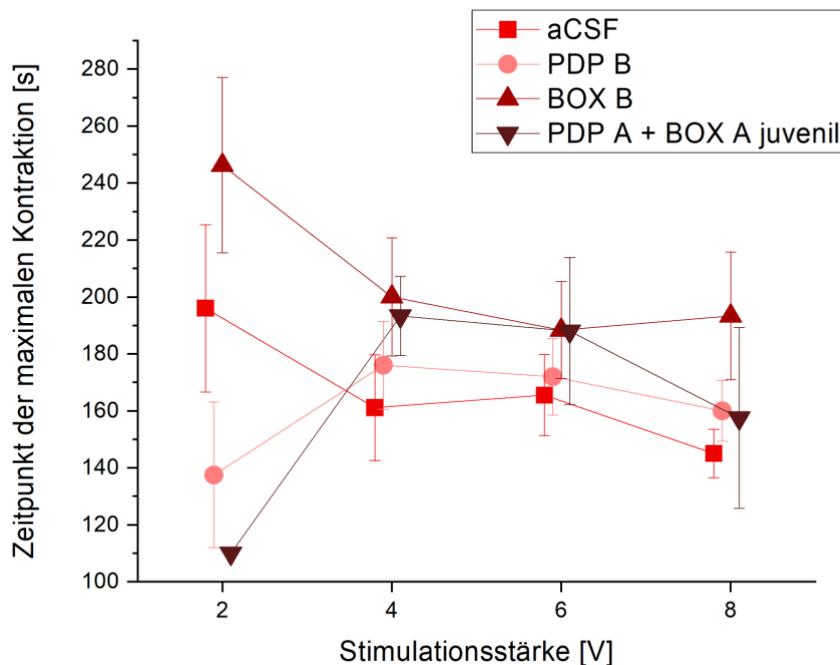


Abbildung 21: Mittelwerte und Standardfehler des Zeitpunkts der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken für die juvenilen Interventionsgruppen (aCSF, PDP B, BOX B, PDP A + BOX A).

#### 4.1.5 Amplitude

Die Auswertung der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation zeigte für die Interventionsgruppen von PDP B ( $n_s=19$ ), BOX B ( $n_s=22$ ) und PDP A + BOX A ( $n_s=17$ ) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur aCSF-Kontrollgruppe (Abbildung 22). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation zwischen den Interventionen PDP B ( $0,83 \pm 0,02$ ), BOX B ( $0,84 \pm 0,03$ ) und PDP A + BOX A ( $0,87 \pm 0,03$ ) festgestellt werden. Der minimale relative Gefäßdurchmesser wurde innerhalb der Interventionen über alle Stimulationsstärken gemittelt betrachtet.

Eine Abhängigkeit des minimalen relativen Gefäßdurchmessers von der jeweiligen Stimulationsstärke konnte festgestellt werden. Im paarweisen Vergleich zeigten die Stimulationsstärken von 4V ( $0,84 \pm 0,02$ ) ( $n_s=33$ ), 6V ( $0,84 \pm 0,02$ ) ( $n_s=30$ ) und 8V ( $0,83 \pm 0,02$ ) ( $n_s=28$ ) keine signifikanten Unterschiede untereinander, jedoch einen signifikant geringeren minimalen relativen Gefäßdurchmesser nach elektrischer Stimulation als bei der Stimulationsstärke von 2V ( $0,95 \pm 0,02$ ) ( $p<0,01$ ).

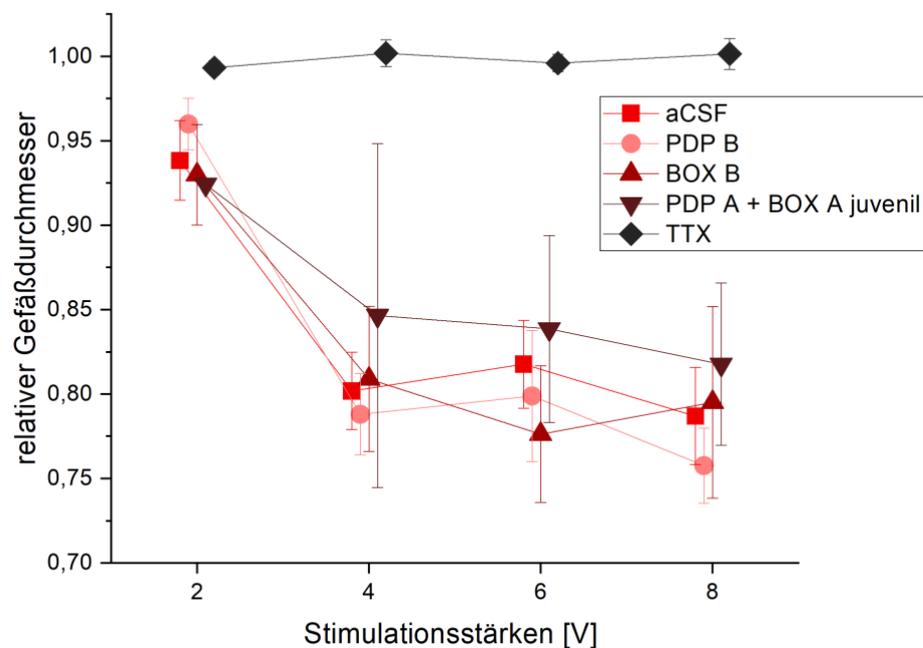


Abbildung 22: Mittelwerte und Standardfehler des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation der juvenilen Interventionsgruppen (aCSF, PDP B, BOX B, PDP A + BOX A, TTX); Darstellung in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V).

#### 4.1.6 Zeitkonstante $\tau$

$\tau$  beschreibt die Zeitkonstante der Wiederaufweitung (fit-Kurve) des Gefäßes nach stattgehabter Kontraktion. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede von  $\tau$  festgestellt werden, weder zwischen den verschiedenen Interventionsgruppen noch zwischen den vier Stimulationsstärken (Abbildung 23).

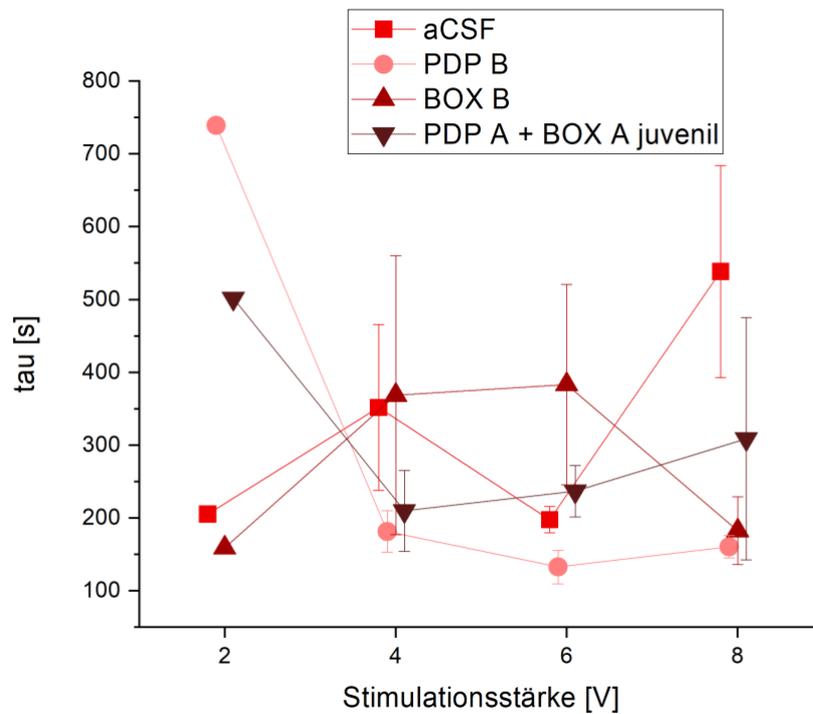


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardfehler der Zeitkonstante  $\tau$  der Wiederaufweitung der Gefäße in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken für die juvenilen Interventionsgruppen (aCSF, PDP B, BOX B, PDP A + BOX A).

#### 4.1.7 A1 – Aufweitung der Gefäße

Die Aufweitungsfähigkeit A1 der Arteriolen nach elektrischer Stimulation zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Stimulationsstärke von 2V zu den übrigen drei Stimulationsstärken ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 24). Der Mittelwert bei 2V lag bei  $0,04 \pm 0,02$  ( $n_s=5$ ) und wies damit einen signifikanten Unterschied zu den Mittelwerten bei 4V ( $0,15 \pm 0,02$ ;  $n_s=20$ ), 6V ( $0,16 \pm 0,02$ ;  $n_s=18$ ) und 8V ( $0,20 \pm 0,03$ ;  $n_s=20$ ) auf ( $p < 0,01$ ). Die Stimulationsstärken 4V, 6V und 8V zeigten untereinander jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Ebenso zeigte sich keine Beeinflussung der Aufweitungsfähigkeit A1 durch die verschiedenen Interventionen.

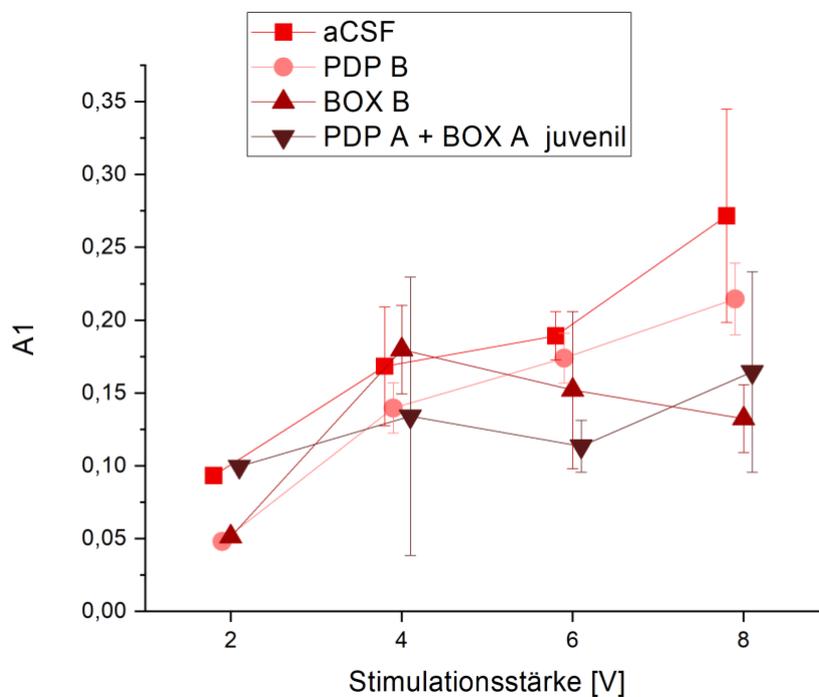


Abbildung 24: Mittelwerte und Standardfehler der Aufweitung A1 in Abhängigkeit von den vier Stimulationsstärken für die juvenilen Interventionsgruppen (aCSF, PDP B, BOX B, PDP A + BOX A).

#### 4.1.8 AUC – area under the curve

Die Evaluation der AUC (Abbildung 25) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Stimulationsstärken, jedoch keine Abhängigkeit von den Interventionsgruppen.

Wie bereits bei der Auswertung der maximalen Amplitude der Kontraktion und der Aufweitungsfähigkeit A1, fand sich eine statistische Signifikanz zwischen der Stimulationsstärke von 2V ( $40,7 \pm 7,5$  s;  $n_s=5$ ) und den drei höheren Stimulationsstärken von 4V ( $73,5 \pm 6,2$  s) ( $p<0,01$ ;  $n_s=20$ ), 6V ( $67,0 \pm 7,9$  s) ( $p<0,05$ ;  $n_s=18$ ) und 8V ( $74,8 \pm 8,2$  s) ( $p<0,05$ ;  $n_s=20$ ). Der paarweise Vergleich der drei höheren Stimulationsstärken untereinander ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede.

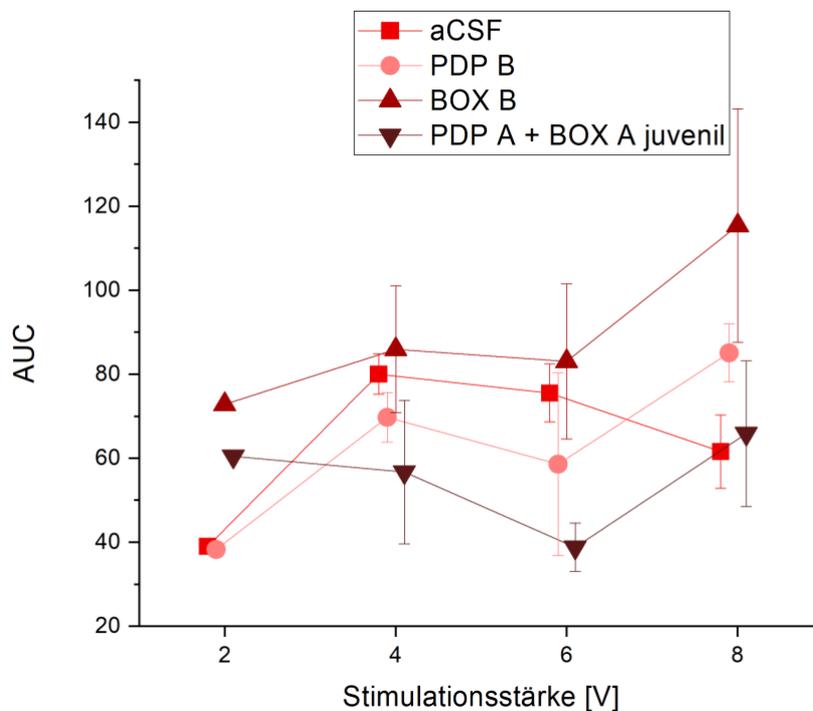


Abbildung 25: Mittelwerte und Standardfehler der AUC in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken für die juvenilen Interventionsgruppen (aCSF, PDP B, BOX B, PDP A + BOX A).

#### 4.1.9 Vergleich PDP A + BOX A juvenil und adult

Zur Analyse einer Altersabhängigkeit wurden Experimente mit der Substanzkombination PDP A + BOX A sowohl an juvenilen ( $n_a=7$ ) als auch an adulten Tieren durchgeführt ( $n_a=4$ ) (Abbildung 26). Hierbei wurden die maximale Kontraktion nach elektrischer Stimulation und der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion statistisch ausgewertet. Aussagen über die Parameter  $\tau$ ,  $A1$  und  $AUC$  konnten aufgrund fehlender Daten entsprechend der Ausschlusskriterien nicht ermittelt werden.

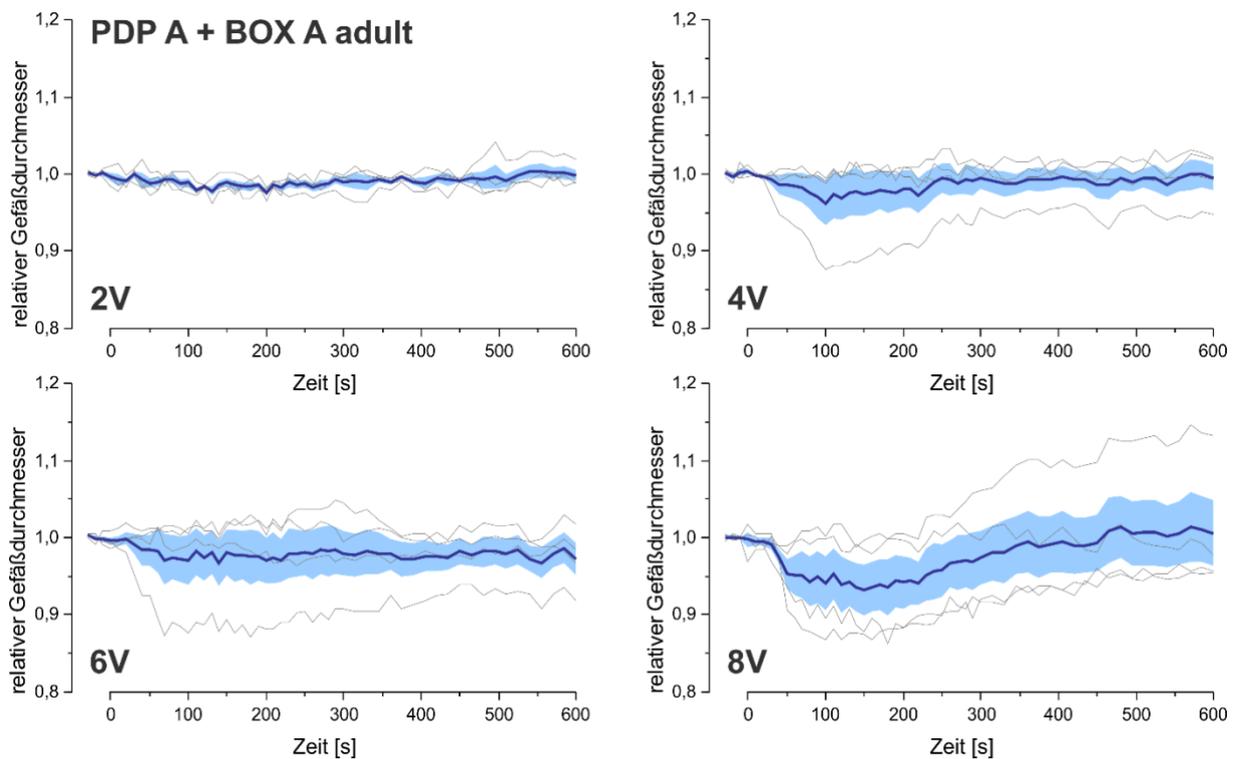


Abbildung 26: Rohdaten der dynamischen Gefäßreaktion der adulten PDP A + BOX A-Kohorte ( $n_a=4$ ) im zeitlichen Verlauf (600s) für die vier Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V): Reaktion der einzelnen Versuchstiere (grau), Mittelwert (dicke Kurve) und Standardfehler des Mittelwertes (Fläche).

Die maximale Kontraktion nach elektrischer Stimulation in den beiden Versuchsgruppen zeigte eine statistisch signifikante Altersabhängigkeit ( $p < 0,05$ ). Im Mittel zeigten juvenile Tiere einen minimalen relativen Gefäßdurchmesser nach elektrischer Stimulation von  $0,87 \pm 0,03$  ( $n_s=17$ ), während die adulte Kohorte im Durchschnitt einen minimalen relativen Gefäßdurchmesser von  $0,94 \pm 0,02$  aufwies ( $n_s=11$ ) (Abbildung 27).

Auch die Stimulationsstärke hatte neben dem Altersaspekt einen signifikanten Einfluss auf die maximale Kontraktion der Gefäße. Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der niedrigsten Stimulationsstärke von 2V ( $0,95 \pm 0,01$ ;  $n_s=6$ ) und den übrigen Stimulationsstärken von 4V ( $0,89 \pm 0,03$ ) ( $n_s=8$ ;  $p < 0,05$ ), 6V ( $0,9 \pm 0,02$ ) ( $n_s=7$ ;  $p < 0,05$ ) und 8V ( $0,89 \pm 0,02$ ) ( $n_s=7$ ;  $p < 0,01$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei höheren Stimulationsstärken wurde nicht festgestellt.

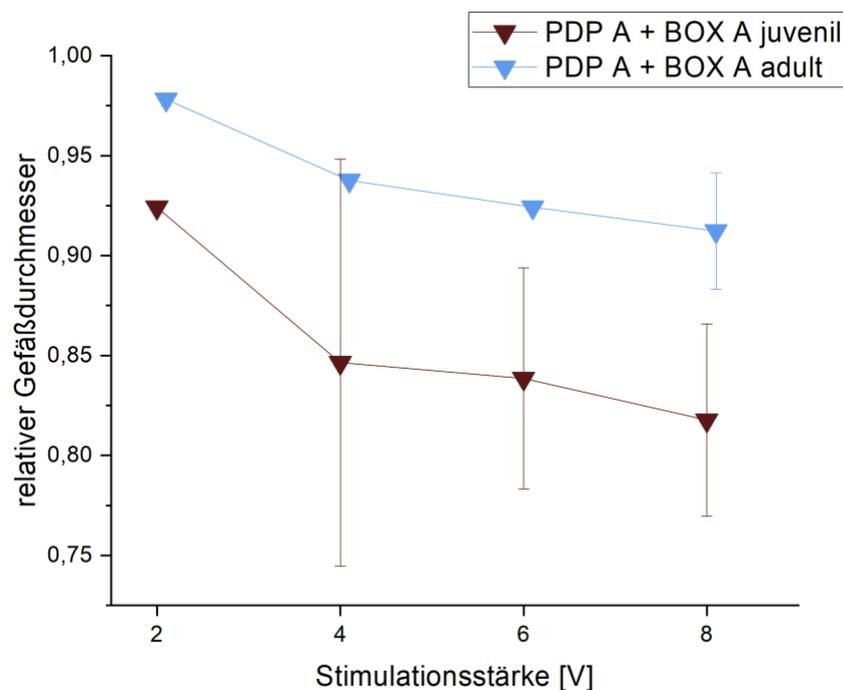


Abbildung 27: Mittelwerte und Standardfehler des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation der PDP A + BOX A-Intervention juvenil und adult; Darstellung in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V).

Abbildung 28 veranschaulicht die Zeitpunkte der maximalen Kontraktion der juvenilen und adulten PDP A + BOX A-Interventionsgruppen nach elektrischer Stimulation. Im Vergleich zwischen juvenilen und adulten Tieren zeigte sich kein signifikanter Altersunterschied.

Jedoch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationsstärken von 6V ( $197 \pm 17,7$  s;  $n_s=7$ ) und 8V ( $156$  s  $\pm$  18 s;  $n_s=7$ ) festgestellt werden ( $p<0,05$ ). Die paarweisen Vergleiche aller übrigen Stimulationsstärken zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

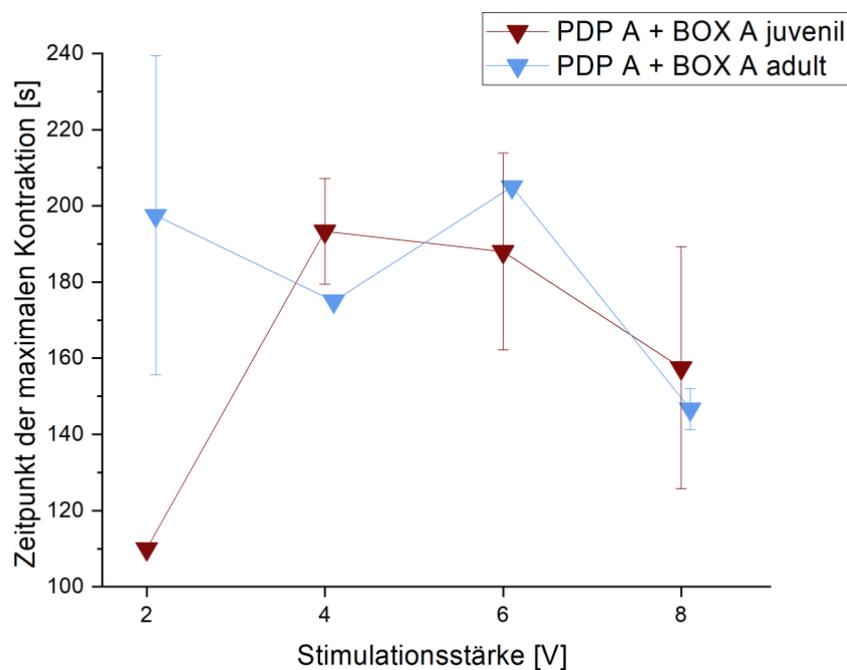
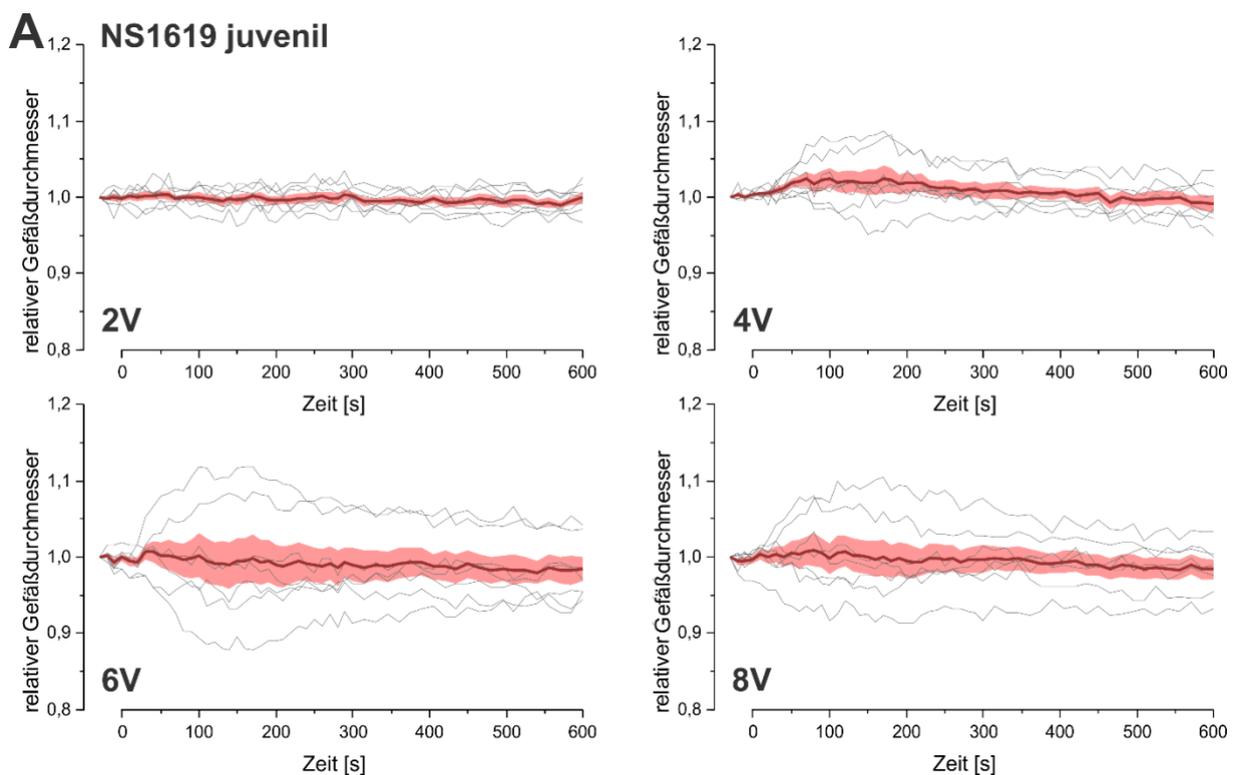


Abbildung 28: Mittelwerte und Standardfehler der Zeitpunkte der maximalen Kontraktion in Abhängigkeit der vier Stimulationsstärken für die Interventionen PDP A + BOX A juvenil und adult.

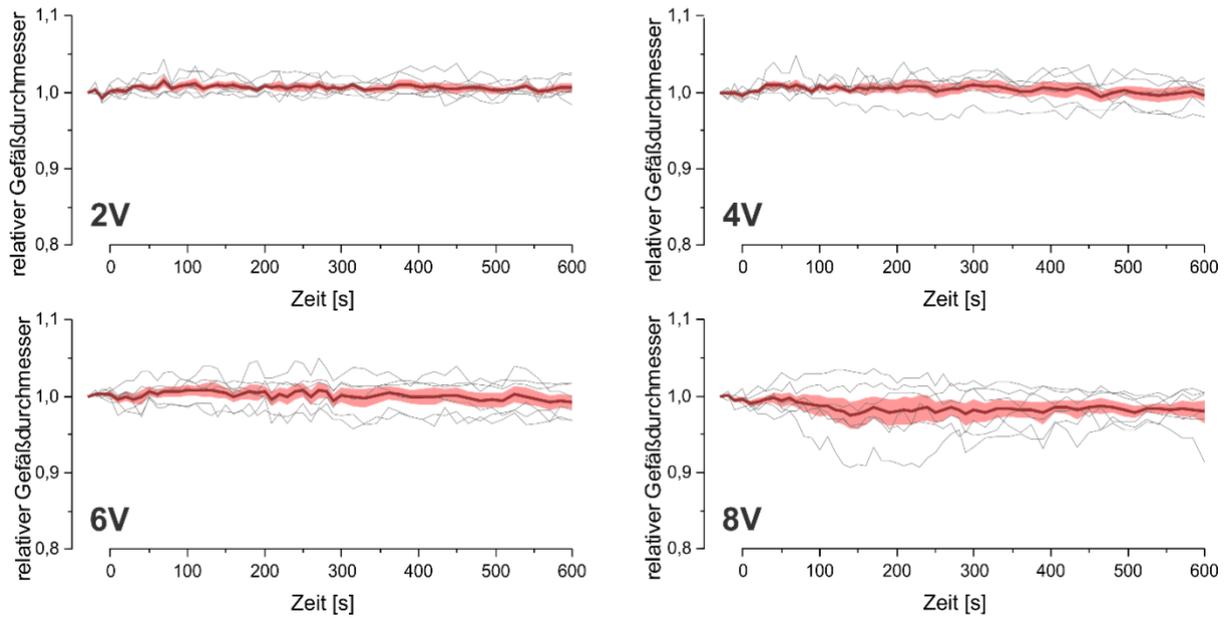
## 4.2 Teilprojekt 2

In Teilprojekt 2 wurde die Auswirkung des BK-Kanal-Öffners NS1619 auf die Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation untersucht. Hierzu wurden verschiedene Experimente durchgeführt, sowohl mit alleiniger Applikation von NS1619 (juvenil  $n_a=7$ , adult  $n_a=5$ ), als auch mit Substanzkombinationen aus NS1619 + PDP A (juvenil  $n_a=6$ , adult  $n_a=4$ ) oder NS1619 + BOX A (juvenil  $n_a=7$ ). Es wurden sowohl juvenile als auch adulte Tiere betrachtet, um den Einfluss des Alters zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte entsprechend der Parameter des ersten Teilprojekts, jedoch waren statistische Aussagen zu  $\tau$ ,  $AUC$  und  $A1$  aufgrund von Datenlücken nicht möglich. Daher wurde in diesen Fällen lediglich eine deskriptive Betrachtung mittels einer explorativen Datenanalyse durchgeführt.

Die Rohdaten der Interventionsgruppen verdeutlichen die Wirkung des BK-Kanal-Öffners NS1619 in Form einer Inhibition der Vasokonstriktion nach elektrischer Stimulation (Abbildung 29 und 30).



## B NS1619 + PDP A juvenil



## C NS1619 + BOX A juvenil

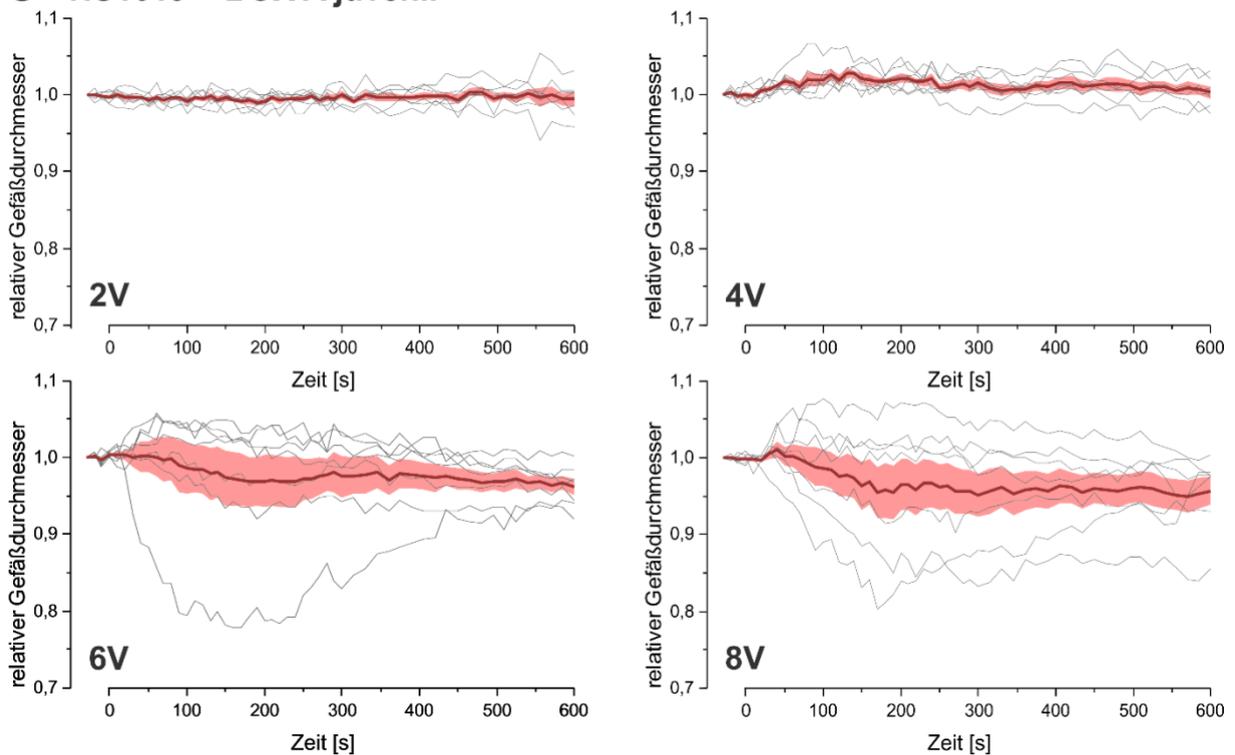
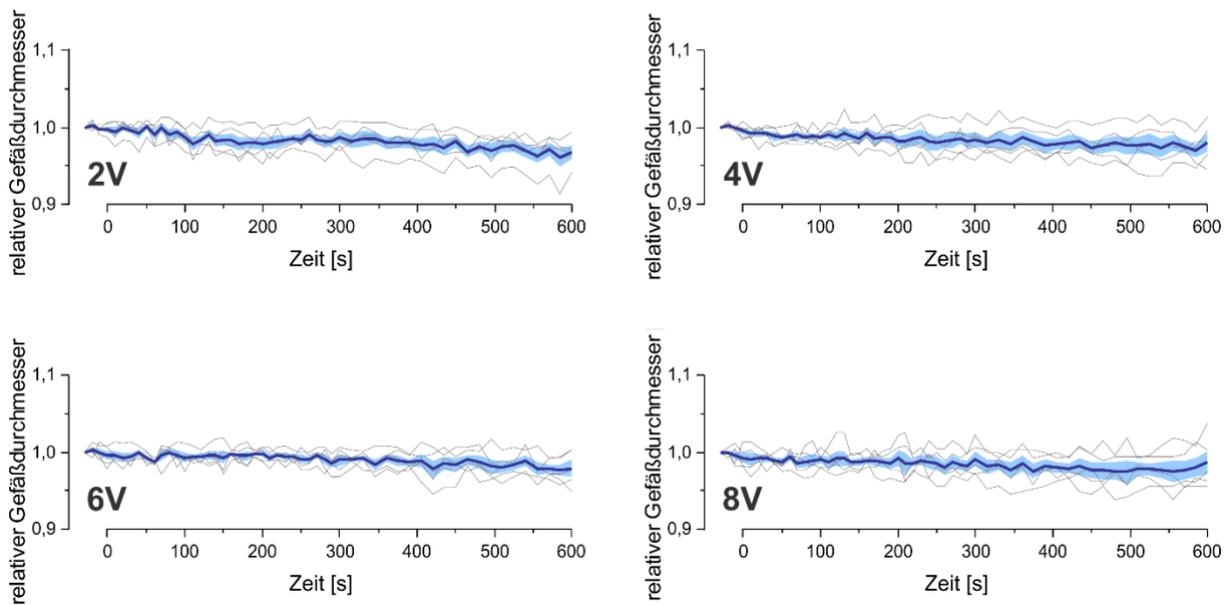


Abbildung 29: Rohdaten der dynamischen Gefäßreaktion der juvenilen NS1619-Kohorte ( $n_a=7$ ) (A), NS1619 + PDP A-Kohorte ( $n_a=6$ ) (B) und NS1619 + BOX A-Kohorte ( $n_a=7$ ) (C) im zeitlichen Verlauf (600s) für die vier Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V): Reaktion der einzelnen Versuchstiere (grau), Mittelwert (dicke Kurve) und Standardfehler des Mittelwertes (Fläche).

## A NS1619 adult



## B NS1619 + PDP A adult

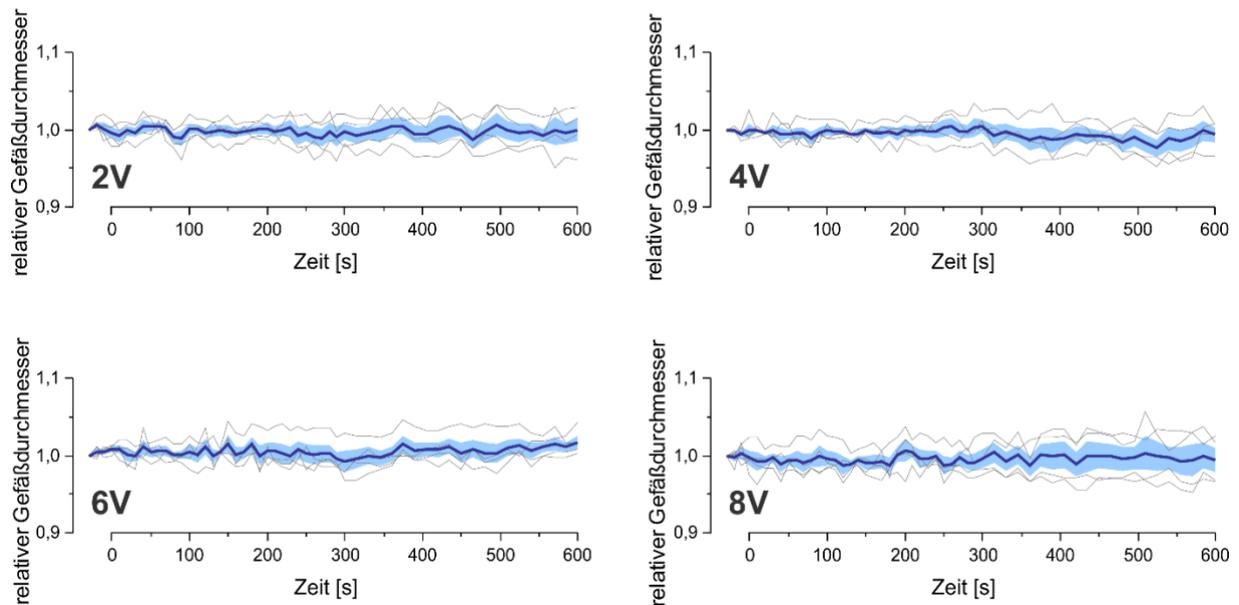


Abbildung 30: Rohdaten der dynamischen Gefäßreaktion der adulten NS1619-Kohorte ( $n_a=5$ ) (A) und der adulten NS1619 + PDP A-Kohorte ( $n_a=4$ ) (B) im zeitlichen Verlauf (600s) für die vier Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V): Reaktion der einzelnen Versuchstiere (grau), Mittelwert (dicke Kurve) und Standardfehler des Mittelwertes (Fläche).

#### 4.2.1 NS1619-Wirkung

Zur Verdeutlichung der NS1619-Wirkung als direkter Aktivator der BK-Kanäle wurde ein Vergleich zwischen den juvenilen NS1619-Interventionsgruppen und der juvenilen aCSF-Kontrollgruppe des ersten Teilprojekts vorgenommen (Abbildung 31).

Der relative Gefäßdurchmesser nach elektrischer Stimulation der aCSF-Kontrollgruppe zeigt hierbei eine deutliche Vasokonstriktion im Vergleich zu den NS1619-Interventionsgruppen (NS1619, NS1619 + PDP A, NS1619 + BOX A).

Die Darstellung veranschaulicht die inhibitorische Wirkung des NS1619 auf die Vasokonstriktion im Versuchsmodell. Die Abbildung dient dabei lediglich dieser Veranschaulichung und soll zu einem besseren Verständnis beitragen; es erfolgte keine statistische Auswertung der Grafik.

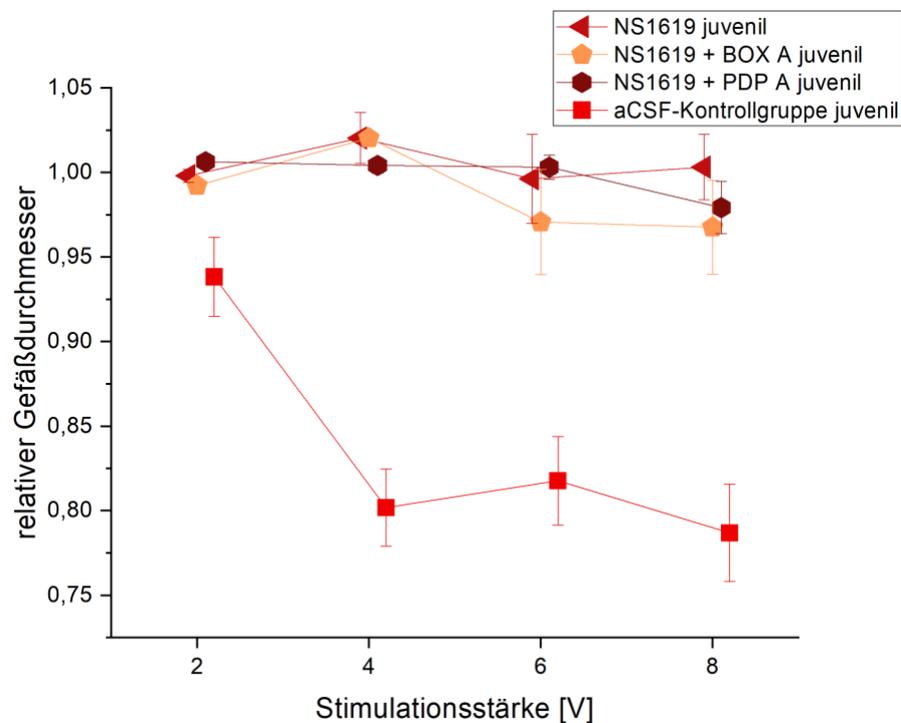


Abbildung 31: Mittelwerte und Standardfehler des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation der aCSF-Kontrollgruppe und der NS1619-Interventionsgruppen; Darstellung in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V); Verdeutlichung des inhibitorischen Effekts von NS1619 auf die Vasokonstriktion.

#### 4.2.2 Zeitpunkt der maximalen Kontraktion

Der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation zeigte keine signifikanten Unterschiede, weder bei Betrachtung der Alterskohorte oder in den verschiedenen Interventionsgruppen, noch in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Stimulationsstärken (Abbildung 32).

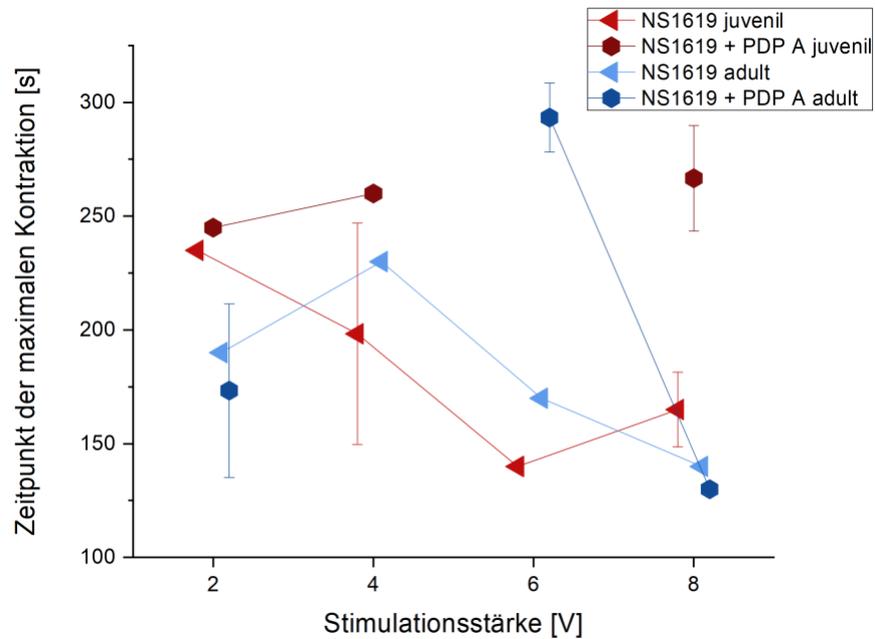


Abbildung 32: Mittelwerte und Standardfehler der Zeitpunkte der maximalen Kontraktion in Abhängigkeit der Stimulationsstärke für die NS1619-Interventionsgruppen (NS1619 juvenil/adult, NS1619 + PDP A juvenil/adult).

Die Auswertung der Interventionsgruppe NS1619 + BOX A ( $n_a=7$ ) erfolgte separat im Vergleich zu den übrigen juvenilen Interventionsgruppen mit NS1619 ( $n_a=7$ ) und der Kombination NS1619 + PDP A ( $n_a=6$ ), da keine Experimente mit adulten Tieren und der Substanzkombination NS1619 + BOX A durchgeführt wurden.

Der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation (Abbildung 33) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen juvenilen Interventionsgruppen (NS1619, NS1619 + PDP A und NS1619 + BOX A).

Auch in Bezug auf die unterschiedlichen Stimulationsstärken konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede des Zeitpunkts der maximalen Kontraktion erfasst werden.

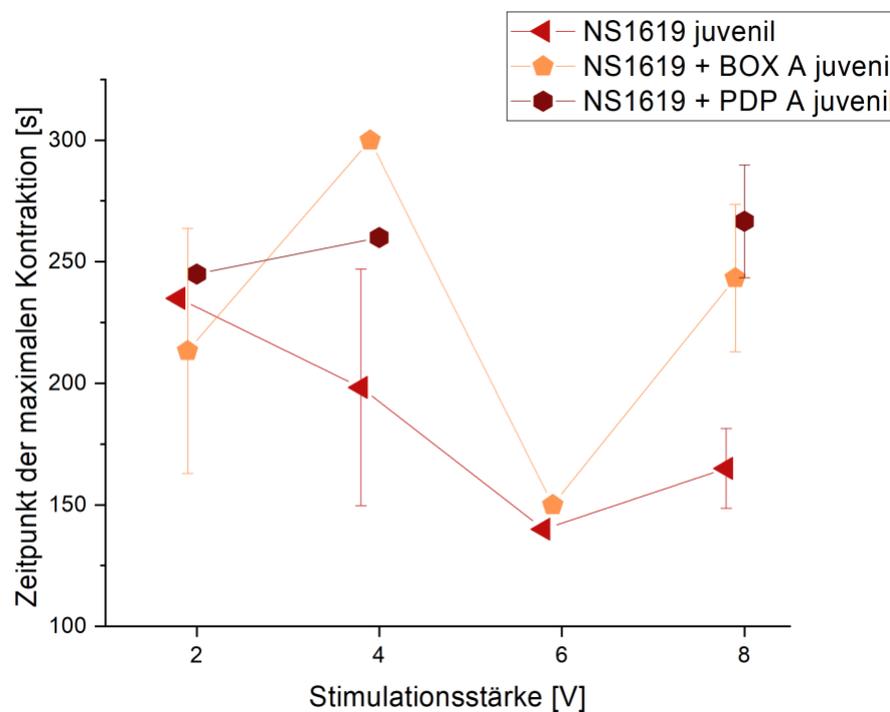


Abbildung 33: Mittelwerte und Standardfehler der Zeitpunkte der maximalen Kontraktion in Abhängigkeit der Stimulationsstärke für die juvenilen NS1619-Interventionsgruppen (NS1619, NS1619 + PDP A, NS1619 + BOX A).

### 4.2.3 Amplitude

Die Auswertung der maximalen Gefäßkontraktion nach elektrischer Stimulation zeigte eine statistisch signifikante Altersabhängigkeit (Abbildung 34). Bei Betrachtung der juvenilen und adulten Tiere, ohne Berücksichtigung der verschiedenen Interventionsgruppen, zeigten juvenile Tiere einen minimalen relativen Gefäßdurchmesser nach elektrischer Stimulation von  $0,96 \pm 0,01$  ( $n_s=17$ ), während adulte Tiere einen minimalen relativen Gefäßdurchmesser von  $0,98 \pm 0,01$  aufwiesen ( $n_s=12$ ;  $p<0,05$ ).

Eine unterschiedliche Wirkung zwischen den Interventionen NS1619 und der Kombination aus NS1619 + PDP A konnte statistisch nicht nachgewiesen werden. Zudem nahmen die verschiedenen Stimulationsstärken keinen Einfluss auf die Amplitude der Gefäßreaktion.

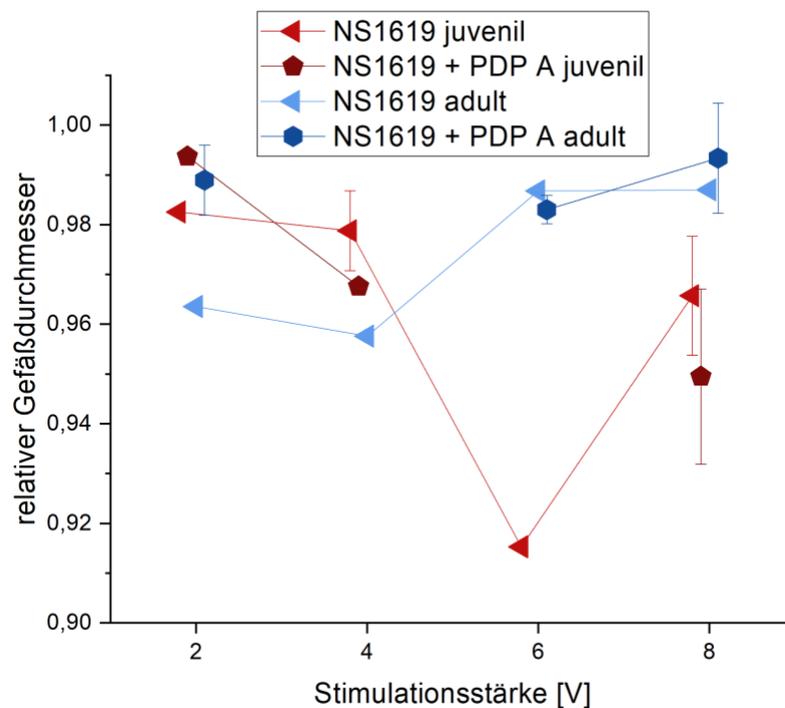


Abbildung 34: Mittelwerte und Standardfehler des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation der verschiedenen Interventionsgruppen (NS1619 juvenil/adult, NS1619 + PDP A juvenil/adult); Darstellung in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V).

Die Auswertung der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation zeigte signifikante Unterschiede zwischen der NS1619 + BOX A-Intervention im Vergleich zu den beiden übrigen juvenilen Gruppen NS1619 und NS1619 + PDP A (Abbildung 35). Statistische Signifikanz erreichte sowohl der Unterschied des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation zwischen NS1619 + BOX A ( $0,89 \pm 2 \times 10^{-4}$ ;  $n_s=8$ ) und NS1619 ( $0,96 \pm 2 \times 10^{-4}$ ;  $n_s=11$ ;  $p<0,01$ ) als auch der Unterschied zwischen NS1619 + BOX A ( $0,89 \pm 2 \times 10^{-4}$ ) und NS1619 + PDP A ( $0,95 \pm 0,01$ ;  $n_s=6$ ,  $p<0,01$ ).

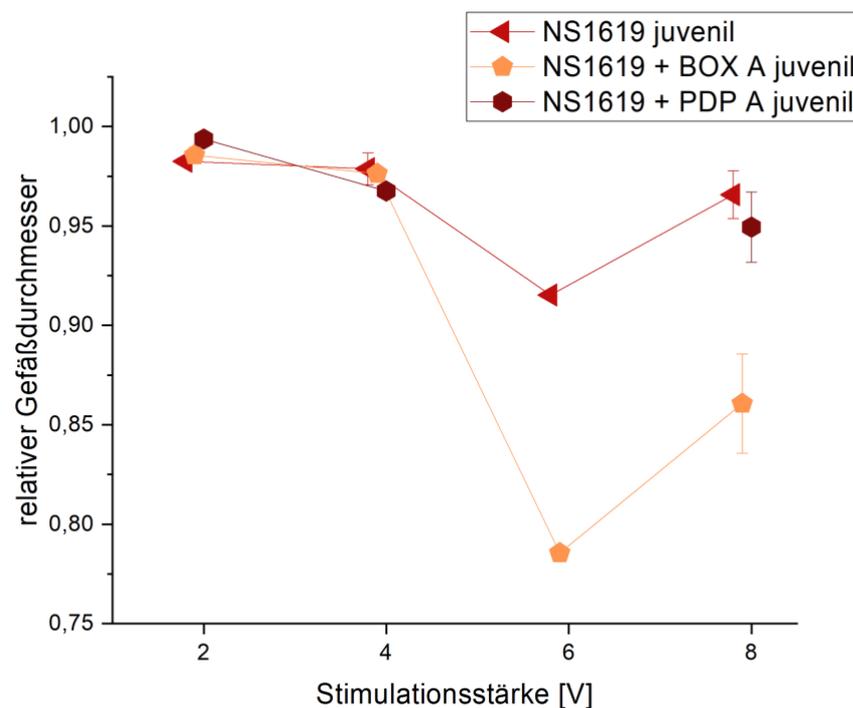


Abbildung 35: Mittelwerte und Standardfehler des minimalen relativen Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation der juvenilen NS1619-Interventionsgruppen (NS1619, NS1619 + PDP A, NS1619 + BOX A); Darstellung in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken (2V, 4V, 6V, 8V).

#### **4.2.4 Zeitkonstante tau**

Der explorative Vergleich zwischen den beiden Interventionsgruppen NS1619 und NS1619 + PDP A konnte nicht vollständig durchgeführt werden, da für die Interventionsgruppe NS1619 + PDP A lediglich ein einzelner Messwert vorlag. Auch eine Betrachtung der Altersunterschiede in beiden Interventionsgruppen war aufgrund fehlender Daten nicht möglich. Der Mittelwert der Zeitkonstante *tau* für die Interventionsgruppe NS1619, ungeachtet der Altersgruppen, belief sich auf  $224 \pm 125$  s ( $n_s=3$ ). Der Wert der NS1619 + PDP A-Interventionsgruppe lag bei 364 s ( $n_s=1$ ). Die NS1619 + BOX A Interventionsgruppe zeigte einen Mittelwert von  $382 \pm 94,8$  s ( $n_s=2$ ).

#### **4.2.5 A1 – Aufweitung der Gefäße**

Die Aufweitungsfähigkeit A1 wurde ebenfalls rein deskriptiv betrachtet. Der Mittelwert der NS1619-Interventionsgruppe ohne Betrachtung der Altersunterschiede lag bei  $0,04 \pm 0,01$  ( $n_s=3$ ). Die Interventionsgruppe mit NS1619 + PDP A zeigte einen Wert von 0,07 ( $n_s=1$ ). In der NS1619 + BOX A-Gruppe konnte für A1 ein Wert von  $0,18 \pm 0,01$  ( $n_s=2$ ) gemessen werden.

#### **4.2.6 AUC – area under the curve**

Die AUC der NS1619-Intervention ergab einen Mittelwert von  $29,4 \pm 8,8$  s ( $n_s=3$ ). Bei der Kombination aus NS1619 + PDP A konnte ein Wert von 31,5 s ( $n_s=1$ ) gemessen werden. Die Interventionsgruppe NS1619 + BOX A wies eine AUC von  $69,8 \pm 8,7$  s ( $n_s=2$ ) auf.

### **4.3 Teilprojekt 3**

Das dritte Teilprojekt befasste sich mit den langfristigen Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf das morphologische Erscheinungsbild zerebraler Gefäße. Hierzu wurde der relative Anteil der Gefäßwand an der Gesamtfläche des Gefäßquerschnitts bestimmt. Im Folgenden wird dieser Wert als relative Gefäßwanddicke bezeichnet. Als Einflussfaktoren auf diesen Parameter wurden die unterschiedlichen Zeitpunkte der Dekapitation der Tiere nach stattgehabter Intervention untersucht. Dies ermöglichte die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Gefäßveränderungen. Zudem wurden die Auswirkungen der verschiedenen Interventionen auf die relative Gefäßwanddicke verglichen. Zur Analyse wurden drei verschiedene Gefäßtypen berücksichtigt. Eine ausführliche Erläuterung dieser Parameter erfolgte im Abschnitt „Material und Methoden“.

### 4.3.1 Tag der Dekapitation

Zunächst erfolgte ein Vergleich zwischen den Tagen 3, 7, 14 und 28 nach stattgefundener Intervention (Abbildung 36). Ungeachtet der Interventionen und der unterschiedlichen Gefäßtypen fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Gefäßwanddicke zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen Tag 3 ( $14,1 \pm 0,35$  %) ( $n_a=15$ ) und Tag 7 ( $12,8 \pm 0,2$  %) ( $n_a=20$ ;  $p<0,01$ ). Signifikanz erreichte auch der Unterschied zwischen Tag 3 ( $14,1 \pm 0,35$  %) und Tag 28 ( $12,9 \pm 0,26$  %) ( $n_a=20$ ;  $p<0,05$ ). Eine weitere signifikante Unterscheidung war zwischen Tag 7 ( $12,8 \pm 0,2$  %) ( $n_a=20$ ) und Tag 14 ( $14,3 \pm 0,31$  %) messbar ( $n_a=20$ ,  $p<0,01$ ). Auch zwischen Tag 14 ( $14,3 \pm 0,31$  %) und 28 ( $12,9 \pm 0,26$  %) war eine signifikante Unterscheidung möglich ( $p<0,01$ ).

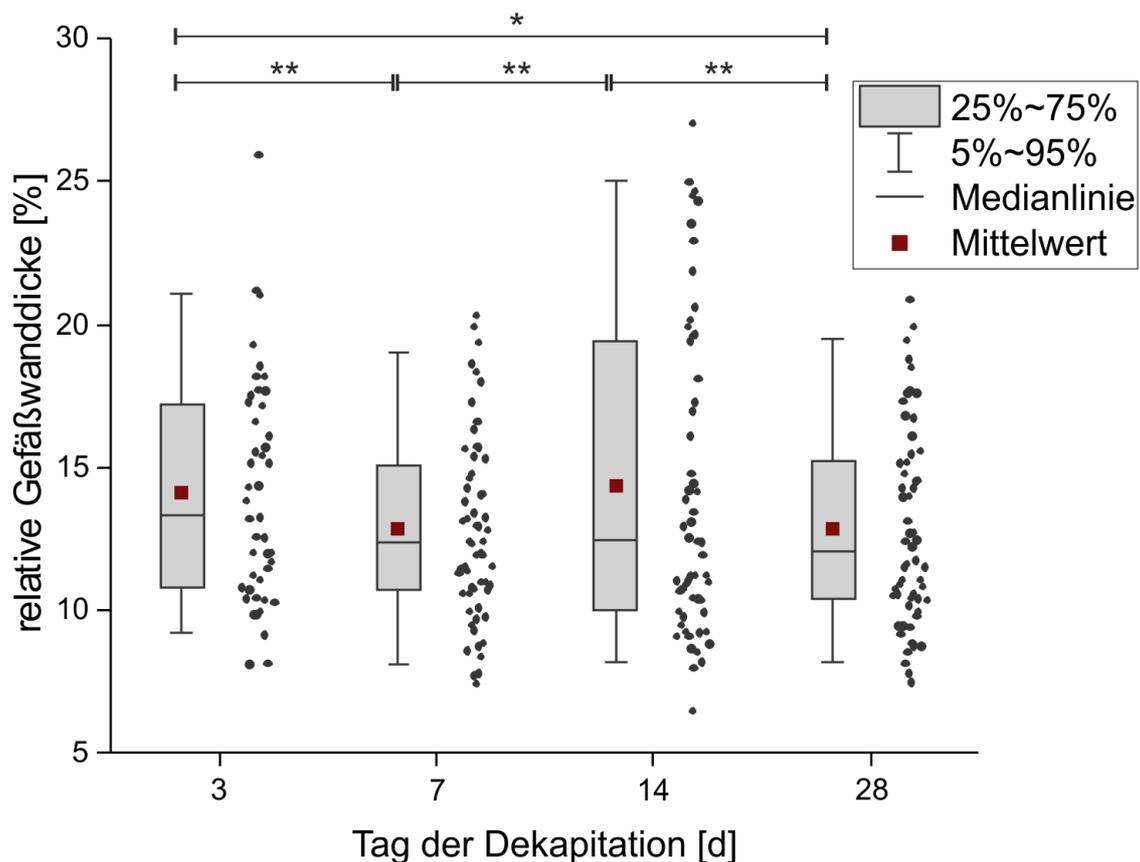


Abbildung 36: Einfacher Boxplot der relativen Gefäßwanddicke [%] am Tag der Dekapitation 3, 7, 14 und 28 (Daten der Tage 3, 7 und 14 aus vorherigen Arbeiten); Signifikanzdarstellung \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .

### 4.3.2 Intervention

Bei alleiniger Betrachtung der Interventionen, ohne Berücksichtigung der verschiedenen Gefäßtypen und Zeitpunkte der Dekapitation, fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Gefäßwanddicke zwischen *sham*-operierten Tieren ( $12,9 \pm 0,29$  %) ( $n_a=20$ ) und der Intervention mit BOX ( $14,3 \pm 0,34$  %;  $n_a=15$ ;  $p<0,05$ ). Auch der Unterschied zwischen der *sham*-Kohorte ( $12,9 \pm 0,29$  %) und der Eigenblut-Intervention ( $14 \pm 0,25$  %;  $n_a=20$ ) erreichte Signifikanz ( $p<0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied der relativen Gefäßwanddicke zwischen der BOX- ( $14,3 \pm 0,34$  %) und PDP-Intervention ( $13 \pm 0,24$  %;  $n_a=20$ ) wurde ebenfalls festgestellt ( $p<0,05$ ). Darüber hinaus fand sich ein signifikanter Unterschied der Intervention mit PDP ( $13 \pm 0,24$  %) und Eigenblut ( $14 \pm 0,25$  %;  $p<0,05$ ) (Abbildung 37).

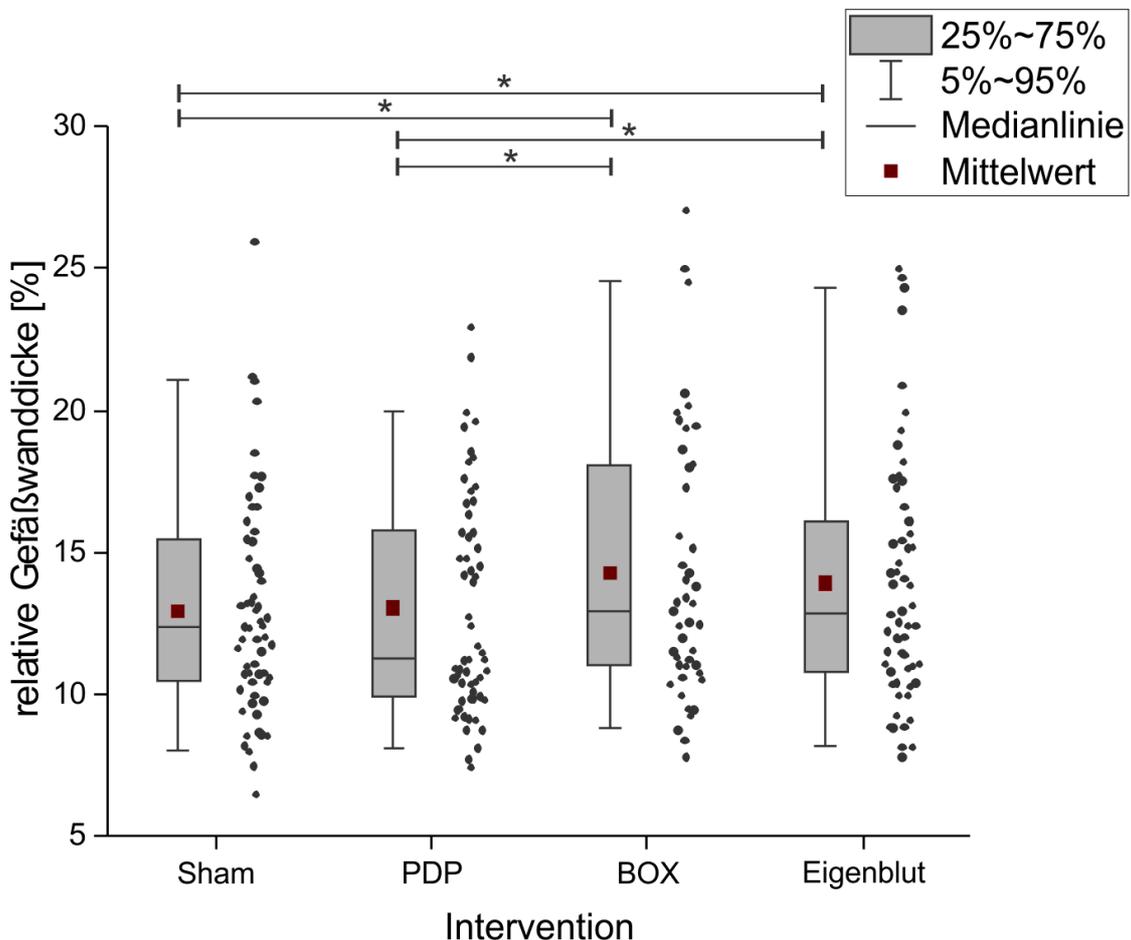


Abbildung 37: Einfacher Boxplot der relativen Gefäßwanddicke [%] in den Interventionsgruppen *sham*, PDP, BOX und Eigenblut; Signifikanzdarstellung \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .

### 4.3.3 Gefäßtyp

Insgesamt wurden drei unterschiedliche Gefäßtypen unter dem Laser-Scan-Mikroskop aufgesucht und gescannt. Der paarweise Vergleich der Gefäßtypen zeigte zwischen allen drei Gefäßarten statistisch signifikante Unterschiede der relativen Gefäßwanddicke (Abbildung 38). Die Mittelwerte der relativen Gefäßwanddicke der *Arteria cerebri posterior* (PCA) lagen bei  $17,9 \pm 0,3 \%$  ( $n_a=75$ ), die der *Arteria azygos pericallosa* (APA) bei  $10,7 \pm 0,2 \%$  ( $n_a=75$ ) und der *Arteria basilaris* (BA) bei  $11,8 \pm 0,29 \%$  ( $n_a=75$ ). Die APA – als Kontrollgefäß – zeigte signifikante Unterschiede der relativen Wanddicke zur BA ( $p<0,01$ ) und zur PCA ( $p<0,01$ ). Auch die BA und PCA zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied der relativen Wandfläche ( $p<0,01$ ).

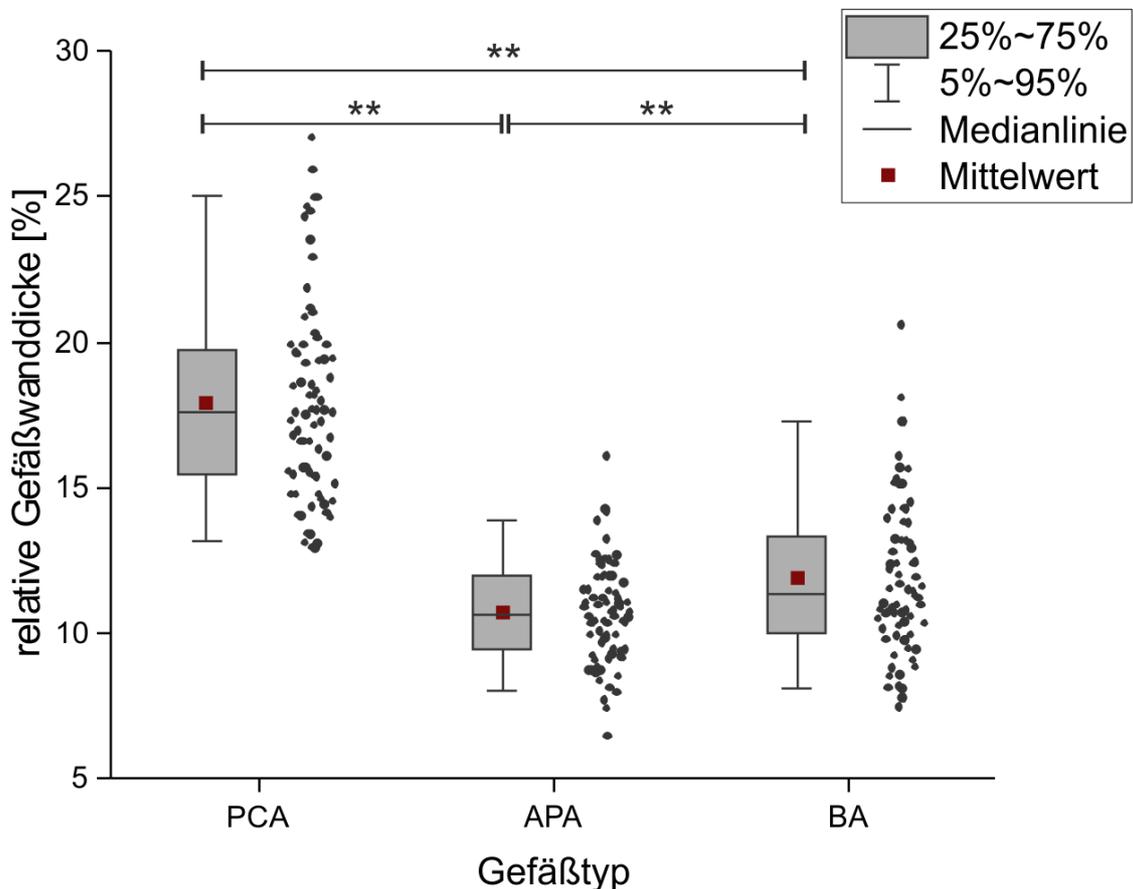


Abbildung 38: Einfacher Boxplot der relativen Gefäßwanddicke [%] der Gefäßtypen *Arteria communicans posterior* (PCA), *Arteria azygos pericallosa* (APA) und *Arteria basilaris* (BA); Signifikanzdarstellung \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .

#### 4.3.4 Zeitlicher Verlauf der relativen Gefäßwanddicke innerhalb der Interventionsgruppen

Neben der alleinigen Auswertung der drei Parameter – Tag der Dekapitation, Intervention und Gefäßtyp und ohne Berücksichtigung der jeweils anderen Einflussfaktoren – war der Anteil der relativen Gefäßwanddicke innerhalb einer Interventionsgruppe im zeitlichen Verlauf von großem Interesse. Somit sollte eine Aussage darüber ermöglicht werden, wie sich die Wandfläche bzw. Gefäßwanddicke im zeitlichen Verlauf über 28 Tage nach der jeweiligen Intervention verhielt.

Zum Vergleich wurden die drei untersuchten Gefäßtypen getrennt voneinander betrachtet. In den unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden die Tage der Dekapitation einem paarweisen Vergleich unterzogen.

##### Arteria communicans posterior

Die Auswertung der *Arteria communicans posterior* (PCA) ergab folgende Ergebnisse (Abbildung 39).

Für die *sham*-Interventionsgruppe konnte ein signifikanter Unterschied der relativen Gefäßwanddicke zwischen Tag 3 ( $20,5 \pm 3,7$  %;  $n_a=5$ ) und Tag 14 ( $14,6 \pm 1,5$  %;  $n_a=5$ ) festgestellt werden ( $p<0,05$ ). Die paarweisen Vergleiche mit Tag 7 ( $16,2 \pm 2,7$  %;  $n_a=5$ ) und Tag 28 ( $15,8 \pm 2,3$  %;  $n_a=5$ ) wiesen keine statistische Signifikanz auf.

In der PDP-Interventionsgruppe fanden sich in keiner Interventionsgruppe statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Tagen der Dekapitation.

In der BOX-Interventionsgruppe fehlte eine Erfassung des dritten Tages nach Dekapitation. Hier konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Gefäßwanddicke zwischen Tag 7 ( $16,7 \pm 2,8$  %;  $n_a=5$ ) und Tag 14 ( $23,3 \pm 3,2$  %;  $n_a=5$ ) im Sinne einer Zunahme der relativen Gefäßwanddicke festgestellt werden ( $p<0,05$ ). Der Vergleich mit Tag 28 ( $16,9 \pm 2,6$  %;  $n_a=5$ ) *post interventionem* war nicht von statistischer Signifikanz.

Die Eigenblutgruppe zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme der relativen Gefäßwanddicke der PCA zwischen Tag 7 ( $15,1 \pm 1,8$  %;  $n_a=5$ ) und Tag 14 ( $23,5 \pm 2,1$  %;  $n_a=5$ ) ( $p<0,01$ ). Der Vergleich mit Tag 28 ( $18,4 \pm 2,0$  %;  $n_a=5$ ) war nicht statistisch signifikant.

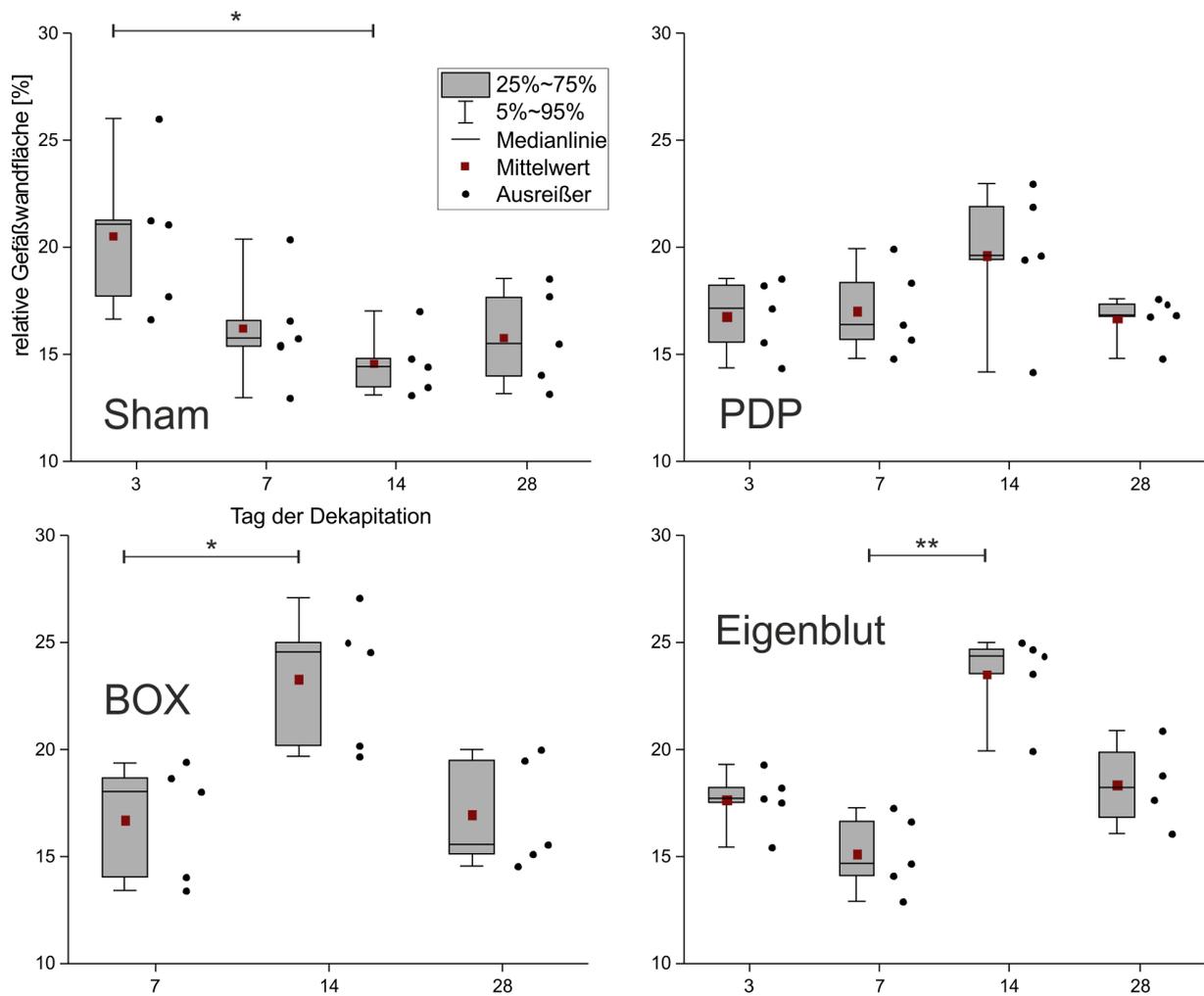


Abbildung 39: Boxplots der relativen Gefäßwandfläche [%] der Arteria communicans posterior (PCA) der unterschiedlichen Interventionsgruppen (sham, PDP, BOX, Eigenblut); Signifikanzdarstellung \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### Arteria basilaris

Die Auswertung der relativen Gefäßwanddicke der *Arteria basilaris* (BA) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen Gefäßwandfläche zwischen den verschiedenen Dekapitationstagen innerhalb der Interventionsgruppen.

### Arteria azygos pericallosa

Die Auswertung des Kontrollgefäßes *Arteria azygos pericallosa* (APA) zeigte ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede der Gefäßwanddicke in den verschiedenen Interventionsgruppen (siehe Abbildung 40).

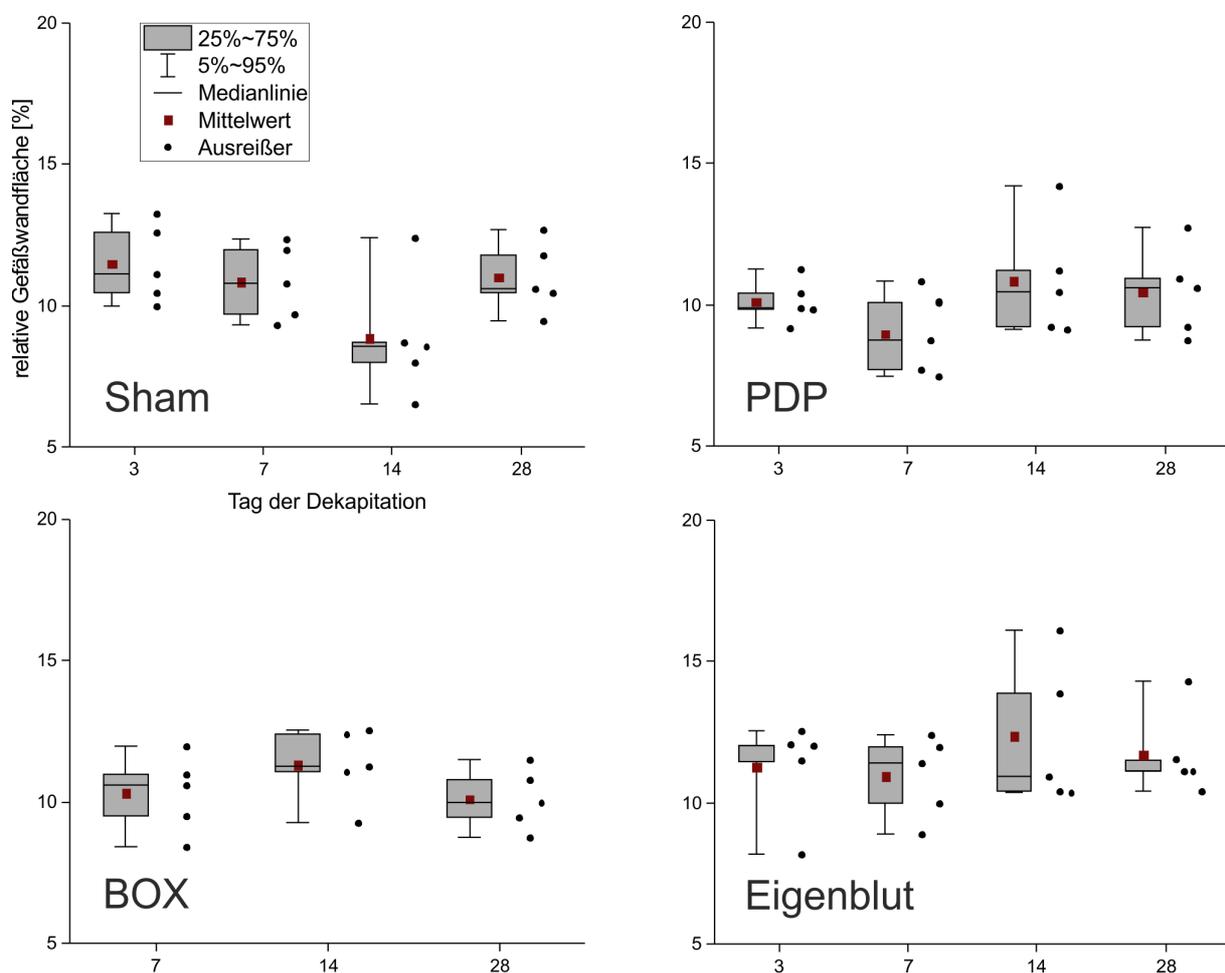


Abbildung 40: Boxplots der relativen Gefäßwanddicke [%] der Arteria azygos pericallosa (APA) der unterschiedlichen Interventionsgruppen (sham, PDP, BOX, Eigenblut); Signifikanzdarstellung \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Aufgaben der Arbeit

Zahlreiche Hypothesen und Studien versuchen das komplexe Bild einer verzögerten zerebralen Ischämie nach Subarachnoidalblutung zu erklären. Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Einflussfaktoren ist aktuell nicht vollständig geklärt und weitere – bislang unbeachtete – Mechanismen können eine Rolle in der Pathophysiologie dieser Folgeerscheinung der SAB spielen.

Einige Vorarbeiten belegen, dass Hämoglobinabbauprodukte über ihren gefäßverengenden Effekt einen Einfluss auf die Entstehung einer verzögerten zerebralen Ischämie nehmen (Kranc et al. 2000, Clark et al. 2002, Deng et al. 2018). Bislang wurde in Studien der Gefäßdurchmesser als statischer Parameter unter Gleichgewichtsbedingungen *in vivo* und *in vitro* untersucht (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019). Dabei wurde allerdings die physiologische Funktion der neurovaskulären Kopplung nicht betrachtet. Der Fokus der Studien lag vielmehr auf der Beschreibung einer durch Hämoglobinabbauprodukte und Blut hervorgerufenen Vasokonstriktion pialer und parenchymaler Arteriolen (Wellman und Koide 2013, Wang et al. 2015).

Diese Promotionsarbeit befasste sich mit den Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf die dynamische Gefäßreaktion unter dem Einfluss der neurovaskulären Kopplung. Dreier beobachtete eine Inversion der induzierten Hyperämie durch die neurovaskuläre Kopplung nach Subarachnoidalblutung (Dreier 2011). Es konnte eine Vasokonstriktion – anstelle einer Mehrdurchblutung – als Antwort auf neuronale Aktivität gemessen werden. Die Frage, inwiefern Hämoglobinabbauprodukte in diesen Prozess eingreifen, blieb bislang ungeklärt. Ferner ist die Evaluation möglicher pharmakologischer Interventionen von großem Interesse, um eine Vasokonstriktion und die Entstehung eines verzögerten neurologischen Defizits zu verhindern.

Die vorliegende Promotionsarbeit ermöglicht eine Ergänzung des bisherigen Wissens über Hämoglobinabbauprodukte und deren Wirkung auf die neurovaskuläre Kopplung und sorgt für eine Erweiterung des pathophysiologischen Verständnisses.

Das erste Teilprojekt dieser Arbeit befasste sich mit den Auswirkungen spezifischer Hämoglobinabbauprodukte auf die dynamische Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation. Untersucht wurden hierbei die Substanzen PDP B und BOX B, sowie eine Kombination aus PDP A und BOX A. Eine Versuchsreihe mit TTX wurde durchgeführt,

um den experimentellen Aufbau der elektrischen Stimulation zu verifizieren. Zur Durchführung wurden vor allem juvenile Tiere verwendet, lediglich die Substanzkombination aus PDP A und BOX A wurde an juvenilen und adulten Tieren untersucht.

Es konnte für die verschiedenen Substanzen kein signifikanter Unterschied der Amplitude der induzierten Vasokonstriktion festgestellt werden (mit Ausnahme von TTX). Es fand sich jedoch ein signifikanter Unterschied der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation zwischen juvenilen und adulten Tieren. Die Zeitkonstante  $\tau$  der Wiederaufweitung und das Ausmaß dieser Dilatation  $A_1$  sowie der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Interventionsgruppen. Die Stimulationsstärken hatten einen signifikanten Einfluss auf die Amplitude der Vasokonstriktion sowie auf die *AUC*.

Im zweiten Teilprojekt wurde der identische experimentelle Aufbau genutzt, um die Wirkung des BK-Kanal-Aktivators NS1619 auf die dynamische Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation zu untersuchen. Hierzu wurden Experimente mit NS1619 allein sowie NS1619 in Kombination mit verschiedenen Hämoglobinabbauprodukten (PDP A, BOX A) durchgeführt. Auch hier erfolgten Experimente an juvenilen und adulten Tieren, um den Einfluss des Alters auf die Gefäßreaktion zu ermitteln.

Die Amplitude der maximalen Kontraktion zeigte einen statistisch signifikanten Altersunterschied mit einer größeren Amplitude bei juvenilen Tieren. Eine Beeinflussung der Amplitude durch die verschiedenen Interventionen konnte allerdings nicht festgestellt werden. Insgesamt bestätigten die Experimente die inhibitorische Wirkung von NS1619 auf die Vasokonstriktion nach elektrischer Stimulation.

Neben den kurzfristigen Auswirkungen der Hämoglobinabbauprodukte auf die akute dynamische Reaktion infolge einer elektrischen Stimulation, untersuchte das dritte Teilprojekt die langfristigen Auswirkungen von PDPs und BOXes auf die arterielle Gefäßwand. Ziel war es morphologische Veränderungen in Form einer Wandflächenveränderung festzustellen. Die Daten wurden für den Tag 28 nach einer intrathekalen Applikation von Eigenblut, PDPs oder BOXes gesammelt und mit Vordaten der Arbeitsgruppe von Tag 3, 7 und 14 der gleichen Interventionen verglichen.

Der Vergleich der einzelnen Tage zeigte statistisch signifikante Unterschiede in der relativen Gefäßwanddicke. Auch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Interventionen und den untersuchten Gefäßtypen konnten festgestellt werden. Ein Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte innerhalb einer Interventionsgruppe ermöglichte darüber hinaus, eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Gefäßwandflächenveränderungen nach der entsprechenden Intervention zu treffen.

## **5.2 Teilprojekt 1 und 2**

### **5.2.1 Methodik Teilprojekt 1 und 2**

#### **5.2.1.1 Auswahl der Versuchstiere**

Basierend auf bisherigen Untersuchungen, die das Mausmodell für die Forschung der Subarachnoidalblutung etablierten, fiel die Wahl der experimentellen Versuchstiere für diese Promotionsarbeit ebenfalls auf die Maus. Die Grundlagenforschung zur Subarachnoidalblutung erfolgte insbesondere an Mäusen und Ratten, die sich hierfür als sehr geeignet herausstellten (Lin et al. 2003).

Kikkawa et al. schlugen die Verwendung von Hasen als Modelltiere für die Erforschung der Subarachnoidalblutung vor, da diese im Vergleich zu Mäusen und Ratten den Vorteil bieten, dass Angiographien durchgeführt und somit Beobachtungen der chronologischen Veränderungen der Gefäßdurchmesser innerhalb desselben Tieres vollzogen werden können (Kikkawa et al. 2015).

Themenbezogene Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe wurden am Mausmodell durchgeführt. Die etablierten Methoden wurden entsprechend der Vorerfahrungen ergänzt und fortlaufend optimiert. Somit konnten stabile Versuchsbedingungen geschaffen werden, auf deren Grundlage die entsprechenden Daten erhoben werden konnten. In den entsprechenden vorherigen Studien kamen ebenfalls Slo 1-Mäuse zum Einsatz. Untersuchungen sowohl mit Slo 1-Wildtyp-Mäusen (Slo 1 +/+), als auch mit Slo 1-Knockout-Mäusen (Slo 1 -/-) wurden durchgeführt und konnten belegen, dass die Gefäßreaktionen durch Hämoglobinabbauprodukte in Abhängigkeit des Slo-Gens auftreten (Joerk et al. 2014). Dieser klare Beleg für die Abhängigkeit von BK-Kanälen (codiert durch das Slo-Gen) begründete die Auswahl der reinen Wildtyp-Mäuse in dieser Studie ohne Erfassung spezifischer Knockout-Tiere.

Durch die Verwendung des äquivalenten experimentellen Aufbaus sowie der gleichen Versuchstiere ist eine Vergleichbarkeit mit früheren Ergebnissen gewährleistet.

Ein weiterer positiver Aspekt des Versuchstiers Maus ist die gute Planbarkeit des Nachwuchses. Mit einer kurzen Generationsdauer und Tragezeiten von 18,5 bis 21 Tagen konnte eine regelmäßige Nachwuchsgenerierung gewährleistet werden, wodurch ein stetiges und konstantes Experimentieren mit juvenilen Tieren ermöglicht wurde (Ayadi et al. 2011). Zu beachten sind außerdem die geringen Haltungskosten von Mäusen. Die gute Kenntnis des Mausgenoms und genetische Veränderungen der Tiere ermöglichten zudem, dass spezifische Slo 1-Knockout-Tiere generiert und getestet werden konnten, während ein entsprechendes Modell für andere Tierarten (z.B. Ratten) noch nicht etabliert wurde.

Zur Analyse einer möglichen Altersabhängigkeit der dynamischen Gefäßreaktion kamen juvenile und adulte Tiere zum Einsatz. Das Alter der juvenilen Tiere wurde mit einem Zeitraum von 20 bis 30 Tagen definiert. Durch diese zeitliche Einschränkung wurden infantile Tiere ausgeschlossen, die bis zu ihrem 20. Lebensstag in der Regel noch keine Unabhängigkeit des Muttertieres aufweisen (Ayadi et al. 2011). Der gewählte Zeitraum bis zum Tag 30 sollte eine deutliche Abgrenzung gegenüber adulten Tieren ermöglichen. Zum 30. postnatalen Tag bestand bereits eine deutlich stärkere Verknöcherung des Schädels als noch 10 Tage zuvor. Die Altersgrenze der adulten Tiere wurde durch das Mindestalter von 365 Tagen definiert. Damit erreichten diese Tiere bereits ein fortgeschrittenes Alter. Mäuse in der experimentellen Tierhaltung haben im Allgemeinen eine Lebenserwartung von ca. 1,5 bis 3 Jahren (Ayadi et al. 2011). Bei der Übertragung der Alterskohorten der Versuchstiere auf das menschliche Alter ergibt sich folgende Einschätzung. Die juvenilen Tiere des Experiments entsprechen weitgehend einer adoleszenten Altersgruppe beim Menschen. Für die adulte Kohorte des ersten und zweiten Teilprojekts mit einem Alter von mindestens einem Jahr kann – im Hinblick auf die Lebenserwartung der Versuchstiere – ein gehobenes menschliches Alter von etwa 60-70 Jahren angenommen werden.

Die im dritten Teilprojekt verwendeten Tiere mit einem Alter von mindestens 60 Tagen entsprechen in diesem Modell am ehesten einer mittelalten Bevölkerungsgruppe zwischen 50-70 Jahren, in der das Krankheitsbild der Subarachnoidalblutung klinisch am häufigsten auftritt.

### **5.2.1.2 Methode der Hirnpräparation**

Wie bereits erwähnt, fanden einige Vorarbeiten mit einem äquivalenten oder in großen Teilen sehr ähnlichen Versuchsaufbau statt. Die dort verwendete Methode der Hirnschnittpräparation wurde in hiesiger Untersuchung erneut aufgegriffen. Die Methode ist anfällig gegenüber mechanischen Schäden am Hirnparenchym durch das Präparationsbesteck bei Eröffnung der Schädelkalotte. Außerdem müssen auch oxidative Schäden berücksichtigt werden, die einen möglichen Hinweis auf eine zu ausgedehnte Präparationsdauer oder eine zu geringe Kühlung gaben. Oxidative Schäden konnten hierbei vor allem bei den adulten Tieren beobachtet werden, die eine geringere Ischämietoleranz aufweisen. Diese einschränkende Voraussetzung führte folglich zu einer Verschlechterung der Hirnschnittqualität der adulten Tiere und damit zu schwierigeren experimentellen Bedingungen im Vergleich zu den juvenilen Mäusen. Um dem entgegenzuwirken, wurde der Präparationsvorgang bei den adulten Tieren bereits frühzeitiger unter eiskalter aCSF-Lösung durchgeführt als bei juvenilen Tieren. Als Nachweis der Vitalität der Hirnschnitte erfolgte nach jedem Experiment die Kontrolle mittels Noradrenalin-Applikation. So konnte gewährleistet werden, dass jedes eingeschlossene Experiment auf Grundlage einer vitalen Arteriole durchgeführt wurde.

### **5.2.1.3 Perfusionsdruck**

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe – insbesondere in statischen Untersuchungen – wurde zumeist eine vasokonstriktorische Substanz eingesetzt, um eine Vorspannung der untersuchten Arteriolen zu erzeugen. Im akuten Hirnschnittmodell der Maus fehlt der physiologische Einfluss des Blutdrucks auf die Gefäße, wodurch diese in einem dilatierten Zustand vorliegen. Um den physiologischen Zustand der vorgespannten Gefäße zu imitieren, wurde die Substanz L-Arginin Methyl Ester (L-NAME) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Inhibitor der endothelialen und neuronalen NO-Synthase (eNOS/nNOS). NO ist ein bedeutendes Signalmolekül, welches durch die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase zu einer Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in glatten Muskelzellen führt und damit eine Vasorelaxation hervorruft.

Durch die Inhibition der NOS durch L-NAME konnte eine Vasorelaxation erfolgreich verhindert und eine Vorspannung der Gefäße im Versuchsaufbau gewährleistet werden (Pfeiffer et al. 1996).

In dieser Promotionsarbeit wurde auf die Verwendung von L-NAME zur Vorspannung der Gefäße verzichtet, um einen möglichen Einfluss auf die Vasokonstriktion nach elektrischer Stimulation auszuschließen. NO ist für eine suffiziente Dilatation der Arteriolen nach elektrischer Stimulation notwendig. Diese Fähigkeit wird durch den NO-Entzug durch L-NAME verhindert und führt zu großen Problemen bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse.

Zudem zeigte L-NAME selbst eine geringe vasokonstriktorische Wirkung auf Gefäße (Langguth 2020). Diese Beeinflussung der Messungen und eine Beeinträchtigung der Dilatation der Arteriolen sollte bei dieser Arbeit vermieden werden.

#### **5.2.1.4 Substanzen**

In Teilprojekt 1 erfolgte die Administration von verschiedenen isolierten Hämoglobinabbauprodukten sowie einer Kombination dieser. Die Auswahl der verwendeten Isomere PDP B und BOX B lässt sich durch Voruntersuchungen begründen, die eine vasokonstriktorische Aktivität dieser Substanzen nachweisen konnten (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019). In direkt vorangegangenen Studien wurden bereits die Substanzen PDP A und BOX A im gleichen experimentellen Aufbau untersucht (Daten noch nicht veröffentlicht). Eine Kombination aus PDP A und BOX A sollte in der vorliegenden Arbeit zudem eine Aussage darüber ermöglichen, ob eventuell Wechselwirkungen zwischen den Substanzen bzw. additive Effekte stattfinden.

Die Konzentrationen der untersuchten Substanzen richteten sich hierbei nach den Ergebnissen von Joerk et al., in denen gezeigt werden konnte, dass eine geringe Konzentration der PDPs von 0,5  $\mu\text{M}$  – entsprechend ihres Vorkommens im Liquor von SAB-Patient:innen (0,7  $\mu\text{M}$ ) – bereits vasokonstriktorische Effekte zeigte, während die gemessene BOX-Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  nicht für eine Vasoreaktion ausreichte (Joerk et al. 2019). Aus diesem Grund wurde die Konzentration der BOXes von 5 $\mu\text{M}$  beibehalten, um die Vergleichbarkeit zwischen bereits erhobenen Daten aus Vorarbeiten zu ermöglichen.

#### **5.2.1.5 Stimulationsstärken und Elektrodenposition**

Die elektrische Stimulation erfolgte in vier Stufen von je 2 Volt Differenz. Hierbei wurden die Spannungen von 2V, 4V, 6V und 8V in aufsteigender Intensität appliziert. Nach jeder Stimulation folgte eine 10-minütige Erholungsphase, in welcher die

Messungen in Form von Einzelaufnahmen vorgenommen wurden. Durch die verschiedenen Stimulationsstärken sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die dynamischen Reaktionen der Gefäße auf unterschiedliche Stimulationsstärken und damit eine mögliche Empfindlichkeit der Arteriolen zu erfassen.

Das Stimulationsprotokoll basierte hierbei auf Voruntersuchungen von Holthoff bzw. Holthoff und Witte. Diese beobachteten nach elektrischer Stimulation das Auftreten intrinsischer optischer Signale durch Veränderungen des extrazellulären Volumens. Für diese Untersuchung wurde das Gehirn zehnmal in Folge stimuliert, mit einer Erholungszeit von je 5 Minuten nach der Stimulation (Holthoff und Witte 1996, Holthoff et al. 1994). Zur Gewährleistung einer vollständigen Regeneration des Gefäßes vom elektrischen Impuls wurde diese Zeitspanne auf 10 Minuten ausgedehnt. Ursprünglich beinhaltete das Stimulationsprotokoll Spannungen zwischen 1V und 9V, mit Intervallen von jeweils 1V (Schröder 2021). Allerdings zeigte sich im Verlauf der Experimente, dass diese 9 Stimulationen mit anschließenden Erholungsphasen zu einer sehr hohen Beanspruchung der Hirnschnitte führte und folglich zahlreiche Experimente aufgrund des Vitalitätsverlustes der Hirnschnitte abgebrochen oder ausgeschlossen werden mussten. Daher wurde das Stimulationsprotokoll auf die hier verwendete Form von 2V bis 8V (in 2V-Schritten) reduziert.

Die verschiedenen Stimulationsstärken wurden in aufsteigender Intensität appliziert und nicht randomisiert. Durch jede Stimulation wird eine Veränderung der Ionenkonzentrationen im Intra- und Extrazellulärraum hervorgerufen, die schließlich in eine Vasoreaktion mündet. Es ist anzunehmen, dass nach jeder zusätzlichen Stimulation eine Wiederherstellung der ursprünglichen Ionenkonzentrationen für das Gewebe schwieriger wird. Somit zeigt sich nach wiederholter Stimulation eine gewisse „Erschöpfung“ des Hirnschnittmodells und damit auch eine geringere Vasoreaktivität der Gefäße. Vermutlich fällt diese „Erschöpfung“ nach hohen Stimulationsstärken von 6V und 8V deutlich größer aus als nach einer Stimulation mit 2V. Die aufsteigende Anordnung der Stimulationsstärken wurde daher gewählt, um eine möglichst geringe Verfälschung der Vasokonstriktion nach elektrischer Stimulation mit geringen Stimulationsstärken hervorzurufen. Jedoch ist davon auszugehen, dass die Vasokonstriktion bei höheren Stimulationsstärken bereits durch die vorausgegangenen Stimulationen beeinträchtigt wurde und damit geringer ausfiel als bei alleiniger Stimulation mit dieser Voltstärke.

Eine umgekehrte Stimulationsreihenfolge brächte den Vorteil, dass bei der Stimulation mit 8V eine maximale Gefäßreaktion ausgelöst wird und dabei keine Verfälschung durch eine „metabolische Erschöpfung“ des Hirnschnittmodells auftritt. Die größte Beeinflussung des Ergebnisses würde bei der Stimulation mit 2V auftreten, bei welcher jedoch sowieso die geringste Gefäßreaktion zu erwarten ist. Eine Umkehr des Stimulationsprotokolls sollte daher für nachfolgende Arbeiten in Erwägung gezogen werden.

Die Positionierung der Elektrode erfolgte in Kortexschicht VI, wobei die Messung der Gefäßreaktion in Schicht II/III vorgenommen wurde. Die Platzierung der Elektrode erfolgte in der Nähe der ausgewählten Arteriole, allerdings ohne direkten Kontakt zum Gefäß. Dies war entscheidend, denn eine direkte Stimulation des Gefäßes durch den elektrischen Impuls sollte streng vermieden werden. 1994 konnte Holthoff zeigen, dass eine Stimulation in Kortexschicht VI (an der Grenze zur weißen Substanz) zur Erregung einer gesamten Kolumne des Hirnparenchyms führte. Ein intrinsisches optisches Signal in diesem Bereich konnte von Schicht II-VI gemessen werden, wobei Schicht I in keinem Fall betroffen war (Holthoff et al. 1994). Diese Grundlage wurde hier verwendet, um eine Kolumne in der Umgebung der Arteriole zu aktivieren und durch diese neuronale Aktivierung eine Gefäßreaktion zu erzeugen. Entsprechend des Versuchsaufbaus bei Holthoff wurde auch in dieser Untersuchung eine konzentrische bipolare Elektrode verwendet, mit einem Durchmesser der Spitze von 0,1mm.

Nach korrekter Positionierung der Elektrode erfolgte eine 100-minütige Wartezeit vor Beginn der Stimulationsreihe. Diese wurde einerseits genutzt, um den Hirnschnitt mit der zu untersuchenden Substanz zu perfundieren, andererseits konnte dadurch eine Stabilität des experimentellen Versuchsaufbaus kontrolliert und gewährleistet werden. Es ist anzunehmen, dass durch den senkrechten Einstich der Elektrode in das Hirnparenchym eine Verletzung von Zellen hervorgerufen wurde, die zu einer Freisetzung von Ionen – insbesondere von Kaliumionen – führte. Durch die 100-minütigen Phase nach Elektrodenpositionierung vor Beginn der elektrischen Stimulationen konnten die ursprünglichen Ionenverhältnisse im Hirnschnitt mit hoher Wahrscheinlichkeit wiederhergestellt werden.

### 5.2.1.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung und statistische Analyse wurden im Abschnitt „Material und Methoden“ beleuchtet.

Die optische Auswertung des inneren Gefäßdurchmessers erfolgte am Monitor und war teilweise von einer begrenzten Bildqualität bestimmt. Der gleiche Punkt der inneren Gefäßwand wurde dabei über alle Aufnahmen im zeitlichen Verlauf verfolgt und für jedes Bild und beide Seiten des Gefäßlumens einzeln bestimmt (per Mausklick).

Die Ausschlusskriterien sowie die Parameter für die Auswertung wurden im Vorfeld festgelegt und orientierten sich hierbei an Voruntersuchungen, um eine Vergleichbarkeit mit bereits erhobenen Daten zu ermöglichen. Die Definition der Ausschlusskriterien sollte eine Validität der Daten ermöglichen, jedoch resultierte daraus ein Wegfall zahlreicher Experimente des zweiten Teilprojekts. Durch die Wirkung von NS1619 im Versuchsmodell waren zahlreiche Ausschlusskriterien erfüllt, was die Datensumme reduzierte und somit die statistische Auswertung erschwerte bzw. gänzlich verhinderte.

Der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion des Gefäßes wurde durch einen sogenannten *moving-average*-Filter ermittelt. Dieser Filter errechnete aus den Rohdaten des Gefäßdurchmessers von jeweils 5 benachbarten Zeitpunkten einen Mittelwert. Damit sollte verhindert werden Extremwerte der Gefäßreaktion oder Artefakte fälschlicherweise als maximale Kontraktion zu werten.

Die maximale Amplitude der Gefäßreaktion wurde ebenfalls mittels des *moving-average*-Filters ermittelt, sodass Streuungen der Kontraktion nicht zu einer Überschätzung der Amplitude der Vasokonstriktion führten.

Die Parameter der Zeitkonstante  $\tau$  und der Aufweitungsfähigkeit  $A1$  konnten durch die Bestimmung einer fit-Kurve erfasst werden. Hierbei handelte es sich um eine exponentielle Kurve, die dem Verlauf der Wiederaufweitung des Gefäßes nach stattgehabter Kontraktion möglichst genau angenähert wurde. Die Zeitkonstante dieser Kurve wurde schließlich bestimmt sowie deren Amplitude als Parameter der Aufweitungsfähigkeit  $A1$ . Einschränkend stellte sich hierbei teilweise die Anpassung der Kurve an den Verlauf der Gefäßreaktion dar. Bei einigen Experimenten konnte die Annäherung mittels der exponentiellen fit-Kurve nicht vorgenommen werden, da der Verlauf der Gefäßreaktion eher einer linearen Wiederaufweitung entsprach. Somit war

die mathematische Annahme einer exponentiellen Relaxation des Gefäßes nicht mehr geeignet und sowohl die Zeitkonstante  $\tau$ , die Aufweitung  $A1$  als auch *die area under the curve (AUC)* konnten nicht sinnvoll ermittelt werden.

Die *AUC* wurde ergänzend zu den einzelnen Parametern ermittelt. Sie sollte gegebenenfalls die Aussagen der übrigen Parameter zusammenfassen und damit die Auswertung der Gefäßreaktion vereinfachen. Entsprechend der hier erfassten Daten ließ sich dieses Ziel der *AUC* nicht verifizieren. Es ist tendenziell allerdings anzunehmen, dass die Aussagekraft der *AUC* nicht ausreicht, um die übrigen Parameter zu ersetzen.

## **5.2.2 Ergebnisse Teilprojekt 1**

### **5.2.2.1 Interpretation der dynamischen Gefäßreaktion der aCSF-Kohorte**

Bei Betrachtung der dynamischen Gefäßreaktion der Kontrollgruppe, die mit aCSF perfundiert wurde, ist eine deutliche Vasokonstriktion bei 4V, 6V und 8V zu erkennen, während eine Stimulation mit 2V zu keiner derartigen Veränderung des Gefäßdurchmessers führte.

Es wird angenommen, dass in dem verwendeten Versuchsaufbau die elektrische Stimulation eine so starke Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration hervorruft, dass eine Vasokonstriktion anstatt einer Vasodilatation ausgelöst wird. Diese Reaktion ist dabei durch den Versuchsaufbau und die Platzierung der Elektrode zu erklären.

Durch die Veränderung des Ionenmilieus in Folge der elektrischen Stimulation wird die Vasokonstriktion begünstigt und ist im Versuchsaufbau deutlich messbar.

Diese zunächst „paradox“ erscheinende Vasokonstriktion der Gefäße wurde in Kauf genommen, da eine Dilatation bei eventuell geringeren Stimulationsstärken nicht ausreichend durch das Auswertungsverfahren erfassbar gewesen wäre. Die Effektstärke der beobachteten Vasokonstriktion war ausreichend, um diese durch das Auswertungsverfahren zu erfassen und zu analysieren.

Bei einer Stimulationsstärke von 2V war in der Regel keine Kontraktion zu erkennen (unabhängig von der Intervention). Als Ursache für diese Beobachtung kann angenommen werden, dass die Stimulationsstärke nicht ausreichend für das Hervorbringen von Aktionspotentialen und für eine deutliche Veränderung des Ionenmilieus war und somit keine Gefäßreaktion hervorgerufen werden konnte. Oder

die Anzahl der ausgelösten Aktionspotentiale war zu gering, um eine adäquate Gefäßreaktion zu erzeugen.

Die übrigen Stimulationsstärken von 4V, 6V und 8V verliefen ohne signifikante Unterschiede. Dies lässt vermuten, dass bereits bei 4V ein „Plateau“ der elektrischen Stimulation erreicht wurde und bereits bei dieser Stimulationsstärke eine so hohe Zahl an Aktionspotentialen hervorgebracht wurde, dass eine annähernd maximale Vasokonstriktion des Gefäßes folgte. Eine weitere Erhöhung der Stimulationsstärke führte folglich zu keiner weiteren Veränderung der dynamischen Gefäßreaktion.

### **5.2.2.2 Interpretation der TTX-Reaktion**

Die extrazelluläre Stimulationselektrode des experimentellen Aufbaus sollte durch einen elektrischen Impuls die neuronale Aktivität anregen und somit eine neurovaskuläre Reaktion hervorrufen. Sie sollte nicht zu einer direkten Stimulation der Arteriole im Hirnschnittmodell führen. Diese Hypothese konnte unter Verwendung des Natriumkanalblockers TTX belegt werden. TTX hemmt Natriumkanäle, die essentiell für die Generierung von Aktionspotentialen in Neuronen sind. Durch die Hemmung der Kanäle mit TTX wurde die Entstehung der Aktionspotentiale an Neuronen und folglich die neurovaskuläre Kopplung verhindert. Das Experiment verifiziert den experimentellen Aufbau und belegt, dass durch die extrazelluläre Stimulationselektrode nicht eine direkte Stimulation der glatten Gefäßmuskulatur hervorgerufen wurde, sondern die Erregung des umgebenden Nervengewebes schließlich zu einer neurovaskulären Reaktion führte.

### **5.2.2.3 Interpretation der Auswertungsparameter**

Die untersuchten Interventionen des ersten Teilprojekts beinhalteten die Substanzen PDP B, BOX B und die Substanzkombination PDP A + BOX A. Die Untersuchung mit dem Neurotoxin TTX wurde bereits erörtert.

Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollgruppe mit aCSF bezogen. Nur bei der Analyse der verschiedenen Stimulationsstärken erfolgte ein paarweiser Vergleich der Spannungen. Die Interpretation des Altersvergleichs in der PDP A + BOX A-Gruppe erfolgt gesondert.

### Zeitpunkt der maximalen Kontraktion

Die Auswertung des Zeitpunktes der maximalen Gefäßkontraktion nach elektrischer Stimulation ergab statistisch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur aCSF-Kontrollgruppe. Sowohl eine Abhängigkeit von den Interventionen als auch den Stimulationsstärken konnte nicht nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Interventionen und Spannungsstärken keinen messbaren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Gefäße nehmen. Auch ein Einfluss der Interventionen oder Spannungsstärken auf die Geschwindigkeit der neurovaskulären Kopplung ist anhand dieser Ergebnisse als unwahrscheinlich anzusehen.

### Amplitude

Die Erfassung der maximalen Amplitude der Kontraktion nach elektrischer Stimulation zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Interventionen (Ausnahme: TTX). Die hier verwendeten Substanzkonzentrationen von PDP B, BOX B, sowie PDP A + BOX A sorgten für keine Veränderung der dynamischen Gefäßreaktion im Vergleich zur aCSF-Gruppe.

Der relative Gefäßdurchmesser ließ sich signifikant lediglich durch die verschiedenen Stimulationsstärken beeinflussen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen 2V und den drei übrigen Stimulationsstärken. Die Annahme dieser Beobachtung kann äquivalent zum oben beschriebenen Erklärungsansatz gewertet werden.

### Zeitkonstante $\tau$

Ein ähnliches Ergebnis fand sich bei der Betrachtung der Zeitkonstante  $\tau$  für die Dilatation der Gefäße nach Kontraktion. Es konnten keine signifikanten Unterschiede für diesen Parameter zwischen den verschiedenen Interventionen erfasst werden.

### Aufweitungsfähigkeit $A_1$

Jedoch fanden sich signifikante Unterschiede der Relaxationsfähigkeit der Gefäße in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken. Die Unterschiede waren zwischen 2V und den übrigen Stimulationsstärken nachweisbar. Allerdings ist die Interpretation dieses Ergebnisses fraglich, da bei der Spannungsstärke von 2V in der Regel keine signifikante Kontraktion gemessen werden konnte und somit eine Beurteilung der Wiederaufweitung der Gefäße nicht sinnvoll erscheint.

### AUC

Durch die fehlende Vasokonstriktion bei 2V, verglichen mit den übrigen Stimulationsstärken, ergaben sich signifikante Unterschiede der gemessenen AUC.

Die *AUC* der 2V-Stimulation stellte sich als signifikant kleiner dar, da durch diese Spannung keine Kontraktion der Arteriolen hervorgerufen werden konnte. Durch eine Stimulation von 4V und mehr wurde eine signifikante Vasokonstriktion ausgelöst, welche mit einer größeren Fläche unterhalb der Kurve (*AUC*) verbunden war.

#### Fazit

Das erste Teilprojekt zeigte insgesamt, dass die durchgeführten Interventionen keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation ergaben. Es konnte über alle Versuchsgruppen gezeigt werden, dass eine Stimulation von 2V nicht ausreichend war, um eine signifikante Vasokonstriktion der Arteriole hervorzurufen, im Vergleich zu den Stimulationsstärken von 4V, 6V und 8V.

Durch die Experimente mit TTX konnte der verwendete Versuchsaufbau verifiziert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand der hier gewonnenen Ergebnisse eine Beeinflussung der Gefäßreaktion durch die untersuchten Hämoglobinabbauprodukte nicht nachgewiesen werden konnte.

#### **5.2.2.4 Altersvergleich zwischen PDP A und BOX A**

Die Intervention der Substanzkombination aus PDP A + BOX A ermöglichte einen Altersvergleich zwischen juvenilen und adulten Tieren.

##### Zeitpunkt der maximalen Kontraktion

Die Auswertung der Zeitpunkte der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen juvenilen und adulten Tieren. Dadurch wird deutlich, dass vermutlich keine Beeinflussung der Gefäßreagibilität durch das Alter vorliegt und sich somit die Geschwindigkeit der Vasokonstriktion nicht durch das Alter der Tiere verändert. Ein Unterschied zwischen den Zeitpunkten der maximalen Kontraktion konnte zwischen den Stimulationsstärken von 6V und 8V nachgewiesen werden. Bei der Stimulation mit 8V schien der Zeitpunkt der maximalen Gefäßkontraktion hierbei im Mittel etwa 40 Sekunden früher aufzutreten als bei einer Stimulation mit 6V (ohne Beachtung des Standardfehlers). Durch die höhere Spannungsstärke ist eine stärkere elektrische Aktivierung des Nervengewebes möglich und damit auch eine schnellere Übertragung der Erregung auf die Arteriole. Bei dieser Auswertung wurde keine Unterscheidung der Altersgruppen vorgenommen. Da eine entsprechende Beobachtung in der Auswertung der Interventionen mit PDP B und BOX B fehlt, ist jedoch fraglich, ob es sich bei diesem

Ergebnis tatsächlich um einen Unterschied der Geschwindigkeit der Vasoreaktion handelt oder lediglich um einen zufällig messbaren statistischen Unterschied.

### Amplitude

Die Amplitude der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation fiel zwischen juvenilen und adulten Tieren signifikant unterschiedlich aus. Der relative Gefäßdurchmesser der adulten Tiere war signifikant größer als in der juvenilen Kohorte. Das bedeutet, dass die Arteriolen der juvenilen Tiere sich durchschnittlich mit einer größeren Amplitude verengten und daraus ein kleinerer minimaler Gefäßdurchmesser resultierte als bei den adulten Tieren. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass juvenile Tiere empfindlicher auf die elektrische Stimulation reagierten und/oder die Kontraktilität der Gefäße in der juvenilen Kohorte ausgeprägter war als bei den adulten Tieren. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Beobachtungen aus vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe, die ebenfalls eine geringere Vasoreaktion bei adulten Tieren erfassten (Schröder 2021).

Äquivalent zu den oben beschriebenen Ergebnissen zeigte sich auch bei der PDP A + BOX A-Intervention ein signifikanter Unterschied der maximalen Gefäßkontraktion in Abhängigkeit von den Stimulationsstärken. Statistische Signifikanz erreichte der Vergleich von 2V zu den drei weiteren Stimulationsstufen von 4V, 6V und 8V. Dieses Ergebnis berücksichtigte jedoch nicht die unterschiedlichen Altersgruppen der Intervention. Die Interpretation dieser Beobachtung entspricht dem bereits oben genannten Erklärungsansatz.

## **5.2.3 Ergebnisse Teilprojekt 2**

### **5.2.3.1 Interpretation der NS1619-Wirkung**

Die NS1619-Wirkung wird vor allem durch einen Vergleich mit der dynamischen Gefäßreaktion der aCSF-Kontrollgruppe deutlich. Der Vergleich ermöglicht ein Verständnis der inhibitorischen Wirkung des BK-Kanal-Aktivators NS1619, wird jedoch rein deskriptiv und nicht statistisch vorgenommen.

Die spezifische Wirkung von NS1619 könnte durch verschiedene Angriffspunkte dieser Substanz in der neurovaskulären Kopplung entfaltet werden. BK-Kanäle werden ubiquitär im Körper exprimiert und treten im zentralen Nervensystem in verschiedenen Lokalisationen auf, beispielsweise in Neuronen oder astrozytären Endfüßen (Price et al. 2002). Aufgrund der zahlreichen Expressionsorte der BK-Kanäle sind verschiedene Angriffspunkte der Substanz NS1619 anzunehmen.

Einerseits könnte NS1619 direkt an BK-Kanäle der Neurone des zentralen Nervensystems binden und dort der Entstehung von Aktionspotentialen entgegenwirken. Dabei könnte durch den induzierten Ausstrom von Kaliumionen durch die BK-Kanäle eine Depolarisation der Neurone unterbunden und somit die Entstehung von Aktionspotentialen gehemmt werden. Eine neuronale Aktivität kann dann nicht mehr gebahnt werden.

Andererseits ist auch eine Wirkung von NS1619 an den astrozytären Endfüßen denkbar. Auch dadurch könnte die neurovaskuläre Kopplung unterbrochen werden. Bei dieser Annahme werden Aktionspotentiale in den Neuronen gebildet, diese können allerdings nicht mehr auf die glatte Muskulatur der Arteriolen übertragen werden, da die Astrozyten durch den stetig induzierten Kaliumausstrom keine Signalübertragung mehr ermöglichen.

Zuletzt könnten direkt die BK-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur durch NS1619 beeinflusst werden. Durch ihre Öffnung kommt es demnach zu einem „Kurzschluss“ der glatten Muskelzellen. Signale der Neurone und Astrozyten können zwar auf die glatte Muskulatur der Gefäßwand übertragen werden, jedoch wird hier die Entstehung einer konstriktorisches Reaktion komplett unterbunden, da der stetige Ausstrom von Kaliumionen jeglicher Reaktion sofort entgegenwirkt.

In Voruntersuchungen belegt werden, dass NS1619 seine Wirkung nicht ausschließlich an BK-Kanälen entfaltet, sondern ebenfalls Einfluss auf Kalziumströme nehmen kann. Diese simultane Aktivierung der BK-Kanäle bei gleichzeitiger Inhibition spannungsgesteuerter L-Typ-Kalziumkanäle und spannungs- und ATP-gesteuerter Kaliumströme führt zu der beschriebenen Verhinderung der Vasokonstriktion durch NS1619 (Edwards et al. 1994, Holland et al. 1996).

### **5.2.3.2 Interpretation der Auswertungsparameter**

Das Teilprojekt 2 untersuchte den Einfluss des BK-Kanal-Aktivators NS1619 auf die dynamische Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation. Hierbei wurden die akuten Hirnschnitte sowohl mit NS1619 allein perfundiert als auch mit einer Substanzkombination aus NS1619 + PDP A. Die Experimente wurden an adulten und juvenilen Tieren durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Alters zu erfassen.

Die Substanzkombination aus NS1619 + BOX A wurde lediglich an juvenilen Tieren getestet, weswegen die statistische Betrachtung gesondert erfolgte.

Die Ausschlusskriterien und Auswertungsparameter entsprachen denen im ersten Teilprojekt.

#### Zeitpunkt der maximalen Kontraktion

Der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Alterskohorten, den verschiedenen Interventionsgruppen oder den verschiedenen Stimulationsstärken. Eine signifikante Auswirkung der beschriebenen Einflussfaktoren auf die Gefäßreagibilität ist folglich eher unwahrscheinlich.

#### Amplitude

Die Amplitude der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation war signifikant vom Alter der Versuchstiere abhängig. Wie bereits im ersten Teilprojekt konnte auch bei diesen Experimenten eine geringere Amplitude der Vasokonstriktion bei adulten Tieren festgestellt werden. Dies bestätigte die bisherigen Beobachtungen, dass juvenile Tiere im Vergleich zu adulten eine stärkere Vasokonstriktion als Antwort auf die elektrische Stimulation zeigen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionen aus NS1619 und NS1619 + PDPA ohne Berücksichtigung des Alters konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass durch den sehr potenten BK-Kanal-Aktivator NS1619 eine starke/komplette Öffnung der Kanäle verursacht wird. Jede Depolarisationskraft auf die Zelle durch Einstrom von Kationen wird dabei sofort durch einen Ausstrom von Kaliumionen antagonisiert, wodurch eine Erregung der Zelle gänzlich verhindert wird. Die zusätzliche Gabe eines vasokonstriktorischen Agens – in diesem Fall PDP A – konnte keine Wirkung auf die Gefäßreaktion entfalten, da NS1619 dieser sofort entgegengewirkt hat.

Ein signifikanter Unterschied der Amplitude konnte sowohl zwischen den Interventionsgruppen NS1619 + BOX A und NS1619 festgestellt werden, als auch beim Vergleich zwischen NS1619 + BOX A und NS1619 + PDP A. Diese Beobachtung legt die Frage nahe, ob BOX A eventuell eine höhere Potenz zur Vasokonstriktion trotz der NS1619-Behandlung aufwies (im Vergleich zu PDP A). Die Evaluation dieser Hypothese sollte in weiteren Experimenten mit größeren Kohorten erfolgen, um verlässliche Aussagen über die Tendenz der hier gewonnenen Ergebnisse zu erlangen.

### Zeitkonstante $\tau$ , A1 und AUC

Die Parameter  $\tau$ , A1 und AUC konnten für das Teilprojekt 2 nicht statistisch ausgewertet werden. Aufgrund der definierten Ausschlusskriterien ergaben sich Datenlücken, die eine statistische Analyse dieser Parameter nicht möglich machten. Der Grund dieser fehlenden Daten liegt wiederum in der Wirkung von NS1619, welche jegliche vasokonstriktorische Aktivität verhindert hat.

Eine Auswertung der definierten Parameter erschien für die Daten nicht sinnvoll und nicht möglich, da diese auf eine Vasokonstriktion als Gefäßreaktion ausgelegt waren. Es erfolgte daher eine explorative Datenanalyse zur deskriptiven Beschreibung der erhobenen Daten. Ein Vergleich der Altersgruppen konnte aufgrund fehlender Daten der adulten Kohorte nicht durchgeführt werden und auch der Vergleich der Interventionen NS1619 und NS1619 + PDP A war nur sehr eingeschränkt möglich (NS1619 + PDP A:  $n_s=1$ ). Ebenfalls wurde die Interventionsgruppe NS1619 + BOX A rein deskriptiv betrachtet ( $n_s=2$ ).

### Fazit

Zusammenfassend bestätigte das Teilprojekt 2 die inhibitorische Wirkung des BK-Kanal-Aktivators NS1619. Diese Beobachtungen decken sich mit *in vivo*-Ergebnissen, bei denen ebenfalls eine Unterbindung der Vasokonstriktion durch NS1619 in Kombination mit Hämoglobinabbauprodukten nachgewiesen werden konnte (Joerk et al. 2019). Eine signifikante Vasokonstriktion nach elektrischer Stimulation konnte lediglich in Experimenten mit der Substanzkombination NS1619 + BOX A gesehen werden; diese Beobachtung sollte allerdings in Zukunft weiterhin untersucht werden. Die Wirkung von NS1619 könnte eine potentielle pharmakologische/therapeutische Intervention darstellen, um eine Vasokonstriktion der Arteriolen nach SAB zu verhindern und somit der Komplikation einer verzögerten zerebralen Ischämie mit neurologischen Defiziten vorzubeugen bzw. entgegenzuwirken. Allerdings entfaltet NS1619 eine relativ unspezifische Wirkung, denn durch die ubiquitäre Expression der BK-Kanäle ist der Einsatz mit einem Risiko für zahlreiche Nebenwirkungen assoziiert. Dennoch sollte die Erkenntnis über die hier belegte Wirkung von NS1619 als Grundlage genutzt werden, um potentielle Substanzen einer ähnlichen chemischen Struktur zu entwickeln, die eine spezifischere Bindung an BK-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur ermöglichen und hier dieselbe inhibitorische Wirkung entfalten wie NS1619.

Weitere BK-Kanal-Aktivatoren könnten darüber hinaus eine protektive Wirkung hinsichtlich einer verzögerten zerebralen Ischämie nach Subarachnoidalblutung entfalten. Für ein weiteres Benzimidazolone NS004 konnte in einem Modell mit Wüstenrennmäusen eine Reduktion der zerebralen Schäden sowohl nach einem transienten als auch fokalen permanenten Schlaganfall gezeigt werden (Gribkoff et al. 2001). Die Substanzen BMS-204352 und BMS-191011, beides Aktivatoren von BK-Kanälen, zeigten vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Untersuchungen. BMS-204352 konnte im Tiermodell eine Reduktion des Infarktolumens von bis zu 20% nach einem induzierten ischämischen Schlaganfall erreichen. Trotz dieser vielversprechenden präklinischen Ergebnisse und einer guten Verträglichkeit der Substanz mit günstigem Risikoprofil, zeigte eine klinische Phase-III-Studie keine signifikante Verbesserung der Prognose nach dem ischämischen Ereignis (Jensen 2002).

Die Substanz BMS-191011 bewirkte in einem Rattenmodell eine Dilatation retinaler Arteriolen (Jensen 2002, Mori et al. 2011).

Beide Substanzen wurden in einer vorausgegangenen Promotionsarbeit untersucht. Für BMS-204352 konnte dabei eine präventive Wirkung einer PDP A-induzierten Vasokonstriktion nachgewiesen werden, während BMS-191011 in dieser Untersuchung keine signifikante Wirkung erzielte (Ritter 2021). Diese vielversprechenden präklinischen Ergebnisse, insbesondere der Substanz BMS-204352, sollten im Hinblick auf die verzögerte zerebrale Ischämie nach Subarachnoidalblutung untersucht und weitergehend erforscht werden.

### **5.3 Teilprojekt 3**

Das dritte Teilprojekt beschäftigte sich mit der längerfristigen Auswirkung der Hämoglobinabbauprodukte auf zerebrale Gefäße im Sinne morphologischer Veränderungen der Gefäßwand. Eine Zunahme der Gefäßwandfläche von Arterien im fixierten Hirnschnittpräparat stellte hierbei den entscheidenden Aspekt dar. Eine Verdickung der Gefäßwand wurde als Kontraktion der glatten Wandmuskulatur gewertet und führte folglich zu einer Einengung des Gefäßlumens.

In dieser Promotionsarbeit wurde der Langzeit-Einfluss von Hämoglobinabbauprodukten auf zerebrale Gefäße untersucht. Die Versuchstiere erhielten hierzu initial eine Injektion von PDPs, BOXes oder Eigenblut in die *Cisterna*

*magna* und wurden schließlich 28 Tage nach dieser Intervention getötet. Nach Kryofixierung des Hirngewebes wurden Hirnschnitte angefertigt. Die mikroskopische Analyse der Proben erfolgte nach immunhistochemischer Färbung mit anti-SMA, einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich gegen Aktinfasern der glatten Gefäßmuskulatur richtet.

### **5.3.1 Methodik Teilprojekt 3**

#### **5.3.1.1 Injektion von Eigenblut – Induktion einer SAB**

Die Induktion der Subarachnoidalblutung wurde für das Experiment mittels einer intrathekalen Injektion von Eigenblut in die *Cisterna magna* vorgenommen (Positivkontrolle). Alternativ wurden entweder PDPs oder BOXes in die Zisterne injiziert. Die *sham*-Gruppe (Negativkontrolle) erhielt eine Scheinoperation mit Punktion der *Cisterna magna*, aber ohne Injektion einer Substanz.

Für das Experiment wurde die Methode einer einfachen Injektion gewählt. Dafür wurden einmalig 30µl Eigenblut, PDPs oder BOXes in die die *Cisterna magna* injiziert. Es handelt sich um eine vielfach verwendete und etablierte Methode, die bereits bei den Voruntersuchungen der Tage 3, 7 und 14 angewandt wurde und somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht.

Dennoch sollten andere Methoden der Induktion einer SAB in Betracht gezogen oder zumindest diskutiert werden. Neben einer Injektion von Blut in den Subarachnoidalraum ist ebenso die Punktion eines intrakraniellen Gefäßes möglich. Nachteil dieses Verfahrens ist die hohe Mortalität unter den Versuchstieren und die nicht kontrollierbare Menge des freigesetzten Blutes.

Dennoch ähnelt die endovaskuläre Punktion am ehesten der Aneurysmaruptur beim Menschen mit Verletzung eines Blutgefäßes im Vergleich zu den Injektionsmethoden (Gules et al. 2002, Lin et al. 2003).

Neben der einfachen Injektion von 30µl Eigenblut etablierte sich ein zweites Modell mit einer doppelten Injektion. Hierbei wird 48 Stunden nach der ersten Injektion eine erneute Punktion der *Cisterna magna* mit einer weiteren Applikation von 30µl Eigenblut vorgenommen. Eine Studie an Ratten belegte, dass eine doppelte Injektion eine deutlich stärkere Vasokonstriktion, vor allem zwischen Tag 6 und 8 nach Injektion verursachte und ausgeprägtere histopathologische Veränderungen der Gefäßwand hervorrief als die einfache Injektion. Zudem ist diese Methode im Vergleich zur

Punktion eines Gefäßes mit einer sehr niedrigeren Mortalitätsrate verbunden (Gules et al. 2002).

Aufgrund der Voruntersuchungen, die mit einem einfachen Injektionsmodell vorgenommen wurden, lag die Wahl derselben Methode für das Experiment nahe, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Dennoch sollte für nachfolgende Studien eine Änderung des Versuchs-Prozederes bedacht werden, um aussagekräftige Ergebnisse entsprechend der oben genannten Untersuchung von Gules et al. zu erzielen. Eine doppelte Injektion wäre hierbei die Methode der Wahl, da sie mit einer geringen Mortalität verbunden ist und auch andere Substanzen wie PDPs oder BOXes zweifach verabreicht werden können. Die endovaskuläre Punktion ist für dieses Versuchsvorhaben aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit mit der Injektion von PDPs oder BOXes nicht geeignet.

#### **5.3.1.2 Methode der Hirnpräparation/Fixierung**

Die Organentnahme der Gehirne wurde nach erfolgreicher Anästhesie vorgenommen, wobei jedoch keine speziellen Verfahren zum Erhalt der Perfusion der Blutgefäße getroffen wurden. Es erfolgte eine Immersionsfixierung, indem die Gehirne sofort nach der Entnahme in 4%iges Paraformaldehyd transferiert wurden. Die Methode der Aldehydfixierung ist weit verbreitet und etabliert. Dabei wird die Verwendung von Paraformaldehyd in einer 4%igen Lösung empfohlen, wie es auch in dieser Arbeit angewendet wurde. Jedoch ist diese Form der Immersionsfixierung mit häufigen histologischen Artefakten assoziiert (Fix und Garman 2000). Um diese Artefakte so gering wie möglich zu halten, ist ein sofortiges Einfrieren der Gehirne nach der Entnahme notwendig.

Ein weiteres Problem dieser Methodik stellte das Kollabieren der Blutgefäße dar. Durch die Unterbrechung des Blutflusses bei der Dekapitation der Tiere konnte der Druck innerhalb der Gefäße nicht aufrechterhalten werden, sodass es zum Kollabieren dieser kam. Es ist nicht auszuschließen, dass sich hierdurch nicht nur die Form der Arterien, sondern auch ihr Zustand veränderte, was zu einer erschwerten Auswertung und zu einer eingeschränkten Interpretation der Ergebnisse führte.

Eine Veränderung des Fixationsprozesses wäre eine denkbare Lösung, um diese Problematik zu umgehen und somit bessere und aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen. Für die Fixierung des Nervensystems etablierte sich das Konzept der Ganzkörper-Perfusionsfixierung. Hierbei wird bei gleichbleibendem systolischem

Blutdruck die Fixationslösung durch das vaskuläre System des Versuchstiers gespült. Zu diesem Zweck wird der linke Ventrikel des Herzens punktiert und durch eine entsprechende Kanüle das Fixans injiziert. Gleichzeitig wird das Blut aus dem rechten Vorhof abgelassen. Diese Methode stellt eine schnelle und sehr elegante Variante der Fixierung dar, ist allerdings mit einem größeren Aufwand und erheblichen Störanfälligkeiten verbunden. Es darf beispielsweise während des Prozesses zu keinem starken Abfall des systolischen Blutdrucks kommen, weil ansonsten eine ausreichende Perfusion und Fixierung peripherer Gewebe nicht gewährleistet werden kann. Nach der Perfusionsfixierung und Organentnahme ist eine weitere Immersionsfixierung im gleichen Fixans notwendig (Fix und Garman 2000). Eine Anpassung und Verbesserung der Fixierung ist für zukünftige Experimente zu bedenken, da somit eine bessere Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse erzielt werden kann. Eine Pilotstudie hierzu wurde bereits durchgeführt. Sowohl die technologische Ausrüstung als auch die notwendige Erfahrung des geschulten Personals ist vorhanden und sichergestellt und ermöglicht damit eine Umstellung der Methodik in zukünftigen Projekten.

### **5.3.1.3 Färbung**

Die Färbung der Hirnschnitte wurde mit zwei etablierten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Neben DAPI als Marker für den Chromatingehalt in den Zellkernen erfolgte als Zielstruktur die Färbung der Aktinfasern der glatten Gefäßmuskelzellen. Bereits bekannte und etablierte Färbeprotokolle kamen hierbei zum Einsatz und entsprachen den Färbungen der vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Aktinfasern stellen ein essentielles kontraktiles Element der glatten Muskelzellen dar und standen im Fokus der Betrachtung. Die *Tunica media* der Gefäßwand wird zum größten Teil aus glatten Gefäßmuskelzellen mit Aktinanteil gebildet und konnte durch die anti-SMA-Färbung sichtbar gemacht werden.

Studien in der Vergangenheit zeigten, dass Blut Einfluss auf die Aktin-Expression in glatten Muskelzellen nahm und zudem zu einer Zelltransformation der glatten Muskelzellen führte (Ohkuma et al. 2003). Der Fokus dieser Arbeit lag in der Quantifizierung der Gefäßwandfläche. Eine mögliche Zunahme der Aktinfasern nach Injektion von Hämoglobinabbauprodukten oder Blut sollte anhand einer Zunahme der Wandfläche des Gefäßes ermittelt werden.

#### 5.3.1.4 Auswahl der Gefäße

Zur Analyse der Gefäßwände wurden drei verschiedene Gefäßtypen aufgesucht. Als Kontrollgefäß wurde hierzu die *Arteria azygos pericallosa* (APA) verwendet, die aufgrund ihrer intraparenchymalen Lage keinen direkten Kontakt zum Subarachnoidalraum, dem Liquor und den hier injizierten Substanzen aufwies. Die APA entstammt dabei der *Arteria cerebri anterior* und verläuft auf dem *Corpus callosum* nach posterior (Dorr et al. 2007). Durch die geschützte Lage des Gefäßes konnten Manipulationen während der Präparation, Fixation und Färbung verhindert werden und durch den prominenten Gefäßverlauf oberhalb des Balkens war die Arterie stets gut auffindbar.

Als Untersuchungsgefäße dienten die *Arteria communicans posterior* (PCA) und die *Arteria basilaris* (BA). Die PCA stellt einen recht kurzen Verbindungsast zwischen der *Arteria cerebri posterior* (aus dem hinteren Stromgebiet der *Arteriae vertebrales*) und der *Arteria carotis interna* dar. Sie verläuft am posterioren Anteil des Großhirns und umgibt dabei das Ende des Hypothalamus (Dorr et al. 2007).

Die BA fügt sich aus den paarigen *Arteriae vertebrales* zusammen. Diese vereinigen sich auf Höhe der *Medulla oblongata* und bilden die BA, die mittig auf der ventralen Seite des Hirnstamms verläuft (Dorr et al. 2007).

Die extraparenchymale Lage der BA und PCA ermöglicht den direkten Kontakt der Gefäße mit Liquor und den injizierten Hämoglobinabbauprodukten bzw. Eigenblut. Es kann daher von einer direkten Interaktion dieser Substanzen mit den Gefäßwänden ausgegangen werden.

#### 5.3.1.5 Auswertung der relativen Gefäßwanddicke

Die Auswertungsmethode der relativen Gefäßwanddicke wurde entsprechend der experimentellen Voraussetzung gewählt. Dabei sollte der Einfluss der zahlreichen kollabierten Gefäße möglichst geringgehalten werden, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu verhindern. Aus diesem Grund wurde die relative Wandfläche als Parameter etabliert und der absoluten Gefäßwanddicke vorgezogen.

Zur Ermittlung des Anteils der Wandfläche an der Gesamtfläche des Gefäßes musste sowohl die innere Gefäßfläche bestimmt werden, also das Lumen des Gefäßes, als auch die Gesamtfläche inklusive der Gefäßwand.

Um die Gesamtfläche des Gefäßes aufgrund des Kollabierens nicht zu unterschätzen, wurde aus dem Außenumfang mithilfe der allgemein gültigen Kreisformeln die Fläche

eines idealen Kreises berechnet. Rechnerisch wurde somit ein kreisrundes Gefäß imitiert, welches am ehesten der physiologischen Gegebenheit vor Fixation entsprach:

$$\text{Umfang} = 2 \times r \times \Pi$$

$$\text{Kreisfläche} = r^2 \times \Pi$$

Die Differenz zwischen dieser idealisierten Kreisfläche zur Fläche des inneren Lumens ergab folglich die absolute Wandfläche. Diese konnte schließlich ins Verhältnis zur Gesamtfläche des Gefäßes gesetzt werden und ergab die relative Wandfläche der Gefäßwand:

$$\text{Relative Wandfläche [\%]} = \frac{\text{absolute Wandfläche}}{\text{Gesamtfläche des Gefäßes}} \times 100$$

### 5.3.2 Ergebnisse Teilprojekt 3

Die Darstellung der Ergebnisse des dritten Teilprojekts setzt sich zusammen aus bereits erhobenen Daten aus Vorarbeiten und neu erfassten Daten. Bereits in Voruntersuchungen wurde eine Analyse der Tage 3, 7 und 14 nach Intervention vorgenommen (Schröder 2021) (Daten von Tag 3 und 7 noch nicht veröffentlicht). Die Datengewinnung am postinterventionellen Tag 28 war Aufgabe dieser Arbeit und ergänzt die bereits vorliegenden Ergebnisse. Zur vollständigen Auswertung und für den besseren Vergleich wurden alle Zeitpunkte berücksichtigt und analysiert.

#### 5.3.2.1 Interpretation der einzelnen Auswertungsparameter

Einflussparameter auf die relative Gefäßwandfläche, die in dieser Auswertung analysiert wurden, umfassten den Zeitpunkt der Dekapitation nach Injektion/Intervention, die verschiedenen Interventionen (*sham*, PDP, BOX, Eigenblut) und die drei Gefäßtypen (APA, PCA und BA).

##### Zeitpunkt der Dekapitation

Die Auswertung der Zeitpunkte der Dekapitation zeigte signifikante Unterschiede der relativen Gefäßwanddicke. Jedoch ist zu beachten, dass diese statistische Auswertung weder die verschiedenen Interventionen noch die drei unterschiedlichen Gefäßtypen berücksichtigte. Zwischen den Tagen 3 und 7 fand sich eine Abnahme der relativen Wanddicke um 1,26%. Dieser Rückgang war gefolgt von einer Zunahme der relativen Gefäßwanddicke zwischen Tag 7 und 14 um 1,43%. Zwischen Tag 14 und 28 fand sich eine erneute Abnahme der relativen Gefäßwanddicke um 1,36%. Insgesamt konnte eine statistisch signifikante Abnahme der relativen Wanddicke von 1,19% zwischen Tag 3 und Tag 28 gemessen werden. Aufgrund der gemeinsamen

Betrachtung aller Interventionen und aller Gefäßtypen ist eine Interpretation dieser statistischen Ergebnisse nicht eindeutig möglich. Eine sinnhafte Aussage kann durch die hier erfassten Wandflächenveränderungen nicht getätigt werden.

### Interventionen

Es erfolgte des Weiteren eine Analyse der vier verschiedenen Interventionen *sham*, PDP, BOX und Eigenblut. Bei dieser Auswertung wurden wiederum weder die unterschiedlichen Tage der Dekapitation noch die verschiedenen Gefäßtypen berücksichtigt. Insgesamt konnte bei der scheinoperierten Gruppe eine statistisch signifikant geringere relative Gefäßwanddicke nachgewiesen werden als bei der BOX-Interventionsgruppe. Auch der Vergleich zwischen *sham*- und Eigenblut-Intervention zeigte, dass die Eigenblut-behandelten Tiere eine statistisch signifikant größere relative Wanddicke aufwiesen. Ein Unterschied zwischen den Interventionen PDP und BOX konnte ebenfalls festgestellt werden. Demnach zeigte die BOX-Gruppe eine signifikant größere relative Gefäßwanddicke als die PDP-Gruppe. Zuletzt konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der PDP und Eigenblut-Intervention erfasst werden, wobei ebenfalls die PDP-Gruppe eine geringere relative Wanddicke aufwies als die Eigenblut-Gruppe. Auch hier ist eine Interpretation der statistischen Ergebnisse nur eingeschränkt möglich. Es konnten signifikante Unterschiede bestätigt werden, allerdings fehlt bei dieser Auswertung die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs und der verschiedenen Gefäßtypen. Es lässt sich die Vermutung aufstellen, dass durch die Intervention mit BOX eine Zunahme der Gefäßwanddicke induziert wurde, die im Vergleich zur Kontrolle (*sham*), aber auch zu PDP und Eigenblut größer ausfiel. Die Intervention mit PDP zeigte einen deutlich geringeren Einfluss auf die Gefäßwanddicke.

### Gefäßtypen

Als dritter einzelner Parameter wurden die verschiedenen Gefäßtypen untersucht. Ein sehr deutlicher statistisch signifikanter Unterschied der relativen Wanddicke ergab sich zwischen der PCA und APA. Aufgrund der gemeinsamen Betrachtung aller Dekapitationstage und Interventionen lässt sich allerdings nicht analysieren, ob diese Messungen Auswirkungen der Behandlungen der Tiere sind oder ob es sich lediglich um physiologisch messbare Unterschiede der Gefäßwanddicke handelt. Auch der Vergleich der APA zur BA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied, der jedoch geringer ausfiel als im Vergleich zur PCA. Zuletzt konnte auch ein Unterschied der relativen Gefäßwanddicke zwischen der BA und PCA nachgewiesen werden, welcher

statistische Signifikanz erreichte, jedoch wiederum nicht sicher auf die Auswirkungen der durchgeführten Interventionen zurückzuführen ist. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass die erfassten Unterschiede lediglich die Physiologie der unterschiedlichen Gefäße und ihrer Wandfläche widerspiegeln.

### **5.3.2.2 Interpretation des zeitlichen Verlaufs der relativen Gefäßwanddicke der Interventionsgruppen**

Nach der Betrachtung der drei einzelnen Einflussfaktoren auf die relative Gefäßwanddicke ohne Berücksichtigung der anderen Prädiktoren erfolgte schließlich auch eine Betrachtung der Veränderungen innerhalb der einzelnen Interventionsgruppen in Abhängigkeit vom jeweiligen Tag der Dekapitation. Hierzu wurden die untersuchten Gefäße jeweils einzeln betrachtet und die relative Gefäßwanddicke an den verschiedenen Tagen der Dekapitation einem paarweisen Vergleich unterzogen. Diese statistische Analyse war von besonders großem Interesse, da sie eine Aussage bezüglich der Gefäßwandveränderungen im Verlauf der Zeit ermöglicht, die unter den verschiedenen Interventionen auftreten.

#### *Arteria communicans posterior:*

Innerhalb der *sham*-Interventionsgruppe konnte gezeigt werden, dass die relative Wanddicke der PCA zwischen Tag 3 und Tag 14 signifikant abnahm.

In der Interventionsgruppe mit PDPs zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In der BOX-Gruppe fand sich eine statistisch signifikante Zunahme der relativen Gefäßwandfläche zwischen Tag 7 und Tag 14. Ebenfalls konnte in dieser Gruppe eine nicht-signifikante Abnahme der relativen Gefäßwandfläche von Tag 14 zu Tag 28 beobachtet werden.

In der positiven Kontrollgruppe mit Eigenblutinjektion ergab sich eine signifikante Zunahme der relativen Gefäßwandfläche zwischen Tag 7 und 14, gefolgt von einer nicht-signifikanten Abnahme von Tag 14 zu Tag 28.

Diese Ergebnisse zeigen die Tendenz einer Zunahme der Gefäßwandfläche im Sinne einer Vasokonstriktion in den Interventionsgruppen mit BOX und Eigenblut. In der negativen Kontrollgruppe (*sham*) konnte eine Zunahme der Gefäßwandfläche nicht aufgezeigt werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass als Antwort auf die Intervention eine Zunahme der Wanddicke angenommen werden kann, die ihren Peak an Tag 14

*post interventionem* erreichte und gefolgt wurde von einer Abnahme der relativen Gefäßwanddicke.

Diese Beobachtung deckt sich mit bereits beschriebenen wissenschaftlichen Ergebnissen. Es konnte gezeigt werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen bei längerfristiger Exposition mit BOXes (von 96 Stunden) eine Veränderung ihrer Zellmorphologie und einen Anstieg des Stresslevels und des oxidativen Metabolismus aufweisen (Lyons et al. 2004). In Zellkulturen von Hepatozyten (HepG2) führte die Applikation von BOX A ebenfalls zu morphologischen Veränderungen in Form von sphärischen Zellkörpern (Seidel et al. 2020). Eine weitere Studie belegte ebenfalls eine phänotypische Transformation der glatten Muskelzellen nach Subarachnoidalblutung. Diese zeigten nach einer induzierten SAB die Tendenz zur Proliferation, Sekretion von Zytokinen und Migration in die subendotheliale Schicht (Shimamura und Ohkuma 2014). Aus diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass ein vaskulärer morphologischer Umbau und die Veränderungen innerhalb der glatten Muskelzellen der Gefäßwände zur Pathogenese des Vasospasmus beitragen. Die phänotypischen Veränderungen nach SAB konnten dabei nicht nur an großen extraparenchymalen Arterien nachgewiesen werden, sondern ebenfalls an intraparenchymalen Arteriolen, die eine Veränderung der Aktinexpression zeigten (Ohkuma et al. 2003).

#### *Arteria basilaris:*

Die Auswertung der Ergebnisse der *Arteria basilaris* zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede. In allen Interventionsgruppen ist demnach die Nullhypothese beizubehalten, sodass die Verteilung der relativen Gefäßwandfläche an allen untersuchten Tagen der Dekapitation als identisch anzunehmen ist.

#### *Arteria azygos pericallosa:*

In der Auswertung der relativen Gefäßwandfläche der APA zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Interventions- und Kontrollgruppen und an den verschiedenen Tagen der Dekapitation.

Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei der APA um ein Kontrollgefäß des hier verwendeten Versuchsaufbaus handelte. Diese Arterie stand aufgrund ihrer anatomischen Lage nicht im direkten Kontakt zum Liquor und damit

auch nicht in unmittelbarer Beziehung zu den injizierten Substanzen (PDP, BOX, Eigenblut).

#### **5.4 Ausblick**

Nach Abschluss der Arbeit lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen und Erkenntnisse aus den gewonnenen Daten ziehen.

In Teilprojekt 1 und 2 konnte eine Tendenz der Altersabhängigkeit der dynamischen Gefäßreaktion gezeigt werden, insbesondere bei Betrachtung des Gefäßdurchmessers bzw. der Amplitude der maximalen Kontraktion. Durch die geringe Anzahl an adulten Tieren in diesen Teilprojekten ist jedoch lediglich eine tendenzielle Aussage möglich, da keine ausreichende Fallzahl erreicht wurde. Um dieser Tendenz nachzugehen und um diese zu bestätigen sind weitere Untersuchungen mit weitaus größeren Kohorten notwendig.

Die Auswertung des zweiten Teilprojekts konnte eine inhibitorische Wirkung der Substanz NS1619 auf die Vasokonstriktion bestätigen. Aufgrund der unklaren Angriffspunkte von NS1619 und einer Vielzahl von Möglichkeiten sollte diese Substanz genauer untersucht werden. Das Wissen über die Wirkung und chemische Struktur von NS1619 könnte die Grundlage zur Entwicklung eines spezifischen BK-Kanal-Inhibitors darstellen, der ausschließlich an die BK-Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen im Gehirn bindet und dort eine Vasokonstriktion verhindert. Diese Spezifität könnte das Nebenwirkungsprofil deutlich minimieren und einen effektiven Schutz einer verzögerten zerebralen Ischämie darstellen.

Der Einfluss der BK-Kanäle auf die Entwicklung eines Vasospasmus ist allerdings kontrovers zu diskutieren. Jahromi et al. konnten in einer Untersuchung bestätigen, dass nach der Induktion einer Subarachnoidalblutung bei Hunden keine Veränderungen der Stromdichte, Kinetik, Kalzium- und Spannungssensitivität oder Leitfähigkeit der BK-Kanäle nachzuweisen war (Jahromi et al. 2008). Vielmehr stellten sie anhand ihrer Ergebnisse die Vermutung auf, dass die Vasokonstriktion nach SAB eher auf andere Kalium- oder Ionenkanäle zurückzuführen sei. Als Folge dieser Beobachtung, sollten auch andere Ansatzpunkte der Pathophysiologie des zerebralen Vasospasmus und der DCI weiterhin erforscht werden.

Einen durchaus interessanten Ansatz für eine mögliche Prävention und Therapie beschrieben Seidel et al 2020. Sie konnten Hämoglobinabbauprodukte durch Photokonversion in ein Konstitutionsisomer geringerer Toxizität überführen und

dadurch vasokonstriktorisches Effekte der Substanzen verhindern (Seidel et al. 2020). Weitere Studien zu diesem Thema könnten einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellen und sollten unbedingt durchgeführt werden.

Weiterhin ist eine fortlaufende Forschung zur Erfassung der Pathophysiologie der verzögerten zerebralen Ischämie unabdingbar. Weitere Einflussfaktoren auf die Genese sind denkbar und könnten einen entscheidenden Aspekt für die Prävention dieses Krankheitsbildes darstellen. Um dabei das Verständnis und die klinische Prognose einer verzögerten zerebralen Ischämie zu verbessern, ist in Zukunft die einheitliche Verwendung der Terminologie und Definition der DCI anzustreben, die 2010 als internationaler Konsensus festgelegt wurde (Raatikainen et al. 2021).

## 6 Schlussfolgerung

In dieser Promotionsarbeit sollten Erkenntnisse über die Pathophysiologie der verzögerten zerebralen Ischämie nach Subarachnoidalblutungen gewonnen und somit eine Verbesserung des Verständnisses dieser Komplikation ermöglicht werden.

Ziel der Arbeit stellte die Untersuchung der neurovaskulären Kopplung in Abhängigkeit verschiedener Hämoglobinabbauprodukte dar. Im experimentellen Aufbau eines akuten Hirnschnittmodells der Maus mit einer elektrischen Stimulation zur Imitation der neurovaskulären Kopplung wurden hierbei verschiedene Hämoglobinabbauprodukte (HDPs) untersucht.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen HDPs bei der Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation festgestellt werden.

Weitere Experimente mit dem BK-Kanal-Aktivator NS1619 wurden im äquivalenten Versuchsaufbau durchgeführt. Die zu erwartende Antagonisierung der Vasokonstriktion durch NS1619 konnte in allen Experimenten des zweiten Teilprojekts bestätigt werden; durch Öffnung der BK-Kanäle erreichte NS1619 in jedem Fall eine Verhinderung der Vasokonstriktion als Antwort auf die elektrische Stimulation.

Die Untersuchung der neurovaskulären Kopplung konnte eine Altersabhängigkeit der Gefäßreaktion aufzeigen. Während die Vasokonstriktion nach elektrischer Stimulation bei juvenilen Tieren deutlich größer ausfiel, war diese bei adulten Tieren signifikant geringer ausgeprägt.

Die mikroskopische Analyse fixierter und fluoreszenz-gefärbter Hirnschnitte ermöglichte die Erfassung der langfristigen Auswirkung der HDPs auf die Gefäßwände großer zerebraler Arterien. Durch *in vivo*-Applikation von HDPs und anschließender Fixierung der Gehirne nach 28 Tagen *post interventionem* konnten morphologische Veränderungen der Gefäßwände per Laser-Scan-Mikroskopie erfasst und schließlich mit bereits erhobenen Daten der gleichen Untersuchung verglichen werden. Die Ergebnisse zeigten eine Tendenz auf, dass vor allem BOXes einen deutlichen Einfluss auf die Gefäßwandmorphologie nehmen, der vor allem zwischen Tag 7 und 14 aufzutreten scheint.

Dieser Promotionsarbeit gelang es leider nicht, eine vollständige Erklärung für die Entstehung einer verzögerten zerebralen Ischämie nach SAB zu liefern. Allerdings

dienen die hier gewonnenen Erkenntnisse der Erweiterung des bisherigen Wissens und ermöglichen ein besseres Verständnis des komplexen Pathomechanismus der DCI.

Die Ergebnisse der Promotionsarbeit zeigen die Bedeutung der hier untersuchten Erklärungsansätze auf und weisen gleichzeitig auf die Notwendigkeit hin, die bisherigen Erkenntnisse zu vertiefen und weiterführende Forschung in diesem Bereich zu fördern. Es ist dringend geboten den Pathomechanismus der zerebralen Ischämie weiter zu entschlüsseln und mögliche therapeutische Interventionen zu erforschen, die einer Prophylaxe und Therapie der verzögerten zerebralen Ischämie dienen.

## Literaturverzeichnis

- Al-Khindi T, Macdonald RL, Schweizer TA. 2010. Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 41 (8):e519-536.
- Al-Shahi R, White PM, Davenport RJ, Lindsay KW. 2006. Subarachnoid haemorrhage. *Bmj*, 333 (7561):235-240.
- Anetsberger A, Gempt J, Blobner M, Ringel F, Bogdanski R, Heim M, Schneider G, Meyer B, Schmid S, Ryang YM, Wostrack M, Schneider J, Martin J, Ehrhardt M, Jungwirth B. 2020. Impact of Goal-Directed Therapy on Delayed Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Randomized Controlled Trial. *Stroke*, 51 (8):2287-2296.
- Athar MK, Levine JM. 2012. Treatment options for cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurotherapeutics*, 9 (1):37-43.
- Ayadi A, Ferrand G, Cruz IG, Warot X. 2011. Mouse Breeding and Colony Management. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1 (1):239-264.
- Balbi M, Koide M, Wellman GC, Plesnila N. 2017. Inversion of neurovascular coupling after subarachnoid hemorrhage in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37 (11):3625-3634.
- Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A. 2014. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)*, 6 (2):693-755.
- Béjot Y, Bailly H, Durier J, Giroud M. 2016. Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse Med*, 45 (12 Pt 2):e391-e398.
- Brown RD, Jr., Broderick JP. 2014. Unruptured intracranial aneurysms: epidemiology, natural history, management options, and familial screening. *Lancet Neurol*, 13 (4):393-404.
- Brown RD, Jr., Wiebers DO, Forbes GS. 1990. Unruptured intracranial aneurysms and arteriovenous malformations: frequency of intracranial hemorrhage and relationship of lesions. *J Neurosurg*, 73 (6):859-863.
- Caranci F, Briganti F, Cirillo L, Leonardi M, Muto M. 2013. Epidemiology and genetics of intracranial aneurysms. *Eur J Radiol*, 82 (10):1598-1605.
- Chapman AB, Rubinstein D, Hughes R, Stears JC, Earnest MP, Johnson AM, Gabow PA, Kaehny WD. 1992. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*, 327 (13):916-920.

- Chen S, Luo J, Reis C, Manaenko A, Zhang J. 2017. Hydrocephalus after Subarachnoid Hemorrhage: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*, 2017:8584753.
- Ciurea AV, Palade C, Voinescu D, Nica DA. 2013. Subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm - literature review. *J Med Life*, 6 (2):120-125.
- Clark JF, Sharp FR. 2006. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (10):1223-1233.
- Clark JF, Reilly M, Sharp FR. 2002. Oxidation of bilirubin produces compounds that cause prolonged vasospasm of rat cerebral vessels: a contributor to subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (4):472-478.
- Coelho LG, Costa JM, Silva EI. 2016. Non-aneurysmal spontaneous subarachnoid hemorrhage: perimesencephalic versus non-perimesencephalic. *Rev Bras Ter Intensiva*, 28 (2):141-146.
- Contet C, Goulding SP, Kuljis DA, Barth AL. 2016. BK Channels in the Central Nervous System. *Int Rev Neurobiol*, 128:281-342.
- Cui J, Yang H, Lee US. 2009. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci*, 66 (5):852-875.
- D'Souza S. 2015. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol*, 27 (3):222-240.
- de Oliveira Manoel AL, Mansur A, Murphy A, Turkel-Parrella D, Macdonald M, Macdonald RL, Montanera W, Marotta TR, Bharatha A, Effendi K, Schweizer TA. 2014. Aneurysmal subarachnoid haemorrhage from a neuroimaging perspective. *Crit Care*, 18 (6):557.
- de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. 2007. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78 (12):1365-1372.
- Deng W, Kandhi S, Zhang B, Huang A, Koller A, Sun D. 2018. Extravascular Blood Augments Myogenic Constriction of Cerebral Arterioles: Implications for Hemorrhage-Induced Vasospasm. *J Am Heart Assoc*, 7 (8).
- Dopico AM, Bukiya AN, Jaggar JH. 2018. Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch*, 470 (9):1271-1289.

- Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J. 2007. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007 (3):Cd000277.
- Dorr A, Sled JG, Kabani N. 2007. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage*, 35 (4):1409-1423.
- Dreier JP. 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*, 17 (4):439-447.
- Edwards G, Niederste-Hollenberg A, Schneider J, Noack T, Weston AH. 1994. Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 113 (4):1538-1547.
- Etminan N, Rinkel GJ. 2016. Unruptured intracranial aneurysms: development, rupture and preventive management. *Nat Rev Neurol*, 12 (12):699-713.
- Etminan N, Dörfler A, Steinmetz H. 2020. Unruptured Intracranial Aneurysms- Pathogenesis and Individualized Management. *Dtsch Arztebl Int*, 117 (14):235-242.
- Findlay JM, Nisar J, Darsaut T. 2016. Cerebral Vasospasm: A Review. *Can J Neurol Sci*, 43 (1):15-32.
- Fix AS, Garman RH. 2000. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system. *Toxicol Pathol*, 28 (1):122-131.
- Foreman B. 2016. The Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia. *J Clin Neurophysiol*, 33 (3):174-182.
- Gathier CS, van den Bergh WM, van der Jagt M, Verweij BH, Dankbaar JW, Müller MC, Oldenbeuving AW, Rinkel GJE, Slooter AJC. 2018. Induced Hypertension for Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Randomized Clinical Trial. *Stroke*, 49 (1):76-83.
- Geraghty JR, Testai FD. 2017. Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: Beyond Vasospasm and Towards a Multifactorial Pathophysiology. *Curr Atheroscler Rep*, 19 (12):50.
- Greving JP, Wermer MJ, Brown RD, Jr., Morita A, Juvela S, Yonekura M, Ishibashi T, Torner JC, Nakayama T, Rinkel GJ, Algra A. 2014. Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: a pooled analysis of six prospective cohort studies. *Lancet Neurol*, 13 (1):59-66.

- Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI. 2001. Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist*, 7 (2):166-177.
- Grobelny TJ. 2011. Brain aneurysms: epidemiology, treatment options, and milestones of endovascular treatment evolution. *Dis Mon*, 57 (10):647-655.
- Gules I, Satoh M, Clower BR, Nanda A, Zhang JH. 2002. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283 (6):H2551-2559.
- Hansen-Schwartz J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. 2007. Cerebral vasospasm: looking beyond vasoconstriction. *Trends Pharmacol Sci*, 28 (6):252-256.
- Harrod CG, Batjer HH, Bendok BR. 2006. Deficiencies in estrogen-mediated regulation of cerebrovascular homeostasis may contribute to an increased risk of cerebral aneurysm pathogenesis and rupture in menopausal and postmenopausal women. *Med Hypotheses*, 66 (4):736-756.
- Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP. 1996. Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 117 (1):119-129.
- Holthoff K, Witte OW. 1996. Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci*, 16 (8):2740-2749.
- Holthoff K, Dodt HU, Witte OW. 1994. Changes in intrinsic optical signal of rat neocortical slices following afferent stimulation. *Neurosci Lett*, 180 (2):227-230.
- Horrigan FT, Heinemann SH, Hoshi T. 2005. Heme regulates allosteric activation of the Slo1 BK channel. *J Gen Physiol*, 126 (1):7-21.
- Jahromi BS, Aihara Y, Ai J, Zhang ZD, Weyer G, Nikitina E, Yassari R, Houamed KM, Macdonald RL. 2008. Preserved BK channel function in vasospastic myocytes from a dog model of subarachnoid hemorrhage. *J Vasc Res*, 45 (5):402-415.
- Jensen BS. 2002. BMS-204352: a potassium channel opener developed for the treatment of stroke. *CNS Drug Rev*, 8 (4):353-360.
- Joerk A, Seidel RA, Walter SG, Wiegand A, Kahnes M, Klopffleisch M, Kirmse K, Pohnert G, Westerhausen M, Witte OW, Holthoff K. 2014. Impact of heme and

- heme degradation products on vascular diameter in mouse visual cortex. *J Am Heart Assoc*, 3 (4).
- Joerk A, Ritter M, Langguth N, Seidel RA, Freitag D, Herrmann KH, Schaeffgen A, Ritter M, Gunther M, Sommer C, Braemer D, Walter J, Ewald C, Kalff R, Reichenbach JR, Westerhausen M, Pohnert G, Witte OW, Holthoff K. 2019. Proentdyopents as Heme Degradation Intermediates Constrict Mouse Cerebral Arterioles and Are Present in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Subarachnoid Hemorrhage. *Circ Res*, 124 (12):e101-e114.
- Juvela S, Poussa K, Lehto H, Porras M. 2013. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: a long-term follow-up study. *Stroke*, 44 (9):2414-2421.
- Kikkawa Y, Kurogi R, Sasaki T. 2015. The single and double blood injection rabbit subarachnoid hemorrhage model. *Transl Stroke Res*, 6 (1):88-97.
- Kim JH, Kim JW, Song SW, Ahn SJ, Park M, Park SK, Suh SH. 2021. Intracranial Aneurysms Are Associated With Marfan Syndrome: Single Cohort Retrospective Study in 118 Patients Using Brain Imaging. *Stroke*, 52 (1):331-334.
- Kim YW, Lawson MF, Hoh BL. 2012. Nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage: an update. *Curr Atheroscler Rep*, 14 (4):328-334.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. 2012. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  (BK) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (21):E1387-1395.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. 2013. Subarachnoid blood converts neurally evoked vasodilation to vasoconstriction in rat brain cortex. *Acta Neurochir Suppl*, 115:167-171.
- Kranc KR, Pyne GJ, Tao L, Claridge TD, Harris DA, Cadoux-Hudson TA, Turnbull JJ, Schofield CJ, Clark JF. 2000. Oxidative degradation of bilirubin produces vasoactive compounds. *Eur J Biochem*, 267 (24):7094-7101.
- Kundra S, Mahendru V, Gupta V, Choudhary AK. 2014. Principles of neuroanesthesia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 30 (3):328-337.
- Langguth N. 2020. Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus.
- Lee US, Cui J. 2010. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci*, 33 (9):415-423.

- Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, Lee KS. 2003. A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *J Neurosci Methods*, 123 (1):89-97.
- Lyons MA, Shukla R, Zhang K, Pyne GJ, Singh M, Biehle SJ, Clark JF. 2004. Increase of metabolic activity and disruption of normal contractile protein distribution by bilirubin oxidation products in vascular smooth-muscle cells. *J Neurosurg*, 100 (3):505-511.
- Macdonald RL, Schweizer TA. 2017. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 389 (10069):655-666.
- Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, Frey A, Roux S, Pasqualin A. 2008. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke*, 39 (11):3015-3021.
- Magleby KL. 2003. Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol*, 121 (2):81-96.
- Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (25):14066-14071.
- Meurer WJ, Walsh B, Vilke GM, Coyne CJ. 2016. Clinical Guidelines for the Emergency Department Evaluation of Subarachnoid Hemorrhage. *J Emerg Med*, 50 (4):696-701.
- Molyneux AJ, Kerr RS, Yu LM, Clarke M, Sneade M, Yarnold JA, Sandercock P. 2005. International subarachnoid aneurysm trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion. *Lancet*, 366 (9488):809-817.
- Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. 2011. BMS-191011, an opener of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels, dilates rat retinal arterioles in vivo. *Biol Pharm Bull*, 34 (1):150-152.

- Naidech AM, Kreiter KT, Janjua N, Ostapkovich ND, Parra A, Commichau C, Fitzsimmons BF, Connolly ES, Mayer SA. 2005. Cardiac troponin elevation, cardiovascular morbidity, and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Circulation*, 112 (18):2851-2856.
- Naraoka M, Matsuda N, Shimamura N, Asano K, Ohkuma H. 2014. The role of arterioles and the microcirculation in the development of vasospasm after aneurysmal SAH. *Biomed Res Int*, 2014:253746.
- Ohkuma H, Suzuki S, Ogane K. 2003. Phenotypic modulation of smooth muscle cells and vascular remodeling in intraparenchymal small cerebral arteries after canine experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett*, 344 (3):193-196.
- Olubajo F, Kaliaperumal C, Choudhari KA. 2020. Vascular Ehlers-Danlos Syndrome: Literature review and surgical management of intracranial vascular complications. *Clin Neurol Neurosurg*, 193:105775.
- Ostergaard JR. 1991. Headache as a warning symptom of impending aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cephalalgia*, 11 (1):53-55.
- Park YK, Yi HJ, Choi KS, Lee YJ, Chun HJ, Kwon SM. 2018. Predictive Factors of Fever After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Its Impact on Delayed Cerebral Ischemia and Clinical Outcomes. *World Neurosurg*, 114:e524-e531.
- Perry JJ, Spacek A, Forbes M, Wells GA, Mortensen M, Symington C, Fortin N, Stiell IG. 2008. Is the combination of negative computed tomography result and negative lumbar puncture result sufficient to rule out subarachnoid hemorrhage? *Ann Emerg Med*, 51 (6):707-713.
- Perry JJ, Stiell IG, Sivilotti ML, Bullard MJ, Emond M, Symington C, Sutherland J, Worster A, Hohl C, Lee JS, Eisenhauer MA, Mortensen M, Mackey D, Pauls M, Lesiuk H, Wells GA. 2011. Sensitivity of computed tomography performed within six hours of onset of headache for diagnosis of subarachnoid haemorrhage: prospective cohort study. *Bmj*, 343:d4277.
- Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, Steiger HJ. 2017. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Dtsch Arztebl Int*, 114 (13):226-236.
- Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. 1996. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for

- bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol*, 118 (6):1433-1440.
- Phillips AA, Chan FH, Zheng MM, Krassioukov AV, Ainslie PN. 2016. Neurovascular coupling in humans: Physiology, methodological advances and clinical implications. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36 (4):647-664.
- Phillips TJ, Dowling RJ, Yan B, Laidlaw JD, Mitchell PJ. 2011. Does treatment of ruptured intracranial aneurysms within 24 hours improve clinical outcome? *Stroke*, 42 (7):1936-1945.
- Price DL, Ludwig JW, Mi H, Schwarz TL, Ellisman MH. 2002. Distribution of rSlo Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat astrocyte perivascular endfeet. *Brain Res*, 956 (2):183-193.
- Raatikainen E, Vahtera A, Kuitunen A, Junttila E, Huhtala H, Ronkainen A, Pyysalo L, Kiiski H. 2021. Prognostic value of the 2010 consensus definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Sci*, 420:117261.
- Ramappa P, Thatai D, Coplin W, Gellman S, Carhuapoma JR, Quah R, Atkinson B, Marsh JD. 2008. Cardiac troponin-I: a predictor of prognosis in subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 8 (3):398-403.
- Rass V, Helbok R. 2021. How to diagnose delayed cerebral ischaemia and symptomatic vasospasm and prevent cerebral infarction in patients with subarachnoid haemorrhage. *Curr Opin Crit Care*, 27 (2):103-114.
- Rinkel GJ, Algra A. 2011. Long-term outcomes of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet Neurol*, 10 (4):349-356.
- Ritter M. 2021. Charakterisierung von Pathogenese und Prävention des zerebralen Vasospasmus mittels Durchmesseranalyse zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnittmodell der Maus.
- Ritter M, Seidel RA, Bellstedt P, Schneider B, Bauer M, Görls H, Pohnert G. 2016. Isolation and Identification of Intermediates of the Oxidative Bilirubin Degradation. *Org Lett*, 18 (17):4432-4435.
- Rose MJ. 2011. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an update on the medical complications and treatments strategies seen in these patients. *Curr Opin Anaesthesiol*, 24 (5):500-507.
- Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS,

- Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV. 2013. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44 (7):2064-2089.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*, 7 (12):921-931.
- Sanchis IM, Shukoor S, Irazabal MV, Madsen CD, Chebib FT, Hogan MC, El-Zoghby Z, Harris PC, Huston J, Brown RD, Torres VE. 2019. Presymptomatic Screening for Intracranial Aneurysms in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 14 (8):1151-1160.
- Schröder C. 2021. Charakterisierung von Pathogenese und Prävention des zerebralen Vasospasmus im akuten und fixierten Hirnschnittmodell der Maus.
- Seidel RA, Ritter M, Joerk A, Kuschke S, Langguth N, Schulze D, Görls H, Bauer M, Witte OW, Westerhausen M, Holthoff K, Pohnert G. 2020. Photoisomerization Neutralizes Vasoconstrictive Activity of a Heme Degradation Product. *ACS Omega*, 5 (34):21401-21411.
- Shimamura N, Ohkuma H. 2014. Phenotypic transformation of smooth muscle in vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res*, 5 (3):357-364.
- Starke RM, Connolly ES, Jr. 2011. Rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 15 (2):241-246.
- Suzuki H, Kanamaru H, Kawakita F, Asada R, Fujimoto M, Shiba M. 2020. Cerebrovascular pathophysiology of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Histol Histopathol*:18253.
- Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. 2003. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature*, 425 (6957):531-535.
- Tso MK, Macdonald RL. 2014. Subarachnoid hemorrhage: a review of experimental studies on the microcirculation and the neurovascular unit. *Transl Stroke Res*, 5 (2):174-189.
- Tulla M, Tillgren T, Mattila K. 2019. Is there a role for lumbar puncture in early detection of subarachnoid hemorrhage after negative head CT? *Intern Emerg Med*, 14 (3):451-457.

- Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S, Raabe A, Thome C, Ringel F, Breu V, Schmiedek P. 2005. Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study. *J Neurosurg*, 103 (1):9-17.
- van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. 2007. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 369 (9558):306-318.
- van Gijn J, van Dongen KJ, Vermeulen M, Hijdra A. 1985. Perimesencephalic hemorrhage. A nonaneurysmal and benign form of subarachnoid hemorrhage, 35 (4):493-493.
- van Lieshout JH, Bruland I, Fischer I, Cornelius JF, Kamp MA, Turowski B, Tortora A, Steiger HJ, Petridis AK. 2017. Increased mortality of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage caused by prolonged transport time to a high-volume neurosurgical unit. *Am J Emerg Med*, 35 (1):45-50.
- van Lieshout JH, Dibué-Adjei M, Cornelius JF, Slotty PJ, Schneider T, Restin T, Boogaarts HD, Steiger H-J, Petridis AK, Kamp MA. 2018. An introduction to the pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgical Review*, 41 (4):917-930.
- Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdicks EF, Muizelaar JP, Mendelow AD, Juvela S, Yonas H, Terbrugge KG, Macdonald RL, Dringer MN, Broderick JP, Dreier JP, Roos YB. 2010. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke*, 41 (10):2391-2395.
- Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. 2011. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 10 (7):626-636.
- Wagner KR, Dwyer BE. 2004. Hematoma removal, heme, and heme oxygenase following hemorrhagic stroke. *Ann N Y Acad Sci*, 1012:237-251.
- Wang CX, Lin YX, Xie GB, Shi JX, Zhou ML. 2015. Constriction and dysfunction of pial arterioles after regional hemorrhage in the subarachnoid space. *Brain Res*, 1601:85-91.

- Wang GX, Zhang D, Wang ZP, Yang LQ, Yang H, Li W. 2018. Risk factors for ruptured intracranial aneurysms. *Indian J Med Res*, 147 (1):51-57.
- Wellman GC, Koide M. 2013. Impact of subarachnoid hemorrhage on parenchymal arteriolar function. *Acta Neurochir Suppl*, 115:173-177.
- Yew KS, Cheng EM. 2015. Diagnosis of acute stroke. *Am Fam Physician*, 91 (8):528-536.
- Zhang JH, Badaut J, Tang J, Obenaus A, Hartman R, Pearce WJ. 2012. The vascular neural network--a new paradigm in stroke pathophysiology. *Nat Rev Neurol*, 8 (12):711-716.
- Zoerle T, Lombardo A, Colombo A, Longhi L, Zanier ER, Rampini P, Stocchetti N. 2015. Intracranial pressure after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med*, 43 (1):168-176.

### **Abbildungsverzeichnis**

- Kellner P, Stoevesandt D, Soukup J, Bucher M, Raspé C. 2012. [Aneurysmal subarachnoid hemorrhage]. *Anaesthesist*, 61 (9):792-814.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff, Dr. med. Alexander Jörk, Elisabeth Settke (statistische Betreuung).

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift der Verfasserin

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Knut Holthoff danken. Er begeisterte mich bereits in unserem ersten Gespräch für dieses Projekt und betreute mich während der gesamten Zeit dieser Arbeit sehr umfassend. Während der experimentellen Zeit im Labor unterstützte er mich mit den Erfahrungen aus seiner eigenen Laborzeit und mit seinem ausgeprägten feinmotorischen Geschick. Als Ansprechpartner stand er mir stets zur Seite und unterstützte mich in jeglichen Verständnis- und Statistikfragen mit seinem umfangreichen Wissen und seiner sehr großen Geduld.

Herrn Dr. med. Alexander Jörk danke ich für die großartige und umfassende Betreuung während des gesamten Projekts. Trotz zeitlich begrenzter Kapazitäten nahm er sich stets Zeit für meine zahlreichen Fragen und unterstützte mich bei auftretenden Problemen oder Zweifeln. Durch seine Expertise auf diesem Forschungsgebiet und seine umfangreichen, gewissenhaften und präzisen Erläuterungen und Hilfestellungen konnte ich stets neue Erkenntnisse sammeln und zahlreiche Erfahrungen aus meiner Forschungsarbeit mitnehmen.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt meiner Vorgängerin Linda Ma. Mit größter Geduld beantwortete sie mir alle Fragen zu jeder Tages- und Nachtzeit, arbeitete mich in die gesamten experimentellen Abläufe und Auswertungsmethoden ein und beriet und unterstützte mich während der gesamten Promotionszeit. Ich bedanke mich für die zahlreichen konstruktiven Besprechungen in Präsenz und via Zoom, die einen großen Gewinn für meine Arbeit darstellten.

Außerdem danke ich ihr sehr für ihre Daten im dritten Teilprojekt, die eine sehr wesentliche Ergänzung zu meinem Datensatz darstellten.

Ebenfalls möchte ich hier meiner Vorgängerin Charlotte Schröder danken, die ebenfalls ihre Daten zur Auswertung zur Verfügung stellte.

Ein außerordentlicher Dank gilt Ina Ingrisch für ihre großartige, gewissenhafte Arbeit, ihre Flexibilität und ihr umfassendes Verständnis für den manchmal doch unerwarteten Laboralltag. Vielen Dank für die unzähligen Genotypisierungen der Versuchstiere, die Färbungen und Aufbereitung der Gehirne sowie die äußerst großzügige Hilfsbereitschaft in jeglichen Situationen.

Frau Elisabeth Settke (IMSID Jena) danke ich für die statistische Beratung und Unterstützung hinsichtlich der Auswertung, für zahlreiche Zoom-Besprechungen und ihr großes Bemühen, die statistischen Herausforderungen dieses Projektes zu lösen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Marcel Ritter und Herrn Hannes Richter des IAAC Jena für die Bereitstellung der Hämoglobinabbauprodukte.

Franz Kühne möchte ich für seine Hilfe und Beratung bei der Auswertung und dem Umgang mit den Programmen Image J und Excel danken.

Den Mitarbeiter:innen des Tierstalls möchte ich für die Betreuung der Versuchstiere danken, außerdem für die Hilfsbereitschaft und das Verständnis bei ungeplanten Änderungen im Laboralltag.

Großer Dank gilt nicht zuletzt dem Else-Kröner-Promotionskolleg für Altersforschung für die finanzielle Unterstützung während meines experimentellen Jahres. In diesem Rahmen möchte ich auch der „Jena School for Ageing Medicine“ (JSAM) danken, die eine erhebliche Bereicherung meiner wissenschaftlichen Arbeit mit zahlreichen Kursangeboten und Austauschmöglichkeiten darstellte. Vielen Dank hierbei an die Koordinatorinnen Jeanine Linz, Vera Voltersen und Jana Schleicher für die exzellente Organisation.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken für die Kraft, Motivation und ihr stets offenes Ohr, wenn der Laboralltag mal wieder frustran verlief oder die Arbeit unendlich erschien.

Vielen Dank an all diese großartige Unterstützung, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!