



FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA



DISSERTATION

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

Einfluss von Hämabbauprodukten auf die
neurovaskuläre Reaktion und die Morphologie
zerebraler Gefäße im Mausmodell

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

Yilin Linda Ma

Jena, 28.04.2024

Gutachtende

1. Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff, Jena
2. Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger, Jena
3. Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Einheitenverzeichnis.....	9
1 Zusammenfassung.....	10
2 Einleitung.....	12
2.1 Subarachnoidalblutung.....	12
2.2 Zerebraler Vasospasmus.....	15
2.2.1 Allgemeines.....	15
2.2.2 Pathophysiologische Konzepte.....	16
2.2.3 Verzögerte zerebrale Ischämien.....	20
2.3 Zerebraler Mikrovasospasmus.....	21
2.3.1 Neurovaskuläre Einheit.....	21
2.3.2 Neurovaskuläre Kopplung.....	22
3 Ziele der Arbeit.....	24
4 Methodik.....	25
4.1 Versuchstiere.....	25
4.2 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“.....	29
4.2.1 Versuchsgruppen.....	29
4.2.2 Materialien.....	29
4.2.2.1 Geräte und Chemikalien.....	29
4.2.2.2 Vasoaktive Substanzen.....	31
4.2.2.3 Durchlicht-Mikroskopie.....	32
4.2.2.4 Stimulationselektrode.....	32
4.2.3 Versuchsablauf.....	33
4.2.3.1 Herstellung der Lösungen.....	33

4.2.3.2 Präparation Hirnschnitte	34
4.2.3.3 Mikroskopieren	35
4.2.3.4 Messung	36
4.3 Teilprojekt 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“	37
4.3.1 Versuchsgruppen	37
4.3.2 Materialien	37
4.3.2.1 Geräte und Chemikalien	37
4.3.2.2 Vasoaktive Substanzen	38
4.3.3 Versuchsablauf	39
4.3.3.1 Operation	39
4.3.3.2 Hirnentnahme und Kryokonservierung	40
4.3.3.3 Präparation Objekte	40
4.3.3.4 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	43
4.4 Auswertung und Statistik	44
4.4.1 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“	44
4.4.2 Teilprojekt 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“	48
5 Ergebnisse	50
5.1 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“	50
5.1.1 Amplitude	52
5.1.2 Zeitpunkt maximaler Kontraktion	53
5.1.3 Tau	54
5.1.4 Dilatation	55
5.1.5 AUC	56
5.2 Teilprojekt 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“	57
5.2.1 Arteria azygos pericallosa (APA)	57

5.2.2 Arteria communicans posterior (PCA)	58
5.2.3 Arteria basilaris (BA).....	60
6 Diskussion	62
6.1 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“	62
6.1.1 Diskussion der Methodik.....	62
6.1.2 Diskussion der Ergebnisse	67
6.1.2.1 aCSF-Kontrollgruppen	67
6.1.2.2 Einfluss der Interventionen	69
6.1.2.3 Einfluss des Alters	72
6.2 HDPs und Gefäßmorphologie.....	73
6.2.1 Diskussion der Methodik.....	73
6.2.2 Diskussion der Ergebnisse	76
6.2.2.1 Kontrollgefäß APA	76
6.2.2.2 Extraparenchymale PCA	76
6.2.2.3 Extraparenchymale BA	78
7 Schlussfolgerung	80
8 Literatur- und Quellenverzeichnis	82
Ehrenwörtliche Erklärung.....	90

Abkürzungsverzeichnis

20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
aCSF	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
APA	Arteria azygos pericallosa (<i>azygos pericallosal artery</i>)
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BA	Arteria basilaris (<i>basilar artery</i>)
BK _{Ca} -Kanal	Ca ²⁺ - und spannungsabhängiger Kaliumkanal (<i>big conductance</i>)
BOX	Bilirubin-Oxidations-Produkt
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CBF	Zerebrale Durchblutung (<i>cerebral blood flow</i>)
CGRP	<i>Calcitonin-Gene-Related-Peptide</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CVS	Zerebraler Vasospasmus (<i>cerebral vasospasm</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCI	Verzögerte zerebrale Ischämie (<i>delayed cerebral ischemia</i>)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	Einfach destilliertes Wasser
DIND	Verzögertes ischämisches neurologisches Defizit (<i>delayed ischemic neurological deficit</i>)
EB	Eigenblut
EET	Epoxyeicosatriensäure
eNOS/nNOS	Endotheliale/neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
HCl	Wasserstoffchlorid
HDP	Hämabbauprodukt (<i>heme degradation product</i>)
IbTx	Iberiotoxin
ICP	Intrakranieller Druck (<i>intracerebral pressure</i>)
K ⁺	Kaliumion

KO	<i>Knockout</i>
L-NAME	<i>L-Nitro-Arginin-Methylester</i>
LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskop</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MRT	Magnetresonanztomografie
NA	Noradrenalin
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NVU	Neurovaskuläre Einheit (<i>neurovascular unit</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	Arteria communicans posterior (<i>posterior communicating artery</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDP	Propentdyopent
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RT-Lösung	Raumtemperatur-Lösung
SAB	Subarachnoidalblutung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Slo1	<i>slowpoke</i> (Gensequenz BK _{Ca} -Kanal)
Slo1 ^{+/+}	Homozygote Expression des Slo1-Gens
Slo1 ^{+/-}	Heterozygote Expression des Slo1-Gens
Slo1 ^{-/-}	Homozygoter Knockout des Slo1-Gens
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
WT	Wildtyp

Einheitenverzeichnis

a	Beschleunigung	$\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
c	Stoffmengenkonzentration	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
l	Länge	m (Meter)
m	Masse	g (Gramm)
M	Molare Masse	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$
n	Stoffmenge	mol (Mol)
t	Zeit	s (Sekunde) min (Minute)
U	Elektrische Spannung	$\text{V (Volt)} = \text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3} \cdot \text{A}^{-1}$
v	Geschwindigkeit	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
V	Volumen	l (Liter) = $0,001 \cdot \text{m}^3$
Θ	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$ (Grad Celsius)

1 Zusammenfassung

Die Subarachnoidalblutung ist ein medizinischer Notfall. Als eine Form des hämorrhagischen Schlaganfalls ist sie zumeist durch eine Aneurysmaruptur verursacht und mit einer hohen Letalität assoziiert. Die verzögerte zerebrale Ischämie zählt zu einer der wichtigsten Komplikationen des klinisch-neurologischen Verlaufs und bestimmt maßgeblich die Prognose des Patienten nach einer solchen Blutung. Verzögerte zerebrale Ischämien sind mehrheitlich, aber nicht zwingend mit einem angiographisch detektierbaren zerebralen Vasospasmus, einer krampfhaften Verengung intrazerebraler Arterien, die etwa 6-8 Tage nach der Blutung auftritt, vergesellschaftet. Da die Pathogenese des Vasospasmus nur unzureichend verstanden ist, gibt es bislang keine kausal wirksamen Therapieoptionen. In jüngster Zeit stehen neben dem angiografisch detektierbaren Vasospasmus auch Mikrovasospasmen auf Ebene der kleinen arteriellen Gefäße des Kortex im Mittelpunkt der Forschung. Das im Rahmen der Subarachnoidalblutung freigesetzte Hämoglobin sowie dessen Abbauprodukte (Hämabbauprodukte) stehen in Verdacht die neurovaskuläre Kopplung über den BK_{Ca} -Kanal, der physiologisch bedeutsam für die Vasodilatation ist, zu beeinflussen. Als neurovaskuläre Kopplung wird die lokale, aktivitätsadaptierte Bereitstellung von Blut mittels Vasodilatation nach neuronaler Erregung bezeichnet. Ihre Dysfunktion würde ein anhaltendes neurologisches Defizit nach Subarachnoidalblutung erklären. Über Hämabbauprodukte ist zudem bekannt, dass sie befähigt sind, in das zerebrale Parenchym zu diffundieren. Nach einer SAB konnten bei Patienten *post mortem* pathologische Gefäßkonstriktionen sowie verdickte Gefäßwände verzeichnet werden. Ungeklärt ist, ob Hämabbauprodukte selbst gefäßmorphologische Veränderungen hervorrufen.

Diese Arbeit widmete sich daher im ersten Teil dem dynamischen Einfluss des Hämabbauproduktes Z-PDP A auf die durch neuronale Aktivität induzierte Gefäßreaktion und untersuchte die Hypothese, wonach Z-PDP A kurzfristig die neurovaskuläre Kopplung verändert. Zusätzlich war von Interesse, welche Rolle eine veränderte BK_{Ca} -Kanal-Funktion sowie das Alter in der neuronal-induzierten Gefäßreaktion einnimmt. Hierfür wurden Gefäßreaktionen kortikaler Arteriolen nach einer extrazellulären elektrischen Stimulation akuter Maushirnschnitte mittels Durchlichtmikroskopie gemessen. Die Inkubation des Hirnschnittes mit Z-PDP A führte zu keiner Veränderung der neuronal-induzierten Gefäßreaktion. Es zeigte sich jedoch eine signifikant abgeschwächte Gefäßkonstriktion von adulten gegenüber juvenilen

Kohorten in der neurovaskulären Signalübertragung. Dies bestätigte, wie bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben, erneut den Einfluss des Alters in der neurovaskulären Kopplung. Des Weiteren wiesen Arteriolen der genetisch modifizierten BK-Knockout-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verlangsamte Vasodilatation auf, sodass die Stellung des BK_{Ca}-Kanals in der Gefäßtonusregulation bekräftigt wurde.

Das zweite Teilprojekt untersuchte den längerfristigen Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Gefäßmorphologie zerebraler Gefäße. Hierfür wurde *in vivo* eine intrathekale Applikation von Eigenblut bzw. den Hämabbauprodukten Z-PDP A+B und Z-BOX A+B vorgenommen. Im Anschluss wurden die Gehirne der behandelten Tiere an einem von drei definierten postoperativen Tagen (0 / 3 / 7) entnommen. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurden die fixierten und immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte auf den Anteil der Aktinfaserschicht in der Gefäßwand ausgewählter intra- sowie extraparenchymaler Gefäßtypen untersucht. Der Datensatz konnte durch Rohdaten der postoperativen Tage 14 sowie 28 ergänzt werden, welche außerhalb dieser Arbeit erhoben wurden. Es zeigte sich eine reversible Zunahme des Aktinfaserschichtanteils im Sinne einer Gefäßverengung um den Tag 14 nach intrathekaler Applikation von Eigenblut oder Hämabbauprodukten. Diese pathologische Gefäßveränderung ließ sich nur für die extraparenchymal liegenden Gefäßtypen (A. posterior communicans, A. basilaris) beobachten. Eine intraparenchymale Lage des Gefäßes (A. azygos pericallosa) ohne direkten Kontakt zum Subarachnoidalraum zeigte trotz intrathekaler Applikation der Hämabbauprodukte oder Eigenblut diesen Effekt nicht. Eine unmittelbare Nähe des Gefäßes zum Subarachnoidalraum mit den darin zirkulierenden Hämabbauprodukten scheint daher unabdingbar für die beobachtete Gefäßveränderung zu sein. Dies stärkt die Theorie, dass Hämabbauprodukte eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zerebraler Vasospasmen einnehmen.

Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Promotion tragen einen Baustein zum Verständnis der komplexen pathophysiologischen Reaktion zerebraler Gefäße nach einer Subarachnoidalblutung bei. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist wichtig und notwendig, um zukünftig eine adäquate Therapie betroffenen Patienten anbieten zu können.

2 Einleitung

2.1 Subarachnoidalblutung

Die Subarachnoidalblutung (SAB) kennzeichnet eine arterielle Hämorrhagie in den liquorgefüllten kraniellen und/oder spinalen Subarachnoidalraum, welcher durch die beiden weichen Hirnhäute Arachnoidea mater und Pia mater begrenzt wird (Bendszus et al. 2016) (Abb. 1).

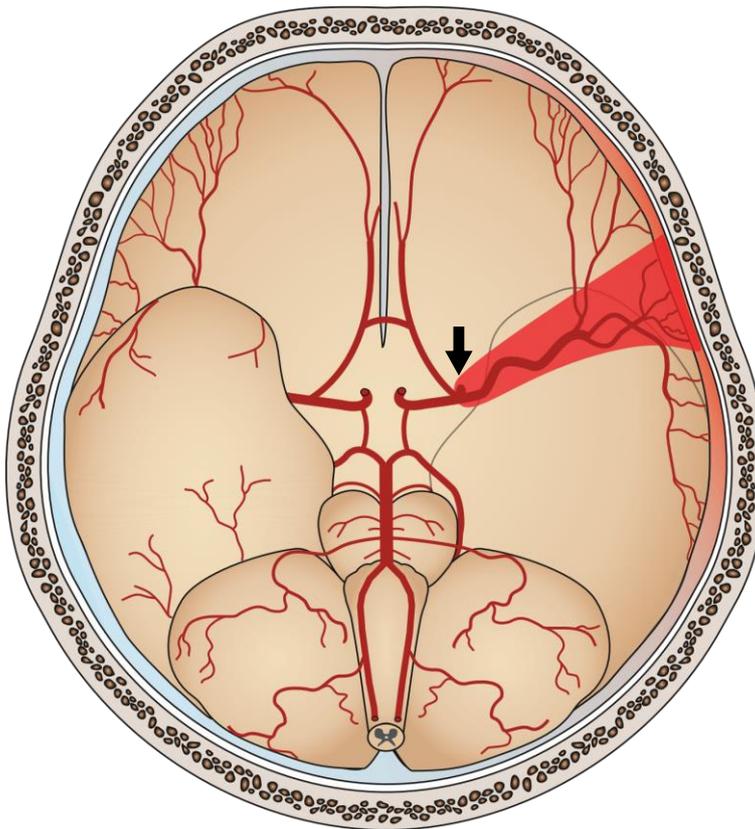


Abb. 1: Blick von kaudal nach kranial auf die Gehirnbasis. Schematische Darstellung einer linksseitigen Subarachnoidalblutung aus einem rupturierten Aneurysma am Circulus arteriosus Willisii (schwarzer Pfeil) mit Verteilung des Blutvolumens entlang der A. cerebri media im Bereich der basalen Zisterne bis an die Hirnoberfläche des äußeren Liquorraumes.

Die Inzidenz der SAB wird mit ca. 9 von 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben. In den Jahren von 1950 bis 2005 ist die Neuerkrankungsrate annähernd unverändert geblieben (de Rooij et al. 2007). Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der 5.-6. Lebensdekade (Hop et al. 1997). Dabei erkranken Frauen ab dem 55. Lebensjahr gegenüber Männern mit einem 1,24-fachen Risiko statistisch häufiger (de Rooij et al. 2007).

Es werden nicht-traumatische von traumatischen Ursachen unterschieden. Den häufigeren nicht-traumatischen SABs liegt in 85 % der Fälle die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas, insbesondere in den basalen Liquorzisternen, zugrunde. Davon abzugrenzen ist die Aneurysmen-unabhängige perimesenzepale SAB und seltenere Ursachen wie z.B. arteriovenöse Malformationen, Fisteln, Vaskulitiden, arterielle Dissektionen oder Drogenabusus (van Gijn et al. 2007).

Zu den vom Lebensstil beeinflussbaren Risikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Nikotin- sowie Alkoholabusus (Longstreth et al. 1992, Feigin et al. 2005). Genetische Risikofaktoren für eine SAB stellen die autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankheit, das Ehlers-Danlos-Syndrom, die fibromuskuläre Dysplasie und eine positive Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades dar (Schievink et al. 1992, Schievink et al. 1994, Bromberg et al. 1995). Im Vergleich führen beeinflussbare Risikofaktoren zu zwei von drei SABs, wohingegen genetische Faktoren nur einem von zehn Fällen zugrunde liegen (van Gijn et al. 2007).

Leitsymptom der SAB ist der akut einsetzende holozepale Vernichtungskopfschmerz, welcher in 75 % aller Fälle auftritt und bei einem Drittel der Patienten der einzige Hinweis auf eine SAB bleibt (Linn et al. 1994). Weitere Symptome wie Nackensteifigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Photophobie, Schweißausbruch oder Kreislaufdysregulation können hinzutreten. Diese Begleiterscheinungen werden vorwiegend über eine meningeale Reizung und den intrakraniellen Druckanstieg durch das akut in den Subarachnoidalraum strömende Blut vermittelt (Bendszus et al. 2016). Neurologische Ausfallerscheinungen zeigen sich in Form von Hemi- oder Tetraparesen, Spastik, Aphasie, Neglect oder Hirnnervenparesen (van Gijn et al. 2007). Eine Vigilanzminderung von soporös bis komatös wird bei etwa einem Viertel der Patienten beobachtet (Linn et al. 1998). Ein Prodromus der SAB, auch als *warning leak* bezeichnet, tritt in etwa 25 % der Fälle einige Tage bis Wochen vor der SAB als starkes Kopfschmerzereignis auf. Sowohl von Patienten als auch medizinischem Personal wird dieses Warnsignal oft missinterpretiert und bedeutet die verpasste Chance für eine frühzeitige Intervention (Linn et al. 1994).

In der Akutdiagnostik der SAB ist die kraniale CT das Mittel der ersten Wahl (Bendszus et al. 2016). Die kraniale MRT hat ähnliche Vorteile hinsichtlich der Sensitivität. Allerdings unterliegt sie aufgrund der Verfügbarkeit und Untersuchungsdauer in der akuten Phase der kranialen CT (Mitchell et al. 2001). Der Goldstandard zur Gefäßdarstellung ist die digitale Subtraktionsangiografie. Sie kann entscheidende

Hinweise zur Aneurysmalokalisation, -größe, Blutzufuhr und Abfluss sowie Bezug zu den Nachbargefäßen geben. Der Nachteil dieser Technik gegenüber einer ebenfalls sehr spezifischen und sensitiven CT-Angiographie ist die Invasivität und ein erhöhtes Re-Ruptur-Risiko von 1-2 % (de Oliveira Manoel et al. 2014, Saitoh et al. 1995).

Bei der kausalen Therapie zur Aneurysmaausschaltung stehen zwei Methoden zur Verfügung: Interventionelles *Coiling* oder mikrochirurgisches *Clipping*. Untersuchungen der randomisiert kontrollierten Studie ISAT und ihrer Substudie N-ISAT zeigten für das *Coiling* bessere 5-Jahres-Überlebensraten (Molyneux et al. 2009) sowie eine geringere Häufigkeit von kognitiver Leistungsminderung (Scott et al. 2010). Vorteil des *Clippings* ist die geringere Re-Blutungsrate (Molyneux et al. 2005). Die Entscheidung, welchen Eingriff der Patient erhält, ist abhängig von der Expertise der anwesenden Neuroradiologen bzw. Neurochirurgen. Entscheidend ist die frühe Versorgung möglichst unter 72 Stunden nach Erstblutung (Whitfield und Kirkpatrick 2001), sodass Komplikationen der Re-Blutung sowie dem zerebralem Vasospasmus entgegengewirkt wird. Die Gefahr einer spontanen Re-Ruptur bei Aneurysma-bedingter SAB liegt bei etwa 22 % und ist mit einer Mortalität von 50-75 % assoziiert (Albert et al. 1987, Juvela 1989). Maßnahmen, welche das Risiko senken, sind Blutdruckkontrolle mit systolischen Werten unter 140 mmHg sowie Stressvermeidung durch Schmerz-, Angst- sowie Obstipationskontrolle (Rabinstein et al. 2010). Diese Maßnahmen sind ebenfalls wichtig für die erste Phase des Managements bezüglich der häufigen frühen Folgen nach einer SAB. Diese entstehen infolge eines rasant ansteigenden intrakraniellen Drucks (ICP) innerhalb der ersten 72 Stunden nach der initialen Blutung und werden in ihrer Gesamtheit als *early brain injury* bezeichnet (Rowland et al. 2012). Dabei entwickeln Patienten akut auftretende zerebrale Durchblutungsstörungen, die frühe Ischämien bewirken und/oder einen unmittelbar letalen Ausgang nehmen können. Im gleichen Zeitrahmen entwickeln 20 % der Patienten einen akuten Hydrozephalus durch den gestörten Liquorabfluss nach Blutgerinnselbildung (Suarez-Rivera 1998). Die Anlage einer externen Ventrikel-drainage zur Verringerung des Hirndrucks und Verbesserung des zerebralen Perfusionsdrucks stellt die Therapie der Wahl dar (Kusske et al. 1973). Stellt sich im Verlauf ein chronischer Hydrozephalus ein, empfiehlt die S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie eine dauerhafte ventrikuloperitoneale oder ventrikuloatriale Shuntableitung.

Neben allgemein bekannten Faktoren der Neuroprotektion, wie z.B. Normotonie, Normothermie, Normonatriämie, Normoglykämie, Normovolämie (Konczalla und Seifert 2020), liegt der Fokus der Therapie in der Spätphase auf den späten Komplikationen der Blutung. Häufig folgen auf die *early brain injury* verzögerte zerebrale Ischämien (*delayed cerebral ischemia*, DCI), die in Form von verzögerten ischämischen neurologischen Defiziten (DINDs) symptomatisch werden und bei Progress zu zerebralen Infarkten führen können. Zerebrale Vasospasmen, die sehr häufig in der Spätphase auftreten, sind ein großer Forschungsschwerpunkt der DCI. Weitere Komplikationen entstehen durch die Manifestation neurogener extrazerebraler Organfunktionsstörungen, wonach eine erhöhte Katecholaminausschüttung myokardiale Nekrosen, Herzinsuffizienz oder Lungenödem verursacht (Rabinstein et al. 2010). Die vielseitigen schweren Komplikationen nach SAB erklären die Notwendigkeit der zeitnahen Verlegung in ein neurovaskulär-spezialisiertes Zentrum mit intensiv-medizinischem Monitoring (Bederson et al. 2009).

Fortschritte in der intensivmedizinischen Versorgung führten seit den 1970er Jahren zu einem kontinuierlichen Rückgang der Mortalität (Bonita et al. 1983, Ingall et al. 1989). Dennoch ist die 30-Tage-Mortalität bei der SAB mit 32 % deutlich höher als die des ischämischen Schlaganfalls (Feigin et al. 2009). Prähospital versterben bereits ca. 12 % der Patienten (Huang und van Gelder 2002). 15-40 % bleiben infolge neurologischer Defizite durch die Blutung selbst, aber ebenso wegen ihrer Komplikationen im Bereich der Physis, Psyche und Kognition auf eine dauerhafte Pflege angewiesen (Hop et al. 1997, Dombovy 1998, Dumont et al. 2003, Passier et al. 2010). Weniger als ein Viertel der Patienten verzeichnen eine vollständige neurologische und psychosoziale Genesung (van Gijn et al. 2007).

2.2 Zerebraler Vasospasmus

2.2.1 Allgemeines

Lange Zeit wurde der zerebrale Vasospasmus (CVS) als bedeutendste Komplikation und Hauptverursacher der DCI nach einer SAB angesehen. Definitionsgemäß ist der CVS eine angiografisch detektierbare Gefäßverengung intrakranieller Arterien (Ecker und Riemenschneider 1951). Die Inzidenz rangiert zwischen 30-70 % nach einer SAB. 20-30 % der angiografisch nachgewiesenen Vasospasmus-Fälle gehen mit verzögerten ischämischen neurologischen Defiziten (DINDs) einher (Dorsch und King 1994). Liegen DINDs und ein angiografischer CVS vor, so wird dieser als

symptomatischer Vasospasmus bezeichnet. Er ist mit einer Mortalität und Morbidität von ca. 10-13 % assoziiert (Kassell et al. 1990, Dorsch und King 1994).

Zu den klinischen Symptomen zählen beispielsweise eine veränderte Verbalität, Vigilanzminderung, ein neu aufgetretener Pronationsdrift, Kopfschmerzen sowie weitere fokalneurologische Ausfälle. Da diese Symptome nicht alleinig auf den Vasospasmus zurückzuführen sind, sondern ebenfalls im Rahmen anderer Differentialdiagnosen auftreten können, z.B. bei Hyponatriämie, Hirnödem, Hydrozephalus, Hypoxämie, ist die alleinige klinische Beobachtung des Patienten unzureichend (Findlay et al. 2016).

Der CVS kann fokal oder diffus in unterschiedlichen Schweregraden meist ab 72 Stunden bis zu 2 Wochen nach dem initialen Blutungsereignis auftreten (Weir et al. 1978, Findlay et al. 2016). Diagnostischer Goldstandard ist die digitale Subtraktionsangiografie. Die Multislice-CT-Angiografie kann ebenfalls bildgebend eingesetzt werden. Im Anschluss an eine positive CVS-Diagnostik erfolgt häufig dennoch eine therapeutische digitale Subtraktionsangiografie (Otagawa et al. 2002). Eine nichtinvasive, direkt am Krankenbett praktikierbare Methode der Detektion des CVS ist die transkranielle Dopplersonografie (Purkayastha und Sorond 2012).

Eine kausale Therapie für den CVS existiert bislang nicht. Generelle Maßnahmen des Elektrolyt- sowie Flüssigkeitsmanagements stehen im Vordergrund. Häufig tritt nach einer SAB eine Hyponatriämie auf, welche selbst einen Risikofaktor für den CVS darstellt. Hyponatriämien sowie Hypovolämien gilt es zu vermeiden (Nakagawa et al. 2002, McGirt et al. 2004). Die früher angewandte Triple-H-Therapie, bestehend aus Hypervolämie, Hämodilution, Hypertension gilt als obsolet (Dankbaar et al. 2010). Die einzige medikamentöse Therapie mit statistisch moderat positivem Einfluss auf die neurologische Prognose, aber ohne direkten Einfluss auf den angiografischen CVS, ist die orale Gabe des Kalziumantagonisten Nimodipin in einer Dosierung von 60 mg alle vier Stunden für drei Wochen (Dorhout Mees et al. 2007).

2.2.2 Pathophysiologische Konzepte

Nach einer SAB wird eine Inflammationsreaktion getriggert, welche über vasoaktive sowie proinflammatorische Faktoren, die aus dem eingeströmten Blut freigesetzt werden, vermittelt wird. Zudem scheint eine neurogene Inflammation nach Substanz P und CGRP-Freisetzung mit Schädigung der Blut-Hirn-Schranke eine mindestens neurotoxische Wirkung einzunehmen (Sercombe et al. 2002, Dumont et al. 2003). Inflammationsprozesse scheinen nicht der alleinige Auslöser der pathologischen

Gefäßverengung zu sein, wirken aber vermutlich im komplexen Zusammenspiel aller pathophysiologischen Prozesse begünstigend auf die Vasokonstriktion (Findlay et al. 2016).

Daneben rücken die von der Blutung ausgehenden, im Subarachnoidalraum zirkulierenden, potenziell spasmogenen Substanzen als mögliche Hauptverursacher der zu erforschenden pathologischen Gefäßverengung in den Mittelpunkt (Harrod et al. 2005). Bei Lyse der Erythrozyten wird zunächst Oxyhämoglobin frei, welches wahrscheinlich selbst eine verlängerte arterielle Konstriktion glatter Gefäßmuskeln bewirkt (Macdonald und Weir 1991). Hämoglobin triggert vermutlich über eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die mechanische Kontraktion von Aktin- und Myosinfilamenten (Filamentgleittheorie) in der glatten Muskulatur (Huxley und Hanson 1954, Huxley und Niedergerke 1954, Findlay et al. 2016). Des Weiteren führt die Autooxidation von Oxyhämoglobin zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Misra und Fridovich 1972), welche selbst und über Lipidperoxidation (Kamezaki et al. 2002) die Zerstörung von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen bewirken (Sasaki et al. 1981, Asano und Matsui 1999). Endothelschäden wiederum gehen mit einem Funktionsverlust der gefäßerweiternden NO-Synthase einher (Iuliano et al. 2004). Bei gleichzeitiger Hämoglobin-getriggelter Überproduktion des vasokonstriktorisches Faktors Endothelin (Fuwa et al. 1993) wird womöglich das ursprüngliche vasotonische Gleichgewicht in Richtung Vasokonstriktion verschoben. Oxygeniertes Hämoglobin steht zudem im Verdacht, Schäden an der arteriellen Gefäßwand zu verursachen. Myonekrosen, Invasion myointimaler Zellen in die Tunica intima, Veränderungen der endothelialen Basalmembran sowie die Abscherung der endothelialen Zellen wurden beobachtet (Okada et al. 1980). Denkbar wären einsetzende Umbauprozesse, die mit Verdickung der Gefäßwand einhergehen und durch Verengung des Gefäßlumens die Folgen des CVS im Sinne der verminderten zerebralen Durchblutung aufrechterhalten (Harrod et al. 2005).

Dem gegenüber stehen die im Liquor bei SAB-Patienten gemessenen Hämoglobinkonzentrationen, welche zum Eintritt des CVS bereits erniedrigt sind. In der Literatur sind daher Abbauprodukte des Hämoglobins als potenziell vasoaktive Metabolite beschrieben, deren Abbau mit dem zeitlich verzögerten Auftreten des CVS zusammenfallen (Pyne-Geithman et al. 2005, Clark und Sharp 2006). Die Entstehung der Abbauprodukte des Hämoglobins (HDPs, Hämabbauprodukte) ist in Abbildung 2 dargestellt.

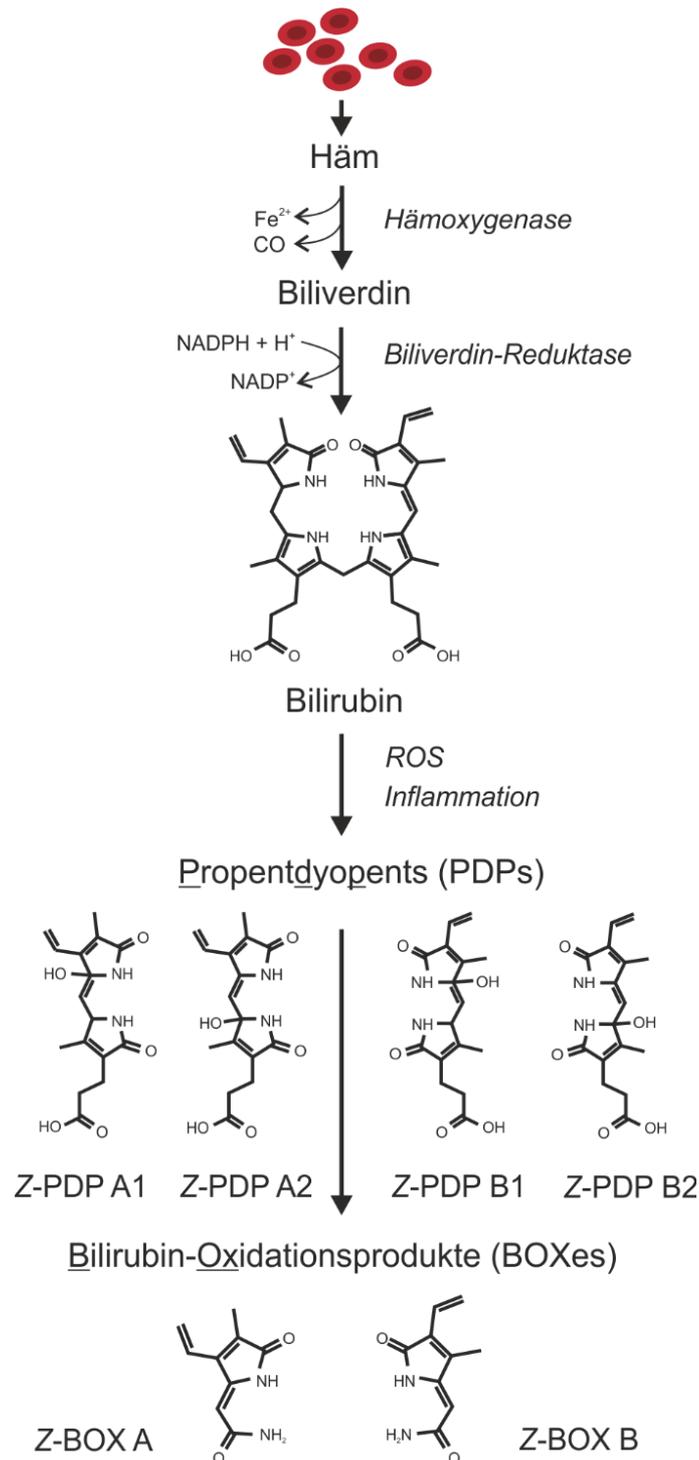


Abb. 2: modifiziert nach Joerk et al. 2019. Schematische Darstellung zur Entstehung der Hämabbauprodukte. Nach Lyse der Erythrozyten wird das freigesetzte Häm enzymatisch sowie nicht-enzymatisch in Propentdyopents (PDPs) und Bilirubin-Oxidationsprodukte (BOXes) abgebaut.

Nach Zerlegung des Hämoglobins in seine vier Globin-Untereinheiten sowie Häm-Moleküle wird Häm durch das Enzym Hämoxygenase zu Biliverdin unter Freisetzung von Eisen und CO katalysiert. Die Biliverdin-Reduktase konvertiert Biliverdin unter

Verbrauch von NADPH und H^+ zu Bilirubin (Whitby et al. 2002, Clark und Sharp 2006). Die intrakranielle Blutung triggert eine inflammatorische Invasion von Makrophagen und Leukozyten, welche selbst eine Quelle für Superoxide und Peroxynitrite sind (Clark et al. 2008). Die erzeugte oxidative Umgebung führt zum nicht-enzymatischen oxidativen Abbau von Bilirubin über die Propentdyopents (PDPs) zu den Bilirubin-Oxidations-Endprodukten (BOXes) (Kranc et al. 2000, Clark et al. 2002, Ritter et al. 2016). HDPs können in zwei Konfigurationen vorliegen. Die *Z*- bzw. *E*- Konfiguration wird anhand der Stellung der Substituenten mit der höchsten Ordnung an einer Doppelbindung definiert. Befinden sich die Substituenten auf entgegengesetzten Seiten, liegt eine *E*-Konfiguration vor. Bei der energetisch bevorzugten *Z*-Konfiguration sind die Substituenten auf der gleichen Seite lokalisiert (Moss 1996).

Sowohl PDP als auch BOXes konnten in Liquorproben von SAB-Patienten mit CVS nachgewiesen werden (Joerk et al. 2019). Inkubationen an Schweinekarotiden mit Liquorproben von SAB-Patienten sowie die alleinige BOX-Gabe konnten einen vasokonstriktorisches Effekt nachweisen (Kranc et al. 2000). Auch konnten die akuten vasoaktiven Effekte der einzelnen Isomere *Z*-PDP A und *Z*-PDP B sowie *Z*-BOX A und *Z*-BOX B an akuten Hirnschnittmodellen der Maus in der Arbeitsgruppe mehrfach demonstriert werden (Joerk 2015, Langguth 2020, Schaefgen 2021).

Es wird angenommen, dass HDPs über spannungs- und Kalzium-abhängige Kalium-Kanäle (BK_{Ca} -Kanäle) wirken. Diese nehmen physiologisch in der Gefäßtonusregulation eine wesentliche Rolle ein. Erreicht ein Aktionspotenzial die Zelle und depolarisiert das Membranpotential, so führt dies zur Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Der einwärtsgerichtete Ca^{2+} -Strom interagiert mit dem BK_{Ca} -Kanal, führt zu dessen Öffnung und damit zum Kaliumausstrom. Es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle und Schließung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle. Durch den Kaliumefflux terminiert der BK_{Ca} -Kanal vasokonstriktive Vorgänge und bildet die Grundlage für vasodilatatorische Vorgänge. Es ist bekannt, dass BK_{Ca} -Kanäle durch NS1619 geöffnet und durch Paxilline sowie Iberiotoxin geschlossen werden. Ihre Öffnungswahrscheinlichkeit wird ebenfalls durch Häm gesenkt (Tang et al. 2003, Salkoff et al. 2006). Hou et al konnten nachweisen, dass BOXes den BK_{Ca} -Kanal im geschlossen konformierten Zustand stabilisieren (Hou et al. 2011). In Untersuchungen der Arbeitsgruppe an BK -Knockout-Mausmodellen konnte die Abhängigkeit der vasokonstriktorisches Effekte der HDPs vom BK_{Ca} -Kanal ebenfalls demonstriert werden (Joerk et al. 2019, Joerk et al. 2014).

In Zusammenschau der Ergebnisse resultiert die pathophysiologische Überlegung bezüglich der Entstehung des CVS, dass Hämabbauprodukte akut BK_{Ca}-Kanäle hemmen und damit zur verstärkten Vasokonstriktion nach SAB führen.

Hämabbauprodukte stehen zudem wie Oxyhämoglobin im Verdacht pathologische Umbauprozesse der Gefäßwand auszulösen. Chen et al. beobachteten 7 Tage nach einer experimentell induzierten SAB in Ratten neben einer Gefäßlumenverengung zusätzlich eine Blut-Hirn-Schrankenstörung und Wandverdickung der Basilararterie (Mayberg et al. 1990, Chen et al. 2011). Bei *in vivo*-Versuchen der Arbeitsgruppe wurde nach intrathekaler Applikation von Eigenblut oder HDPs ein zerebrales Durchblutungsdefizit an Tag 3 und 7 nach der Intervention festgestellt (Joerk et al. 2019). Es stellt sich die Frage, ob die Gefäßwand entsprechende Veränderungen aufweist, die dieses Durchblutungsdefizit im zeitlichen Verlauf erklären.

2.2.3 Verzögerte zerebrale Ischämien

Früher wurde der CVS oft als einzige Ursache für die klinischen und radiologischen Veränderungen nach einer SAB gesehen. Der aktuelle Forschungsstand deutet jedoch auf weitere pathologische Mechanismen nach einer SAB hin, die verzögerte zerebrale Ischämien (DCI) mit klinisch sichtbaren neurologischen Defiziten (DINDs) hervorrufen (Hansen-Schwartz et al. 2007). Ursächlich dafür ist die in Kapitel 2.2.1 erwähnte Diskrepanz zwischen dem Auftreten von angiografischen und symptomatischen Vasospasmen. Eine Therapie der pathologischen Gefäßverengung führte in Studien nicht zwangsläufig zur Besserung der klinischen Symptomatik. Außerdem blieb Nimodipin, welches die DINDs verbessert, ohne signifikanten Einfluss auf den angiografischen Vasospasmus im Sinne einer Vasodilatation. (Dorsch und King 1994, Vergouwen et al. 2011, Rowland et al. 2012). Jedoch konnte ein signifikanter gefäßweiternder Effekt von Nimodipin auf intraparenchymale Arteriolen verzeichnet werden (Wellman und Koide 2013). In jüngster Zeit stehen daher mikrozirkulatorische Dysfunktionen (Mikrovasospasmen) auf Ebene der parenchymalen Arteriolen und Kapillaren unter Verdacht, zur Entstehung der DCI beizutragen. Diese kleinen Gefäße, die 40-50 % des totalen zerebrovaskulären Widerstands ausmachen (Iadecola 2004), spielen insbesondere eine entscheidende Rolle in der Regulation der zerebralen Durchblutung, in der neurovaskulären Kopplung sowie bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke. Neben dem zerebralen Vasospasmus und Mikrospasmus werden *early brain injury*, *cortical spreading depolarizations*, Mikrothrombosen als auch

Inflammation als Faktoren in der multifaktoriellen Genese der DCI gesehen (Sehba et al. 2012, Macdonald 2014, Geraghty und Testai 2017).

In dieser Arbeit stehen allein die pathologischen Gefäßfunktionen im Vordergrund, denn das Verständnis der Pathophysiologie des zerebralen Mikrosasmus sowie angiografischen Vasospasmus würde bereits einen großen Beitrag zur Entwicklung einer potenziellen Therapie der DCI nach SAB leisten und einem wesentlichen Anteil der erkrankten Patienten helfen.

2.3 Zerebraler Mikrovasospasmus

2.3.1 Neurovaskuläre Einheit

Das Konzept der neurovaskulären Einheit (NVU) beschreibt die enge Verknüpfung von Zellen des Gehirns mit zerebralen Gefäßen (Iadecola 2017). Obwohl 20 % des gesamten Energieverbrauchs auf das Gehirn zurückzuführen sind, existiert keine Möglichkeit der lokalen Energiespeicherung (Kety 1957, Sokoloff et al. 1977, Rolfe und Brown 1997). Daher ist eine wichtige Funktion der NVU die neurovaskuläre Kopplung, auch funktionelle Hyperämie genannt (Iadecola 2004). Diese gewährleistet, über die Erhöhung der zerebralen Durchblutung (CBF), die adäquate Versorgung von Neuronen während ihrer Aktivität (Muio et al. 2014). Zudem ist die NVU zum Schutz des Hirns vor systemischen Blutdruckschwankungen an der zerebralen Autoregulation, dem sog. Bayliss-Effekt beteiligt. Im Bereich von 50-150 mmHg gewährleistet sie eine kontinuierliche zerebrale Durchblutung und somit die stetige Versorgung der Zellen. Eine E

rhöhung des Blutdrucks führt zu einer zerebralen Vasokonstriktion und ein Blutdruckabfall zu einer Vasodilatation (Bayliss 1902, Iadecola 2004, Koller und Toth 2012). Weiterhin scheinen die Bestandteile der NVU bei der Hirnentwicklung, Angiogenese, Ausbildung und Integrität der Blut-Hirn-Schranke sowie Säuberung und Immunüberwachung des perivaskulären Raums eine wichtige Rolle einzunehmen (Iadecola 2017).

Die Zusammensetzung der NVU variiert entlang des zerebrovaskulären Stammes. Neuronen, Astrozyten, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen von Arteriolen und Kapillaren (Abb. 3) bilden die Hauptkomponenten (Harder et al. 2002, McConnell et al. 2017).

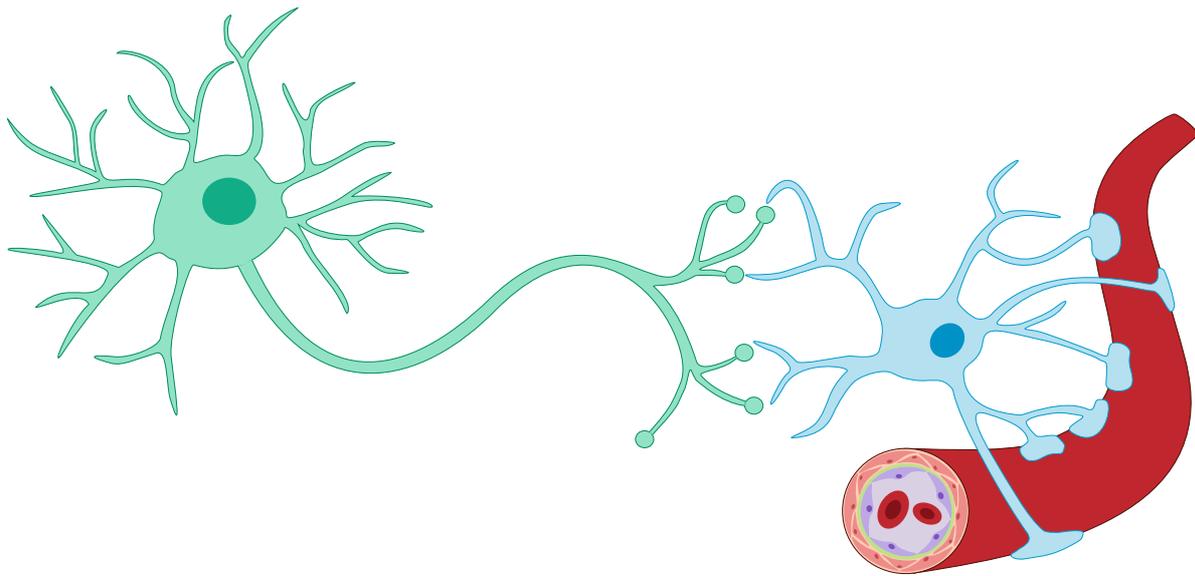


Abb. 3: erstellt mithilfe BioRender.com (2023), im Anschluss modifiziert. Schematische Darstellung einer neurovaskulären Einheit bestehend aus v.l.n.r. Neuron, Astrozyt mit Endfüßchen, Arteriole mit Erythrozyten. Gefäßanschnitt mit den charakteristischen Gefäßwandschichten (von innen nach außen: Endothel, Basallamina, glatte Gefäßmuskulatur, Adventitia).

2.3.2 Neurovaskuläre Kopplung

Die Mechanismen, wie die einzelnen Bestandteile der NVU zur Gefäßreaktion nach neuronaler Erregung beitragen, werden nachfolgend näher betrachtet.

Neuronale Signale vermitteln über den Neurotransmitter Glutamat in den synaptisch gekoppelten Neuronen und Astrozyten einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg (Straub und Nelson 2007). Bei Neuronen bewirkt das die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Enzyme, wie z.B. der neuronalen NO-Synthase (nNOS) sowie COX-2 mit Bildung von vasodilatatorischen Substanzen (NO, PGE-2). In Astrozyten führen Signalkaskaden über eine PLA₂-Aktivierung zur Bildung von Arachidonsäure. Die Freisetzung der Arachidonsäure erfolgt an den astrozytären Endfüßchen mit Kontakt zu glatten Gefäßmuskelzellen. Anschließend erfolgt die Zerlegung in vasoaktive Produkte, wie z.B. 20-HETE, Prostaglandine, Epoxyeicosatriensäuren (EETs) (Harder et al. 2002, Zonta et al. 2003). Ob eine Gefäßkonstriktion oder -dilatation stattfindet, ist abhängig vom Oxygenierungsgrad, Gefäßruhetonus sowie der extrazellulären K^{+} -Konzentration (Filosa et al. 2006, Attwell et al. 2010). Die Gefäße reagieren einerseits direkt auf die freigesetzten vasoaktiven Substanzen aus Neuronen und Astrozyten, andererseits ist es ihnen möglich, vasoaktive Signale an Kapillaren über Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen auf vorgeschaltete Arteriolen rückkoppelnd auszubreiten (Dietrich

et al. 1996, Iadecola 2004). Des Weiteren bindet das nach neuronaler Aktivität freigesetzte intrazelluläre Kalzium an BK_{Ca}-Kanäle in den glatten Gefäßmuskelzellen, bewirkt somit einen K⁺-Ausstrom und folgend die Terminierung der vasokonstriktorisches Vorgänge (Filosa et al. 2006). Indem der BK_{Ca}-Kanal ubiquitär in allen Elementen der neurovaskulären Einheit exprimiert wird, ist er möglicherweise ein unverzichtbares Stellglied in der Gefäßdurchmesserregulation und Durchblutung des Gehirns.

Nach einer SAB verändert sich die Interaktion zwischen den Zellen der NVU. Reaktive Sauerstoffspezies sind befähigt, über Lipidperoxidation einzelne Elemente der NVU zu schädigen. Andererseits löst die SAB mit einem akuten ICP-Anstieg eine plötzliche Reduktion der zerebralen Durchblutung aus. Hirnfunktionen leiden innerhalb weniger Sekunden, Neuronenschäden entstehen innerhalb von Minuten (Chen et al. 2014). Koide et. al zeigten in ihren tierexperimentellen Versuchen eine Inversion der neurovaskulären Kopplung nach SAB. Nach Neuronenaktivität, die physiologisch eine funktionelle Hyperämie über Gefäßaufweitungen auslöst, folgte eine Gefäßverengung. Der BK_{Ca}-Kanal steht, wie bereits erwähnt, im Verdacht eine solche Vasokonstriktion zu vermitteln. Eine inverse neurovaskuläre Kopplung nach SAB würde über einen verminderten CBF mögliche Hypoperfusionen der betroffenen Areale erklären und ebenfalls neurologische Defizite bedeuten. Das im Subarachnoidalraum freigesetzte Blut und seine Abbauprodukte umspülen nicht nur die großen basalen zerebralen Gefäße, sondern sind ebenfalls befähigt, in das zerebrale Parenchym zu diffundieren (Koide et al. 2012). Es stellt sich die Frage, ob Hämabbauprodukte die mikrovaskuläre Funktion im Sinne einer gestörten neurovaskulären Kopplung und damit die Durchblutung des Gehirns beeinflussen. An diesem Punkt knüpft die vorliegende Arbeit an.

3 Ziele der Arbeit

Verzögerte zerebrale Defizite sind häufige Komplikationen der aneurysmatischen SAB und führen bei den Betroffenen zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität. Die Pathogenese ist am ehesten multifaktoriell bedingt und nur unzureichend verstanden, sodass effektive therapeutische Optionen bislang fehlen. In dieser Arbeit stehen besonders pathologische Gefäßreaktionen wie der zerebrale Makro- und Mikrovasospasmus sowie Abbauprodukte des Hämoglobins nach SAB im Fokus. PDPs und BOXes als Vertreter dieser Hämabbauprodukte stehen im Verdacht die Konstriktion zerebraler Arterien und Arteriolen über die Hemmung von BK_{Ca}-Kanälen zu vermitteln.

Im ersten Teilprojekt „Neurovaskuläre Kopplung“ wurde am akuten Hirnschnittmodell der Maus der kurzfristige Einfluss von Z-PDP A sowie die Inhibition des BK_{Ca}-Kanals auf die neurovaskuläre Kopplung über die Gefäßdurchmesseränderung intrakortikaler Arteriolen nach erhöhter neuronaler Aktivität mittels Durchlichtmikroskopie untersucht. Im zweiten Teilprojekt „HDPs und Gefäßmorphologie“ wurde der längerfristige Einfluss von Z-PDP A+B und Z-BOX A+B auf den Anteil der Aktinfaserschicht in der Gefäßwand von zerebralen Arterien am fixierten Maushirnschnitt mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen analysiert.

Insgesamt sollte folgenden Fragestellungen auf den Grund gegangen werden:

- Beeinflusst Z-PDP A kurzfristig die Dynamik der neuronal-induzierten Gefäßreaktion intrakortikaler Arteriolen?
- Verändert die ubiquitäre genetische (BK-Knockout-Maus) oder pharmakologische (Iberiotoxin) Hemmung der BK-Kanal-Aktivität die Dynamik der neuronal-induzierten Gefäßreaktion intrakortikaler Arteriolen?
- Gibt es eine Altersabhängigkeit in der neuronal-induzierten Gefäßantwort intrakortikaler Arteriolen?
- Inwiefern wirkt die intrathekale Applikation von Eigenblut, Z-PDP A+B und Z-BOX A+B in einem zeitlichen Fenster von 0-28 Tagen auf die Gefäßwände zerebraler Arterien ein?

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Pathophysiologie des zerebralen Makro- und Mikrovasospasmus nach SAB leisten und mögliche Wege für Forschungsansätze in Bezug auf die Übertragbarkeit auf das humane Modell und damit verbundene potenzielle Therapien aufzeigen.

4 Methodik

4.1 Versuchstiere

Die Tiere wurden von der Zentralen Experimentellen Tierhaltung des Forschungszentrums des Universitätsklinikums Jena (Am Klinikum 1, 07747 Jena) bereitgestellt. Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum und wurden von den Tierpflegenden täglich in Augenschein genommen. Die Narkotisierung und Tötung der Tiere erfolgte durch ausgebildete Mitarbeitende mit Abschluss in den Fächern Humanmedizin, Tiermedizin oder Biologie, Laborangestellte mit Hochschulstudium sowie gültigem Sachkundenachweis (Versuchstierkundlicher Kurs, EU-Tätigkeitsgebiet A, früher: FELASA B). Die Tötung wurde mit dem Ziel der Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt (§1 und §4, Absatz 3, Tierschutzgesetz). Für alle Versuche dieser Arbeit wurden Mäuse des Slo1-Stammes ausgewählt. Die Züchtung dieser Mäuse erfolgte auf Grundlage eines beim Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV) genehmigten Zuchtrahmenantrags mit der Registriernummer ZRA UKJ-17-013. Jede gezüchtete Maus wurde durch eine Tier-ID gekennzeichnet und in einer elektronischen Datenbank (PyRAT) erfasst.

Im ersten Teilprojekt „Neurovaskuläre Kopplung“ wurden zwei verschiedene Alterskohorten untersucht. Das Alter der juvenilen Mäuse betrug 20 bis 30 Lebenstage. Bei adulten Mäusen wurde das Mindestalter von 365 Lebenstagen festgelegt. Für das zweite Teilprojekt „HDPs und Gefäßmorphologie“ wurden Mäuse zwischen 90 und 200 Lebenstagen gewählt. Sowohl männliche als auch weibliche Mäuse wurden in alle Versuche eingeschlossen. Hinsichtlich des Genotyps wurden Wildtyp-Mäuse (WT, Slo1^{+/+}) als auch Knockout-Mäuse (KO, Slo1^{-/-}) ausgewählt. Die homozygoten KO-Mäuse wurden als mittelgradig belastet, WT-Mäuse als unbelastet eingestuft. Heterozygote Mäuse wurden im Sinne der Zucht von KO-Mäusen verwendet. Vor dem Einschluss in die experimentellen Gruppen erfolgte eine Genotypisierung aus der Schwanzbiopsie, welche in der zweiten Woche postnatal entnommen wurde. Im Verlauf der Arbeit wurde die für die Tiere schonendere Ohrbiopsie angewendet. Zusätzlich konnten die Slo1^{-/-}-Mäuse anhand ihres auffälligen Phänotyps, z.B. der Ataxie, identifiziert werden. Nach dem Experiment wurde eine weitere Biopsie der Schwanzspitze entnommen und mit dem initial bestimmten Genotyp verglichen. Bei Unterschieden zwischen den Ergebnissen konnte der Versuch nicht gewertet werden (n=3).

Für die Genotypisierung musste die DNA zunächst aus der Biopsie isoliert werden. Hierzu wurde das Biopsat mit 180 µl ATL (Gewebe-Lyse-Puffer) und 20 µl Proteinase K in einer Zentrifuge bei 56 °C, 550 rpm ein bis drei Stunden inkubiert. Zur Einleitung des Lysestopps nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 200 µl AL (Lyse-Puffer) und 200 µl absolutem Ethanol. Nachdem sich der feste weiße Anteil am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzt hatte, wurde das flüssige Lysat auf eine Trennsäule des DNA-Isolation Kits pipettiert. Diese wurde für eine Minute bei 8000 xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 500 µl AW 1 (Spül-Puffer) auf die Trennsäule pipettiert und bei 8000 xg für eine Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses erfolgte die erneute Zugabe von 500 µl AW 2 (Spül-Puffer) und Zentrifugierung bei 16100 xg für drei Minuten. Danach wurde die Trennsäule auf ein sauberes Reaktionsgefäß umgesteckt und 35 µl AE (Elutions-Puffer) auf die Säule pipettiert. Nach einer 1-minütigen Einwirkzeit wurde für eine weitere Minute bei 8000 xg zentrifugiert. Das DNA-Eluat wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung der DNA wurden jeweils 3 µl der eluierten DNA mit 7 µl des PCR-Mix-Ansatzes versetzt. Zur Bestimmung der Genotypen WT oder KO wurden jeweils zwei verschiedene Primer verwendet (Tab. 1). Da diese vier Primer jedoch untereinander interferierten, war die Vorbereitung von zwei Ansätzen (Tab. 2) mit jeweils 3 µl des DNA-Eluats notwendig. Alle Proben wurden im Anschluss in den Thermozykler für die PCR gestellt und nach dem in Tabelle 3 gezeigten Programm amplifiziert.

Tab. 1: DNA-Primersequenzen zur Bestimmung des Slo1-Genotyps

Ansatz	Primer (biomers.net)	Sequenz 5' – 3'	Länge (bp)
1 (KO)	Neo 5'	atagcctgaagaacgagatcagc	23
	RA 14025 3'	cctcaagaaggggactctaac	22
2 (WT)	Exon1 5'	ttcatcatcttgctctggcggacg	24
	WT 3'	ccatagtcaccaatagccc	19

Tab. 2: Ansätze für PCR-Mix zur Bestimmung des Slo1-Genotyps, Angaben der Mengenverhältnisse in μ l

	Ansatz 1 (KO)	Ansatz 2 (WT)
Gibco Wasser	2,7	2,7
5x Q-Buffer	2	2
10x Puffer	1	1
2,5mM sNTP's	0,2	0,2
Primer Neo 5' (KO)	0,5	-
Primer RA 14025 3'	0,5	-
Primer Exon1 5' (WT)	-	0,5
Primer WT 3' (WT)	-	0,5
Taq-Polymerase	0,1	0,1

Tab. 3: Thermozyklerprogramm zur Amplifikation der DNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
				go to			go to		
				2:			5:		
				15x			30x		
Temperatur (°C)	94	94	55	68	94	50	68	72	16
Dauer (min)	2	0,5	0,5	2	0,5	0,5	2	5	-

Die getrennten Ansätze mit der amplifizierten DNA wurden nach der PCR jeweils wieder in eine Probe zusammengebracht und mithilfe der automatisierten Gelelektrophorese des QIAxcel Advanced Systems in der DNA-Screening Kit Kartusche aufgeschlüsselt. Die WT-Bande lag bei 332 bp, die KO-Bande bei 1000 bp. Bei den heterozygoten Proben waren beide Banden sichtbar. Die Ergebnisse wurden mit vier Kontrollproben (Wasser, WT, KO, heterozygot) verglichen und bei unklarem Bild wiederholt (Abb. 4).

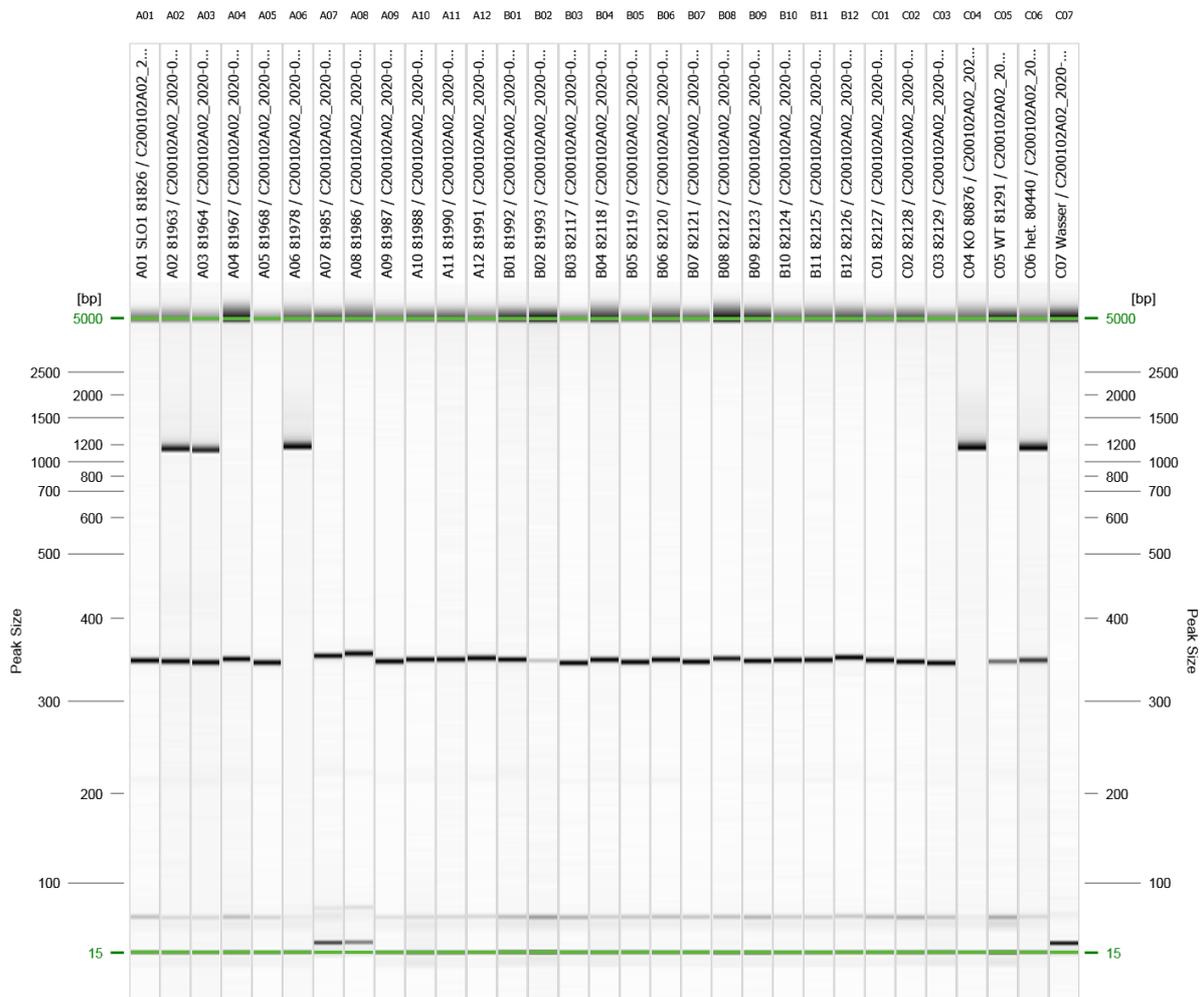


Abb. 4: Beispielbild einer Gelelektrophorese von 27 Proben (A01-C03) zur Identifizierung der *Slo1*-Genotypen mit den vier Kontrollen KO (C04), WT (C05), heterozygot (C06) und Wasser (C07). WT-Bande: 332 bp; KO-Bande: 1000 bp.

4.2 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

4.2.1 Versuchsgruppen

Dieses erste Teilprojekt befasste sich vorrangig mit dem Einfluss von Z-PDP A auf die neuronal-induzierte Gefäßantwort. Die negative Kontrollgruppe wurde alleinig mit artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) umspült. Für die positive Kontrollgruppe wurde zusätzlich zu aCSF die pharmakologische Substanz Iberitoxin (IbTx, selektiver BK_{Ca}-Kanal-Inhibitor) gegeben. Als eine zusätzliche Positivkontrolle wurde neben der pharmakologischen Modulation des BK_{Ca}-Kanals die konventionelle BK-KO-Maus gewählt. Den BK-KO-Tieren fehlte ein essenzielles Gensegment, sodass der BK_{Ca}-Kanal ubiquitär funktionslos blieb. Neben dem Einfluss der Interventionen (aCSF / Z-PDP A / IbTx / KO) sollte der Einfluss des Alters auf die neurovaskuläre Kopplung untersucht werden (Tab. 4).

Tab. 4: Versuchsgruppen des Teilprojekts 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

Alterskohorte	Juvenil (p 30-40)				Adult (p > 365)			
	aCSF	PDP	IbTx	KO	aCSF	PDP	IbTx	KO
Intervention								
Stichprobe	7	7	7	7	5	6	6	7
Gesamt	28				24			

aCSF = arterielle Zerebrospinalflüssigkeit, PDP = Z-PDP A, IbTx = Iberitoxin, KO = BK_{Ca}-Knockout

4.2.2 Materialien

4.2.2.1 Geräte und Chemikalien

Im Folgenden sind alle Geräte und Chemikalien in Tabelle 5 und 6 aufgelistet.

Tab. 5: Geräte des Teilprojekts 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

Gerät	Artikel/Seriennummer	Herstellerefirma
Analog-Digital-Wandler	C2400-60	Hamamatsu Photonics
Analysewaage	MC1 AC210P	Sartorius
Auflicht-Stereomikroskop	Kaps SOM 82	Karl Kaps
CCD-Kamera	Rolera- XR Fast 1394, Q-Imaging, C7500-11	Hamamatsu Photonics
DNA Isolation Kit	DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen GmbH

DNA-Screening Kit	QIAxcel DNA Screening Kit (2400)	Qiagen GmbH
Durchlichtmikroskop	Eclipse FN 1	Nikon Instruments
Isolierter Pulsstimulator	Unit MRE / MLE (3 axes Mini 25) Model 2100	Luigs & Neumann
Peristaltikpumpe	PLP380 behrotest Laborschlauchpumpe	behr Labor Technik GmbH
pH-Meter	pH-Meter 765 Calimatic	Welabo GmbH
Rasierklinge	Superior Stainless Steel Double Edge	Astra
Sekundenkleber	UHU	UHU GmbH & Co. KG
Skalpell	Präzisa Fig. 20	Dahlhausen Medizin- technik GmbH
Stimulationselektrode	SNE-100	Science Products
System Gelelektrophorese	QIAxcel Advanced System	Qiagen GmbH
Temperaturregler	Badcontroller V	Luigs & Neumann
Thermocycler	Biometra TRIO 48	Biometra GmbH
Vibratom	Leica VT1200 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Wasserimmersionsobjektiv	Nikon LWD 16x/0.80W DIC N2	Nikon Instruments

Tab. 6: Chemikalien des Teilprojekts 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

Chemikalien	Artikelnummer	Herstellerfirma
C₆H₁₂O₆	6780.1	Carl Roth
CaCl₂	1.023.820.250	Merck KGaA
HCl	4.80934.1000	Merck KGaA
Iberiotoxin	401002	Sigma-Aldrich
Isofluran CP®	31303	cp-pharma
KCl	1.049.360.500	Merck KGaA
MgCl₂	2189.1	Carl Roth
NaCl	3957.1	Carl Roth
NaH₂PO₄	1.063.461.000	Merck KGaA
NaHCO₃	1.063.291.000	Merck KGaA
NaOH	38214	Riedel-de Haën
Norepinephrin bitartrate salt	A9512-1G	Sigma-Aldrich

4.2.2.2 Vasoaktive Substanzen

In den Experimenten wurden die beiden vasoaktiven Substanzen Z-PDP A und Iberiotoxin untersucht. Noradrenalin (Norepinephrin, NA), ein potentes Katecholamin, kam zusätzlich nach dem abgeschlossenen Experiment zur Kontrolle der Vitalität des Hirnschnitts zum Einsatz.

Zur Herstellung der NA-Lösung wurde 2 mg pulverförmiges NA in 2 ml NaCl 0,9 % gelöst. Anschließend lagerte die Lösung bei 4-6 °C im Kühlschrank. Am Tag des Experiments wurden 10 µl der Lösung zur Positivkontrolle nach Ende der Messreihe in die Perfusionskammer des Mikroskops pipettiert.

Iberiotoxin wurde als gefrorenes Pellet bei -20 °C geliefert. Die aliquotierte Stamm-lösung (jeweils 100 µl, gelagert bei -20 °C) erreichte nach dem Auftauen in 40 ml aCSF-Perfusionslösung eine Zielkonzentration von 50 nM.

Das beim Abbau von Bilirubin als Zwischenstufe entstehende Z-PDP A wurde von Hannes Richter (Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena) bereitgestellt. Die Synthese von Z-PDP A erfolgte nach dem Protokoll von Ritter et al. aus 5 g Bilirubin (8,6 mMol) vermischt in 2,5 Liter 5 M NaOH. 24 Stunden später wurde der pH-Wert der Suspension auf 7,5 mit 2 M HCl eingestellt. Über weitere 4 Stunden wurde 50 %ige H₂O₂ Lösung hinzugefügt, bis eine finale Konzentration von 1 % erreicht wurde. Das Gemisch wurde weitere 20 Stunden gerührt und anschließend erfolgte die Zugabe von Chloroform zur Isolation der entstandenen BOXes. Zur Aufreinigung der PDPs wurde die überstehende wässrige Phase einer Festphasenextraktion (6 g-Oasis-*hydrophilic-lipophilic-balanced* Kartuschen, Waters, Manchester, United Kingdom) unterzogen. Nach dem Auftragen folgte die Waschung mit H₂O. Die Addition von Acetonitril-Wasser-Mischung (1:4) ermöglichte die Eluierung der PDP-Intermediate Z-PDP A₁/A₂/B₁/B₂. In einer Vakuumzentrifuge wurden die Einzelisomere getrocknet und eine präparative Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC, LC-8A, Shimadzu, Kyoto, Japan) mit UV/Vis-Detektion bei 280 nm durchgeführt. Zur Vermeidung von Umwandlungen der Einzelisomere in ihre Konstitutionsisomere wurde flüssiger Stickstoff unmittelbar nach der HPLC-Fraktionierung zum Einfrieren der Einzelisomere verwendet. Die Einzelisomere wurden ein weiteres Mal getrocknet und waren anschließend im Festzustand stabil (Ritter et al. 2016). Für die Experimente erfolgte die Einwaage der PDPs oder BOXes in 4 ml Vials nach gewünschter Konzentration an einer Feinwaage. Anschließend wurden die PDPs in H₂O oder 1:1 H₂O/MeOH und die BOXes in Acetonitril für den Direktverbrauch gelöst. Das

Aliquotieren erfolgte je nach Endkonzentration in lichtgeschützte 15 ml *Falcon Tubes* und das Lösungsmittel in der Vakuumzentrifuge entfernt. Die Probenaufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4-6 °C. Im Experiment wurde zum lichtgeschützten *Falcon Tube* 30 ml der aCSF-Perfusionslösung pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 0,5 µM Z-PDP A erreicht wurde.

4.2.2.3 Durchlicht-Mikroskopie

Zum Mikroskopieren der Hirnschnitte wurde das Wasserimmersionsobjektiv des Durchlichtmikroskops verwendet. Die Begutachtung am Computerbildschirm wurde mittels einer digitalen CCD-Kamera und der Videoaufnahmesoftware Streampix 5 (NorPix Inc., Montréal, Kanada) ermöglicht. Die Auflösung der Bilder betrug 696x520 Pixel.

Die Hirnschnitte lagen in einer lichtdurchlässigen Glaskammer unter dem Mikroskop mit Anschluss an eine Peristaltikpumpe. Diese versorgte mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 4-5 ml/min das Präparat kontinuierlich mit 37 °C warmer aCSF-Perfusionslösung.

4.2.2.4 Stimulationselektrode

Bei der Stimulationselektrode handelte es sich um eine konzentrische, bipolare Platin-Iridium-Mikroelektrode mit einer Polyimid-Isolierung sowie Edelstahl-Ummantelung (Spitzendurchmesser: 100 µm). Die Nähe der Stimulationselektrode zum Wasserimmersionsobjektiv verlangte eine entsprechende Biegung der Elektrode, sodass diese unter dem Objektiv genügend Spielraum für eine Fokussierung des Hirnschnitts ließ. Dazu wurde unmittelbar hinter der Elektrodenspitze am Polyimid-umhüllten Schaft die Elektrode vorsichtig um 90 ° gebogen. Um die Elektrode in den Halteapparat einzuspannen, wurde eine weitere Biegung von 140 ° ca. 2 cm weiter distal von der Elektrodenspitze benötigt.

Die benötigten Impulse wurden über einen isolierten Pulsstimulator erzeugt und nach gewünschter Intensität (Spannungsstärke) moduliert. Folgende Einstellungen wurden am Pulsstimulator vorgenommen:

Stimulationslänge 2 s, Pulsdauer $2 \cdot 10^{-4}$ s, Zwischenpulsperiode $2 \cdot 10^{-2}$ s.

4.2.3 Versuchsablauf

Der Versuchstag gliederte sich im Wesentlichen in folgende Schritte:

1. Herstellung der Lösungen
2. Präparation koronarer Hirnschnitte
3. Mikroskopieren: Gefäßwahl, Elektrodenplatzierung
4. Messung: Einwaschung vasoaktiver Substanz, elektrische Stimulation

4.2.3.1 Herstellung der Lösungen

Zu Beginn jeder neuen Versuchsreihe wurde ein Grundstock der aCSF-Lösung von 1000 ml angesetzt. Dazu wurden die in Tabelle 7 gelisteten Substanzen mittels Feinwaage gewogen, in einen 1000 ml-Glaskolben umgefüllt und in ddH₂O gelöst. Weitere Stammlösungen von CaCl₂, MgCl₂ und Glukose wurden nach gleichem Prinzip in einer Menge von jeweils 100ml hergestellt (Tab. 8). Alle Lösungen lagerten im Kühlschrank bei 4-6 °C.

Tab. 7: Zusammensetzung eines 1 Liter aCSF-Grundstocks

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]	Masse [g]
NaCl	58,44	1250	73,05
NaHCO ₃	84,01	250	21,00
NaH ₂ PO ₄	137,99	12,5	1,725
KCl	74,55	40	2,982

Tab. 8: Weitere Stammlösungen jeweils 100 ml

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]	Masse [g]
CaCl ₂	147,02	1000	14,70
MgCl ₂	203,30	1000	20,33
Glucose	198,17	2000	39,63

Tab. 9: Zusammensetzung Präparations- und Perfusionslösung; alle Mengenangaben in ml

Substanz	Präparationslösung 500 ml	Perfusionslösung 1000 ml
aCSF-Stammlösung	50	100
CaCl ₂	0,25	2
MgCl ₂	3	1
Glucose	2,5	5

Diese Stammlösungen dienten am Tag des Experiments zur Herstellung der kalten Präparations- sowie gewärmten Perfusionslösung. Tabelle 9 gibt die Zusammensetzung der beiden Lösungen an, wobei von der Perfusionslösung 400 ml für die dritte Raumtemperatur-Lösung entnommen wurden.

Für optimale Versuchsbedingungen wurde die Präparationslösung täglich auf mindestens unter 4 °C in einem eisgefüllten Styroporbehälter gekühlt und die Perfusionslösung auf mindestens 35 °C im Wasserbad erwärmt. Alle drei Lösungen wurden in dieser Zeit eine halbe Stunde kontinuierlich mit dem Gasgemisch Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) oxygeniert, bevor ein pH-Wert von 7,4 durch Zugabe von HCl oder NaOH eingestellt wurde. Im Anschluss erfolgte die weitere Oxygenierung aller Lösungen.

4.2.3.2 Präparation Hirnschnitte

Nachdem alle Lösungen, der Präparationstisch und das Vibratom (Vorschubgeschwindigkeit: 0,14 mm/s; Amplitude: 1 mm; Schnittdicke: 350 µm) vorbereitet sowie die Identität der Maus geprüft waren, erfolgte die Präparation der Hirnschnitte.

Als schnellste und für die Entnahme des Gehirns behutsamste Tötungsmethode wurde die Dekapitation mit einer scharfen Schere nach vorheriger Inhalation einer Isofluranüberdosis (5 Vol.%) gewählt. Setzte die Schnappatmung ein, wurde die Maus aus der Narkoseglocke genommen, auf den fehlenden Zehenzwischenreflex überprüft und dekapitiert. Nach Entfernung des Skalps über dem Schädelknochen mittels einer kleinen Schere wurde der Schädel in die mit kalter Präparationslösung befüllte Petrischale gelegt und mit einer Pinzette in den Orbitahöhlen fixiert. Diese unmittelbare Hypothermie sollte die Zellen vor einsetzenden ischämischen Prozessen schützen.

Unter dem Stereomikroskop bei 0,6-facher Vergrößerung wurde zuerst mit einer Mikrofederschere zentral über dem Cerebellum okzipital der Sutura lambdoidea der Schädelknochen vorsichtig perforiert. Anschließend wurde dem Verlauf der Sutura sagittalis folgend bis zum Bregma sowie an beiden Enden des Schnitts senkrecht die leicht verknöcherte Kalotte eingeschnitten und die knöchernen Platten nach lateral abgeklappt. Das freigelegte Gehirn wurde mit einem koronaren Schnitt des Skalpell kaudal vom Cerebellum sowie dem Hirnstamm und rostral vom vorderen Teil des Lobus frontalis abgetrennt. Mithilfe eines gebogenen Spatels wurde das Hirn aus der Petrischale auf einen mit Kleber vorbereiteten Probenhalter des Vibratoms transferiert,

sodass die rostrale Schnittseite darauf fixiert wurde. Die maximale Dauer der Hirnentnahme lag bei fünf Minuten.

Nach der Überführung des Probentellers in die Pufferwanne des Vibratoms, wurde diese mit der gekühlten, begasten aCSF-Präparationslösung befüllt, die Schnittgrenzen ausgewählt und acht koronare Hirnschnitte von okzipital beginnend gewonnen. Die Hirnschnitte wurden hiernach mindestens eine halbe Stunde in der Raumtemperatur-Lösung konstant mit Carbogen begast, bevor sie unter dem Mikroskop begutachtet wurden.

4.2.3.3 Mikroskopieren

Es erfolgte zunächst die Auswahl einer geeigneten senkrecht von der Hirnoberfläche in den Kortex ziehenden Arteriole für die Messung. Entscheidend hierbei war die gute Darstellbarkeit klarer Gefäßgrenzen in der später für die Messung relevanten Kortexschicht II/III sowie die mikroskopische Beurteilung einer muskulären Gefäßwand. Das Vorkommen dieser Tunica media unterscheidet arterielle von venösen Blutgefäßen. Ein zusätzliches Auswahlkriterium war der Gefäßinnendurchmesser, der mindestens 15 μm betrug. Im Anschluss erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle die Platzierung der Stimulationselektrode in Kortexschicht VI mit einem Abstand von etwa 30 μm zur ausgewählten Arteriole (Abb. 5).

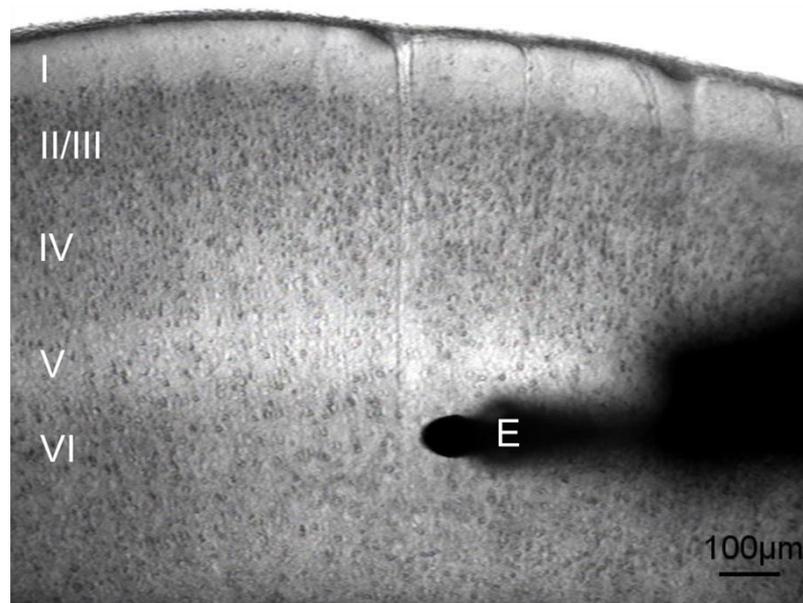


Abb. 5: Beispielhafte Elektrodenplatzierung in Kortexschicht VI in räumlicher Nähe zu einer senkrecht durch den Kortex ziehenden Arteriole. Die Fokusebene des Mikroskops liegt auf der Ebene des Hirnschnitts sowie der Elektrodenspitze.

4.2.3.4 Messung

Wurde ein geeignetes Blutgefäß bestimmt und die Elektrode erfolgreich platziert, begann die Messung. Der Ablauf ist in Abbildung 6 dargestellt.

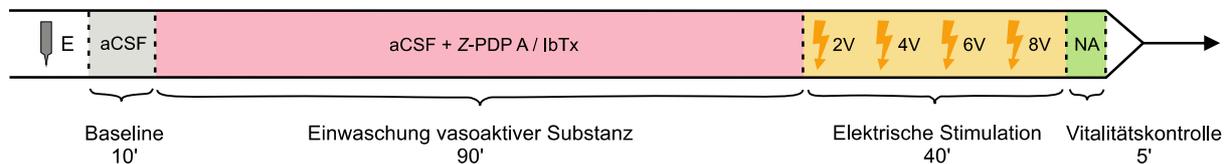


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns von Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“. Nach Elektrodenplatzierung (E) folgte je nach Versuchsgruppe eine Einwaschung von Z-PDPA oder Iberiotoxin in aCSF. Nach 100 min wurde der Hirnschnitt mit aufsteigenden Stimulationsstärken (2,4,6,8 V) stimuliert. Zum Experimentende erfolgte eine Kontrolle der Gefäßvitalität mit Noradrenalin (NA).

Nach erfolgreicher Einwaschung der Substanzen folgte ab Minute 100 die für die Ergebnisse relevante elektrische Stimulation. Das Stimulationsprotokoll sah eine Stimulation aufsteigend mit vier Reizintensitäten von 2, 4, 6 oder 8 Volt in Kortexschicht VI vor. Nach der Gabe des elektrischen Stimulus wurden alle 10 Sekunden innerhalb der ersten fünf Minuten und alle 15 Sekunden in den folgenden fünf Minuten Einzelbilder des Gefäßabschnittes in Kortexschicht II/III aufgenommen und gespeichert.

Alle Messungen wurden ab Minute 0 aufgrund der Photosensitivität von Z-PDPA unter maximaler Abschirmung aller Lichtquellen durchgeführt. Die Beleuchtungsquelle am Mikroskop wurde nur für die Dauer der Bildaufnahme eingeschaltet.

4.3 Teilprojekt 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“

4.3.1 Versuchsgruppen

Dieses zweite Teilprojekt befasste sich mit den längerfristigen Einflüssen von HDPs auf die Gefäßwand. Dazu gab es vier verschiedene Interventionsgruppen. Die Schein-OP (Sham) als Negativkontrolle, Eigenblut als Positivkontrolle, Z-BOX A+B sowie Z-PDP A+B als Vertreter der HDPs. Nachdem in der Arbeitsgruppe bereits Untersuchungen der Gefäßmorphologie an Tag 14 nach Intervention im Rahmen einer *in vivo*-Studie stattfanden, behandelte dieses Projekt die Tage 0, 3 und 7 nach Intervention (Tab. 10). Die Versuchsgruppe Tag 0 umfasste aus statistischen Gründen ebenfalls 4 „Interventionsgruppen“. Die Tiere von Tag 0 wurden nicht operiert und demzufolge keiner Intervention unterzogen.

Tab. 10: Versuchsgruppen des Teilprojekts 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“

Hirnentnahme	Tag 0				Tag 3				Tag 7			
	„S“	„EB“	„PDP“	„BOX“	S	EB	PDP	BOX	S	EB	PDP	BOX
Stichprobe	5	5	5	5	5	5	5	7	5	5	5	5
Gesamt	20				22				20			

S = Sham, EB = Eigenblut, PDP = Z-PDP A+B, BOX = Z-BOX A+B

4.3.2 Materialien

4.3.2.1 Geräte und Chemikalien

Tabelle 11 und 12 listen alle in Teilprojekt 2 verwendeten Geräte und Chemikalien.

Tab. 11: Geräte des Teilprojekts 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“

Geräte	Artikel / Seriennummer	Herstellerfirma
Flussmeter Isofluran	SN: 650148-2-001	Föhr Medical Instruments GmbH
Flussmeter Luft	SN: 650148-3-001	Föhr Medical Instruments GmbH
Flussmeter Sauerstoff	SN: 650148-1-001	Föhr Medical Instruments GmbH
Glaskapillare	Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand™
Injektionspumpe	Aladdin single syringe pump 220V AL-1000 / SN.:302740	World Precision Instruments Germany GmbH
Mikrotom	Microm HM 450	Thermo Scientific
Mikrotom-Kühleinheit	Microm KS 34	Thermo Scientific

Stereomikroskop	ZEISS Stemi 305 trino SN: 3947000499	ZEISS
Zellkulturplatte	TC-Platte 24 Well Standard	Sarstedt AG & Co. KG

Tab. 12: Chemikalien des Teilprojekts 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“

Chemikalien	Bestellnummer	Herstellerfirma
Alexa647 donkey anti rabbit	711-606-152	Dianova
Anti-SMA rabbit	ab5694	Abcam
Chrom (III) Kaliumsulfat-Dodecahydrat	3535.3	Roth
D(+)-Saccharose	4621.1	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	1.065.801.000	Merck KGaA
Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	1.065.860.500	Merck KGaA
Ethylenglycol 99,5%	1.096212.500	Sigma Aldrich
Formalin 4% pH 7,4	F04-0004%PH7,4	SAV Liquid
Gelatine	1.04078.1000	Merck KGaA
Glucose Monohydrat	6780.1	Carl Roth
NaCl	3957.1	Carl Roth
Normal Donkey Serum	GTX73245	GeneTex (Biozol)
Tris Ultra Qualität	5429.3	Carl Roth
Tris-hydrochlorid	9090.3	Carl Roth
Triton X-100 zur Analyse	1.086.031.000	Merck KGaA

4.3.2.2 Vasoaktive Substanzen

Die Bereitstellung der vasoaktiven Substanzen Z-PDP A+B sowie Z-BOX A+B erfolgte erneut durch Hannes Richter (Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena). Die Hämabbauprodukte Z-PDP A+B sowie Z-BOX A+B wurden nach dem in Kapitel 4.2.2.2 beschriebenen Verfahren synthetisiert. Für die Probenvorbereitung zur direkten Nutzung in den Experimenten des zweiten Teilprojekts erfolgte die Einwaage der benötigten PDPs oder BOXes in 2 ml Reaktionsgefäßen an einer Feinwaage. Die Hämabbauprodukte wurden in aCSF bis zu einer Konzentration von 150 µM mittels Vortexens gelöst, danach Aliquots abgenommen und auf 2 µM mit aCSF verdünnt. Jeweils 30 µl Aliquote wurden im Anschluss in Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C bis zum Experimentiertag eingefroren.

4.3.3 Versuchsablauf

Das Vorhaben wurde in mehrere Schritte untergliedert:

1. Operation
2. Hirnentnahme (Tag 0 / 3 / 7) und Kryokonservierung
3. Präparation der Objekte
4. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

4.3.3.1 Operation

Am Tag der Operation (Tag 0) wurde die Tiere gewogen und erhielten eine orale analgetische Prämedikation mit Meloxicam 1 mg/kg KG (CP-Pharma). Die Narkose wurde mittels 3 %-Isofluraninhalationsnarkose in einer Einleitungsbox für 5 min durchgeführt. Im Anschluss erfolgte das Umlegen auf den OP-Tisch und die weitere Gabe von 2 % Isofluran über eine Maske. Zum Schutz vor Austrocknung der Kornea wurde eine Augensalbe (ViscOphtal, 0,01 g lokal, Bausch, Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin) aufgetragen. Das Fell über dem Nacken am Ansatz zum Schädel wurde rasiert sowie desinfiziert. Nach Kontrolle des Zehenzwischenreflexes wurden 0,25 ml Lidocain (Lidocainhydrochlorid 2 %, 20 mg/ml, bela-pharm) im rasierten Bereich subkutan appliziert. Die anschließende Mittellinieninzision legte die Halsmuskulatur frei, welche mithilfe von 3-0-Ethicon-Fäden zu beiden Seiten gezogen wurde, um die Cisterna magna freizulegen. Vor Punktion der Cisterna magna mussten 30 µl der zu injizierenden Substanz in den Schlauch der Injektionspumpe aufgezogen werden und konnten anschließend mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min in den subarachnoidalen Raum gepumpt werden. Bei der Kontrollgruppe Sham handelte es sich lediglich um eine Punktion der Cisterna magna ohne Substanzinjektion. Die PDP und BOXes-Proben lagen lichtgeschützt und tiefgekühlt (-20 °C) in der benötigten Menge in kleinen Reaktionsgefäßen vor. Das Eigenblut der Tiere wurde aus einer Schwanzvenenpunktion gewonnen und in einer Heparin-beschichteten Glaskapillare aufgefangen. Nach vollständiger Injektion der entsprechenden Substanz und dem Setzen einer kleinen Luftblase zum Verschluss der Punktionsstelle wurde nach 5-minütiger Wartezeit die Injektionsnadel entfernt. Die Halsmuskeln wurden defixiert und repositioniert und der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten (5-0-Ethicon) verschlossen. Postoperativ wurde die Maus gewogen und in den Heimatkäfig zurückgelegt. Die Erholung von der Narkose erfolgte meist innerhalb weniger Minuten nach Abdrehen des Isofluran-Vaporisierers.

Am ersten postoperativen Tag sowie bedarfsweise am zweiten und dritten postoperativen Tag erhielten die Tiere ein weiteres Mal 1 mg/kg KG Meloxicam. Bis zur Dekapitation an Tag 3 oder 7 erfolgte eine tägliche Gewichts-, Wund- und Verhaltenskontrolle.

4.3.3.2 Hirnentnahme und Kryokonservierung

Entsprechend der Gruppenzugehörigkeit wurden die Tiere entweder an Tag 0 ohne o.g. Operation, Tag 3 oder Tag 7 postoperativ dekapitiert. Dies erfolgte nach Inhalation einer Isofluranüberdosis (5 Vol.%) mit einer scharfen Schere. Die Hirne wurden jeweils in einem 15 ml *Falcon Tube*, welcher mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung befüllt wurde, aufgefangen. 72 h danach erfolgte die Überführung in 10 % Saccharose-Lösung. Nach weiteren 24 h wurden die Hirne in 30 % Saccharose-Lösung umgesetzt. Nachdem sie etwa 72 h später im *Falcon Tube* abgesunken waren, wurden sie in -25 °C kaltem Methylbutan kryokonserviert und anschließend bei -80 °C einzeln in Plastiktütchen gelagert.

Alle Lösungen wurden mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) hergestellt (Tab. 13). Für die Herstellung der PBS Lösung wurden 87,5 ml von Stock 2 zu 3500 ml dH₂O gegeben und mit 400 ml Stock 1 auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Anschließend wurde mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 5000 ml aufgefüllt.

Tab. 13: Zusammensetzung der PBS Lösung

Stammlösung	Substanz	Menge
Stock 1 (Base)	NaH ₂ PO ₄ anhyd	42,588 g
	NaCl	238,435 g
	dH ₂ O	3000 ml
Stock 2 (Acid)	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	41,397 g
	NaCl	238,434 g
	dH ₂ O	3000 ml

4.3.3.3 Präparation Objekte

Die gefrorenen Hirne wurden auf dem -40 °C gekühlten Probenhalter des Mikrotoms mittels Auffriergel (Tissue-Tek® Paraform® Tissue Orientation Gels, Sakura Finetek Europe B.V.) befestigt. Anschließend wurden zügig 40 µm dünne Hirnschnitte angefertigt. Für den Transfer der Schnitte mithilfe eines Pinsels in 24-Well-Platten wurden die Vertiefungen mit 1 ml Antifreeze-Lösung befüllt (Tab. 14).

Für die Herstellung der Antifreeze-Lösung wurde zuerst ein Phosphatpuffer hergestellt. Dazu wurden 700 ml dH₂O mit 17,5 ml von Stock 2 gemischt und mit Stock 2 bis auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Anschließend erfolgte die Zugabe von dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 1-Liter Phosphatpuffer. Die Antifreeze-Lösung wurde nach Mischung von Ethylenglycol, Phosphatpuffer, Natriumacid, Glukose und dH₂O erstellt. Glukose wurde als Letztes unter ständigem Rühren portionsweise hinzugefügt. Anschließend wurde mit dH₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Tab. 14: Zusammensetzung der Antifreeze-Lösung

Lösung	Stammlösung	Substanz	Menge
Phosphatpuffer für Antifreeze-Lösung	Stock 1 (Base, 500 ml)	Na ₂ HPO ₄	7,098 g
		dH ₂ O	500 ml
Antifreeze-Lösung (1000 ml)	Stock 2 (Acid, 1000 ml)	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	13,799 g
		dH ₂ O	1000 ml
	Ethylenglycol	300 ml	
	Phosphatpuffer	500 ml	
	Natriumacid	0,2 g	
	Glukose	150 g	
	dH ₂ O	200 ml	

Die Hirnschnitte einer Maus wurden reihenweise in die Wells gelegt. War die Platte voll, wurde wieder im ersten Well begonnen, sodass jeder 25. Schnitt in eine Vertiefung gelegt wurde und pro Vertiefung etwa 3 bis 4 Hirnschnitte zusammenlagen. Im geschnittenen Zustand konnten die Proben bei -80 °C bis zur immunhistochemischen Färbung aufbewahrt werden.

Für die Immunhistochemie wurde der primäre Antikörper anti-SMA rabbit (1:250) und der sekundäre Antikörper Alexa647 donkey anti rabbit (1:500) zur Färbung der Aktinfasern glatter Gefäßmuskulatur gewählt. Die benötigten Lösungen beschränkten sich auf PBS, Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) und TBS +, welches aus TBS, Triton und Normal Donkey Serum bestand (Tab. 15).

TBS wurde mittels Verdünnung aus TBS 10x hergestellt. Für die Herstellung von 2 Liter TBS 10x wurden die in Tabelle 15 gelisteten Substanzen gemischt und mit dH₂O auf 2000 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Tab. 15: Zusammensetzung der TBS und TBS+ Lösungen

Lösung	Substanz	Menge
TBS 10x	Tris-Hydrochlorid (HCl)	264,4 g
	Tris-Ultra (Base)	38,8 g
	NaCl	180 g
	dH ₂ O	1000 ml
TBS	TBS 10x	500 ml
	dH ₂ O	4500 ml
TBS+	TBS	100 ml
	Triton	0,1 ml
	Normal Donkey Serum	3 ml

Des Weiteren musste eine 0,5 % Gelatine zum Aufziehen der Präparate auf die Objektträger vorbereitet werden. Hierzu wurden alle Substanzen aus Tabelle 16 gemischt, für 10 min ruhen gelassen und unter langsamen Rühren auf 40 °C erwärmt. Die Lagerung der filtrierten Lösung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Tab. 16: Zusammensetzung der 0,5 % Gelatine

Substanz	Menge
dH₂O	200 ml
Gelatine	1 g
Chrom-III Kaliumsulfat	0,1 g

Die Färbeschritte verteilten sich auf zwei Tage. Am ersten Tag wurden die Hirnschnitte aus der sechsten Spalte der 24-Well Platte aus der Antifreeze-Lösung genommen und sechsmal in TBS für jeweils 15 min gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation in TBS+ wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte wieder das Waschen in TBS dreimal für je 10 min, Inkubation in TBS+ für 30 min, Gabe des zweiten Antikörpers mit einer Inkubationszeit von 2 h und anschließend sechsmal für je 10 min in TBS waschen. Im Anschluss wurden die Hirnschnitte in 0,5 % Gelatine auf Objektträger aufgezogen und zum Trocknen zur Seite gelegt. Vor dem Eindecken mit Fluoromount wurden die Hirnschnitte auf den Objektträgern in PBS für 5 min gewaschen, mit DAPI für 5 min inkubiert und wiederum dreimal für je 5 min in PBS gewaschen.

4.3.3.4 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Hirnschnitte unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 710) mit der Computersoftware Zen2000 betrachtet. Zunächst wurde die Funktion der Transmissionsmikroskopie genutzt, um die Gefäßquerschnitte von *A. azygos pericallosa* (APA), *A. communicans posterior* (PCA) sowie *A. basilaris* (BA) unter dem 10-fachen Objektiv zu identifizieren. Die intraparenchymale APA war stets zentral über dem Corpus callosum auffindbar. Eine äußerst sorgfältige Präparation der Hirne und Behandlung der Hirnschnitte war notwendig, um die beidseits angelegte extraparenchymal gelegenen PCAs sowie BAs nicht ungewollt vom Hirn abzureißen. Die BA fand sich stets mittig vor dem Hirnstamm. Die Verfolgung der Schnitte nach rostral führte, nach den selten zu findenden *Aa. cerebri posteriores*, zu den rechten und linken Anschnitten der PCA.

Nach erfolgreicher Identifizierung der Gefäße wurde auf das 20-fach vergrößernde Objektiv und in Zen2000 auf die Laserfunktion mit definierten Anregungswellenlängen gewechselt. DAPI absorbierte Wellenlängen im Bereich von 364 nm und emittierte im Maximum 454 nm lange Wellen. Es diente unter Anfärbung des Chromatins der Zellkerne der Orientierung und Färbekontrolle der Präparate. Gescannt wurden lediglich anti-SMA gefärbte Aktinfasern. Alexa647 hatte eine Absorptionswellenlänge von 650 nm und Emissionswellenlänge von im Maximum 670 nm. Die Channel-Parameter für Alexa647 wurden möglichst konstant gehalten:

Laserpower 3 %, Pinhole 102, Master Gain 600, Digital Offset -450, Digital Gain 1.0, Number of Averaging 4, Speed 7-9 frames/sec, Resolution 2048x2048. Je nach Durchmesser und Höhe des Gefäßanschnitts wurden die Parameter Zoom und Stack manuell angepasst (z-Intervall = 1).

4.4 Auswertung und Statistik

4.4.1 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

Die während des Experiments entstandenen 51 Bilder pro Stimulationsstärke und Versuchstier wurden zur Gefäßdurchmesser-Bestimmung in die Computersoftware ImageJ geladen. Alle Bilder wurde mithilfe eines teilautomatisierten Auswertungsverfahrens anhand drei eingeblendeter horizontaler Linien ausgewertet. Die Schnittpunkte von Linie und Gefäßinnenwand wurde mit dem Point tool-Werkzeug ausgewählt. Der Abstand zwischen den Punkten, die sich gegenüber lagen, wurde mittels des Satzes des Pythagoras berechnet, um den wahren Innendurchmesser bei nicht-senkrechter Gefäßlage zu ermitteln. Der Abstand zwischen den Punkten entlang des Gefäßabschnitts einer Seite betrug 25 μm , sodass auf einem Gesamtabschnitt von 50 μm der mittlere Gefäßdurchmesser aus insgesamt drei Werten ermittelt wurde (Abb. 7).

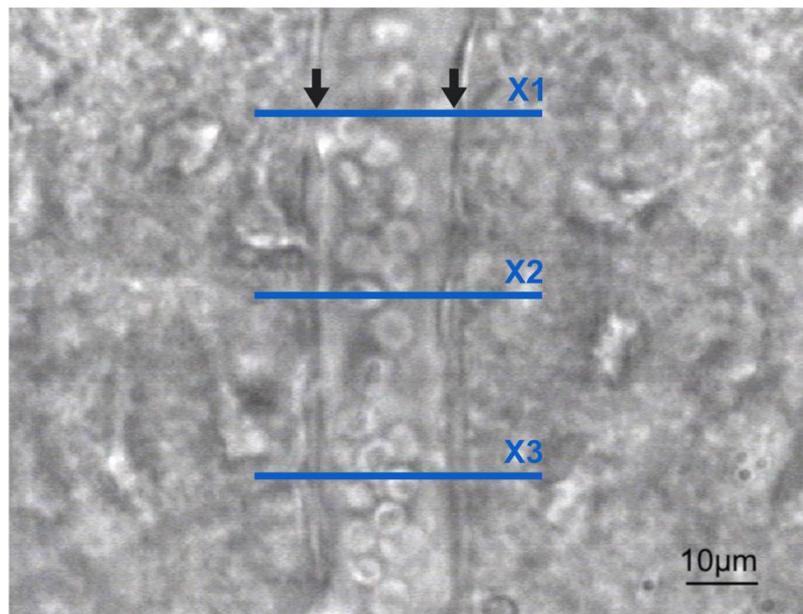


Abb. 7: Beispielbild einer intraparenchymalen Arteriole in Kortexschicht II/III. Der Gefäßdurchmesser (beispielhaft zwischen den beiden schwarzen Pfeilen dargestellt) wurde aus drei definierten Höhen (blaue Linien, X1-3) als Mittelwert bestimmt.

Für die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Gefäßgrößen wurde der absolute Gefäßdurchmesser auf den bei der Baseline ermittelten Durchmesser normiert. Die prozentuale Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit wurde in einem Diagramm mit vier Kurven für die jeweilige Stimulationsstärke dargestellt (Abb. 8).

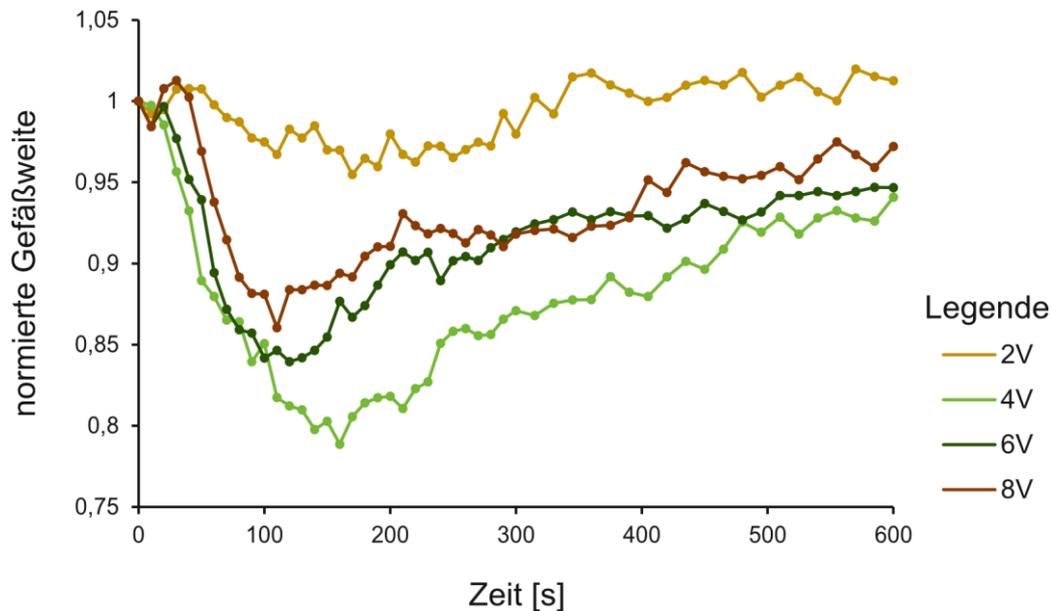


Abb. 8: Beispieldiagramm einer Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation in Kortexschicht II/III im zeitlichen Verlauf (600 s) für die vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Die Kurven zeigten zunächst eine Verringerung des Gefäßdurchmessers von der Ausgangsgrundlinie nach elektrischer Stimulation des neuronalen Extrazellulärtraumes (Kontraktion). Nach einem kurzen Plateau folgte eine exponentielle Aufweitung der Gefäßwände bis zu einer neuen Grundlinie (Dilatation). Um eine objektive Aussage über die Gefäßantwort zu treffen, wurden folgende Parameter für die statistische Betrachtung ausgewählt:

- **Amplitude (∂A)** beschreibt die maximale prozentuale Kontraktion nach der elektrischen Stimulation (Abb. 9.1).
- **Zeitpunkt ($t(\text{Min})$)** gibt an, wann die maximale Kontraktion erreicht wird (Abb. 9.2).
- **Zeitkonstante Tau (τ)** als indirektes Maß der Geschwindigkeit der Dilatation (Abb. 9.3).
- **Dilatation ($A1/\partial A$)** beschreibt den prozentualen Anteil der theoretisch berechneten Aufweitung ($A1$) von der maximalen Kontraktion (∂A) (Abb. 9.4).
- **Area under the curve (AUC)** als zusätzlicher Parameter, beeinflusst durch die oben genannten Parameter (Abb. 9.5).

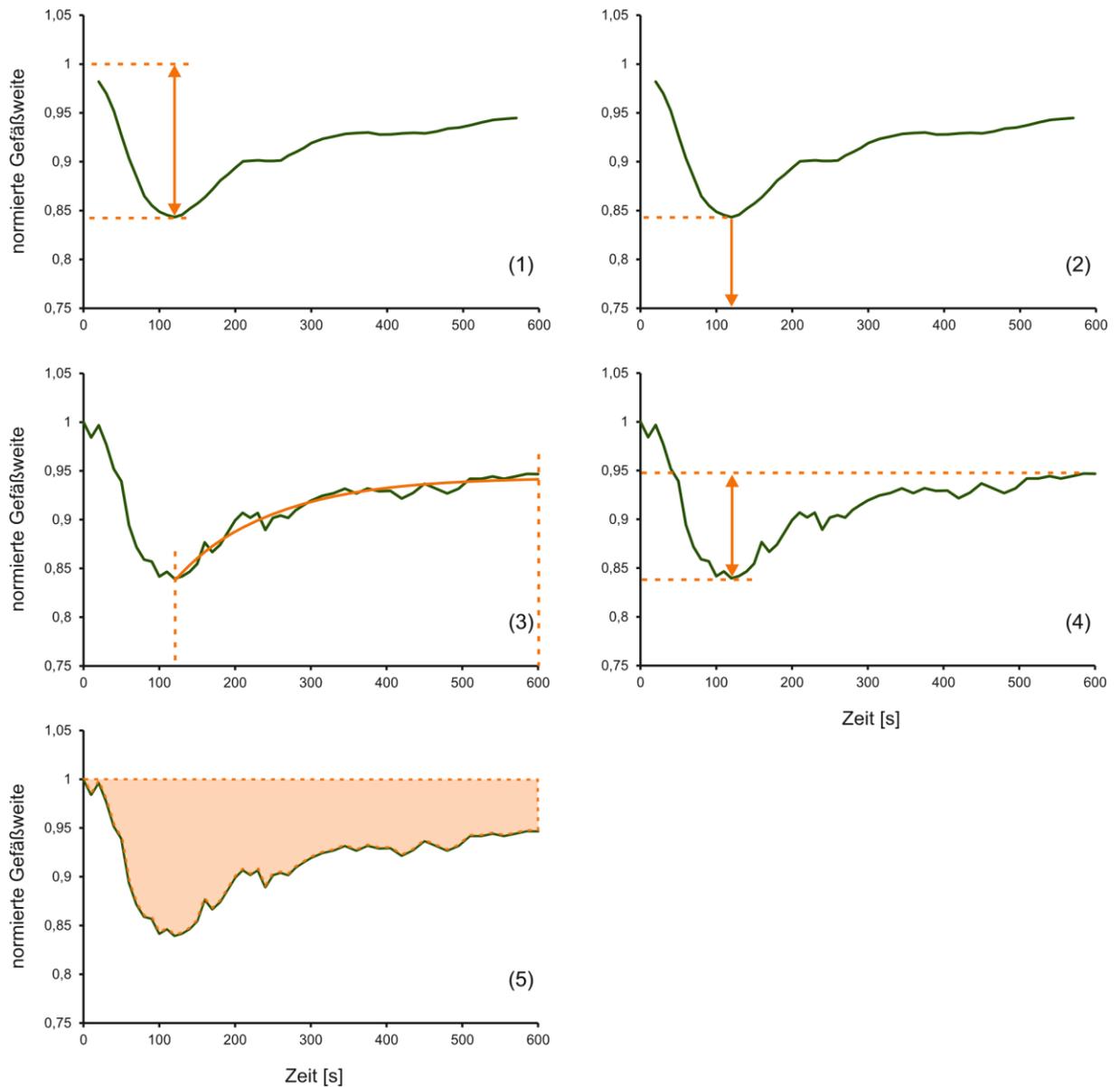


Abb. 9: Beispieldiagramme zur Darstellung der Parameter der dynamischen Gefäßreaktion: (1) Amplitude, (2) Zeitpunkt maximaler Kontraktion, (3) Tau, (4) Dilatation, (5) AUC. Die einzelnen Rohdatenpunkte wurden zur besseren Übersichtlichkeit als Verbindungslinie dargestellt. Diagramme (1)-(2) mit moving-average-Filter (daher verkürzte Kurvendarstellung), Diagramme (3)-(5) Originalrohdatendarstellung ohne moving-average-Filter.

Die Parameterbestimmung erfolgte mit der Software OriginLab2021, welche anhand der vorliegenden Rohdaten die zugehörigen Werte für ∂A , $t(\min)$, τ , $A1$, AUC ermittelte. Jeder Parameter wurde für jede der vier Stimulationsstärken einmal analysiert. Für die Parameter ∂A und $t(\min)$ wurde ein *moving-average*-Filter angewendet. τ , $A1$, AUC wurden an der Originaldatenkurve ermittelt. Zusätzlich wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- Wenn der Zeitpunkt der maximalen Kontraktion außerhalb von 80-350 s nach Stimulation lag, wurden alle Parameter nicht bestimmt.
- Wenn die Aufweitungskurve nicht einfach-exponentiell verlief, wurden Tau, Dilatation und AUC nicht bestimmt.
- Wenn die maximale Kontraktion nicht mehr als 5 % von der Baseline betrug, konnte kein anderer Parameter bestimmt werden, da nicht von einer signifikanten Reaktion auszugehen war. Jedoch fiel auf, dass bei adulten Tieren, deren maximale Kontraktion sehr häufig unter 5 % lag, dennoch eine den juvenilen Tieren ähnlich verlaufende Kurve zu sehen war. Diese aus der Auswertung auszuschließen, erschien bei Etablierung der Parameterbestimmung fehlerhaft, da sich die Amplitude der maximalen Kontraktion adulter Tiere fälschlicherweise den juvenilen Tieren bei Nichtbeachtung der Daten angleichen würde. Deshalb wurden bei einer Kontraktion < 5 %, aber korrekten Verlauf der Kurve, dennoch Amplitude und Zeitpunkt aufgenommen, jedoch nicht Tau, Dilatation und AUC.

Von Interesse war, ob Interventionen oder Alter einen signifikanten Einfluss auf die Gefäßantwort, charakterisiert durch die o.g. Parameter, nehmen. Um diese nicht normalverteilten Daten zu analysieren, wurden verallgemeinerte Schätzungsgleichungen in SPSS angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Alle Werte werden folgend in Form von Mittelwert \pm SEM (Standardfehler) angegeben. Die im Ergebnisteil verwendeten Graphiken stellen juvenile (blau) den adulten (rot) Versuchsgruppen gegenüber und vereinen die Darstellung eines ausgewählten Parameters und den vier Stimulationsstärken in Form einer Dosis-Wirkungskurve.

4.4.2 Teilprojekt 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“

Für jedes Tier lagen abhängig vom Gefäßtyp mehrere gescannte Gefäßquerschnitte vor (APA n = 4-6; PCA n = 6-12; BA n = 4-6). Von jedem Gefäßquerschnitt wurde im Bilderverarbeitungsprogramm ImageJ der Flächeninhalt des Gefäßes ($A_{\text{außen}}$), des Lumens (A_{innen}) sowie der Außenumfang ($U_{\text{außen}}$) bestimmt (Abb. 10). Ausgehend von diesen Parametern konnte der Flächeninhalt der Aktinfaserschicht (Gefäßwand) nach der Formel $A_{\text{Wand}} = A_{\text{außen}} - A_{\text{innen}}$ berechnet werden.

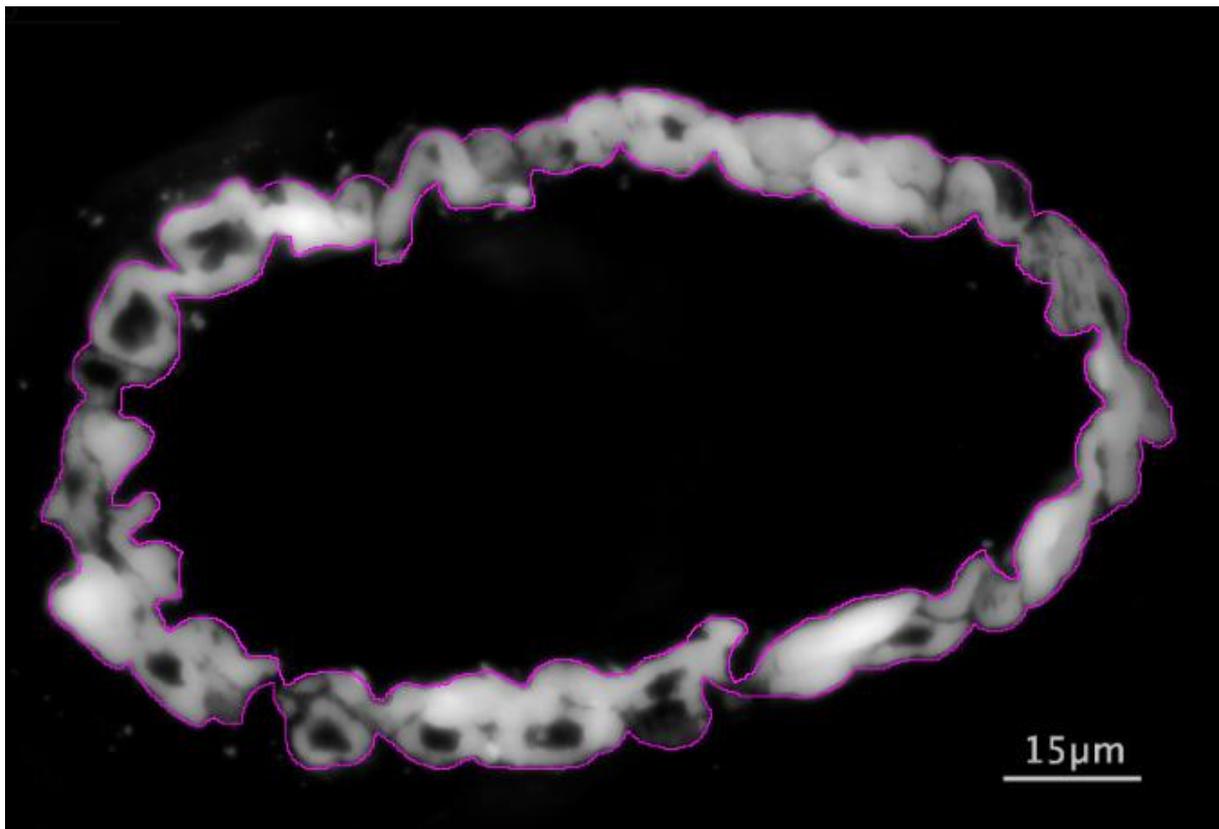


Abb. 10: Beispielbild eines Gefäßquerschnitts mit immunhistochemisch gefärbter Aktinfaserschicht aufgenommen unter dem Laserscanning-Mikroskop. Markiert sind der Innen- und Außenumfang (violette Linien), dazwischen die Wandfläche (weiße Fläche).

Eine Normierung der Wandfläche (A_{Wand}) auf die gesamte Gefäßfläche ermöglichte den Vergleich trotz interindividuell unterschiedlich großer Gefäßkaliber. Die relative Wandfläche (siehe Diskussion Kapitel 6.2.1) wurde als neuer Parameter verwendet. Die Werte der relativen Wandfläche aller Gefäßquerschnitte eines Gefäßtyps eines Tieres wurden gemittelt. Im Anschluss erfolgte daraus die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung für die einzelnen Versuchsgruppen.

Zur Untersuchung des Einflusses von Intervention (Sham, Eigenblut, Z-PDP A+B, Z-BOX A+B) und Dekapitationszeitpunkt (Tag der Dekapitation 0 / 3 / 7 / 14 / 28) auf die relative Wandfläche wurde der erhobene Datensatz entsprechend der 3 Gefäßtypen (APA, PCA, BA) aufgeteilt. Mithilfe der Software R wurde zunächst ein Test auf Interaktion von Intervention und Dekapitationszeitpunkt durchgeführt. Eine lineare Regression mit Interaktion vs. ohne Interaktion der beiden unabhängigen Variablen (Interventionsgruppe und Dekapitationszeitpunkt) wurde gerechnet und ein F-Test (ANOVA, Signifikanzniveau $p < 0,05$) angewendet. War das Ergebnis für den jeweiligen Gefäßtyp statistisch signifikant, wurden die einzelnen Datensätze abhängig von der Interventionsgruppe oder dem Dekapitationszeitpunkt aufgespalten und die Einzelinteraktionen statistisch verglichen.

Die Rohdaten für Sham, Eigenblut, Z-PDP A+B, Z-BOX A+B an Tag 14, Z-PDP A+B an Tag 7 wurden von Sophie Charlotte Schröder sowie Sham, Eigenblut, Z-PDP A+B, Z-BOX A+B an Tag 28 von Katharina Holzmüller erhoben. Diese Daten wurden bereits in deren Dissertationen ausgewertet. Die Rohdaten wurden freundlicherweise für diese Arbeit bereitgestellt, um sie auf den neu definierten Parameter der relativen Wandfläche erneut auszuwerten sowie statistisch zu analysieren.

5 Ergebnisse

5.1 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

Zunächst erfolgt die visuelle Darstellung der gemittelten Gefäßweitenänderung ohne Darstellung der Standardabweichungen für die jeweiligen juvenilen (Abb. 11) sowie adulten Versuchsgruppen (Abb. 12).

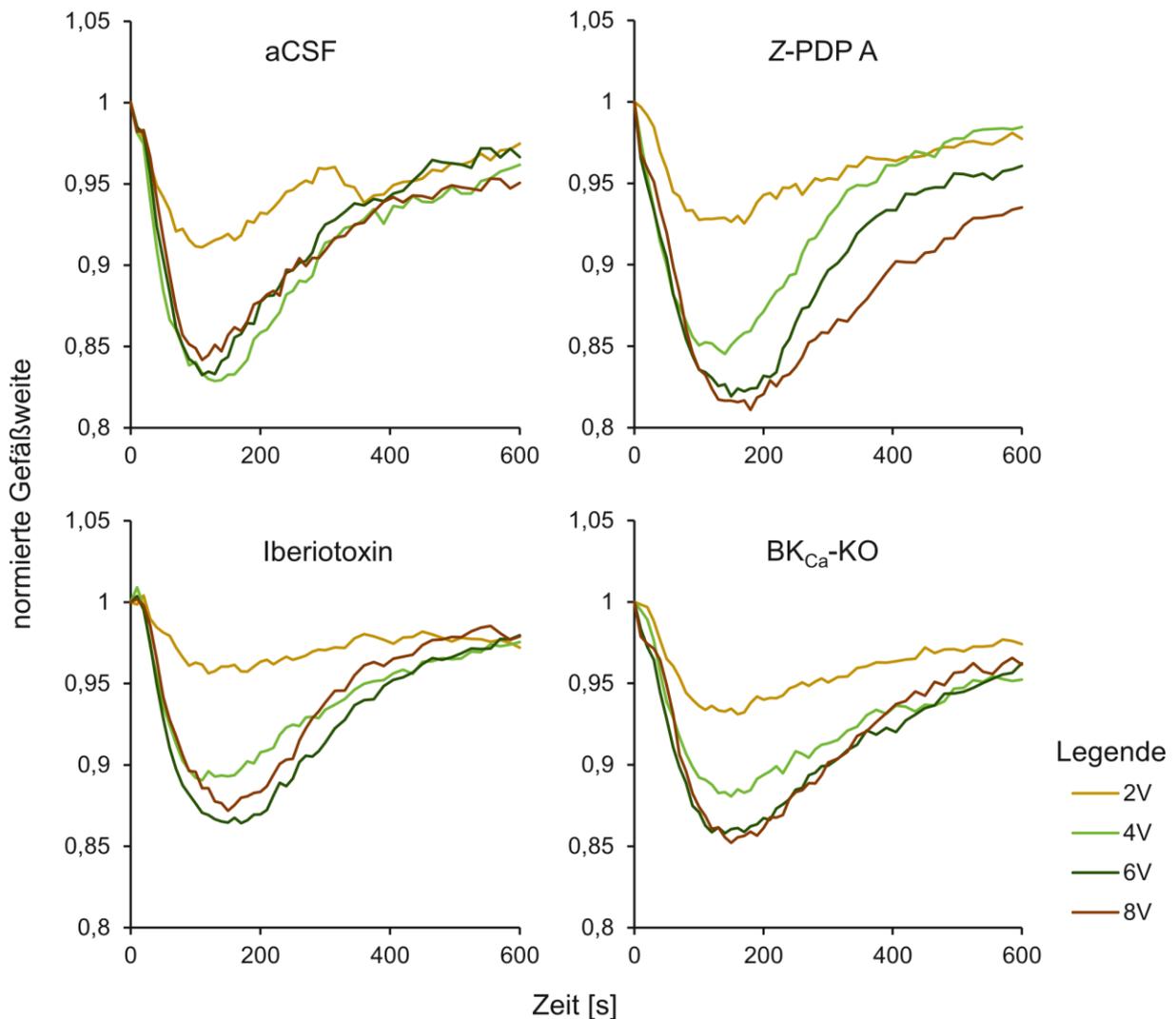


Abb. 11: Darstellung der gemittelten Gefäßreaktionen der vier juvenilen Interventionsgruppen (aCSF, $n = 7$; Z-PDP A, $n = 7$; Iberiotoxin, $n = 7$; BK_{Ca}-KO, $n = 7$) im zeitlichen Verlauf (600 s) für die vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V) ohne Darstellung der Standardabweichungen.

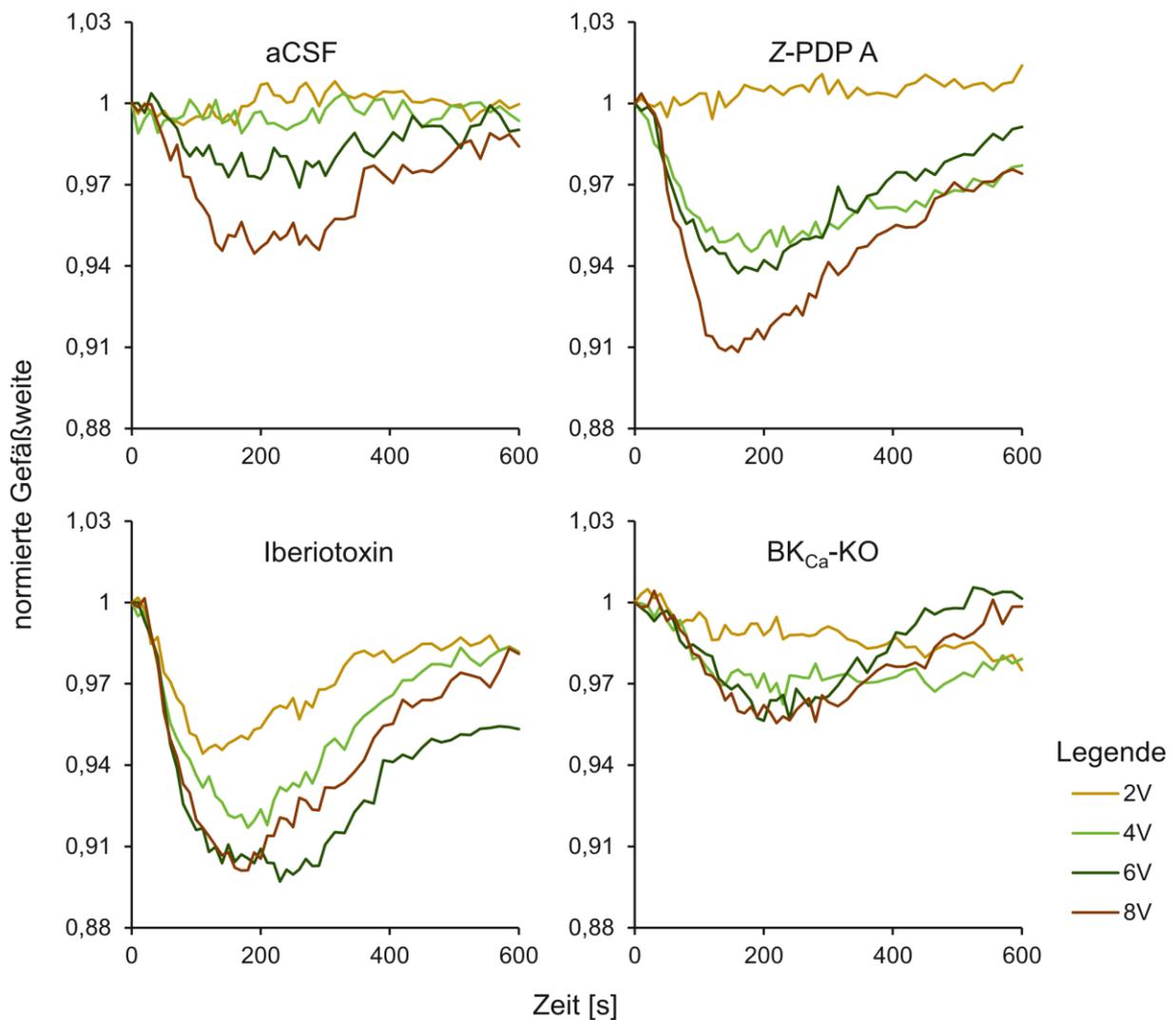


Abb. 12: Darstellung der gemittelten Gefäßreaktionen der vier adulten Interventionsgruppen (aCSF, $n = 5$; Z-PDP A, $n = 6$; Iberiotoxin, $n = 6$; BK_{Ca}-KO, $n = 7$) im zeitlichen Verlauf (600 s) für die vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V) ohne Darstellung der Standardabweichungen.

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse der statistischen Auswertung des Einflusses von Alter und Intervention entsprechend der in Kapitel 4.4.1 erläuterten Parameter Amplitude, Zeitpunkt maximaler Kontraktion, Tau, Dilatation und AUC einzeln dargestellt.

5.1.1 Amplitude

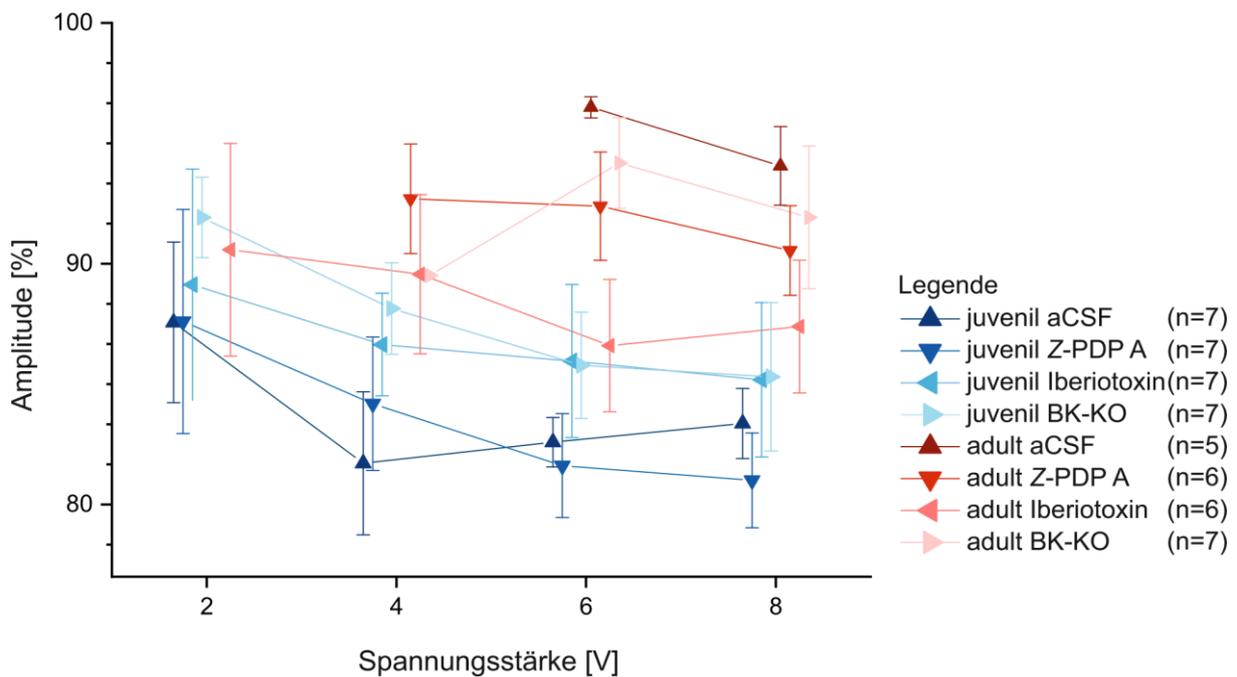


Abb. 13: Mittelwerte und Standardfehler des Parameters maximale Kontraktion nach elektrischer Stimulation (Amplitude) in Abhängigkeit der vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Im Mittel verengte sich der Gefäßdurchmesser aller juvenilen Tiere auf $85 \pm 1 \%$ ($n = 28$). Die Amplitude adulter Tiere erreichte ein Minimum von $92 \pm 1 \%$ ($n = 24$). Diese beschriebene Altersabhängigkeit der Amplitude war mit $p < 0,05$ statistisch signifikant.

Bei der Betrachtung der Interventionen erreichten die aCSF-Gruppen der juvenilen und adulter Tiere im Mittel einen Amplitudenwert von $88 \pm 1 \%$ ($n = 12$). Die juvenilen und adulter Tiere, welche mit dem Hämabbauprodukt Z-PDP A behandelt wurden, verengten ihren Gefäßdurchmesser auf $87 \pm 1 \%$ ($n = 13$). Die Gruppen mit der Inkubation des BK-Kanal-Inhibitors Iberiotoxin erreichten das Minimum bei $88 \pm 2 \%$ ($n = 13$). Die Knockout-Tiere kontrahierten auf einen Mittelwert von $91 \pm 1 \%$ ($n = 14$). Der statistische Vergleich der Interventionen erbrachte bei $p = 0,25$ keinen signifikanten Unterschied für die Amplitudenwerte (Abb. 13).

5.1.2 Zeitpunkt maximaler Kontraktion

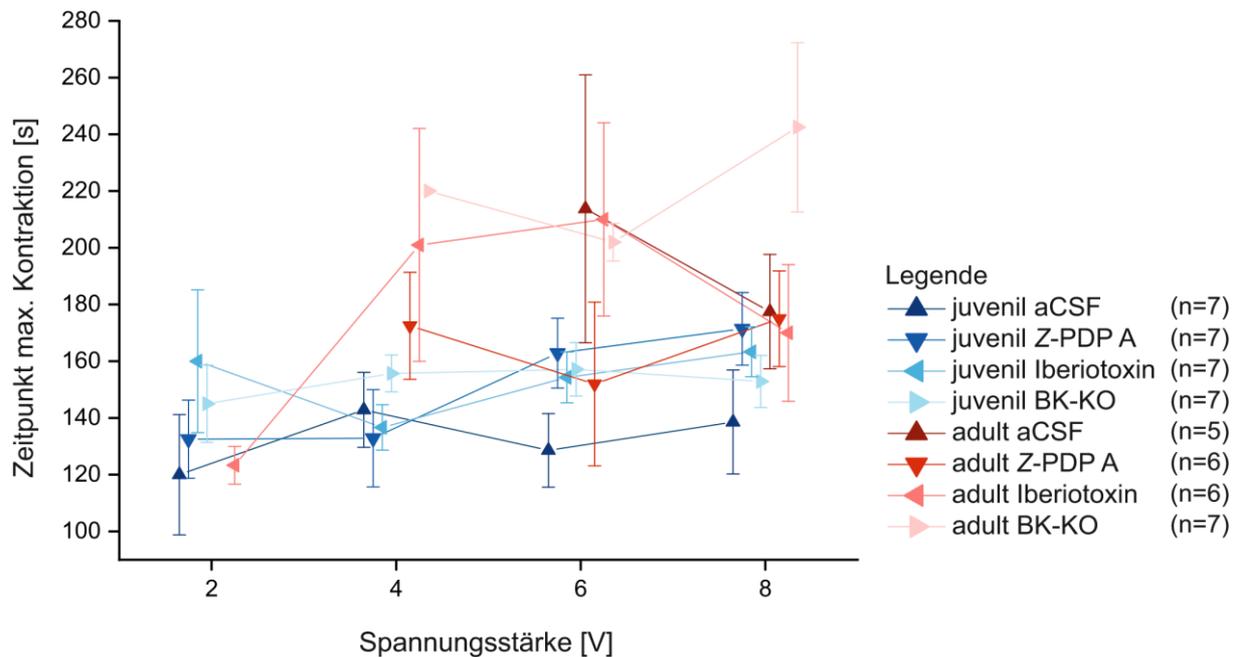


Abb. 14: Mittelwerte und Standardfehler des Parameters Zeitpunkt maximaler Kontraktion nach elektrischer Stimulation in Abhängigkeit der vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Die Gefäße der juvenilen Tiere erreichten im Durchschnitt nach 148 ± 5 s ($n = 28$) den Zeitpunkt maximaler Kontraktion. Der Mittelwert der adulten Kohorte lag bei 187 ± 10 s ($n = 24$). Es ergab sich eine statistische Alterssignifikanz mit $p < 0,05$ für den Parameter Zeitpunkt maximaler Kontraktion.

Der statistische Vergleich des Zeitpunktes maximaler Kontraktion für die Gruppen aCSF (159 ± 9 s, $n = 12$), Z-PDP A (162 ± 8 s, $n = 13$), Iberiotoxin (168 ± 12 s, $n = 13$) sowie BK-KO (180 ± 6 s, $n = 14$) blieb nicht signifikant ($p = 0,144$) (Abb. 14).

5.1.3 Tau

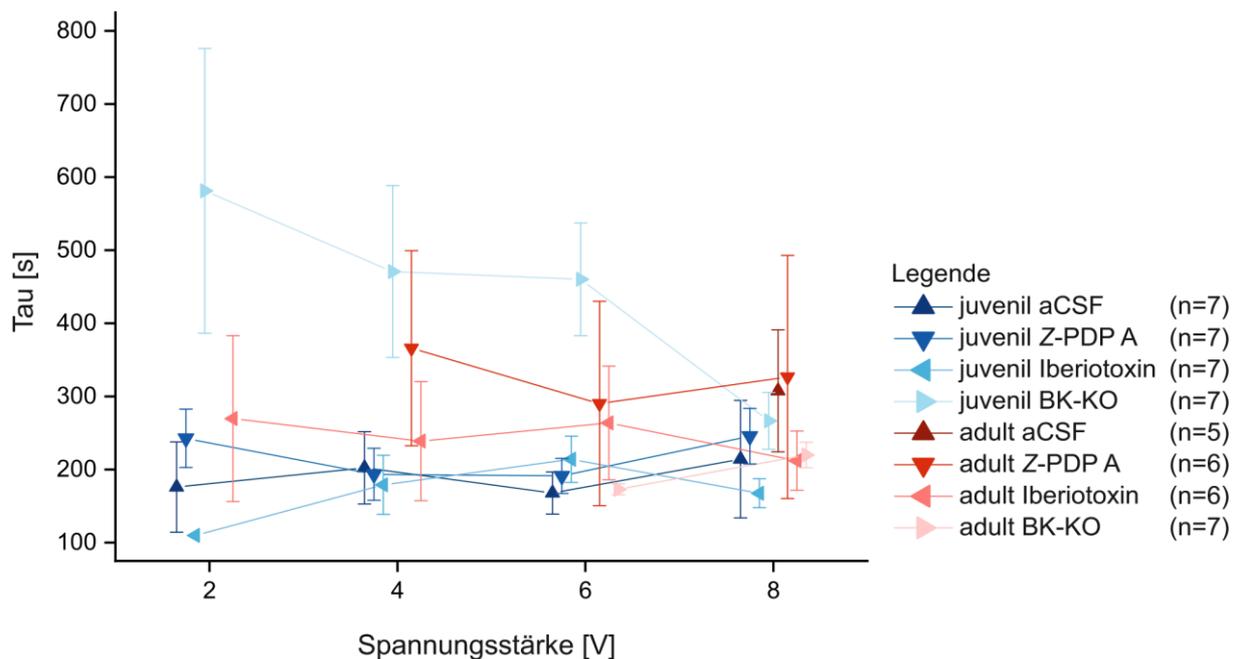


Abb. 15: Mittelwerte und Standardfehler des Parameters Zeitkonstante (Tau) der Aufweitung des Gefäßes nach initialer Kontraktion nach elektrischer Stimulation in Abhängigkeit der vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Der Tau-Wert der juvenilen Tiere lag im Mittel bei 256 ± 20 s ($n = 28$) und der Wert der adulten Tiere bei 271 ± 47 s ($n = 24$). Das Alter nahm keinen signifikanten Einfluss auf den Wert Tau ($p = 0,764$).

Die aCSF-Gruppe hatte einen Tau-Wert im Mittel von 209 ± 38 s ($n = 12$). Für die Z-PDP A-Gruppe ergab sich ein Tau-Wert von 249 ± 36 s ($n = 13$). Der mittlere Tau-Wert der Iberiotoxin-Gruppe betrug 210 ± 24 s ($n = 13$). Die BK-Knockout-Tiere 385 ± 63 s ($n = 14$). Für die Interventionen zeigte sich ein genereller statistischer Unterschied in den Ergebnissen von Tau ($p < 0,05$). In der Betrachtung der einzelnen paarweisen Vergleiche ergaben sich statistische Signifikanzen ($p < 0,05$) für die Einzelvergleiche von BK-KO-Tieren mit der aCSF-Gruppe, BK-KO mit der Z-PDP A-Gruppe und BK-KO mit der Iberiotoxin-Gruppe. Andere Einzelvergleiche wie z.B. aCSF und Z-PDP A ($p = 0,333$) oder aCSF und Iberiotoxin ($p = 0,969$) blieben ohne statistische Signifikanz (Abb. 15).

5.1.4 Dilatation

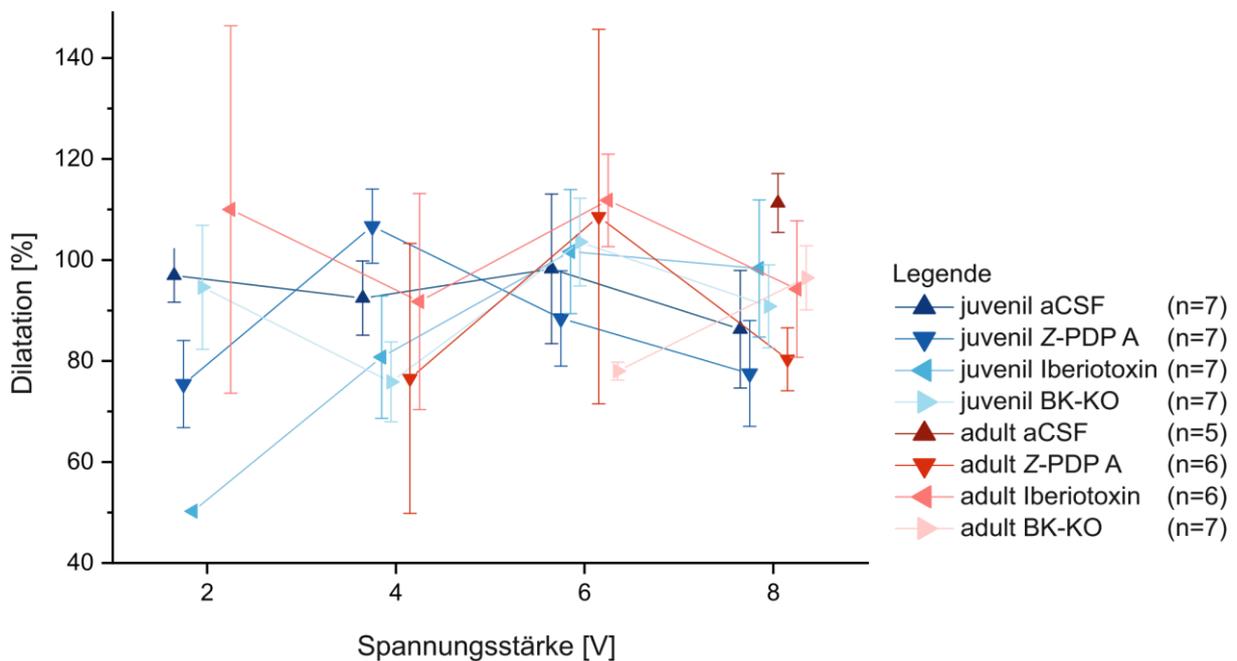


Abb. 16: Mittelwerte und Standardfehler des Parameters Dilatation in Abhängigkeit der vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Bei Betrachtung der Werte für die Dilatation juveniler ($92 \pm 3 \%$, $n = 28$) sowie adulter Tiere ($92 \pm 9 \%$, $n = 24$) ergab sich mit $p = 0,951$ keine statistische Signifikanz für den Altersvergleich.

Die Interventionen mit aCSF ($95 \pm 7 \%$, $n = 12$), Z-PDP A ($89 \pm 7 \%$, $n = 13$), Iberiotoxin ($96\% \pm 6 \%$, $n = 13$) sowie BK-KO-Gruppe ($88 \pm 6 \%$, $n = 14$) im Vergleich untereinander bleiben ohne statistischen Einfluss auf den Parameter Dilatation ($p = 0,701$) (Abb. 16).

5.1.5 AUC

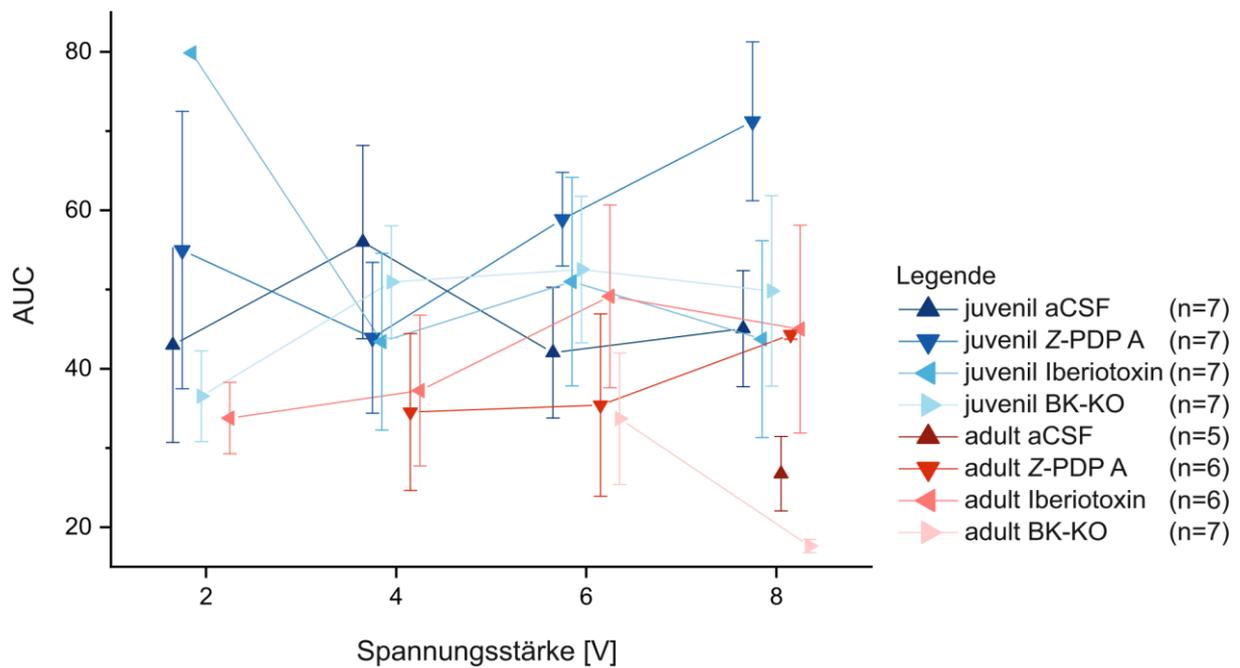


Abb. 17: Mittelwerte und Standardfehler des Parameters AUC in Abhängigkeit der vier Stimulationsstärken (2,4,6,8 V).

Die *Area under the curve* der juvenilen Kohorte betrug $50,7 \pm 3,4$ ($n = 28$) und bei der adulten Kohorte $34,7 \pm 4,1$ ($n = 24$). Im statistischen Vergleich der Werte zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Alters mit $p < 0,05$ auf die AUC.

Beim Vergleich der Interventionen hatten aCSF-Gruppen im Mittel eine AUC von $39,0 \pm 5,3$ ($n = 12$), Z-PDP A-Gruppen $48,7 \pm 4,3$ ($n = 13$), Iberiotoxin-Gruppen $44,6 \pm 6,4$ ($n = 13$) und BK-KO-Tiere $38,6 \pm 5,1$ ($n = 14$). Die Interventionen nahmen mit $p = 0,386$ keinen statistischen signifikanten Einfluss auf die AUC-Werte (Abb. 17).

5.2 Teilprojekt 2 „HDPs und Gefäßmorphologie“

Folgend werden die Ergebnisse der statistischen Auswertung des Einflusses von Intervention (Sham, PDP, BOX, EB) und Dekapitationszeitpunkt (Tag der Dekapitation 0 / 3 / 7 / 14 / 28) auf die Gefäßwandfläche entsprechend der 3 Gefäßtypen (APA, PCA, BA) dargestellt. Zur Darstellung der Daten wurden zwei Abbildungen gewählt: Die jeweils obere Abbildung zeigt die relative Wandfläche [%] (Parameterbeschreibung siehe Kapitel 4.4.2 im Methodikteil) in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes (Tag der Dekapitation 0 / 3 / 7 / 14 / 28) innerhalb der jeweiligen Interventionsgruppe (Sham, EB, PDP, BOX). Die jeweils untere Abbildung stellt die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit der unterschiedlichen Interventionsgruppen (Sham, EB, PDP, BOX) an den jeweiligen Dekapitationszeitpunkten (Tag der Dekapitation 0 / 3 / 7 / 14 / 28) dar. In diesem Teilprojekt steht die Abkürzung PDP für Z-PDP A+B, BOX für Z-BOX A+B.

5.2.1 Arteria azygos pericallosa (APA)

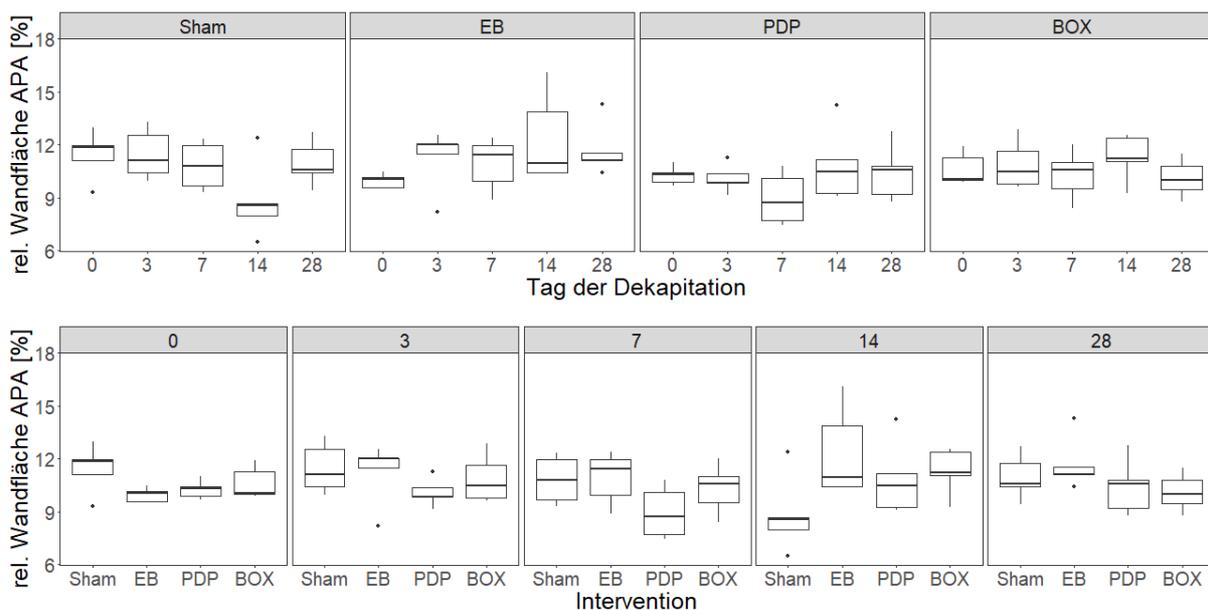


Abb. 18: Einfache Boxplots zur Darstellung der ermittelten Daten der Arteria azygos pericallosa (APA). Im oberen Teil der Abbildung ist die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes (0 / 3 / 7 / 14 / 28) innerhalb der jeweiligen Interventionsgruppe (Sham, EB, PDP, BOX) dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung wird die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit der unterschiedlichen Interventionsgruppen (Sham, EB, PDP, BOX) an den jeweiligen Dekapitationszeitpunkten (0 / 3 / 7 / 14 / 28) gezeigt. Einfacher Boxplot dargestellt mit Medianlinie, unterem (25%) und oberem Quartil (75%), Whisker (max. 1,5-fache Boxlänge) sowie Ausreißerpunkten.

Für die Auswertung der Daten der APA blieb der Test auf Interaktion zwischen Interventionsgruppe sowie Dekapitationszeitpunkt nicht signifikant ($p = 0.052$), sodass weitere Einzelvergleiche nicht zulässig waren.

Die relative Wandflächen zeigten einen gleichartigen zeitlichen Verlauf für die einzelnen Interventionsgruppen (Abb. 18).

5.2.2 Arteria communicans posterior (PCA)

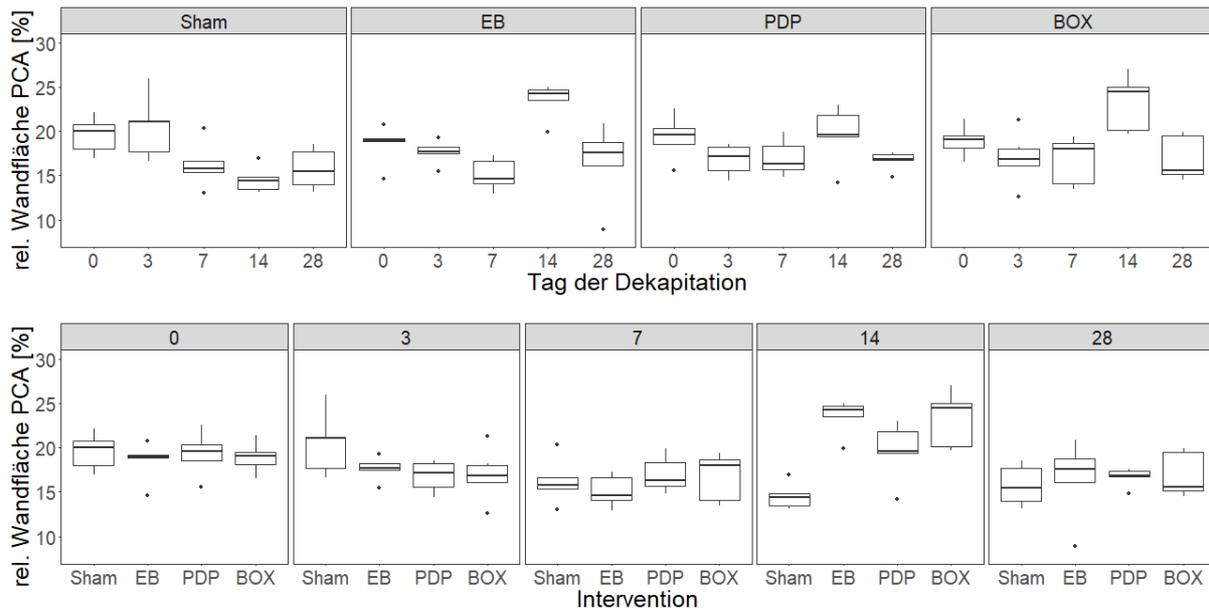


Abb. 19: Einfache Boxplots zur Darstellung der ermittelten Daten der Arteria communicans posterior (PCA). Im oberen Teil der Abbildung ist die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes (0 / 3 / 7 / 14 / 28) innerhalb der jeweiligen Interventionsgruppe (Sham, EB, PDP, BOX) dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung wird die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit der unterschiedlichen Interventionsgruppen (Sham, EB, PDP, BOX) an den jeweiligen Dekapitationszeitpunkten (0 / 3 / 7 / 14 / 28) gezeigt. Einfacher Boxplot dargestellt mit Medianlinie, unterem (25%) und oberem Quartil (75%), Whisker (max. 1,5-fache Boxlänge) sowie Ausreißerpunkten.

Die Daten der PCA wiesen im Test auf Interaktion von Dekapitationszeitpunkt und Interventionsgruppe eine statistische Signifikanz mit $p < 0,001$ auf. Im Folgenden werden daher die Einzelvergleiche in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes bzw. der Interventionsgruppe aufgeschlüsselt dargestellt.

Für die folgenden Einzelbetrachtungen der relativen Wandfläche in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes zeigte sich in der Sham-Gruppe eine signifikante Reduktion der relativen Gefäßwandfläche im zeitlichen Verlauf zwischen

Tag 0 und 14 (Tag 0: $19,6 \pm 2,1$ %, $n = 5$, Tag 14: $14,6 \pm 1,5$ %, $n = 5$, $p < 0,05$),

Tag 3 und 14 (Tag 3: $20,5 \pm 3,7$ %, $n = 5$, Tag 14: $14,6 \pm 1,5$ %, $n = 5$, $p < 0,05$),

Tag 3 und 28 (Tag 3: $20,5 \pm 3,7$ %, $n = 5$, Tag 28: $15,8 \pm 2,3$ %, $n = 5$, $p < 0,05$).

Im Gegensatz zur Sham-Gruppe, die eine im zeitlichen Verlauf abnehmende Gefäßwandfläche zeigte, wiesen die Interventionsgruppen ein Maximum der relativen Gefäßwandfläche an Tag 14 auf, bevor sie zum Tag 28 wieder fielen.

Für die Eigenblutgruppe erwiesen sich die relativen Wandflächen im Vergleich von

Tag 0 und 14 (Tag 0: $18,5 \pm 2,3$ %, $n = 5$, Tag 14: $23,5 \pm 2,1$ %, $n = 5$, $p < 0,05$),

Tag 3 und 14 (Tag 3: $17,6 \pm 1,4$ %, $n = 7$, Tag 14: $23,5 \pm 2,1$ %, $n = 5$, $p < 0,05$),

Tag 7 und 14 (Tag 7: $15,1 \pm 1,8$ %, $n = 5$, Tag 14: $23,5 \pm 2,1$ %, $n = 5$, $p < 0,05$)

als statistisch signifikant verschieden. Die Abnahme der Wandfläche zwischen Tag 14 und 28 (Tag 14: $23,5 \pm 2,1$ %, $n = 5$, Tag 28: $18,4 \pm 2,0$ %, $n = 5$, $p < 0,05$) ebenfalls statistisch signifikant.

Für PDP erwies sich diese Beobachtung als statistisch nicht signifikant.

Das Maximum konnte für die BOX-Gruppe im Vergleich von

Tag 0 und 14 (Tag 0: $19,0 \pm 1,8$ %, $n = 5$, Tag 14: $23,3 \pm 3,2$ %, $n = 5$, $p < 0,05$),

Tag 3 und 14 (Tag 3: $17,0 \pm 2,9$ %, $n = 7$, Tag 14: $23,3 \pm 3,2$ %, $n = 5$, $p < 0,05$),

Tag 7 und 14 (Tag 7: $16,7 \pm 2,8$ %, $n = 5$, Tag 14: $23,3 \pm 3,2$ %, $n = 5$, $p < 0,05$)

als statistisch signifikant verschieden angesehen werden. Wie bei der Eigenblutgruppe ist die Abnahme der relativen Wandfläche von Tag 14 zu 28 (Tag 14: $23,3 \pm 3,2$ %, $n = 5$, Tag 28: $16,9 \pm 2,6$ %, $n = 5$, $p < 0,05$) statistisch signifikant.

Die Einzelvergleiche in Abhängigkeit der Interventionsgruppen lieferten für die Dekapitationszeitpunkte Tag 0 / 3 / 7 statistisch nicht signifikante Ergebnisse.

Die im Verlauf an Tag 14 beschriebenen Peaks konnten ebenfalls in der Gegenüberstellung der Interventionsgruppen am Tag 14 beobachtet werden. Die Einzelvergleiche der relativen Wandfläche zwischen Sham ($14,6 \pm 1,5$ %, $n = 5$) und den jeweiligen Interventionsgruppen Eigenblut ($23,5 \pm 2,1$ %, $n = 5$), PDP ($19,6 \pm 3,4$ %, $n = 5$), BOX ($23,3 \pm 3,2$ %, $n = 5$) am Tag 14 war dabei stets statistisch

signifikant verschieden ($p < 0,05$). Die Wandflächen von Eigenblut, PDP und BOX unterschieden sich am Tag 14 nicht signifikant voneinander.

Am Tag 28 unterschieden sich die Werte der relativen Wandflächen in den vier Gruppen nicht signifikant untereinander (Abb. 19).

5.2.3 Arteria basilaris (BA)

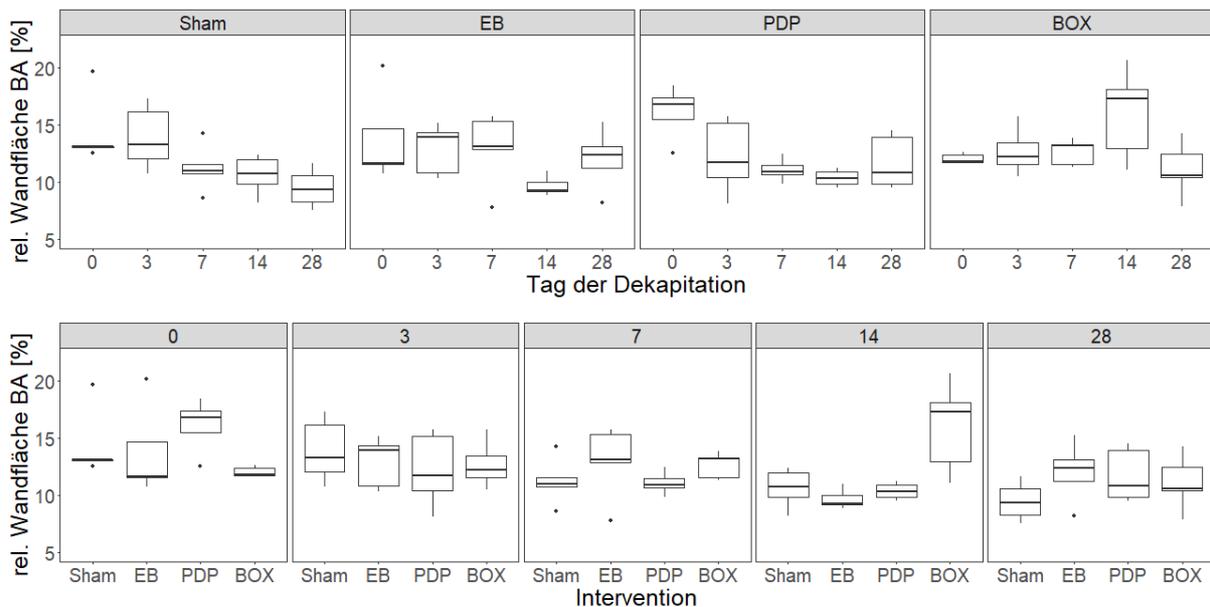


Abb. 20: Einfache Boxplots zur Darstellung der ermittelten Daten der Arteria basilaris (BA). Im oberen Teil der Abbildung ist die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes (0 / 3 / 7 / 14 / 28) innerhalb der jeweiligen Interventionsgruppe (Sham, EB, PDP, BOX) dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung wird die relative Wandfläche [%] in Abhängigkeit der unterschiedlichen Interventionsgruppen (Sham, EB, PDP, BOX) an den jeweiligen Dekapitationszeitpunkten (0 / 3 / 7 / 14 / 28) gezeigt. Einfacher Boxplot dargestellt mit Medianlinie, unterem (25%) und oberem Quartil (75%), Whisker (max. 1,5-fache Boxlänge) sowie Ausreißerpunkten.

Die Daten der BA zeigten eine statistische Signifikanz mit $p < 0,01$ im Test auf Interaktion von Dekapitationszeitpunkt und Interventionsgruppe. Wie für die PCA im vorangegangenen Ergebnisteil erfolgt eine getrennte Einzelbetrachtung der paarweisen Vergleiche in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes und der Interventionsgruppe.

Die Einzelvergleiche der relativen Wandfläche in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes ergaben für die Sham-Gruppe eine signifikante Reduktion

der relativen Gefäßwandfläche im zeitlichen Verlauf zwischen den Tagen 0 und 28 (Tag 0: $14,3 \pm 3,0$ %, $n = 5$, Tag 28: $9,5 \pm 1,8$ %, $n = 5$, $p < 0,05$).

Die in der Abbildung 20 erkennbaren Veränderungen innerhalb der Eigenblutgruppe bezüglich des Wandanteils über die Zeit erwiesen sich innerhalb der Interventionsgruppe als statistisch nicht signifikant verschieden.

Eine signifikante Verminderung der relativen Wandfläche im zeitlichen Verlauf war in der PDP-Gruppe zwischen Tag 0 und 7 (Tag 0: $16,1 \pm 2,6$ %, $n = 5$, Tag 7: $11,0 \pm 1,0$ %, $n = 5$, $p < 0,05$), Tag 0 und 14 (Tag 0: $16,1 \pm 2,6$ %, $n = 5$, Tag 14: $10,4 \pm 0,8$ %, $n = 5$, $p < 0,05$) zu beobachten.

In der BOX-Gruppe war das Maximum der relativen Wandfläche an Tag 14 zu erkennen, welches statistisch nicht signifikant erhöht blieb. Der Abfall der relativen Wandfläche von Tag 14 zu 28 (Tag 14: $16,0 \pm 3,9$ %, $n = 5$, Tag 28: $11,1 \pm 2,4$ %, $n = 5$, $p < 0,05$) war statistisch signifikant.

Für die Einzelvergleiche in Abhängigkeit der Interventionsgruppen ergaben sich für die Dekapitationszeitpunkte Tag 0 / 3 / 7 keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Am Tag 14 zeigte sich eine signifikante Zunahme der relativen Wandfläche der BOX-Gruppe ($16,0 \pm 3,9$ %, $n = 5$) im Vergleich zu den anderen Gruppen Sham ($10,6 \pm 1,7$ %, $n = 5$), Eigenblut ($9,7 \pm 0,9$ %, $n = 5$), PDP ($10,4 \pm 0,8$ %, $n = 5$).

Am Tag 28 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Wandflächen zwischen den vier Gruppen identifiziert werden (Abb. 20).

6 Diskussion

Diese Promotionsarbeit umfasste zwei Teilprojekte zur Untersuchung von kurz- und längerfristigen Auswirkungen von Hämabbauprodukten auf zerebrale arterielle Gefäße der Maus.

Im ersten Teilprojekt „Neurovaskuläre Kopplung“ wurden akute Hirnschnitte von 20-30 Tage alten (juvenilen) und mindestens 365 Tage alten (adulten) Mäusen, die verschiedenen pharmakologischen (Z-PDP A, Iberiotoxin) oder genetischen (BK-KO) Behandlungen unterzogen worden, mit einer konzentrischen Elektrode elektrisch stimuliert. Die resultierende Gefäßreaktion, bestehend aus einer initialen Vasokonstriktion und der anschließenden Vasodilatation, wurde mittels der Parameter Amplitude, Zeitpunkt der maximalen Kontraktion, Zeitkonstante Tau, Dilatation und der Größe der Fläche unter der gesamten Kurve (AUC) charakterisiert. Generell blieben die verschiedenen pharmakologischen Behandlungen nahezu ohne Einfluss auf die Dynamik der neuronal-induzierten Gefäßantwort. Das Alter der Versuchstiere nahm einen signifikanten Einfluss auf die Parameter des initialen Abschnitts der Gefäßkonstriktion (Amplitude und Zeitpunkt maximaler Kontraktion).

Im zweiten Teilprojekt „HDPs und Gefäßmorphologie“ wurden drei große arterielle Gefäße von fixierten, immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitten hinsichtlich des Aktinfaseranteils in der Gefäßwand nach verschiedenen Interventionen mit Eigenblut sowie den Hämabbauprodukten Z-PDP A+B und Z-BOX A+B über einen ausgewählten Zeitraum analysiert. Die intraparenchymale APA zeigte eine über 28 Tage konstant gleichbleibende Gefäßwandfläche trotz verschiedener Behandlungen mit Eigenblut, Z-PDP A+B oder Z-BOX A+B. Bei der PCA führten alle drei Interventionen zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßwandfläche im zeitlichen Verlauf. Für die BA konnte dies nur für Z-BOX A+B beobachtet werden.

6.1 Teilprojekt 1 „Neurovaskuläre Kopplung“

6.1.1 Diskussion der Methodik

Die Inkubation von HDPs an akuten Hirnschnitten der Maus zur Untersuchung intrakortikaler Gefäßreaktionen ist ein seit vielen Jahren etabliertes Modell in der Arbeitsgruppe Bioimaging am Universitätsklinikum Jena. Dabei konnten unter anderem die vasokonstriktorische Wirkung von PDPs und BOXes an mit *L*-NAME

(Joerk 2015, Langguth 2020, Schaefgen 2021, Ritter 2022) oder U-46619 (Daten noch nicht veröffentlicht) vorgespannten kortikalen Arteriolen nachgewiesen werden.

Die Auswahl der Tierart fiel auf den Organismus Maus, da sie hinsichtlich ihrer großen Ähnlichkeit mit dem menschlichen Genom bereits in vielen Studien zum Thema SAB und Vasospasmus verwendet wurde. Kurze Zyklusphasen der weiblichen Tiere von 4-5 Tagen sowie eine kurze anschließende Tragezeit von 18-22 Tagen mit dem Ergebnis von im Durchschnitt 4-9 Nachwuchstieren sowie kostengünstige Zuchthaltungskosten sprechen in der Wissenschaft seit langer Zeit für die Verwendung der Maus in Tierexperimenten (Hardy 2004, Ayadi et al. 2011). Aufgrund ihrer kurzen Lebenserwartung von 1-3 Jahren eignen sich Mäuse insbesondere zur Untersuchung altersabhängiger Veränderungen (Vanhooren und Libert 2013). Zudem gestaltete sich die Verfügbarkeit und Zucht der genetisch modifizierten Slo^{-/-}-Tiere durch die Verpaarung von zwei heterozygoten Slo^{+/-}-Tieren unkompliziert.

Die Wahl der kortikalen Arteriolen als zentrales Untersuchungsobjekt spielte in Hinsicht der Forschung der DCI nach SAB eine große Rolle. Während für den zerebralen Vasospasmus oftmals eine Diskrepanz zwischen angiografischen und symptomatischen Vasospasmus sowie der Therapieeffektivität besteht, ist die Rolle von kleineren arteriellen Gefäßen unzureichend verstanden (Geraghty und Testai 2017). 39 % des zerebralen Gefäßwiderstands gehen auf große zerebrale Arterien zurück, jedoch werden 40-50 % des zerebralen Gefäßwiderstands durch kortikal penetrierende Arteriolen, Kapillaren sowie Venolen gebildet (De Silva und Faraci 2016, Iadecola 2017). Kortikale Arteriolen werden auch als Widerstandsgefäße bezeichnet. Ihr Gefäßdurchmesser reguliert effektiv die Durchblutung des nachfolgenden Gefäßbaumes und demzufolge die Versorgung des Hirnparenchyms (Nishimura et al. 2007). Da in den tieferliegenden Bereichen des Hirnparenchyms zudem eine Abnahme der Kollateralisierung zu verzeichnen ist, steht die Beeinträchtigung der Funktion kortikaler Arteriolen eng in Zusammenhang mit möglichen symptomatischen neurologischen Defiziten bei Mikrovasospasmen (Pluta 2005, Nishimura et al. 2010). Die Funktion von kortikalen Arteriolen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten, ist die Interaktion von Neuronen, Gliazellen sowie glatten Gefäßmuskelzellen, die eine funktionelle Einheit bilden. Diese auch als neurovaskuläre Kopplung bezeichnete Struktur dient zur genauen Anpassung des vaskulären Durchmessers in Abhängigkeit des lokalen zerebralen Bedarfs von Sauerstoff und Glukose (Attwell et al. 2010). Ihre

Untersuchung am intakten Tier ist möglich, jedoch im Experiment sehr komplex abzubilden, sodass in der folgenden Arbeit ein vereinfachter Untersuchungsansatz mittels Messung der vaskulären Durchmesseränderung nach elektrischer Stimulation im akuten Hirnschnitt erfolgte.

Zur Stimulation wurde eine bipolare, konzentrische Elektrode verwendet, die in Kortexschicht VI in der räumlichen Nähe einer senkrecht durch den Kortex-ziehenden Arteriole platziert wurde. Als Grundlage des Experimentaufbaus lag die Arbeit von Prof. Dr. rer. nat. Holthoff vor. Er untersuchte intrinsisch optische Signale, die sich nach elektrischer Stimulation im Hirnschnittmodell von Ratten detektieren ließen. Diese intrinsisch optischen Signale ordneten sich senkrecht zum Stimulationsort an und konnten nach elektrischer Stimulation in Schicht VI im Sinne einer gesteigerten neuronalen Aktivität in Schicht II-VI nachgewiesen werden (Holthoff et al. 1994, Holthoff et al. 2007). Zum Ausschluss der direkten Stimulation des Gefäßes nach elektrischer Stimulation in Kortexschicht VI wurde im Hirnschnittmodell Tetrodotoxin, ein Na⁺-Kanal-blockierendes Neurotoxin zur Unterbindung der neuronalen Aktivität nach elektrischer Stimulation, eingewaschen. Unter diesen Bedingungen konnte keine Gefäßreaktion infolge der elektrischen Stimulation der Neurone gemessen werden und ließ die Annahme zu, dass ein geeignetes Modell zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung vorlag (Ergebnisse noch nicht veröffentlicht).

Zu Beginn dieser experimentellen Arbeit mussten häufig Experimente bei devitalen Hirnschnitten abgebrochen werden. Dabei stellte insbesondere die Elektrodenplatzierung eine Herausforderung dar. Oft hatte das Einführen der Elektrode in den Hirnschnitt eine direkte Kompromittierung der Vitalität des Hirnschnitts zur Folge. Diese Beobachtung konnte durch ein behutsames und sehr langsames Vorgehen bei der Platzierung der Elektrode sowie Optimierung anderer Umfeldfaktoren behoben werden. Dr. med. Schröder fiel bereits auf, dass das 9-stufige Stimulationsprotokoll (1-9 V) aufgrund der zeitlichen Dauer und der hohen Anzahl an Mehrfachstimulationen für die Hirnschnittvitalität ungeeignet sei (Schroeder 2022). Auch die ersten Versuche dieser Arbeit endeten aufgrund der langen Versuchsdauer und zahlreichen Stimulationsstärken häufig in devitalen Hirnschnitten beim Vitalitätstest mit Noradrenalin am Ende des Versuchstages. Eine Reduktion des initialen 9-stufigen Stimulationsprotokolls hin zu einem Protokoll mit nur vier aufsteigenden

Stimulationsstärken (2,4,6,8 V) war ein wesentlicher Faktor für die erfolgreichere Durchführung der Experimente. Weiterhin war das Erlernen einer zügigen und präzisen Präparation der Hirnschnitte essenziell. Hirnschnitte von adulten Tieren waren aufgrund ihrer geringeren Ischämietoleranz häufiger im Gegensatz zu Hirnschnitten von juvenilen Mäusen von der Präparationsart betroffen. Die im Verlauf der Arbeit zunehmend exaktere Präparation war mit einem höheren Erfolg der Durchführung der Experimente assoziiert.

Für die o.g. Punkte fand kurz nach Beginn der experimentellen Arbeit eine Optimierung statt, sodass keine Tiere im Verlauf mehr ausgeschlossen werden mussten. Dennoch muss erwähnt werden, dass die Qualität der Hirnschnitte der adulten Kontrollgruppe im Vergleich zu allen anderen Kohorten zu hinterfragen bleibt. In Abbildung 21 ist die relative Häufigkeit der Experimente mit signifikanter Kontraktion von > 5 % von der Baseline gegenüber der Spannungsstärke aufgetragen.

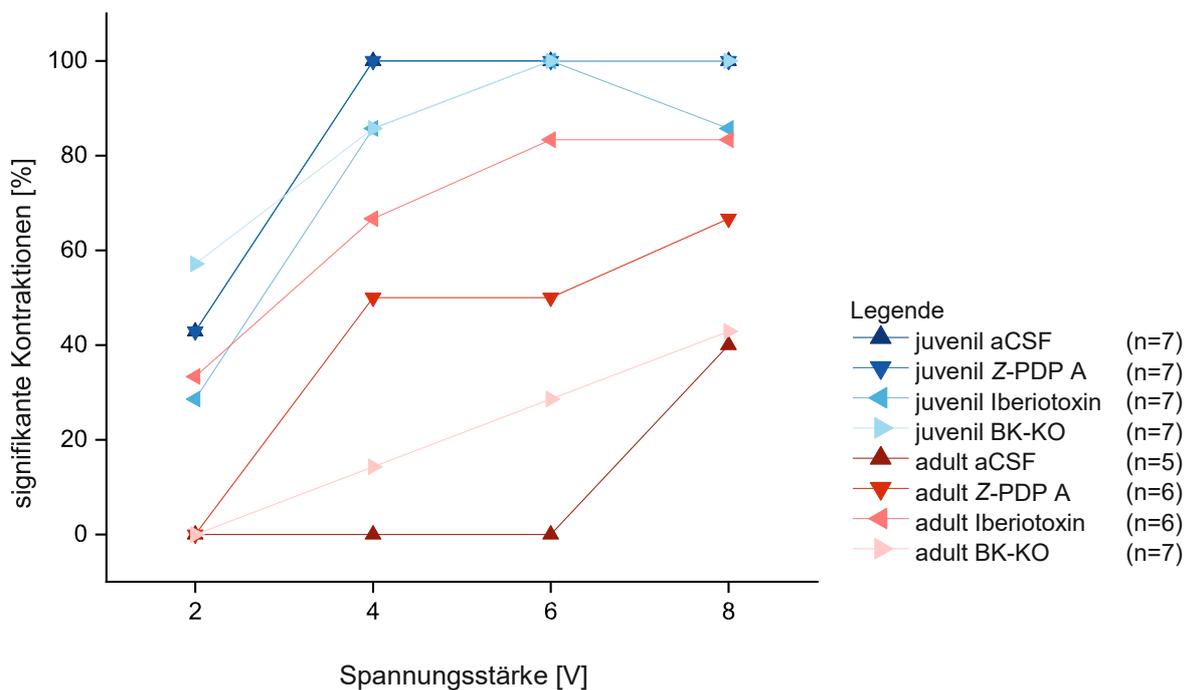


Abb. 21: Darstellung der Häufigkeit signifikanter Kontraktionen in Abhängigkeit der vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Für die Diskussion der Methodik ist relevant, dass die adulte aCSF-Kontrollgruppe in ihrer Anzahl von signifikanten Kontraktionen allen anderen Kohorten unterlegen ist. Dies ist am ehesten der Tatsache geschuldet, dass die adulte aCSF-Kontrollgruppe im experimentellen Ablauf als Erstes durchgeführt wurde. Die Reihenfolge der

Durchführung der Experimente war einerseits von der Geburtenrate der Jungtiere und deren Reifung für 30 Tage abhängig, andererseits durch das Zeitfenster der Alterung adulter Tiere (mind. 365 Tage) bestimmt. Zu Beginn der experimentellen Arbeit, die sich durch den im März 2020 verhängten Covid-19-Lockdown verzögerte, standen Versuche an Hirnschnitten von adulten Tieren im Vordergrund. Experimente an Hirnschnitten juveniler Tiere war aufgrund der eingeschränkten Jungtierzucht bei reduzierter Tierpflegendenkapazität im Covid-19-Lockdown nicht möglich. Wie bereits beschrieben, war eine gute solide Grundfertigkeit in der Präparation der akuten Hirnschnitte, die behutsame Elektrodenplatzierung sowie die Anpassung des Stimulationsprotokolls essenziell für die Vitalität des Hirnschnitts. Nachdem einige adulte Tiere in der initialen Lern- sowie Optimierungsphase bereits verwendet worden waren, war die Anzahl der übrigen adulten Versuchstiere limitiert. Bis zum Abschluss der experimentellen Arbeit waren nicht mehr genügend Tiere für die Aufstockung der adulten Kohorte bis $n = 7$ verfügbar, sodass die aktuelle adulte aCSF-Kontrollgruppe von einer geringeren Stichprobengröße sowie insgesamt geringeren Experimentiererfahrung dominiert ist, was bei der folgenden Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte.

Das aufsteigende Stimulationsprotokoll (2,4,6,8 V) diene insbesondere dazu, Informationen über unterschiedliche Sensitivitäten der neurovaskulären Kopplung und Gefäßreaktion aufzunehmen. In Abbildung 21 wird ersichtlich, dass mit zunehmender Stimulationsstärke eine erhöhte Anzahl an Experimenten signifikante Kontraktionen aufweisen. Eine weitere Anpassung des Stimulationsprotokolls, z.B. mit 4 V oder 6 V als einzige Stimulationsstufe, wäre in Zukunft denkbar. Dies würde eine Verminderung der multiplen zeitintensiven Stimulationen bedeuten sowie eine geringere Verzerrung der Ergebnisse durch die Reduktion des metabolischen Verbrauchs des Hirnschnitts nach Mehrfachstimulationen. Denkbar wäre dafür die Untersuchung von mehreren kortikalen Arteriolen in mehreren Hirnschnitten einer Maus, sodass im Sinne der 3 R-Regel mehr Daten aus einer Maus generiert werden können und die Anzahl der Versuchstiere reduziert wird.

6.1.2 Diskussion der Ergebnisse

6.1.2.1 aCSF-Kontrollgruppen

In dieser Arbeit konnte sowohl für juvenile als auch adulte aCSF-Kontrollgruppen eine Vasokonstriktion mit einer Amplitude von im Durchschnitt 12 ± 1 % nach elektrischer Stimulation verzeichnet werden. Dies steht im Gegensatz zu Angaben aus der Literatur, wo eine Vasodilatation, wie sie im Rahmen der neurovaskulären Kopplung physiologisch zu erwarten ist, mit einem Betrag von etwa 10 % zur Baseline regelhaft beschrieben wird (Zonta et al. 2003, Koide et al. 2012).

In Einklang mit den Daten steht der zeitliche Verlauf der Gefäßreaktion. Die Gefäßreaktion ist in dieser Arbeit, aber auch in den o.g. Studien innerhalb der ersten Minuten auftretend und nähert sich anschließend wieder der Baseline an. Unterschiede, welche möglicherweise zu der beobachteten Vasokonstriktion führten, sollen folgend näher beleuchtet werden. Dabei handelt es sich um Experimentierdauer, pharmakologische Vorspannung der Arteriolen zur Simulation eines Gefäßtonus, dem Stimulationsprotokoll sowie der Oxygenierung der Perfusionslösung.

In diesem Protokoll wurde sich für ein Vorgehen mit einer Inkubationszeit von 100 min entschieden. Die Gesamtexperimentierdauer von etwa 200 min mit Beginn der Elektrostimulation nach 100 min ist nicht mit üblichen Versuchen zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung zu vergleichen. Es bleibt offen, ob die Arteriolen nach dieser langen Inkubationszeit ohne Einwaschung einer Vorspannungssubstanz bereits maximal dilatiert waren, sodass eine adäquate Vasodilatation nach elektrischem Impuls nicht stattfinden konnte. Denkbar wäre, eine aCSF-Kontroll-Versuchsreihe ohne Inkubationszeit durchzuführen, um abzuschätzen, welchen Einfluss die initiale Inkubationszeit auf die neuronal-induzierte Gefäßreaktion der Kontrollgruppe hat. Es sollte weiterhin evaluiert werden, ob eine 100-minütige Inkubationszeit für die Substanzen notwendig ist.

Bei Untersuchungen der Wirkung von Hämabbauprodukten auf den statischen Gefäßtonus in der Arbeitsgruppe wurde u.a. L-NAME, ein Inhibitor der eNOS/nNOS, verwendet, um den im Hirnschnittmodell fehlenden Gefäßtonus zu simulieren (Ritter 2022). In der Literatur wird die Untersuchung an vorgespannten Gefäßen als notwendig beschrieben, um eine möglichst physiologische Gefäßreaktion der neurovaskulären Reaktion im Hirnschnittmodell zu ermitteln (Straub und Nelson 2007). Allerdings reduziert L-NAME die NO-Bioverfügbarkeit und beeinflusst so

möglicherweise die neurovaskuläre Kopplung (Kobari et al. 1994, Liu et al. 2008). Als alternative Substanz zur Simulation eines Gefäßtonus führten Straub und Nelson U-46619 an, welches ebenfalls bei Experimenten von Koide et al. sowie Zonta et al. Verwendung fand (Straub und Nelson 2007, Koide et al. 2012, Zonta et al. 2003). U-46619 ist ein Agonist des Thromboxan-Rezeptors, dessen Aktivierung eine Vasokonstriktion im Sinne einer Gefäßvorspannung NO-unabhängig simuliert. Jedoch werden über ebendiesen Rezeptor antagonistische Effekte durch Moleküle wie PGE₂ und EETs vermittelt, die an astrozytären Endfüßchen im Rahmen der neurovaskulären Signalvermittlung freigesetzt werden (Metaea und Newman 2006, Attwell et al. 2010). Im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe stellte sich heraus, dass unter U-46619-Inkubation weiterhin PDP- und BOX-induzierte Vasokonstriktionen stattfanden (Daten noch nicht veröffentlicht). Zum Experimentierzeitpunkt dieser Arbeit lagen diese Daten nicht vor. Es wurde auf eine pharmakologische Vorspannung der Gefäße verzichtet, um einen möglichst unverfälschten Eindruck der Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation des Hirnschnitts zu erhalten.

Weiterhin ist bei einer elektrischen Stimulation mit einer vorgegebenen Spannung (2,4,6,8 V) unzureichend geklärt, mit welcher Stromstärke der Hirnschnitt stimuliert wurde, da die fließende Stromstärke interindividuell abhängig von den Gewebewiderstandsverhältnissen im Hirnschnitt ist. In vergleichbaren Arbeiten zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung wird die Stromstärke fest eingestellt (Zonta et al. 2003, Koide et al. 2012). Während dieser Arbeit jedoch Untersuchungen von Holthoff et al. sowie weitere Vorarbeiten zur elektrischen Stimulation des Hirnschnitts der Arbeitsgruppe mit Variation der Spannung vorlagen, wurde sich für dieses Vorgehen aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der Daten entschieden (Holthoff et al. 1994, Ritter 2022, Schroeder 2022).

Eine mögliche Erklärung der vasokonstriktorischen Effekte nach elektrischer Stimulation liegt womöglich in der perivaskulären Kaliumkonzentration. In der Literatur wird berichtet, dass perivaskuläres Kalium > 20 mM mit einer Inversion der neurovaskulären Kopplung assoziiert ist (Filosa et al. 2006, Girouard et al. 2010, Koide et al. 2012). Das bedeutet eine Umkehr der Vasodilatation hin zu einer Vasokonstriktion nach elektrischer Aktivität. Diesem Effekt wurde mit einer ausreichenden Regenerationszeit nach der Hirnschnittpräparation sowie nach der jeweiligen elektrischen Stimulation begegnet. Dennoch ist ohne eine intraparenchymale

Kalium-Messelektrode im Hirnschnitt keine genaue Aussage über den zeitlichen Verlauf der perivaskulären Kalium-Konzentration möglich (Holthoff und Witte 1996). Hier kann nur spekuliert werden, dass eine womögliche Überstimulation mit den gewählten Spannungsstärken eine Ionenverschiebung auslöst, die zu einer erhöhten perivaskulären Kaliumkonzentration mit einer folgenden Umkehr der Gefäßantwort hin zu einer Vasokonstriktion nach elektrischer Aktivität führt. Dies ist jedoch aufgrund der Ergebnisse von Holthoff und Witte am ehesten auszuschließen, da perivaskulär eine extrazelluläre Kalium-Konzentration von 10 mM nach elektrischer Stimulation des Hirnschnitts gemessen wurden (Holthoff und Witte 1996).

Zudem wird von einem Zusammenhang der Vasokonstriktion und einer hohen Sauerstoffkonzentration in der Perfusionslösung des Hirnschnitts berichtet. Im experimentellen Design zur Untersuchung an Hirnschnittmodellen wird häufig ein Sauerstoff 95 % - Carbogen 5 % - Gemisch verwendet (Filosa 2010). Dies entspräche einer Gewebsoxygenierung von etwa 100-150 μ M im Hirnschnittmodell, wohingegen unter physiologischen *in vivo*-Bedingungen eine Oxygenierung von 20-60 μ M zu erwarten wäre. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass eine abnorm hohe Oxygenierung eine paradoxe neurovaskuläre Kopplung verursacht und eine Vasokonstriktion nach elektrischer Aktivität zur Folge hat (Offenhauser et al. 2005, Attwell et al. 2010). In dem vorliegenden Versuchsdesign wurde ebenfalls unter supraphysiologischen Oxygenierungsbedingungen gearbeitet. Dies könnte eine mögliche Ursache der beobachteten Vasokonstriktion in den aCSF-Kontrollgruppen darstellen. Für zukünftige Experimente an Hirnschnitten wird eine Perfusion der aCSF-Perfusionslösung mit Sauerstoff von 20 % empfohlen (Bojovic et al. 2022).

Unter Berücksichtigung der bisherigen beleuchteten Faktoren erfolgt nachfolgend die Diskussion des Einflusses von Interventionen sowie Alter auf die neuronal-induzierte Gefäßantwort.

6.1.2.2 Einfluss der Interventionen

In der statistischen Auswertung des Einflusses von Z-PDP A oder Iberiotoxin konnten bezogen auf alle fünf Parameter (Amplitude, Zeitpunkt maximaler Kontraktion, Tau, Dilatation, AUC) keine signifikanten Unterschiede zur aCSF-Kohorte identifiziert werden.

Iberiotoxin wirkt in der Theorie inhibitorisch auf BK_{Ca}-Kanäle (Gao und Garcia 2003). Der BK_{Ca}-Kanal wird ubiquitär exprimiert und setzt sich je nach Gewebelokalisation

aus vier porenformenden α -Untereinheiten und akzessorischen β - oder γ -Untereinheiten zusammen. In Geweben des zentralen Nervensystems wird der BK_{Ca}-Kanal um die β_4 -Untereinheit ergänzt, während bei glatten Gefäßmuskelzellen die β_1 -Untereinheit vorliegt. Die Studienlage beschreibt eine selektive Resistenz der β_4 -Untereinheit gegenüber Iberiotoxin, sodass eine selektive Wirkung des Iberiotoxins auf die glatten Gefäßmuskelzellen der neurovaskulären Einheit angenommen werden kann (Meera et al. 2000, Brenner et al. 2000, Wang et al. 2014). An glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt die Öffnung der BK_{Ca}-Kanäle physiologisch einen K⁺-Ausstrom mit Hyperpolarisierung der Zelle und somit die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Contreras et al. 2013). Demzufolge wäre bei Iberiotoxin-Einwirkung ein Unterschied zur aCSF-Gruppe im Sinne einer reduzierten Vasodilatation (Tau, Dilatation) nach der initialen Kontraktion zu erwarten. Dieser Effekt konnte nicht gezeigt werden. Es sollte unter Berücksichtigung der zuvor in Kapitel 6.1.2.1 diskutierten Punkte in Erwägung gezogen werden, dass ein adäquater Effekt des Iberiotoxins nicht detektiert werden konnte.

Eine Resistenz der β_4 -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals gegenüber Z-PDP A ist bislang nicht bekannt. An Astrozytenendfüßchen triggert ein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg die Öffnung des BK_{Ca}-Kanals. Der folgende K⁺-Efflux über den BK_{Ca}-Kanal führt zum perivaskulären Kaliumanstieg. Eine erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration > 20 mM steht mit einer Inversion der neurovaskulären Kopplung im Sinne einer Vasokonstriktion in Verbindung (Filosa et al. 2006, Straub und Nelson 2007). Folglich stehen sich die Effekte (Vasokonstriktion und Vasodilatation) an den unterschiedlichen BK_{Ca}-Expressionsorten (Astrozyten und glatte Gefäßmuskelzellen) entgegen. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für die gleichartigen Ergebnisse der Z-PDP A-Kohorten gegenüber den aCSF-Kohorten. Daneben wurde nach SAB insbesondere ein starker Ca²⁺-Anstieg in Astrozyten beschrieben (Koide et al. 2012), was eine vermehrte Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen auslöst (Girouard et al. 2010, Contet et al. 2016). Hier müsste weiter der Frage nachgegangen werden, ob Z-PDP A die Ca²⁺-induzierte Signalkaskade in Astrozyten beeinflussen und darüber mit den BK_{Ca}-Kanälen in Interaktion treten kann.

Die dritte „Interventionsgruppe“ war die BK-KO-Gruppe, die sich von den anderen Gruppen dadurch unterschied, dass die Ausschaltung der BK_{Ca}-Kanal-Funktion nicht unmittelbar vor Versuchsbeginn akut ereignete, sondern bereits seit der Geburt der Tiere aufgrund des genetisch konventionellen Knockouts existierte. Für diese Gruppen

wurde in Bezug auf die untersuchten Parameter der Gefäßantwort nach Elektrostimulation kein Unterschied in der initialen gefäßkonstriktiven Phase (Amplitude, Zeitpunkt maximaler Kontraktion) entdeckt, allerdings in der dilatativen Phase (Tau). Dabei unterschieden sich die Tau-Werte der aCSF-Kontrollgruppe (209 ± 38 s) von der BK-KO-Gruppe (385 ± 63 s) signifikant (Abb. 22). Die Arteriolen der BK-KO-Tiere dilatierten im Vergleich zur Kontrolle langsamer. Dies bestätigte die der Arbeit zugrundeliegende bisherige Annahme, dass BK_{Ca} -Kanäle eng mit der vaskulären Antwort nach elektrischer Stimulation verknüpft sind und dass sie modulierend im Sinne einer schnelleren Vasodilatation einwirken. Es bleibt die Frage offen, weshalb die akute Inhibition der BK_{Ca} -Kanäle mittels Iberiotoxin nicht zum gleichen Ergebnis führte. Es gibt die Annahme, Iberiotoxin hätte eine schlechte Gewebegängigkeit und könne daher einen genetischen Knockout nicht nachahmen (Sprossmann et al. 2009).

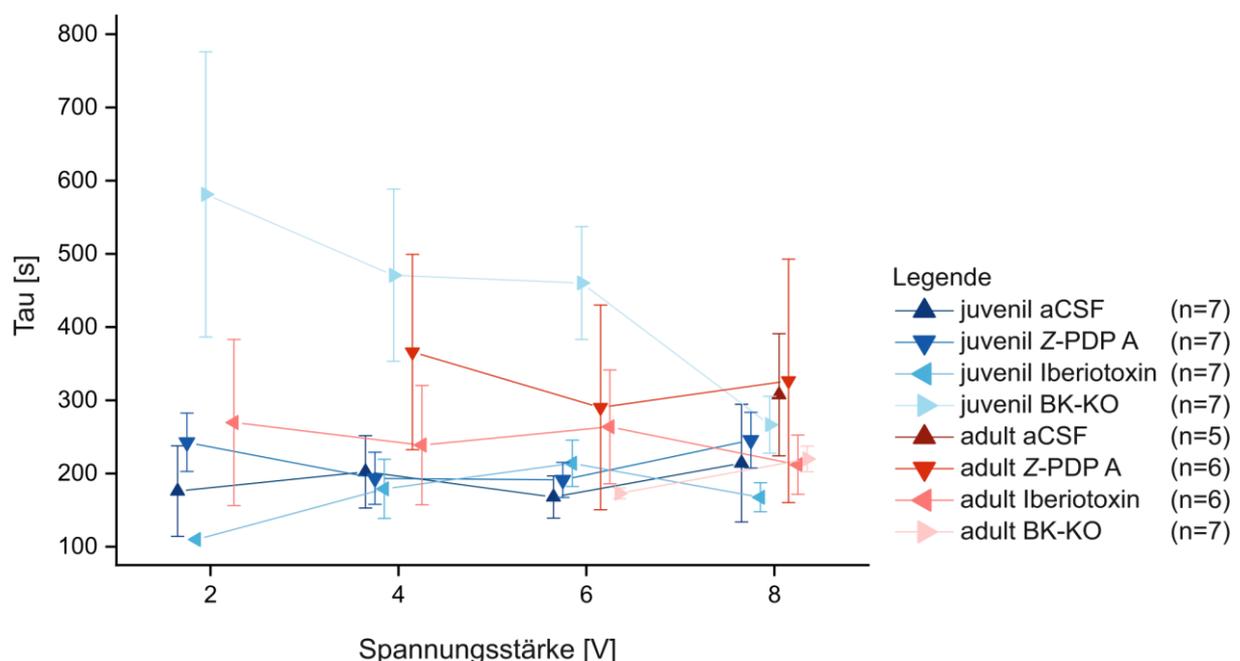


Abb. 22: Mittelwerte und Standardfehler des Parameters Zeitkonstante (Tau) der Aufweitung des Gefäßes nach initialer Kontraktion nach elektrischer Stimulation in Abhängigkeit der vier Stimulationsspannungsstärken (2,4,6,8 V).

Vergleicht man nur die juvenilen und adulten BK-KO-Gruppen, fallen allein optisch deutlich erhöhte Tau-Werte der juvenilen gegenüber den adulten BK-KO Tieren auf. Während adulte BK-KO Tiere vorwiegend den anderen Interventionsgruppen gleichen, scheinen die juvenilen Tiere am ehesten zur o.g. Statistik beizutragen (Abb. 22). Diese Beobachtung ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass bei den Experimenten ein

konventioneller BK-Knockout vorlag. Durch die bereits seit Geburt der Tiere bestehende genetische Funktionslosigkeit des Kanals, ist eine Kompensation im Laufe des Tierlebens denkbar. Ein spezifischer Tamoxifen-induzierter Knockout wenige Tage vor Beginn des Experiments oder ein Zell-spezifischer Knockout wären Alternativen, um eine mögliche Kompensation wie beim konventionellen Knockout im Alter zu eruieren.

6.1.2.3 Einfluss des Alters

Wie in der Arbeitsgruppe mehrfach demonstriert, spielte das Alter einen signifikanten Einfluss auf die neuronal-induzierte Gefäßantwort. Auch in dieser Arbeit konnte erneut ein statistisch-signifikanter Unterschied der Amplitude, des Zeitpunkts maximaler Kontraktion sowie der AUC zwischen juvenilen und adulten Tieren identifiziert werden. Diese Parameter charakterisieren den initialen Teil der neuronal-induzierten Gefäßantwort. Altersphysiologische Prozesse, wie z.B. eine strukturelle Umgestaltung der Gefäßwand mit Veränderung des Verhältnisses von elastischen Fasern und Kollagenfasern, Abnahme der Anzahl und Funktionalität von glatten Gefäßmuskelzellen, veränderte Regenerationsfähigkeit von Endothelzellen sowie reduzierte antioxidative Kapazitäten begründen eine abgeschwächte Gefäßkonstriktion von adulten gegenüber juvenilen Tieren (Samiec et al. 1998, Najjar et al. 2005, Tesauro et al. 2017, Ungvari et al. 2020). Diese Altersabhängigkeit ist ebenfalls für SAB-Patienten beschrieben. Jüngere Patienten haben ein erhöhtes Risiko an angiographischen Vasospasmen zu erkranken (Charpentier et al. 1999, Malinova et al. 2016).

6.2 HDPs und Gefäßmorphologie

6.2.1 Diskussion der Methodik

Der zweite Teil der Arbeit war in ein Promotionsarbeiten-übergreifendes Projekt eingebettet, sodass sich die Methodik weitestgehend an der vorangegangenen Arbeit (Joerk et al. 2019, Schroeder 2022) orientierte. Im Folgenden wird zur besseren Übersichtlichkeit PDP statt Z-PDP A+B und BOX statt Z-BOX A+B verwendet.

Zur SAB-Induktion bei Nagetieren existieren verschiedene Modelle. Zur Simulation einer SAB besteht die Möglichkeit einer endovaskulären Perforation einer zerebralen Arterie. Dabei wird ein stabiler 3-0 Prolene-Faden über die intraoperativ freigelegte A. carotis interna bis nach intrakranial vorgeschoben. Der Faden perforiert die Arterie an der intrakraniellen Aufteilung von A. carotis interna in A. cerebri media und A. cerebri anterior im Bereich des Circulus arteriosus Willisii (Bederson et al. 1995, Sehba 2014). Diese invasive Prozedur lässt eine Kontrolle des Blutvolumens sowie Reruptur nur schwierig steuern und erklärt die hohe Mortalität von bis zu 66 % (Gules et al. 2002, Leclerc et al. 2018). Die Methode fand in der aktuellen Arbeit keine Verwendung, da neben den genannten Nachteilen zusätzlich nur eine Induktion der SAB ohne Möglichkeit der externen Applikation von HDPs möglich gewesen wäre.

Ein dafür geeignetes und ebenfalls häufig angewandtes Modell stellt die intrathekale Injektion dar (Leclerc et al. 2018). Hierbei sind zwei Methoden in der wissenschaftlichen Praxis etabliert: die einfache oder doppelte intrathekale Applikation des Blutes in die intraoperativ freigelegte Cisterna magna. Eine intensiviertere SAB wird als Vorteil einer doppelten Injektion mit einem zeitlichen Abstand von 24-48 Stunden angeführt (Goursaud et al. 2021). Aus der Klinik ist ebenfalls von SAB-Patienten bekannt, dass größere Blutungsmengen mit dem häufigeren Auftreten von Vasospasmen assoziiert sind (Findlay et al. 2016). Jedoch steigt das Risiko der Mortalität nach doppelter intrathekaler Injektion auf bis zu 9 %, während bei der einmaligen Blutinjektion eine hohe Überlebenschance überwiegt (Gules et al. 2002). Eine doppelte Injektion wurde laut dem systematischen Review von Goursaud et al. bisher nur bei Ratten durchgeführt (Goursaud et al. 2021). Für das Projekt wurde sich aus organisatorischen Gründen sowie der geringeren Mortalität für eine singuläre intrathekale Applikation der Substanzen entschieden.

Die direkte Applikation des Volumens (30 µl) gestaltete sich in der Durchführung schwierig. In einigen wenigen Fällen konnte beobachtet werden, dass nach der

Entfernung der Punktionsnadel Liquor aus der Punktionsstelle herauslief. Es lässt sich nicht sicher sagen, ob das gesamte injizierte Volumen intrathekal verblieb. Dies wurde auch durch die Heparinisierung des Eigenbluts vor Injektion begünstigt. Die Heparinisierung mittels beschichteter Glaskapillaren war notwendig, damit die Gerinnung in den Schlauchsystemen bei Injektion unterbrochen wird. Zur Umgehung der Komplikation des Rücklaufs des injizierten Volumens wird beschrieben, dass vor der Applikation zunächst CSF aus dem Subarachnoidalraum abgezogen werden kann, bevor das autologe Blut injiziert wird (Leclerc et al. 2018).

Es sollte erwähnt werden, dass diese Modelle zwar eine Untersuchung von Blut und Hämabbauprodukten auf zerebrale Gefäße zulassen, jedoch die häufigste Ursache einer SAB, die Bildung und Ruptur eines Aneurysmas, nicht berücksichtigen. Pathophysiologische Prozesse, wie endotheliale Veränderungen oder ein lokales proinflammatorisches Milieu rund um das Aneurysma, wirken möglicherweise über additive oder synergistische Effekte auf die komplexe Pathogenese nach SAB ein (Leclerc et al. 2018).

Am jeweiligen Tag der Dekapitation wurden die Hirne entnommen und in eine 4 %ige Formaldehydlösung gelegt. Diese Art der Immersionsfixierung hat den Nachteil, dass Gefäße, die im Querschnitt physiologisch durch das in ihnen zirkulierende Blutvolumen kreisrund gefüllt sind, nach der Dekapitation kollabieren. Andere Studien bevorzugen daher die kardiale Perfusion mit 4 %iger Formaldehydlösung. Dabei wird der linke Ventrikel des Herzens mit einer Nadel punktiert und die Lösung appliziert, sodass diese im gesamten Körperkreislauf verteilt wird, während das rechte Herz zum Ablassen des Blutes kanüliert wird. Wichtig ist dabei das Aufrechterhalten des systolischen Blutdrucks, damit es nicht zur Fixationsversagen des peripheren Gewebe kommt (Fix und Garman 2000). Mithilfe dieser Methode kann der Kollabierung der Gefäße entgegengewirkt werden. Andererseits ist bei unkontrolliertem erhöhten Perfusionsdruck das Risiko erhöht, dass die Gefäße artifiziell maximal dilatieren, sodass die Wanddicke nicht mehr adäquat bestimmbar ist (Leclerc et al. 2018).

Da in den vorangegangenen Studien durchgehend eine Immersionsfixierung mit Formaldehyd-Lösung angewendet wurde, war eine Änderung des Protokolls für diese Arbeit nicht vorgesehen. Jedoch wurde die Auswertung der Rohdaten erneut evaluiert. Die bloße Vermessung des Gefäßinnendurchmessers sowie Bestimmung der Gefäßwanddicke wie bei vergleichbaren Studien (Gules et al. 2002, Chen et al. 2011)

erschien bei stark deformierten Gefäßlumina und ungleichmäßiger Aktinschicht ungeeignet. Stattdessen wurde die in ImageJ direkt ausmessbare Gefäßwandfläche (A_{Wand}) als neuer Parameter in Betracht gezogen. Eine Verminderung der Gefäßwandfläche kann im Sinne einer Vasodilatation und eine Vergrößerung im Sinne einer Vasokonstriktion interpretiert werden. Denkbar ist auch eine Abnahme oder Proliferation von Aktinfasern als Ausdruck der Gefäßwandflächenänderung.

Um interindividuelle Unterschiede von verschiedenen Gefäßgrößen auszugleichen und folgend vergleichbar zu machen, wurde die ausgemessene Gefäßwandfläche (A_{Wand}) auf den theoretischen Gesamtgefäßquerschnitt (A_{Quer}) normiert. Dafür war zusätzlich die Berechnung des theoretischen Gesamtgefäßquerschnitts aus der Vermessung des Außenumfangs des kollabierten Gefäßes notwendig ($U = \pi \cdot 2r$; $A_{\text{Quer}} = \pi \cdot r^2$). Folglich wurde der neue Parameter relative Wandfläche (∂A_{rel}) aus dem Quotienten von Wandfläche zu idealisierter Gefäßfläche errechnet:

$$\partial A_{\text{rel}}[\%] = A_{\text{Wand}} / A_{\text{Quer}} \times 100$$

Die Gefäße, welche auf den neu definierten Parameter untersucht wurden, unterschieden sich hinsichtlich ihrer Lage im Gehirn. Als Kontrollgefäß diente die A. azygos pericallosa (APA). Diese hatte aufgrund ihrer intraparenchymalen Lage keinen direkten Kontakt zum Subarachnoidalraum und den injizierten Substanzen. Die APA, welche beim Menschen nicht existiert, entspringt bei der Maus anatomisch aus der von der A. carotis interna abgehenden A. cerebri anterior und versorgt den anterior-medialen Frontallappen (Dorr et al. 2007). Durch ihre zentrale Lage über dem Corpus callosum ist sie besonders vor Manipulationen während der Präparation, Fixierung und Färbung geschützt. Als Vertreter für extraparenchymale Arterien mit direktem Kontakt zum Subarachnoidalraum wurden die A. communicans posterior (PCA) sowie die A. basilaris (BA) gewählt. Beide Gefäße sind aus dem Circulus arteriosus Willisii des Menschen bekannt. Auch bei Mäusen entsteht die mittig vor dem Hirnstamm verlaufende A. basilaris als Zusammenschluss aus der paarigen in den Schädel ziehenden Aa. vertebrales. Als Verbindungsast zwischen A. basilaris und A. carotis interna existiert die paarige A. communicans posterior, welche ventro-posterior am Großhirn liegt und das posteriore Ende des Hypothalamus einschließt (Dorr et al. 2007). Sie bildet die wichtigste arterielle Anastomose zwischen dem karotidalen und vertebrobasilären Stromgebiet.

6.2.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.2.1 Kontrollgefäß APA

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Wandfläche durch Interventionen oder Zeitpunkte der Dekapitation. Dies entspricht der Theorie, dass intrazerebrale Gefäße nicht in direktem Kontakt mit der Zerebrospinalflüssigkeit und den darin enthaltenen Substanzen stehen, sodass keine Veränderungen der relativen Wandfläche auftreten.

6.2.2.2 Extraparenchymale PCA

Bei der Auswertung der relativen Wandfläche in Abhängigkeit des Dekapitationszeitpunktes fiel in der Sham-Gruppe auf, dass die relative Wandfläche im zeitlichen Verlauf zum Tag 14 bzw. 28 signifikant abnahm. Eine solche Abnahme der Wandfläche kann im Sinne einer Vasodilatation interpretiert werden. Das Ergebnis widerspricht der Annahme, dass die Kontrollgruppe ohne Applikation einer vasoaktiven Substanz über die Zeit stabil bleibt und keine Veränderung der Gefäßwand zeigt. Zur Überprüfung der grundlegenden Annahme, ob die Gefäße von verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Tieren miteinander verglichen werden können, wurde der Tag 0 als eigenständige Gruppe hinzugefügt. Hierbei wurden 20 Tiere im Alter von 90-200 Tagen zu unterschiedlichen Gruppen (Sham, PDP, BOX, EB) randomisiert und ohne Operation sowie Intervention an einem zufällig festgelegten Tag 0 nativ dekapitiert. Die Gefäßwandanalysen dieser vier, in der Theorie gleichartigen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Gefäßwandfläche. Daraus wurde abgeleitet, dass sich die Wandflächen der jeweiligen Gefäßtypen interindividuell über die Zeit stabil verhalten. Dieser Grundsatz konnte sich nicht in der Sham-Gruppe bestätigen. Der Unterschied zwischen den Sham Tieren von Tag 3 / 7 / 14 / 28 und den „Sham“ Tag 0 lag in der Operation der Tiere an den anderen Tagen, welche die Tiere von Tag 0 nicht erlebten. Es sollte hinterfragt werden, ob Bedingungen der Schein-OP durch evtl. Narkose oder die Operation selbst zu einer reaktiven Vasodilatation im postoperativen Verlauf führen. Diese Beobachtung der Vasodilatation im zeitlichen Verlauf konnte für die Sham-Gruppe der BA ebenfalls getätigt werden, allerdings nicht für die Sham-Gruppe der APA. Eine Erklärung kann derzeit nicht geliefert werden.

Die Applikation von Eigenblut führte im zeitlichen Verlauf zu einem signifikanten Anstieg der relativen Wandfläche am Tag 14, der sich zum Tag 28 zurückbildete. Eine Vergrößerung der relativen Wandfläche im Sinne der durch Vasokonstriktion ausgelösten Verringerung des Gefäßquerschnitts bei gleichbleibender Aktinfaserschicht entspricht dem klinischen Bild des Vasospasmus nach einer SAB. In anderen Studien mit Einzelinjektionen von autologem Blut in die Cisterna magna von Ratten wurden Vasospasmen bereits am 2. oder 3. Tag nach der Injektion detektiert (Ram et al. 1991, Gules et al. 2002). Nach doppelter Injektion von autologem Blut wurden Vasospasmen bis zum 5. postoperativ beobachtet (Güresir et al. 2010), jedoch selten darüber hinaus (Goursaud et al. 2021). Die Zunahme der relativen Gefäßwandfläche nach Eigenblutapplikation kann möglicherweise auch durch einsetzende Umbauprozesse der Gefäßwand zwischen Tag 7 und 14 erklärt werden. Allerdings scheint die Gefäßwand am Tag 28 wieder der initialen Tage zu gleichen, was gegen einen Umbau der Aktinfaserschicht spricht. Dennoch kann aus der alleinigen Untersuchung von Aktinfasern keine weitere Aussage über das Endothel oder Kollagen erfolgen. Hier werden die Daten daher eher im Sinne einer pathologischen Gefäßverengung mit Reversibilität interpretiert.

Nach der Injektion von BOX konnte der vasokonstriktive Effekt an Tag 14 sowie dessen Reversibilität zu Tag 28 ebenfalls nachgewiesen werden. Indem sich dieses Hämabbauprodukt wie die Positivkontrolle Eigenblut verhält, scheint es die Hypothese „BOX als Hämabbauprodukt führt zur Vasokonstriktion zerebraler Arterien“ zu bestätigen.

Für PDP war die Zunahme der relativen Wandfläche zum Tag 14 statistisch nicht signifikant, was am Ehesten dem unteren Ausreißer des Boxplots geschuldet ist.

Der Vergleich der relativen Wandflächen der verschiedenen Interventionsgruppen an den jeweiligen Dekapitationszeitpunkten bekräftigt die bisherigen Beobachtungen, dass Blut sowie die Hämabbauprodukte BOX und PDP im Vergleich zur Negativkontrollgruppe Sham am Tag 14 einen vasokonstriktiven Effekt zeigen. Dieser Effekt ist ähnlich stark, da sich keine signifikanten Unterschiede der relativen Wandflächen im Vergleich zwischen den Interventionen zeigen. Im Anschluss an Tag 28 dilatieren die Gefäße wieder auf das gleiche Niveau wie die Sham-Gruppe.

6.2.2.3 Extraparenchymale BA

Für die BA konnten ähnliche Ergebnisse wie für die PCA beobachtet werden. Die relative Wandflächenänderung der Sham-Gruppe im zeitlichen Verlauf wurde bereits im oberen Absatz erläutert.

In der Eigenblut-Gruppe der BA wurde im Gegensatz zur Eigenblut-Gruppe der PCA keine signifikante Gefäßreaktion im zeitlichen Verlauf, besonders an Tag 14, verzeichnet. Eine naheliegende Erklärung liegt in der Rohdatenanalyse der BA. Jede Gruppe setzt sich aus einzelnen Hirnschnitten von jeweils 5 Tieren zusammen. In der Auswertung wurde stets darauf geachtet, dass pro Tier mindestens 3, im Optimalfall mind. 6 Querschnitte der BA ausgewertet wurden. Die BA war aufgrund ihrer exponierten Lage am Hirnstamm während des Schneidens des kryokonservierten Hirns selten komplett zu erhalten. In manchen Präparaten war sie abgerissen oder beschädigt, sodass insgesamt weniger Querschnitte pro Tier in die Mittelwertbildung eingingen. Dies führt dazu, dass Ausreißer einen größeren Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Für die PCA floss bei doppelter Anlage des Gefäßes eine nahezu doppelt so hohe Anzahl an Querschnitten in die Auswertung ein, was die Ergebnisse insgesamt homogener und aussagekräftiger macht. In der Literatur wird von stärkeren Vasokonstriktionen der BA im Vergleich zur PCA nach einer intrathekalen Injektion von autologem Blut berichtet (Leclerc et al. 2018). Dies konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Die BOX-Gruppe führte im zeitlichen Verlauf zu einer Zunahme der relativen Wandfläche am Tag 14 mit nachfolgender Abnahme hin zum Tag 28. Wie bei der BOX-Gruppe der PCA hat BOX einen vasokonstriktiven Effekt auf die BA nach längerfristiger Inkubation zur Folge. Auch im Einzelvergleich der Interventionsgruppen am Tag 14 untereinander wird der dominierende Einfluss von BOX im Gegensatz zu Sham, Eigenblut und PDP bestätigt.

Für PDP konnte kein vasokonstriktiver Effekt nachgewiesen werden. Im Gegenteil wies PDP im zeitlichen Verlauf sogar einen eher vasodilatativen Effekt auf, ähnlich wie die Sham-Gruppe. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die in der „PDP“ Tag 0-Gruppe zu verzeichnenden interindividuellen Unterschiede, welche statistisch im Vergleich zu den anderen Tag 0-Gruppen nicht signifikant sind, beim

Vergleich zu PDP an den Tagen 3/7/14 statistisch zu Tage treten. Dennoch zeigt PDP eindeutig keinen vasokonstriktiven Effekt, was einerseits wie bei der Eigenblutgruppe an einer ungenügenden Anzahl von einzelnen Präparaten an der Gesamtauswertung liegen kann, andererseits aus der unterschiedlichen chemischen Eigenschaft der Hämabbauprodukte resultieren könnte. Während BOXes eher lipophil sind und über diese Fähigkeit in Zellmembranen diffundieren können, sind PDPs durch ihre hydrophilere Polarität vermehrt dem Prozess der Auswaschung aus dem Liquor ausgesetzt. Möglicherweise ist die dadurch verminderte Gesamtkonzentration im Gewebe mit einer verminderten Gefäßreaktion assoziiert.

7 Schlussfolgerung

Im ersten Teilprojekt „Neurovaskuläre Kopplung“ sollte folgenden Fragen auf den Grund gegangen werden:

- Beeinflusst Z-PDP A kurzfristig die Dynamik der neuronal-induzierten Gefäßreaktion intrakortikaler Arteriolen?
- Verändert die ubiquitäre genetische (BK-Knockout-Maus) oder pharmakologische (Iberiotoxin) Hemmung der BK-Kanal-Aktivität die Dynamik der neuronal-induzierten Gefäßreaktion intrakortikaler Arteriolen?
- Gibt es eine Altersabhängigkeit in der neuronal-induzierten Gefäßantwort intrakortikaler Arteriolen?

Es zeigte sich, dass weder das Hämabbauprodukt Z-PDP A, noch die BK_{Ca}-Kanal-Inhibition mittels Iberiotoxin eine Veränderung der Parameter, die zur Bewertung der Dynamik der neuronal-induzierten Gefäßreaktion herangezogen wurden, bewirken konnten. Der konventionelle BK-Knockout führte zur verzögerten Dilatation nach initial neuronal-induzierter Vasokonstriktion. Dies bekräftigte die Rolle des BK_{Ca}-Kanals bei der Gefäßdurchmesserregulation zerebraler Gefäße. Hinsichtlich der Altersabhängigkeit der neuronal-induzierten Gefäßreaktion bestätigte diese Arbeit erneut die bereits berichteten Ergebnisse, dass adulte Mäuse ein insgesamt geringeres vasoreaktives Potenzial gegenüber juvenilen Mäusen aufweisen. Diese Beobachtung korreliert mit Daten aus der Klinik, dass jüngere Patienten im 40.-50. Lebensjahr im Gegensatz zu älteren Patienten häufiger angiografisch detektierbare Vasospasmen aufweisen. Insgesamt fiel eine Bewertung der Ergebnisse vor dem Hintergrund der diskutierten methodischen Hürden schwer. Aktuell scheint das Hämabbauprodukt Z-PDP A die neurovaskuläre Kopplung nicht zu beeinflussen. Weitere Studien mit Optimierung des experimentellen *in vitro*-Versuchsaufbaus bzw. eine Übertragung auf *in vivo*-Bedingungen zur Untersuchung des Einflusses von Hämabbauprodukten auf die neurovaskuläre Kopplung sollten angestrebt werden.

Hinsichtlich des zweiten Teilprojektes „HDPs und Gefäßmorphologie“ wurde zu Beginn folgende Fragestellung formuliert:

- Inwiefern wirkt die intrathekale Applikation von Eigenblut, Z-PDP A+B und Z-BOX A+B in einem zeitlichen Fenster von 0-28 Tagen auf die Gefäßwände zerebraler Arterien ein?

Aus wissenschaftlichen Publikationen ist bekannt, dass die Nähe von Blut am Gefäß die Entstehung des Vasospasmus begünstigt. Diese Aussage konnte in dieser Studie bestätigt und um den Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Gefäßwand in einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen erweitert werden. Von einem Gefäßwandumbau konnte im Hinblick auf die analysierte Aktinschicht im Sinne eines länger anhaltenden Umbauprozesses über 28 Tage nicht gesprochen werden. Hämabbauprodukte sind vermutlich eher mit einer reversiblen pathologischen Gefäßverengung um den Tag 14 assoziiert. In der Klinik korreliert dies in Ansätzen mit dem Zeitfenster des Auftretens des zerebralen Vasospasmus bei Patienten nach einer SAB. Da dieses Teilprojekt insgesamt nur die Aktinschicht der Tunica media ohne weitere Betrachtung von Endothel oder Kollagenfasern, für die in der Literatur Hinweise auf Proliferation vorliegen, berücksichtigt, wäre eine Ausweitung der Studie um diese Faktoren beispielsweise mit HE-gefärbten Hirnschnitte denkbar. Dennoch wurde in diesem Promotionsarbeiten-übergreifenden Projekt einzigartig über einen Zeitraum von 28 Tagen eine reversible pathologische Gefäßveränderung, vermittelt über Hämabbauprodukte, dargestellt. Eine Übertragung auf *in-vivo*-Bedingungen zur Verminderung interindividueller Unterschiede und der besseren Übertragbarkeit auf eine humane Situation ist erstrebenswert. Interessant wäre im Anschluss eine Überprüfung der experimentellen Ergebnisse bei humanen Liquorproben im zeitlichen Verlauf der Erkrankung. Die Gewinnung der Liquorproben könnte durch die Einlage einer externen Ventrikeldrainage oder Lumbaldrainage erfolgen.

Während diese Promotionsarbeit wichtige Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Hämabbauprodukte-abhängigen neurovaskulären Kopplung sowie Gefäßmorphologie zerebraler Gefäße beisteuert, auf deren Grundlage eine weitere Forschung in dem Bereich möglich und nötig ist, sollte dennoch die vielfältige Genese der verzögerten zerebralen Ischämien (DCI) nach SAB nicht vernachlässigt werden. Eine umfassende Aufklärung der pathophysiologischen Vorgänge der DCI im Bereich der *early brain injury*, *cortical spreading depolarizations*, Mikrothrombosen und Inflammation ist ebenfalls unabdingbar, um weitere Forschung an sich daran anknüpfende Therapien zu betreiben. Zuletzt sollten ebenfalls Präventionsmaßnahmen zur Reduktion des Aneurysmarisikos und damit der häufigsten Form einer SAB-Entstehung (Therapie von arterieller Hypertonie, Nikotin-, Alkoholabusus) evaluiert und gefördert werden.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Albert H, Marinus V, Jan van G, Hans van C. 1987. Rerupture of intracranial aneurysms: a clinicoanatomic study. *Journal of Neurosurgery*, 67 (1):29-33.
- Asano T, Matsui T. 1999. Antioxidant Therapy Against Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19 (1):31-44.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468 (7321):232-243.
- Ayadi A, Ferrand G, Cruz IGd, Warot X. 2011. Mouse Breeding and Colony Management. *Current Protocols in Mouse Biology*, 1 (1):239-264.
- Bayliss WM. 1902. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*, 28 (3):220-231.
- Bederson JB, Germano IM, Guarino L. 1995. Cortical Blood Flow and Cerebral Perfusion Pressure in a New Noncraniotomy Model of Subarachnoid Hemorrhage in the Rat. *Stroke*, 26 (6):1086-1092.
- Bederson JB, Connolly ES, Jr., Batjer HH, Dacey RG, Dion JE, Diringer MN, Duldner JE, Jr., Harbaugh RE, Patel AB, Rosenwasser RH, American Heart A. 2009. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 40 (3):994-1025.
- Bendszus M, Jung C, Hacke W, Unterberg A. 2016. Intrakranielle arterielle Aneurysmen und Subarachnoidalblutungen. In: Hacke W, Hrsg. *Neurologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 283-300.
- Bojovic D, Stackhouse TL, Mishra A. 2022. Assaying activity-dependent arteriole and capillary responses in brain slices. *Neurophotonics*, 9 (3):031913.
- Bonita R, Beaglehole R, North JD. 1983. Subarachnoid hemorrhage in New Zealand: an epidemiological study. *Stroke*, 14 (3):342-347.
- Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. 2000. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem*, 275 (9):6453-6461.
- Bromberg JE, Rinkel GJ, Algra A, Greebe P, van Duyn CM, Hasan D, Limburg M, ter Berg HW, Wijdicks EF, van Gijn J. 1995. Subarachnoid haemorrhage in first and second degree relatives of patients with subarachnoid haemorrhage. *Bmj*, 311 (7000):288-289.
- Charpentier C, Audibert G, Guillemin F, Civit T, Ducrocq X, Bracard S, Hepner H, Picard L, Laxenaire MC. 1999. Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 30 (7):1402-1408.
- Chen D, Tang J, Khatibi NH, Zhu M, Li Y, Wang C, Jiang R, Tu L, Wang S. 2011. TREATMENT WITH Z-LIGUSTILIDE, A COMPONENT OF ANGELICA SINENSIS, REDUCES BRAIN INJURY FOLLOWING A SUBARACHNOID HEMORRHAGE IN RATS. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*:jpet.110.177055.
- Chen S, Feng H, Sherchan P, Klebe D, Zhao G, Sun X, Zhang J, Tang J, Zhang JH. 2014. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol*, 115:64-91.
- 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. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22 (4):472-478.
- Clark JF, Loftspring M, Wurster WL, Beiler S, Beiler C, Wagner KR, Pyne-Geithman GJ. 2008. Bilirubin oxidation products, oxidative stress, and intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 105:7-12.
- Contet C, Goulding SP, Kuljis DA, Barth AL. 2016. BK Channels in the Central Nervous System. *International review of neurobiology*, 128:281-342.
- Contreras GF, Castillo K, Enrique N, Carrasquel-Ursulaez W, Castillo JP, Milesi V, Neely A, Alvarez O, Ferreira G, González C, Latorre R. 2013. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Channels (Austin, Tex)*, 7 (6):442-458.
- Dankbaar JW, Slooter AJ, Rinkel GJ, Schaaf IC. 2010. Effect of different components of triple-H therapy on cerebral perfusion in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a systematic review. *Crit Care*, 14 (1):R23.
- 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.
- De Silva TM, Faraci FM. 2016. Microvascular Dysfunction and Cognitive Impairment. *Cell Mol Neurobiol*, 36 (2):241-258.
- Dietrich HH, Kajita Y, Dacey RG, Jr. 1996. Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles. *Am J Physiol*, 271 (3 Pt 2):H1109-1116.
- Dombovy JD-CRSM. 1998. Recovery and rehabilitation following subarachnoid haemorrhage: part II long term follow up. *Brain Injury*, 12 (10):887-894.
- 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.
- Dorsch NW, King MT. 1994. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part I: Incidence and effects. *J Clin Neurosci*, 1 (1):19-26.
- Dumont AS, Dumont RJ, Chow MM, Lin CL, Calisaneller T, Ley KF, Kassell NF, Lee KS. 2003. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. *Neurosurgery*, 53 (1):123-133; discussion 133-125.
- Ecker A, Riemenschneider PA. 1951. Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg*, 8 (6):660-667.
- Feigin V, Parag V, Lawes CM, Rodgers A, Suh I, Woodward M, Jamrozik K, Ueshima H, Asia Pacific Cohort Studies C. 2005. Smoking and elevated blood pressure are the most important risk factors for subarachnoid hemorrhage in the Asia-Pacific region: an overview of 26 cohorts involving 306,620 participants. *Stroke*, 36 (7):1360-1365.

- Filosa J. 2010. Vascular Tone and Neurovascular Coupling: Considerations Toward an Improved In Vitro Model. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2 (16).
- Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, Nelson MT. 2006. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci*, 9 (11):1397-1403.
- 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. *Toxicologic Pathology*, 28 (1):122-131.
- Fuwa I, Mayberg M, Gadjusek C, Harada T, Luo Z. 1993. Enhanced secretion of endothelin by endothelial cells in response to hemoglobin. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 33 (11):739-743.
- Gao YD, Garcia ML. 2003. Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels. *Proteins*, 52 (2):146-154.
- Geraghty JR, Testai FD. 2017. Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: Beyond Vasospasm and Towards a Multifactorial Pathophysiology. *Curr Atheroscler Rep*, 19 (12):50.
- Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. 2010. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (8):3811-3816.
- Goursaud S, Martinez de Lizarrondo S, Grolleau F, Chagnot A, Agin V, Maubert E, Gauberti M, Vivien D, Ali C, Gakuba C. 2021. Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: Is There a Relevant Experimental Model? A Systematic Review of Preclinical Literature. *Front Cardiovasc Med*, 8:752769.
- 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.
- Güresir E, Raabe A, Jaiimsin A, Dias S, Raab P, Seifert V, Vatter H. 2010. Histological evidence of delayed ischemic brain tissue damage in the rat double-hemorrhage model. *Journal of the Neurological Sciences*, 293 (1):18-22.
- Hansen-Schwartz J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. 2007. Cerebral vasospasm: looking beyond vasoconstriction. *Trends Pharmacol Sci*, 28 (6):252-256.
- Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D. 2002. Astrocytes Function in Matching Blood Flow to Metabolic Activity. *Physiology*, 17 (1):27-31.
- Hardy P. 2004. CHAPTER 25 - Gnotobiology and Breeding Techniques. In: Hedrich HJ, Bullock G, Hrsg. *The Laboratory Mouse*. London: Academic Press, 409-433.
- Harrod CG, Bendok BR, Batjer HH. 2005. Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review. *Neurosurgery*, 56 (4):633-654; discussion 633-654.
- 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 H-U, Witte O. 1994. Changes in intrinsic optical signal of rat neocortical slices following afferent stimulation. *Neuroscience letters*, 180:227-230.
- Holthoff K, Sagnak E, Witte OW. 2007. Functional mapping of cortical areas with optical imaging. *Neuroimage*, 37 (2):440-448.

- Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. 1997. Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*, 28 (3):660-664.
- Hou S, Xu R, Clark JF, Wurster WL, Heinemann SH, Hoshi T. 2011. Bilirubin oxidation end products directly alter K⁺ channels important in the regulation of vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):102-112.
- Huang J, van Gelder JM. 2002. The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery*, 51 (5):1101-1105; discussion 1105-1107.
- Huxley AF, Niedergerke R. 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 173 (4412):971-973.
- Huxley H, Hanson J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173 (4412):973-976.
- Iadecola C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5 (5):347-360.
- Iadecola C. 2017. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96 (1):17-42.
- Ingall TJ, Whisnant JP, Wiebers DO, O'Fallon WM. 1989. Has there been a decline in subarachnoid hemorrhage mortality? *Stroke*, 20 (6):718-724.
- Iuliano BA, Pluta RM, Jung C, Oldfield EH. 2004. Endothelial dysfunction in a primate model of cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 100 (2):287-294.
- Joerk A. 2015. Einfluss von Häm und Hämabbauprodukten auf die zerebrale Gefäßreaktivität im visuellen Kortex der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- 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, Schaefgen 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. Propenthyolone 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. 1989. Rebleeding from ruptured intracranial aneurysms. *Surgical Neurology*, 32 (5):323-326.
- Kamezaki T, Yanaka K, Nagase S, Fujita K, Kato N, Nose T. 2002. Increased levels of lipid peroxides as predictive of symptomatic vasospasm and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 97 (6):1302-1305.
- Kassell NF, Torner JC, Haley EC, Jr., Jane JA, Adams HP, Kongable GL. 1990. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg*, 73 (1):18-36.
- Kety SS. 1957. The general metabolism of the brain in vivo. *Metabolism of the nervous system*. Elsevier, 221-237.
- Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H. 1994. Role of nitric oxide in regulation of cerebral microvascular tone and autoregulation of cerebral blood flow in cats. *Brain Res*, 667 (2):255-262.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. 2012. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (21):E1387-1395.

- Koller A, Toth P. 2012. Contribution of flow-dependent vasomotor mechanisms to the autoregulation of cerebral blood flow. *Journal of vascular research*, 49 (5):375-389.
- Konczalla J, Seifert V. 2020. Subarachnoidalblutung und intrakranielle Aneurysmen . In: Marx G, Hrsg. Referenz Intensivmedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 446.
- 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.
- Kusske JA, Turner PT, Ojemann GA, Harris AB. 1973. Ventriculostomy for the treatment of acute hydrocephalus following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 38 (5):591-595.
- Langguth N. 2020. Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Leclerc JL, Garcia JM, Diller MA, Carpenter AM, Kamat PK, Hoh BL, Doré S. 2018. A Comparison of Pathophysiology in Humans and Rodent Models of Subarachnoid Hemorrhage. *Front Mol Neurosci*, 11:71.
- Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. 1998. Headache characteristics in subarachnoid haemorrhage and benign thunderclap headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65 (5):791-793.
- Linn FH, Wijndicks EF, van der Graaf Y, Weerdesteyn-van Vliet FA, Bartelds AI, van Gijn J. 1994. Prospective study of sentinel headache in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 344 (8922):590-593.
- Liu X, Li C, Falck JR, Roman RJ, Harder DR, Koehler RC. 2008. Interaction of nitric oxide, 20-HETE, and EETs during functional hyperemia in whisker barrel cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295 (2):H619-631.
- Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, Belle Gv. 1992. Cigarette smoking, alcohol use, and subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 23 (9):1242-1249.
- Macdonald RL. 2014. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol*, 10 (1):44-58.
- Macdonald RL, Weir BK. 1991. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke*, 22 (8):971-982.
- Malinova V, Schatlo B, Voit M, Suntheim P, Rohde V, Mielke D. 2016. Identification of specific age groups with a high risk for developing cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgical Review*, 39 (3):429-436.
- Mayberg MR, Okada T, Bark DH. 1990. The role of hemoglobin in arterial narrowing after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 72 (4):634-640.
- McConnell HL, Kersch CN, Woltjer RL, Neuwelt EA. 2017. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *J Biol Chem*, 292 (3):762-770.
- McGirt MJ, Blessing R, Nimjee SM, Friedman AH, Alexander MJ, Laskowitz DT, Lynch JR. 2004. Correlation of serum brain natriuretic peptide with hyponatremia and delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 54 (6):1369-1373; discussion 1373-1364.
- Meera P, Wallner M, Toro L. 2000. A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (10):5562-5567.
- Metaa MR, Newman EA. 2006. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci*, 26 (11):2862-2870.

- Misra HP, Fridovich I. 1972. The Generation of Superoxide Radical during the Autoxidation of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 247 (21):6960-6962.
- Mitchell P, Wilkinson ID, Hoggard N, Paley MN, Jellinek DA, Powell T, Romanowski C, Hodgson T, Griffiths PD. 2001. Detection of subarachnoid haemorrhage with magnetic resonance imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70 (2):205-211.
- Molyneux AJ, Kerr RS, Yu LM, Clarke M, Sneade M, Yarnold JA, Sandercock P, International Subarachnoid Aneurysm Trial Collaborative G. 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.
- Molyneux AJ, Kerr RS, Birks J, Ramzi N, Yarnold J, Sneade M, Rischmiller J, Collaborators I. 2009. Risk of recurrent subarachnoid haemorrhage, death, or dependence and standardised mortality ratios after clipping or coiling of an intracranial aneurysm in the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT): long-term follow-up. *Lancet Neurol*, 8 (5):427-433.
- Moss GP. 1996. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68 (12):2193-2222.
- Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. 2014. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)*, 210 (4):790-798.
- Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. 2005. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*, 46 (3):454-462.
- Nakagawa A, Su CC, Sato K, Shirane R. 2002. Evaluation of changes in circulating blood volume during acute and very acute stages of subarachnoid hemorrhage: implications for the management of hypovolemia. *J Neurosurg*, 97 (2):268-271.
- Nishimura N, Rosidi NL, Iadecola C, Schaffer CB. 2010. Limitations of collateral flow after occlusion of a single cortical penetrating arteriole. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30 (12):1914-1927.
- Nishimura N, Schaffer CB, Friedman B, Lyden PD, Kleinfeld D. 2007. Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (1):365-370.
- Offenhauser N, Thomsen K, Caesar K, Lauritzen M. 2005. Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *J Physiol*, 565 (Pt 1):279-294.
- Okada H, Endo S, Kamiyama K, Suzuki J. 1980. [Oxyhemoglobin-induced cerebral vasospasm and sequential changes of vascular ultrastructure (author's transl)]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 20 (6):573-582.
- Otawara Y, Ogasawara K, Ogawa A, Sasaki M, Takahashi K. 2002. Evaluation of vasospasm after subarachnoid hemorrhage by use of multislice computed tomographic angiography. *Neurosurgery*, 51 (4):939-942; discussion 942-933.
- Passier PE, Visser-Meily JM, van Zandvoort MJ, Post MW, Rinkel GJ, van Heugten C. 2010. Prevalence and determinants of cognitive complaints after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*, 29 (6):557-563.
- Pluta RM. 2005. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther*, 105 (1):23-56.
- Purkayastha S, Sorond F. 2012. Transcranial Doppler ultrasound: technique and application. *Semin Neurol*, 32 (4):411-420.

- Pyne-Geithman GJ, Morgan CJ, Wagner K, Dulaney EM, Carrozzella J, Kanter DS, Zuccarello M, Clark JF. 2005. Bilirubin production and oxidation in CSF of patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25 (8):1070-1077.
- Rabinstein AA, Lanzino G, Wijedicks EF. 2010. Multidisciplinary management and emerging therapeutic strategies in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet Neurol*, 9 (5):504-519.
- Ram Z, Sahar A, Hadani M. 1991. Vasospasm due to massive subarachnoid haemorrhage — a rat model. *Acta Neurochirurgica*, 110 (3):181-184.
- Ritter M. 2022. Charakterisierung von Pathogenese und Prävention des zerebralen Vasospasmus mittels Durchmessaanalyse zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnittmodell der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ritter M, Seidel RA, Bellstedt P, Schneider B, Bauer M, Görts H, Pohnert G. 2016. Isolation and Identification of Intermediates of the Oxidative Bilirubin Degradation. *Organic Letters*, 18 (17):4432-4435.
- Rolfe DF, Brown GC. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews*, 77 (3):731-758.
- Rowland MJ, Hadjipavlou G, Kelly M, Westbrook J, Pattinson KT. 2012. Delayed cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: looking beyond vasospasm. *Br J Anaesth*, 109 (3):315-329.
- Saitoh H, Hayakawa K, Nishimura K, Okuno Y, Teraura T, Yumitori K, Okumura A. 1995. Rerupture of cerebral aneurysms during angiography. *AJNR Am J Neuroradiol*, 16 (3):539-542.
- 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.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr., Reed RL, Jones DP. 1998. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 24 (5):699-704.
- Sasaki T, Wakai S, Asano T, Watanabe T, Kirino T, Sano K. 1981. The effect of a lipid hydroperoxide of arachidonic acid on the canine basilar artery. An experimental study on cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 54 (3):357-365.
- Schaefgen A. 2021. In vitro Analyse des Durchmessers zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus unter der Wirkung von Derivaten des oxidativen Hämabbaus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO. 1992. Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3 (1):88-95.
- Schievink WI, Schaid DJ, Rogers HM, Piepgras DG, Michels VV. 1994. On the inheritance of intracranial aneurysms. *Stroke*, 25 (10):2028-2037.
- Schroeder SC. 2022. Charakterisierung von Pathogenese und Prävention des zerebralen Vasospasmus im akuten und fixierten Hirnschnittmodell der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Jena.
- Scott RB, Eccles F, Molyneux AJ, Kerr RS, Rothwell PM, Carpenter K. 2010. Improved cognitive outcomes with endovascular coiling of ruptured intracranial aneurysms: neuropsychological outcomes from the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT). *Stroke*, 41 (8):1743-1747.
- Sehba FA. 2014. Rat endovascular perforation model. *Transl Stroke Res*, 5 (6):660-668.
- Sehba FA, Hou J, Pluta RM, Zhang JH. 2012. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Progress in neurobiology*, 97 (1):14-37.

- Sercombe R, Dinh YR, Gomis P. 2002. Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *Jpn J Pharmacol*, 88 (3):227-249.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. 1977. The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*, 28 (5):897-916.
- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P, Sausbier M. 2009. Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *Febs j*, 276 (6):1680-1697.
- Straub SV, Nelson MT. 2007. Astrocytic calcium signaling: the information currency coupling neuronal activity to the cerebral microcirculation. *Trends Cardiovasc Med*, 17 (6):183-190.
- Suarez-Rivera O. 1998. Acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*, 49 (5):563-565.
- 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.
- Tesauro M, Mauriello A, Rovella V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Cardillo C, Melino G, Di Daniele N. 2017. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. *J Intern Med*, 281 (5):471-482.
- Ungvari Z, Tarantini S, Sorond F, Merkely B, Csiszar A. 2020. Mechanisms of Vascular Aging, A Geroscience Perspective: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*, 75 (8):931-941.
- van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. 2007. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 369 (9558):306-318.
- Vanhooren V, Libert C. 2013. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12 (1):8-21.
- Vergouwen MD, Ildigwe D, Macdonald RL. 2011. Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects. *Stroke*, 42 (4):924-929.
- Wang B, Jaffe DB, Brenner R. 2014. Current understanding of iberiotoxin-resistant BK channels in the nervous system. *Front Physiol*, 5:382.
- Weir B, Grace M, Hansen J, Rothberg C. 1978. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg*, 48 (2):173-178.
- Wellman GC, Koide M. 2013. Impact of subarachnoid hemorrhage on parenchymal arteriolar function. *Acta Neurochir Suppl*, 115:173-177.
- Whitby FG, Phillips JD, Hill CP, McCoubrey W, Maines MD. 2002. Crystal Structure of a Biliverdin IX α Reductase Enzyme–Cofactor Complex. *Journal of Molecular Biology*, 319 (5):1199-1210.
- Whitfield PC, Kirkpatrick PJ. 2001. Timing of surgery for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD001697.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6 (1):43-50.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe,

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,

die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung 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,

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

eine gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation nicht eingereicht wurde.

Jena, 28.04.2024

Yilin Linda Ma