

**Charakterisierung von
Pathogenese und Prävention
des zerebralen Vasospasmus
im akuten und fixierten
Hirnschnittmodell der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Sophie Charlotte Schröder

geboren am 27.10.1995 in Anklam

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Knut Holthoff, Jena
2. Frau Prof. Dr. Ute Neugebauer, Jena
3. Herr PD Dr. Friedrich Jochenning

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.08.2021

Tag des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung: 10.11.2022

Für all die, die staunen können.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Einheitenverzeichnis.....	7
Zusammenfassung	8
1 Einleitung	10
1.1 Subarachnoidalblutung.....	10
1.1.1 Definition, Epidemiologie	10
1.1.2 Risikofaktoren	11
1.1.3 Therapie.....	11
1.2 Vasospasmus.....	12
1.2.1 Definition, Epidemiologie	12
1.2.2 Therapie.....	13
1.2.3 Pathophysiologische Theorien	13
1.3 Neurovaskuläre Einheit	14
1.3.1 Beschreibung und Funktion	14
1.3.2 Kolumnäre Aktivierung nach elektrischer Stimulation	17
1.3.3 BK-Kanal.....	18
1.3.4 Funktion und Modulation der Rho-Kinase	21
1.3.5 Funktion und Modulation des Kir-Kanals	22
1.4 Hämabbauprodukte (HPDs)	24
1.4.1 Entstehung.....	24
1.4.2 Akuter Effekt (BK-Kanäle).....	25
1.4.3 Langzeitwirkung im Hirngewebe (Morphologie)	26
2 Ziele der Arbeit.....	28
3 Methoden	29
3.1 Mauslinien	29
3.1.1 Slo1-Mäuse.....	29
3.1.2 SM-BK-Mäuse.....	30
3.1.3 Genotypisierung.....	32
3.2 Versuchsreihen und experimentelles Design	34
3.2.1 Pharmakologische Modulation	34
3.2.2 BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen.....	35
3.2.3 Elektrostimulationsreihe	35
3.2.4 HDPs und Gefäßmorphologie	36

3.3	Chemikalien.....	36
3.4	Technik.....	37
3.5	Lösungen.....	39
3.5.1	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF).....	39
3.5.2	Vasoaktive Substanzen	41
3.6	Präparation.....	43
3.7	Transmissions-Mikroskopie der Hirnschnitte	44
3.7.1	Elektrische Stimulation akuter Hirnschnitte	46
3.7.2	Gefäßdurchmesserbestimmung am akuten Hirnschnitt	48
3.8	CLSM-Mikroskopie von fixierten Hirnschnitten	48
3.8.1	Kryokonservierung und Erstellen von Hirnschnitten.....	48
3.8.2	Immunhistochemische Färbung	50
3.8.3	Aufnahme von CLSM Bildern.....	52
3.8.4	Messungen am fixierten Hirnschnitt	53
3.9	Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	53
3.9.1	HDP-Experimente	53
3.9.2	Elektrostimulationsreihe	54
3.9.3	LSM-Daten.....	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Pharmakologische Modulation.....	56
4.1.1	Fasudil	56
4.1.2	Bariumchlorid	57
4.1.3	ML133.....	57
4.2	BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen	58
4.3	Elektrostimulationsreihe	60
4.3.1	Amplitude.....	61
4.3.2	Zeitpunkt	62
4.3.3	Zeitkonstante τ	63
4.3.4	Area under the curve	63
4.4	HDPs und Gefäßmorphologie	64
5	Diskussion.....	67
5.1	Pharmakologische Modulation.....	67
5.1.1	Methodik	67
5.1.2	Ergebnisse	70

5.2	BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen	73
5.2.1	Methodik	73
5.2.2	Ergebnisse	75
5.3	Elektrostimulationsreihe	77
5.3.1	Methodik	77
5.3.2	Ergebnisse	82
5.4	HDPs und Gefäßmorphologie	90
5.4.1	Methodik	90
5.4.2	Ergebnisse	95
6	Schlussfolgerungen.....	105
	Literatur- und Quellenverzeichnis	107
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	122
	Danksagung	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
aCSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
APA	<i>azygos pericallosal artery</i> (Arteria azygos pericallosa)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BA	Basilararterie (Arteria Basilaris)
BaCl ₂	Bariumchlorid
BK	<i>big conductance</i> (Ca ²⁺ - und spannungsabhängiger Kaliumkanal)
BK ^{-/-}	Homozygoter Knockout des Slo1-Gens von C57BL/6-Mäusen
BOLD	<i>blood oxygen level-dependent</i> (Blutsauerstofflevel-abhängig)
BOX	<i>bilirubin oxidation product</i>
Cre	<i>cyclization recombination</i> (Zyklisierungsrekombinase)
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i> (konfokale Laserscanmikroskopie)
DCI	<i>delayed cerebral ischemia</i> (verzögerte zerebrale Ischämie)
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DIND	<i>delayed ischemic neurological deficit</i> (verzögertes ischämisches neurologisches Defizit)
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
EBI	<i>early brain injury</i> (frühe Hirnschädigung)
EDCF	<i>endothelium-derived contracting factor</i> (Kontraktionsfaktor des Endothels)
EDHF	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> (Hyperpolarisierender Faktor des Endothels)
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> (γ-Aminobuttersäure)
HDP	<i>heme degradation product</i> (Hämabbauprodukt)
IVC	<i>individually ventilated cage</i> (individuell ventilierter Käfig)
K _{ir}	<i>inward rectifier</i> (einwärts gleichrichtender K ⁺ -Kanal)
KO	<i>knockout</i>
NA	Noradrenalin

NO	Stickstoffmonoxid
PCA	<i>posterior communicating artery</i> (Arteria communicans posterior)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDP	Propentdyopent
RCK	<i>regulator of conductance</i> (Kaliumstrom-regulierende Domäne)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
Slo	<i>slowpoke</i> (Gensequenz für den BK-Kanal)
Slo1 ^{+/+}	Homozygote Expression des Slo1-Gens von FVB-Mäusen (WT-Tier)
Slo1 ^{+/-}	Heterozygote Expression des Slo1-Gens von FVB-Mäusen
Slo1 ^{-/-}	Homozygoter Knockout des Slo1-Gens von FVB-Mäusen (KO-Tier)
SM	<i>smooth muscle</i> (glatte Muskulatur)
SM-BK ^{+/-}	Heterozygote Expression des Slo1-Gens in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen
SM-BK ^{-/-}	Homozygoter Knockout des Slo1-Gens in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen
WT	Wildtyp

Einheitenverzeichnis

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
c	Stoffmengenkonzentration	mol * m ⁻³
f _{rot}	Umdrehungszahl	rpm (rounds per minute)
G	Elektrischer Leitwert	S (Siemens)
l	Länge	m (Meter)
m	Masse	g (Gramm)
M	Molare Masse	kg * mol ⁻¹
n	Stoffmenge	mol (Mol)
Θ	Temperatur	°C (Grad Celsius)
t	Zeit	s (Sekunde) min (Minute)
U	Elektrische Spannung	V (Volt) = kg * m ² * s ⁻³ * A ⁻¹
V	Volumen	l (Liter) = 0,001 * m ³

Zusammenfassung

Die Subarachnoidalblutung (SAB) nach Aneurysmaruptur ist eine neurologische Erkrankung, die mit einer hohen präklinischen Mortalität einhergeht und deren Spätfolgen mit massiven körperlichen und psychischen Beeinträchtigungen assoziiert sein können. Von besonderem Interesse ist der zerebrale Vasospasmus, eine Verengung großer zerebraler Arterien, die als Komplikation typischerweise einige Tage nach der Initialblutung auftritt und oftmals von einer zerebralen Ischämie begleitet wird. Durch diese zeitliche Abfolge eröffnet sich ein potentiell therapeutisches Zeitfenster für Präventivmaßnahmen gegen diese schwerwiegende Komplikation. Es gibt verschiedene Ansätze zur Erklärung der noch nicht vollständig nachvollzogenen pathogenetischen Hintergründe des Vasospasmus. Einer dieser Ansätze und Fokus dieser Arbeit sind die Abbauprodukte des Blutes, die Tage später im Subarachnoidalraum von SAB-Patienten zu finden sind. Diese Hämabbauprodukte (*heme degradation products*, HDPs) hemmen BK-Kaliumkanäle, die unter physiologischen Bedingungen den Ruhetonus glatter Gefäßmuskelzellen beeinflussen.

In den ersten drei Teilprojekten dieser Arbeit wurde mittels DIC-Mikroskopie die zeitliche Änderung des Gefäßdurchmessers intrakortikaler Arteriolen akuter Maushirnschnitte untersucht. Zunächst stand die simultane Applikation des vasokonstriktiv wirkenden HDPs Propentdyopent A (PDP A) mit einem Rho-Kinase- oder K_{ir} -Kanal-Inhibitor im Mittelpunkt. Unter *in vitro*-Bedingungen verhinderte der Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil eine PDP A-vermittelte Vasokonstriktion. Aus der Literatur ist bekannt, dass Fasudil die Inzidenz des verzögerten zerebralen Vasospasmus von SAB-Patienten senkt, ohne Einfluss auf die Entwicklung neurologischer Defizite zu nehmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigen dazu, die Therapie mit Fasudil voranzutreiben, da diese Substanz offenbar das Potential hat, das stark vasokonstriktive PDP A zu antagonisieren. Wie die Rho-Kinase sind auch K_{ir} -Kanäle in die Regulation des Gefäßtonus involviert. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen hatten die K_{ir} -Kanal-Inhibitoren Bariumchlorid ($BaCl_2$) und ML133 keine intrinsische Vasoreaktivität, bei gleichzeitiger Gabe von PDP A blieb dessen vasokonstriktive Wirkung jedoch aus. Es ist daher vorstellbar, dass auch K_{ir} -Kanäle an der Entwicklung HDP-vermittelter Vasospasmen beteiligt sind.

In einem zweiten Teilprojekt wurden Hirnschnitte von C57BL/6-Mäusen mit zellspezifischem BK-Kanal-Knockout (KO) mit PDP A perfundiert. Diese Untersuchung erfolgte mit dem Ziel, den BK-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen als Hauptmediator der PDP A-induzierten Vasokonstriktion zu identifizieren oder auszuschließen. Die Gefäßreaktion unterschied sich nicht zwischen Kontrollgruppe und KO-Gruppe. Arteriolen der Hirnschnitte von C57BL/6-Wildtyp (WT)-Mäusen zeigten jedoch im Gegensatz zu den bisher für diese Experimente genutzten FVB-Mäusen keine Vasoreaktion auf die Applikation von PDP A. Diese unterschiedliche Reaktivität der Mausstämme erschwert eine Beantwortung der Fragestellung, wirft jedoch gleichzeitig die Frage nach der Bedeutung des genetischen Hintergrunds für die Entwicklung des Vasospasmus nach SAB auf.

Für ein drittes Teilprojekt wurden akute Hirnschnitte elektrisch stimuliert. Ziel dieser Experimente war es, genetische und altersassoziierte Modulatoren der neurovaskulären Gefäßreaktion zu identifizieren, um neue Ansätze zur Prävention des zerebralen Vasospasmus zu schaffen. Dabei zeigten junge WT-Mäuse eine stärkere Reaktivität der untersuchten zerebralen Arteriolen als alte WT-Mäuse. Zwischen alten WT- und alten KO-Mäusen wurden diesbezüglich keine Unterschiede identifiziert. Diese Ergebnisse heben die Bedeutung altersassoziiertes vaskulärer Veränderungen für die Entstehung des zerebralen Vasospasmus hervor.

Neben den bisherig beschriebenen Akuteffekten war auch die langfristige Wirkung von HDPs auf zerebrale Gefäße Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dazu wurden einer Versuchsgruppe von Mäusen HDPs intrathekal injiziert, nach zwei Wochen deren Gehirne fixiert und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) potentielle morphologische Veränderungen großer zerebraler Arterien analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass der direkte Kontakt mit HDPs innerhalb von 14 Tagen die Gefäßwände verdickt und über diese Zeit vasokonstriktiv wirkt. Intraparenchymale Gefäße, die keinen Kontakt zum Subarachnoidalraum haben, waren von diesen morphologischen Veränderungen ausgenommen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Pathogenese des Vasospasmus ein Zusammenspiel aus kurzfristigen wie auch längerfristigen Prozessen ist und vom Entstehen und Verbleiben von HDPs im Subarachnoidalraum und deren direkten Kontakt mit Gefäßstrukturen maßgeblich mitbestimmt wird.

1 Einleitung

1.1 Subarachnoidalblutung

1.1.1 Definition, Epidemiologie

Die nicht-traumatische SAB ist ein neurologischer Notfall aus dem Formenkreis der hämorrhagischen Schlaganfälle. Durch die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas, das häufig im Circulus arteriosus Willisii lokalisiert ist, füllt sich der äußere Liquorraum zwischen Pia mater und Arachnoidea mater mit Blut (Abb. 1). Die Folge ist ein akuter Anstieg des intrakraniellen Drucks, durch den es häufig zum Meningismus und zur Vigilanzminderung kommt. Leitsymptom der SAB ist der sogenannte Vernichtungskopfschmerz (Petridis et al. 2017).

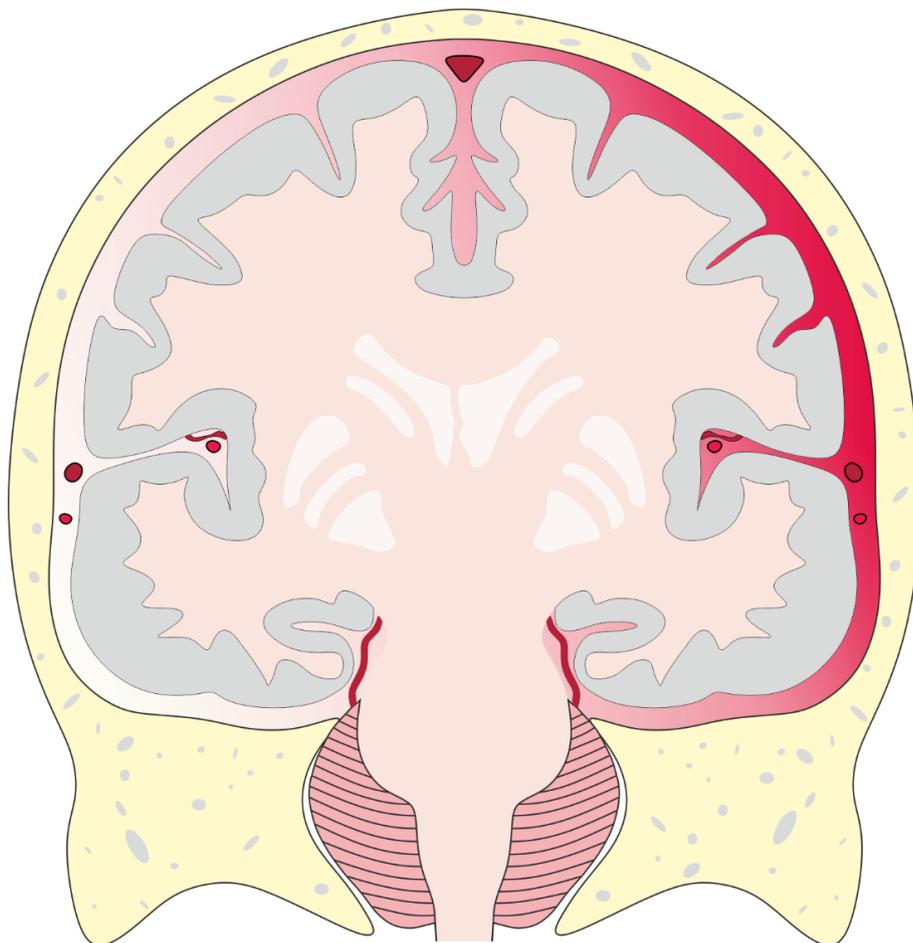


Abb. 1: Schema eines koronaren Schnittbilds durch das menschliche Gehirn mit Illustration einer arteriellen Einblutung in den Subarachnoidalraum infolge eines rupturierten Aneurysmas.

Die SAB nach Aneurysmaruptur betrifft weltweit neun von 100.000 Personen im Jahr und macht insgesamt ca. 5 % aller Schlaganfälle aus (de Rooij et al. 2007). Die 30-Tage-Mortalität ist bei der SAB mit 32 % deutlich höher als die des ischämischen Schlaganfalls (Feigin et al. 2003). Da die Hälfte der SAB-Patienten unter 55 Jahre alt

sind (van Gijn et al. 2007), erstaunt es nicht, dass laut der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) ein Drittel aller durch Schlaganfälle eingebüßten Lebensjahre auf die SAB entfallen.

SAB-Patienten, die nicht an der Initialblutung versterben, können von einer Vielzahl an Komplikationen betroffen sein. Im Rahmen der SAB wird akut das Hirngewebe geschädigt, sowohl durch Minderversorgung aufgrund des Durchblutungsdefizits (Friedrich et al. 2012) und der darauffolgenden Entzündungs- und Abbauprozesse, aber auch mechanisch durch intrazerebrale Einblutungen (Fujii et al. 2013). Neben den Prozessen der frühen Hirnschädigung ist eine typische Spätkomplikation der SAB der verzögerte Vasospasmus. Nachblutungen und die Entwicklung von Hirnödemen sind weitere Risiken. Zudem besteht für die Patienten zeitlebens ein erhöhtes neuro- und kardiovaskuläres Erkrankungsrisiko (Macdonald und Schweizer 2017).

1.1.2 Risikofaktoren

Genetische Erkrankungen, die die Gefäßstruktur schwächen oder mit hämodynamischen Veränderungen an prädestinierten Stellen im Gefäßsystem einhergehen, stellen für das familiär gehäufte Auftreten einer SAB entscheidende Risikofaktoren dar. Als Beispiele seien hier das Ehlers-Danlos-Syndrom (Edwards A 1969, Longstreth WT Jr 1985), die fibromuskuläre Dysplasie (Plouin et al. 2007) und die autosomal-dominante Form der polyzystischen Nierenerkrankung (Chauveau et al. 1994) genannt.

Während das Risiko für eine SAB mit dem Alter ansteigt und für Frauen insgesamt höher ist als für Männer, gibt es auch altersabhängige Geschlechtsunterschiede in der SAB-Inzidenz. So sind im Alter von 25 – 45 Jahren mehr Männer als Frauen betroffen, während es im Alter von 55 – 85 Jahren eher die Frauen sind, die eine SAB erleiden (de Rooij et al. 2007). Auch konnten regionale Unterschiede in Inzidenz und Sterblichkeitsrate der SAB verzeichnet werden (Nieuwkamp et al. 2009).

Die unbehandelte Hypertension, Nikotin- und Alkoholkonsum, sowie der Missbrauch von stimulierenden Drogen stellen wichtige beeinflussbare Risikofaktoren dar (Longstreth WT Jr 1985, Feigin et al. 2005).

1.1.3 Therapie

Nach zügiger Verdachtsbestätigung mittels kranialer Computertomographie und ggf. einer Lumbalpunktion folgt bei Ausschluss einer operationsbedürftigen intrazerebralen

Blutung die Darstellung des Aneurysmas mittels computertomographischer Angiographie oder digitaler Subtraktionsangiographie (Petridis et al. 2017). Anschließend sollte innerhalb von 72 Stunden die Versorgung des Aneurysmas mittels endovaskulärem Coiling oder neurochirurgischem Clipping erfolgen. Laut letztgeprüftem Stand der DGN-Leitlinie (09/2017) bestehen bezüglich der Akutversorgung mehr Vorteile im Coiling (bessere 5-Jahres-Überlebensrate, besserer postinterventioneller neurologischer und kognitiver Zustand) als im Clipping der Aneurysmata, welches allerdings eine geringere Nachblutungsrate hat. Eine solche Abwägung ist aufgrund der aktuellen Forschungslage jedoch nur für Patienten mit klinisch gutem Zustand zutreffend, da nur für diese Patientengruppe belastbare Forschungsergebnisse vorliegen (Lindgren et al. 2018).

Postinterventionell werden nach Leitlinie der DGN Maßnahmen zur Einhaltung eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 60-90 mmHg, die subkutane Gabe von niedermolekularen Heparinen zur Thromboseprophylaxe und die Vermeidung von Blutzuckerentgleisungen, Hyponatriämie und Fieber empfohlen. Abgesehen von der Nimodipin-Gabe und der schnellen Versorgung von Aneurysmata gibt es jedoch kaum evidenzbasierte Empfehlungen aus qualitativ hochwertigen Studien, weswegen weitere Forschung auf diesem Gebiet essentiell ist (Macdonald und Schweizer 2017).

1.2 Vasospasmus

1.2.1 Definition, Epidemiologie

Der verzögerte Vasospasmus bezeichnet eine anhaltende reversible Konstriktion zerebraler Arterienwände als Reaktion auf bisher nicht vollständig nachvollzogene Prozesse nach einer SAB (Findlay et al. 2016). Er stellt eine schwerwiegende Komplikation dar, die den klinischen Zustand von SAB-Patienten maßgeblich beeinflussen kann.

Die SAB-Komplikation des zerebralen Vasospasmus tritt zwischen Tag drei und zwölf nach Initialereignis auf und ist bei ca. 70 % der SAB-Überlebenden angiografisch nachweisbar (Eddleman et al. 2009). Vasospasmen können zu einer Minderperfusion des Hirngewebes und verzögerter zerebraler Ischämie (*delayed cerebral ischemia*, DCI) führen, welche ein unabhängiger Prädiktor von kognitiven Defiziten nach SAB ist (Eagles et al. 2019). Die Genese des verzögerten ischämischen neurologischen Defizits (*delayed ischemic neurological deficit*, DIND) ist noch nicht vollständig nachvollzogen, wird aber immer wieder dem symptomatischen Vasospasmus nach

SAB gleichgesetzt (Joerk et al. 2014) und der DCI zugeschrieben (Macdonald 2014). Solche aus einem verzögerten Perfusionsdefizit folgenden Schlaganfälle treten bei ca. 20 bis 30 % der SAB-Überlebenden auf und sind bei Überleben der Patienten mit starker körperlicher und kognitiver Beeinträchtigung, schlechter Lebensqualität und Verlust der Selbstständigkeit im Alltag assoziiert (Frontera et al. 2009). Typische Komplikationen wie Arrhythmien, Myokardinfarkt, Pulmonal- und Zerebralödeme (Frontera et al. 2009) erklären außerdem die schlechte Erholung körperlicher Funktionen bei 33 % der Patienten mit zerebralem Vasospasmus (Boulouis et al. 2017).

1.2.2 Therapie

Aktuelle Leitlinien der DGN sehen eine orale oder intravenöse Prophylaxe des DIND mit dem Ca²⁺-Kanalblocker Nimodipin (60mg/4h) vor. Nimodipin ist das einzige von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel zugelassene Medikament für die Therapie nach SAB, behandelt zwar nicht den angiografisch nachweisbaren Vasospasmus, verbessert aber den klinischen Zustand der Patienten (Sehba et al. 2012). Die früher etablierte Triple-H-Therapie (Hypervolämie, Hämodilution, Hypertension) konnte den zerebralen Blutfluss nicht signifikant steigern und erwies sich schließlich als ineffektiv (Dankbaar et al. 2010). Sie gilt inzwischen nicht mehr als Standard in der Vasospasmustherapie. Stattdessen beinhalten die aktuellen Empfehlungen ein geeignetes Monitoring zur Detektion von Vasospasmen und Hypovolämien (transkranielle Dopplersonografie, Messung von arteriellem Blutdruck und zentralem Venendruck, Flüssigkeitsbilanzierung) sowie Maßnahmen zur Einhaltung der Normovolämie und Normotension (DGN).

Die Vorstellung, dass die Bekämpfung des Vasospasmus in allen Fällen der Entstehung von neurologischen Defiziten vorbeugt, hat sich in den letzten Jahren stark verändert. So gibt es eine große Diskrepanz zwischen der Inzidenz des Vasospasmus und der des DIND, und nicht in allen Fällen kann eine Vasospasmusprävention ein DIND verhindern (Sehba 2011). Konsistent dazu gibt es einige Medikamente, die zwar keinen Einfluss auf Vasospasmen nehmen, die Erholung neurologischer Funktionen von SAB-Patienten aber dennoch verbessern, und umgekehrt (Brown et al. 2013).

1.2.3 Pathophysiologische Theorien

Durch die spontane Ruptur eines Aneurysmas breitet sich schlagartig Blut in dem starr durch Schädelkalotte, Meningen und Hirn begrenzten Raum aus. Das dadurch

ausgelöste Ungleichgewicht stößt eine Reihe von Prozessen an, deren genaues Zusammenspiel noch nicht vollständig nachvollzogen ist. Diese Prozesse beginnen innerhalb der ersten 72 Stunden nach SAB, werden in ihrer Gesamtheit als frühe Hirnschädigung (*early brain injury*, EBI) bezeichnet und begünstigen die Genese von symptomatischen Vasospasmen und der DCI (Geraghty und Testai 2017).

Im Rahmen von oxidativem Stress wird die Autoregulation des zerebralen Blutflusses gestört. Oxyhämoglobin setzt reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) frei, die das Endothel angreifen (Fumoto et al. 2019, Sehba et al. 2011). Dadurch kommt es zur verminderten Synthese der Vasodilatoren Prostazyklin (Maeda Y 1981), Stickstoffmonoxid (NO) (Pluta 2006, Sabri et al. 2011) und *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (Hyperpolarisierender Faktor des Endothels, EDHF) (Ledoux J 2006), wodurch ein regulatorisches Ungleichgewicht zugunsten der Vasokonstriktion entsteht.

Durch die Freisetzung von Hämoglobin werden auch Ca^{2+} -Ströme aktiviert (Findlay et al. 2016) und komplexe neuroinflammatorische Prozesse angestoßen, die zusätzlich vasokonstriktiv wirken können (Chaichana et al. 2010). In ihrer genauen Entstehung noch weitestgehend unerforscht sind die durch oxidativen Stress induzierten mikrozirkulatorischen Störungen durch Mikrothromben und Mikrovasospasmen (Fumoto et al. 2019, Liu et al. 2018). Diese stehen in Verdacht, sogenannte *cortical spreading depolarizations* (kortikale Streudepolarisierungen) auszulösen (Geraghty et al. 2019), die wiederum auch unabhängig vom Vasospasmus Risikofaktoren für die Entstehung von frühen sowie verzögert auftretenden Hirnschäden darstellen (Brown et al. 2013).

Insgesamt besteht eine Korrelation zwischen der Blutmenge in den basalen Zisternen und dem Auftreten von angiografisch nachweisbaren Vasospasmen (Fisher et al. 1980). Aus diesem Grund widmet sich ein großer Teil der Forschung zum Vasospasmus, unter anderem auch diese Arbeit, den Abbauprodukten von Blut (Kapitel 1.4).

1.3 Neurovaskuläre Einheit

1.3.1 Beschreibung und Funktion

Hirnblutungen wie die SAB gehen mit einer Störung der natürlich vorhandenen Blutflussänderung in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität einher (Koide et al. 2012, Balbi et al. 2019). Die Regulation dieser reaktiven Blutflussänderung erfolgt

durch die sogenannte neurovaskuläre Kopplung, die in diesem Zusammenhang gestört wird. Goldstandard zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung unter *in vivo*-Bedingungen ist die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT). Grundlage dieser Bildgebung ist die Kopplung vom zerebralen Blutfluss mit der neuronalen Aktivität. Wenn der Sauerstoffbedarf des Gewebes steigt, dilatieren Hirngefäße, um den Mehrbedarf an sauerstoffreichem Blut abzusichern. Der BOLD-Kontrast (*blood oxygen level-dependent*, Sauerstofflevel-abhängig) im fMRT reflektiert den Oxygenierungsgrad des Blutes in Abhängigkeit von Blutvolumen und zerebralem Blutfluss (Logothetis 2003).

Die Regulierung der zerebralen Durchblutung findet im Hirn auf kleinster Ebene statt, in einem Netzwerk, das als neurovaskuläre Einheit (Abb. 2) bezeichnet wird, in der Neurone, Astrozyten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen räumlich und funktionell eng miteinander verbunden sind (Girouard und Iadecola 2006). Das Wirken dieses Netzwerks wird als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet (Squair et al. 2020) und maßgeblich über den Botenstoff Glutamat vermittelt.

Die synaptische Glutamatausschüttung führt in nachgeschalteten Neuronen und Astrozyten zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. An nachgeschalteten Kapillaren löst dieses Signal, abhängig von Ruhetonus, O_2 -Konzentration und extrazellulärer K^+ -Konzentration, eine Gefäßreaktion aus, die sich rückkoppelnd über Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen auf die vorgeschalteten Arteriolen ausbreiten kann (Iadecola 2017). Neurone und Astrozyten beeinflussen nachgeschaltete glatte Gefäßmuskelzellen von Arteriolen auch direkt über die Bildung von vasoaktiven Neurotransmittern und die Aktivierung von K^+ -Kanälen (Attwell et al. 2010).

Die extrazelluläre K^+ -Konzentration beeinflusst die Vasoaktivität umliegender Gefäße: Große Mengen extrazelluläres K^+ depolarisieren die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und wirken so vasokonstriktiv, während ein geringer Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration über die Aktivierung von K_{ir} -Kanälen hyperpolarisierend und somit vasodilatativ wirkt (Knot et al. 1996). Deswegen stellen K^+ -Kanäle einen wichtigen Bestandteil der Forschung zur neurovaskulären Kopplung und ihrer Arterien und Arteriolen nach SAB dar. Die glatten Gefäßmuskelzellen von zerebralen Gefäßen und die den Kapillardurchmesser beeinflussenden Perizyten (Attwell et al. 2010) wandeln die Signale der umliegenden Zellen in eine

Gefäßdurchmesseränderung um (Iadecola 2004). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Kontraktion dieser Zellen (Schmidt und Thews 1997).

Neben den kontraktile Zellen der Arterien, Arteriolen und Kapillaren sind auch die Endothelzellen wichtige Bestandteile der neurovaskulären Einheit. Sie bilden im Hirn über ihre *tight junctions* die Blut-Hirn-Schranke und setzen verschiedene vasoaktive Substanzen frei (Cai et al. 2017). Dilatierend wirken NO, Prostazyklin und EDHF, während Endothelin-1 und *endothelium-derived contracting factor* (Kontraktionsfaktor des Endothels, EDCF) vasokonstriktiv wirken (Faraci und Heistad 1998). Über die *gap junctions* des Endothels wird auch die oben beschriebene rückwirkende Weiterleitung kapillärer Gefäßreaktionen an Arteriolen vermittelt (Iadecola 2017).

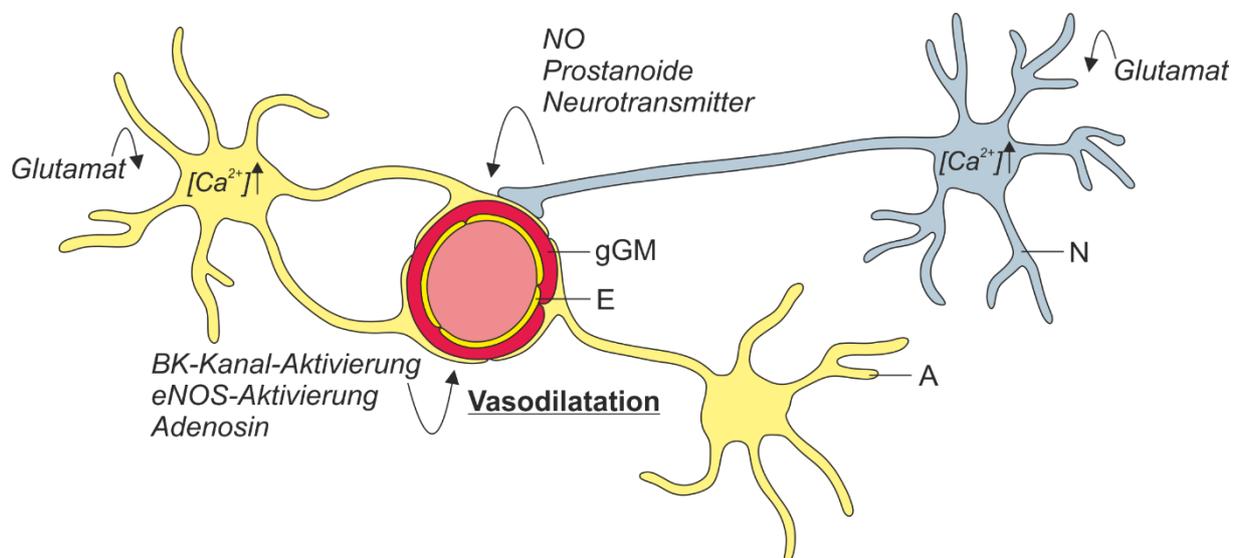


Abb. 2: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit mit Neuron (N), Astrozyten (A) und intraparenchymaler Arteriole mit Endothel (E) und glatter Gefäßmuskulatur (gGM). Die synaptische Glutamatausschüttung führt in den nachgeschalteten Neuronen und Astrozyten zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$). Die daraufhin von Neuronen freigesetzten vasodilatativen Substanzen (z.B. NO, Prostanoiden, Neurotransmitter) wirken auf Astrozyten, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothel. Astrozyten wirken mutmaßlich über Aktivierung von BK-Kanälen in den Astrozytenendfüßchen, Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und Adenosin-Ausschüttung auch direkt vasodilatativ auf glatte Gefäßmuskelzellen. Grafik frei nach Iadecola, 2017.

Die interzelluläre Interaktion in der neurovaskulären Kopplung gerät nach einer SAB in ein Ungleichgewicht. Im Rahmen der *cortical spreading depolarization* folgt auf eine erste kurzzeitige Erhöhung des zerebralen Blutflusses, die vermutlich direkt an die glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt wird, eine über mehrere Stunden anhaltende

Mangelversorgung, für die zumindest partiell der Neurotransmitter 20-HETE eine wichtige Rolle spielt (Attwell et al. 2010). Durch die unzureichende Sauerstoffversorgung wird in einer schädigenden Feedback-Schleife zudem die lokale Produktion des Vasodilatators NO gehemmt und der zerebrale Blutfluss zusätzlich gesenkt.

1.3.2 Kolumnäre Aktivierung nach elektrischer Stimulation

Im gesunden Hirn wird der zerebrale Blutfluss durch Änderungen der neuronalen Aktivität beeinflusst und durch eine koordinierte Reaktion der gesamten neurovaskulären Einheit vermittelt. Der Anstieg neuronaler Aktivität führt über Ausschüttung von Neurotransmittern und die Entstehung von Aktionspotentialen schließlich zu einer Änderung des Gefäßdurchmessers in parenchymalen Arteriolen (Koide et al. 2012). Die Ausschüttung von Glutamat in der Kortexschicht VI aktiviert Interneurone und Pyramidenzellen in den darüberliegenden Schichten IV, III und II. Diese bewirken, entweder direkt über die Ausschüttung des Vasodilatators Prostaglandin E₂ oder über die Aktivierung perivaskulärer Astrozyten eine Änderung des Vasotonus der penetrierenden Arteriolen (Lecrux und Hamel 2016).

Eine solche Aktivierung des Hirngewebes kann auch künstlich durch die elektrische Stimulation mit Elektroden ausgelöst werden. Holthoff et al. setzten am Rattenkortex elektrische Stimuli in Schicht VI, die eine mit intrinsischen optischen Signalen korrelierende Aktivierung des Hirngewebes nach sich zogen. Diese elektrische Aktivierung breitete sich senkrecht zu den kortikalen Schichten in einer Kolumne durch die Kortexschichten VI bis II hindurch aus (Holthoff et al. 1994). Unter gleichen Bedingungen wurde neben den intrinsischen optischen Signalen auch mit Hilfe von ionensensitiven Elektroden die dadurch ausgelöste Änderung der extrazellulären K⁺-Konzentration ermittelt. Innerhalb von Sekunden nach der elektrischen Stimulation in Schicht VI wurde dabei in den Schichten II-III ein transienter Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration auf bis zu 10 mM gemessen (Holthoff und Witte 1996).

Diese Ergebnisse gaben Anlass zu verschiedenen Versuchsreihen innerhalb der Arbeitsgruppe, bei denen die kolumnäre Ausbreitung der neuronalen Aktivität weiterführend untersucht wurde (Joerk 2015, Ritter 2020). Dabei wurde das Wissen um die Ausbreitung der neuronalen Aktivität nach Stimulation in Schicht VI ausgenutzt, um die neurovaskuläre Kopplung an penetrierenden Arteriolen zu untersuchen. Für

diese Arbeit wurde das zuvor verwendete Stimulationsprotokoll angepasst und die Gefäßreaktion auf eine elektrische Stimulationsreihe getestet.

1.3.3 BK-Kanal

Beschreibung

Der BK-Kanal (auch Slo1-Kanal, KCNM-Kanal; Abb. 3) ist ein ubiquitär exprimierter spannungsabhängiger Kaliumkanal, der bei physiologischen Ruhewerten des Membranpotentials ausschließlich abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration geöffnet wird (Nelson MT 1995). Die große Diversität von BK-Kanälen in unterschiedlichen Gewebetypen wird mit alternativen Splicing-Mechanismen des für die α -Untereinheit kodierenden Slo1-Gens (auch KCNMA1-Gen) erklärt (Butler A 1993). Des Weiteren bekannt sind vier verschiedene KCNMB-Gene, die für die regulatorische β -Untereinheit kodieren, und γ -Untereinheiten, die ebenfalls regulatorisch auf die α -Untereinheit wirken (Gonzalez-Perez et al. 2018).

Wie andere spannungsabhängige Kaliumkanäle auch besitzt der BK-Kanal eine porenformende α -Untereinheit mit Transmembrandomänen (S1 – S6) und einen Spannungssensor (S4) (Butler A 1993). Dazu kommt eine S_0 -Domäne am exoplasmatischen NH_2 -Terminus (Wallner et al. 1996) und vier zytoplasmatische hydrophobe Domänen (S7-S10) (Butler A 1993), die zwei Ca^{2+} -sensitive Kaliumstrom-regulierende Domänen (*regulator of conductance*, RCK-Domänen) (Jiang et al. 2002) mit der besonders Ca^{2+} -affinen Ca^{2+} -Bindetasche bilden (Yusifov et al. 2008). Ein Tetramer aus vier α -Untereinheiten formt eine funktionale Kanalpore, die fakultativ durch β - (Toro et al. 1998) oder γ -Untereinheit reguliert wird. Anders als bei rein spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, deren β -Untereinheit zytoplasmatisch liegt, besteht die des BK-Kanals aus zwei Transmembrandomänen, die durch eine zweifach N-glykosylierte extrazelluläre Schleife getrennt sind (Knaus et al. 1994). Bis zu vier β -Untereinheiten können ein Tetramer regulieren, wobei jede Untereinheit stufenweise die Funktion des Kanals hochreguliert (Wang et al. 2002). Die γ -Untereinheit besteht aus einer Transmembrandomäne, an der acht leucinreiche Extrazellulärdomänen hängen (Yan und Aldrich 2012, Dolan et al. 2007). Die γ -Untereinheit reguliert den BK-Kanal nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, dennoch können sich bis zu vier γ -Untereinheiten um eine α -Untereinheit formieren (Gonzalez-Perez et al. 2014).

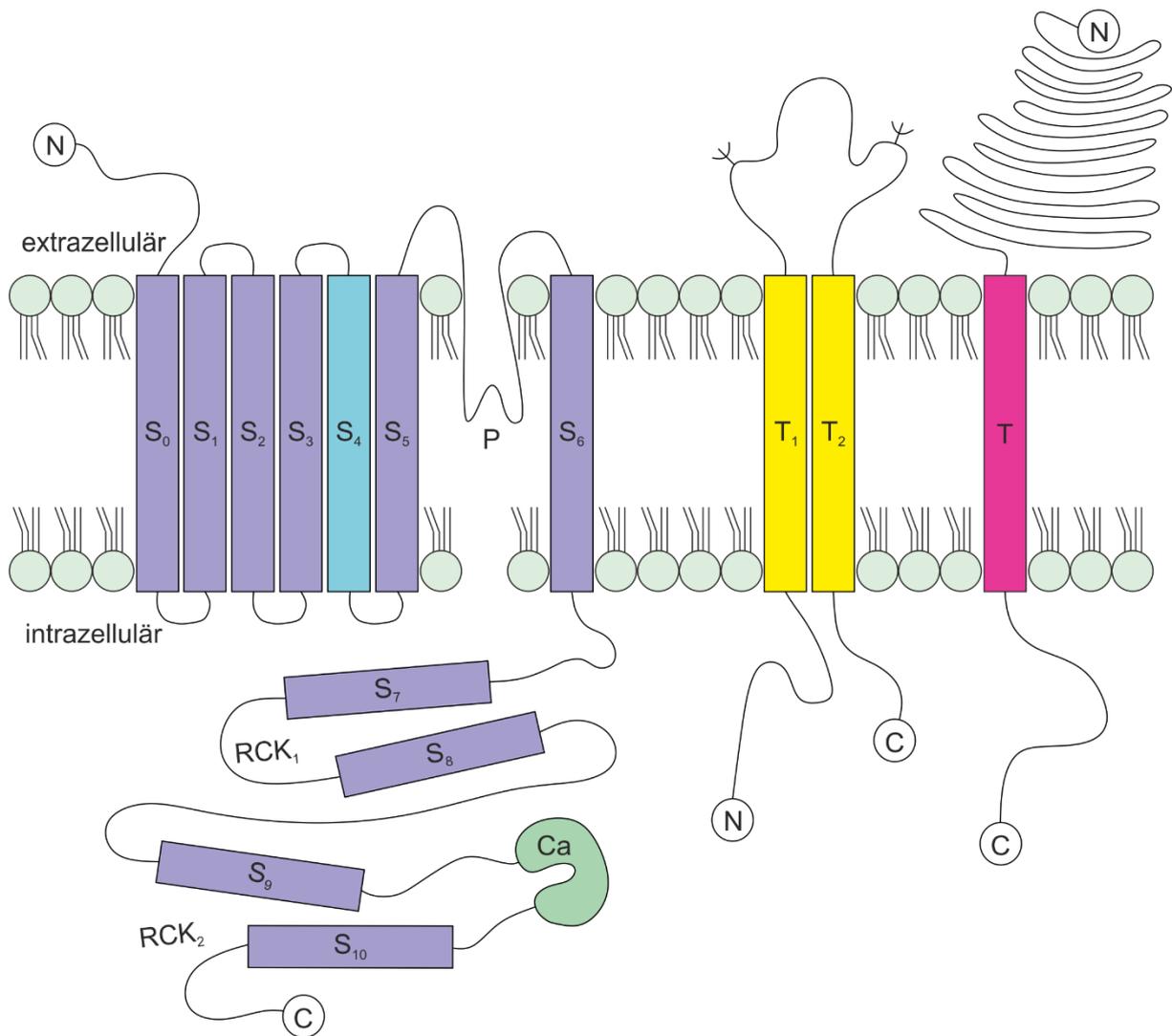


Abb. 3: Schematische Darstellung der Untereinheiten des BK Kanals. Links in Blau: α -Untereinheit mit sieben Transmembrandomänen (S_0 - S_6) inklusive Spannungssensor (S_4) und Porenschleife (P), vier zytosolischen Domänen (S_7 - S_{10}) mit RCK₁ und RCK₂ mit Ca²⁺-Bindetasche (Ca). Mitte in Gelb: β -Untereinheit mit zwei Transmembrandomänen (T_1 und T_2) und zwei extrazellulären Glykosylierungen. Rechts in Rot: γ -Untereinheit mit Transmembrandomäne und leucinreichen Extrazellulärdomänen.

α - und β -Untereinheit in Anlehnung an Gonzalez-Perez, 2019; γ -Untereinheit in Anlehnung an Yan, 2012

Funktion

Der BK-Kanal hat eine hohe Leitfähigkeit für K⁺-Ionen und spielt daher eine wichtige Rolle in der neurovaskulären Kopplung (Longden und Nelson 2015). Seine Leitfähigkeit liegt zwischen 200 und 250 pS (Ko EA 2008). Durch Depolarisation des Membranpotentials und Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt es zur Öffnung des Kanals, und es folgt ein hyperpolarisierend wirkender K⁺-Ausstrom. Durch Hyperpolarisation der Zellmembran schließen spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, deren erhöhte Leitfähigkeit vorher maßgeblich die Zelldepolarisation verstärkt hatte (Ledoux J 2006). Der BK-Kanal wirkt also negativ rückkoppelnd einer Depolarisation und Zellkontraktion entgegen. Aus diesem Grund ist seine Funktion in glatten Gefäßmuskelzellen essentiell für die Muskeltonusregulation und für die Vasodilatation im Rahmen neuronaler Aktivität. Die Hemmung des BK-Kanals führt zu einer verlängerten Depolarisation und wirkt daher in glatten Gefäßmuskelzellen von Arterienwänden konstriktiv (Nelson MT 1995).

Funktion des BK-Kanals nach SAB

Einige Theorieansätze für die Umkehrung der neurovaskulären Kopplung nach SAB beinhalten auch den BK-Kanal. An Ratten wurden *in vivo* in Astrozyten nach induzierter SAB deutlich höhere Ca²⁺-Oszillationsamplituden detektiert als in Kontrollhirnen. Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führt zur erhöhten Aktivität der BK-Kanäle in den astrozytären Endfüßchen und dadurch in der Nähe der von ihnen umschlossenen Blutgefäße zu einem noch stärkeren K⁺-Ausstrom, der die Schwelle zwischen dilatierender und konstringierender extrazellulärer K⁺-Konzentration überschreitet. Dadurch werden spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle aktiviert. In der Konsequenz führt unter diesen Umständen eine neuronale Aktivität nicht zu einer Vasodilatation, sondern zu einer Konstriktion parenchymaler Arterien (Koide et al. 2012).

Ausschalten des BK-Kanals

Wegen seiner zentralen Rolle bei der Vermittlung von Vasodilatation und -konstriktion (Longden und Nelson 2015) stellt die funktionelle Beeinflussung des BK-Kanals einen wichtigen Aspekt der Vasospasmusforschung dar. Die Nervengifte Iberiotoxin und Charybdotoxin hemmen den BK-Kanal selektiv in glatten Gefäßmuskelzellen (Nelson MT 1995, Ko EA 2008), während Paxillin paninhibitorisch auf BK-Kanäle in allen

Zelltypen wirkt (Zhou und Lingle 2014). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden diese Inhibitoren sowie Aktivatoren des BK-Kanals getestet (Schaefgen 2020, Ritter 2020).

Neben der pharmakologischen Modulation des BK-Kanals ist seit einigen Jahren auch die Elimination auf Genomebene etabliert. Beim konventionellen KO wird ein essentielles Gensegment des BK-Kanals permanent entfernt, wodurch die Funktion des Gens ubiquitär verloren geht. Durch Kreuzung von heterozygoten Tieren (Slo1^{+/-}) erhält man unter anderem Slo1^{-/-}-Mäuse, in deren Körperzellen keine funktionellen BK-Kanäle vorhanden sind. Diese Tiere zeigen durch das Fehlen des BK-Kanals einen anderen Phänotyp als die WT-Tiere. Die KO-Tiere neigen zu moderater Ataxie, Harninkontinenz (Meredith et al. 2004), moderaten Störungen der Blutdruckregulation (Sausbier M 2004) und des Hörens (Rüttiger L 2004) sowie zur Blepharitis.

Auch eine gezielte Ausschaltung in gewünschten Zellen und Gewebetypen ist möglich. Mithilfe des Cre/LoxP-Systems wird die für den BK-Kanal kodierende Region der Desoxyribonucleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) markiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen der Zyklisierungsrekombinase (*cyclization recombination*, Cre) ausgeschnitten. Die Cre wird erst dann aktiviert, das Gen also erst „ausgeschnitten“, sobald ein Aktivator, wie beispielsweise Tamoxifen, zugeführt wird. Die Bindung der Tamoxifen-aktivierbaren Cre an einen zellspezifischen Promotor, wie zum Beispiel den der Myosin-Schwerkette der glatten Gefäßmuskelzellen, sorgt dafür, dass lediglich im gewünschten Gewebe und zum gewünschten Zeitpunkt ein KO stattfindet (Wirth et al. 2008). Auf diese Art und Weise konnte ein transgenes Tiermodell entwickelt werden, in dem der BK-Kanal lediglich in glatten Gefäßmuskelzellen ausgeschaltet ist. Die unerwünschten Anpassungsmechanismen, die ein ubiquitärer KO zur Folge haben kann, entfallen in diesem Modell, was einen stark ausgeprägten KO-Phänotyp demaskiert (Sprossmann et al. 2009).

1.3.4 Funktion und Modulation der Rho-Kinase

Die Rho-Kinase ist ein ubiquitär exprimiertes Effektormolekül des kleinen G-Proteins RhoA (Luo et al. 2014). Über diverse Stoffwechselwege und Interaktionspartner ist sie unter anderem in die Formierung und den Umbau des Zytoskeletts (Takai et al. 1995), die Signaltransduktion zur NO-Bereitstellung (Yao et al. 2010), die Thrombusformierung (Eto et al. 2002), in inflammatorische Prozesse (Ma et al. 2011) und die Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen (Somlyo und Somlyo 2000) involviert.

Die Rho-Kinase inhibiert die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase und verstärkt dadurch die Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen (Somlyo und Somlyo 2000, Nagumo et al. 2000). Weil dieser Effekt bei konstanten Ca^{2+} -Konzentrationen zu beobachten ist, spricht man auch vom Ca^{2+} -sensibilisierenden Effekt der Rho-Kinase (Somlyo und Somlyo 2003). Dieser Mechanismus macht die Rho-Kinase zu einem zentralen Mediator in der Entstehung des zerebralen Vasospasmus (Chrissobolis und Sobey 2006, Sato et al. 2000). Durch verschiedene Substanzen, die nach einer SAB im Subarachnoidalraum vorhanden sind, wird die RhoA/Rho-Kinase über den G-Protein gekoppelten Rezeptor hochreguliert (Sato et al. 2000, Jin et al. 2004, Naraoka et al. 2013). Während eine verstärkte NO-Produktion im Endothel die RhoA/Rho-Kinase-Kaskade hemmt, führt eine gesteigerte RhoA/Rho-Kinase-Aktivität (wie nach SAB) zum Sistieren der NO-Produktion, was die Rho-Kinase-vermittelten kontraktile Prozesse weiter verstärkt (Luo et al. 2014).

Aus diesem Grund werden Rho-Kinase-Inhibitoren auch zur Prävention und Therapie des zerebralen Vasospasmus eingesetzt und wurden im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit HDPs präklinisch getestet.

Fasudil

Der erste klinisch für SAB-Behandlung zugelassene Rho-Kinase-Inhibitor ist Fasudil (HA-1077 Dihydrochlorid), ein Medikament, das seit 1995 in Japan zur Vasospasmus-Prävention genutzt wird. Fasudil setzt die Rho-medierte Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase außer Kraft (Nagumo et al. 2000), wirkt dadurch vasodilatativ und reduziert die Inzidenz des Vasospasmus an sich (Zhao et al. 2006), wirkt einem bereits bestehenden Vasospasmus aber auch entgegen (Shibuya et al. 1992, Tanaka et al. 2005, Satoh et al. 2012). Da eine Therapie mit Fasudil jedoch keine signifikante Verbesserung der neurologischen Funktionen zur Folge hat, gibt es inzwischen Ansätze zur Kombinationstherapie mit RhoA-hemmenden Statinen, die sowohl dem akuten Vasospasmus als auch phänotypischen Veränderungen von glatten Gefäßmuskelzellen entgegenwirken (Naraoka et al. 2013).

1.3.5 Funktion und Modulation des K_{ir} -Kanals

K_{ir} -Kanäle (einwärts gleichrichtende Kalium-Kanäle) sorgen unter den meisten physiologischen Bedingungen für einen steten, hyperpolarisierenden K^+ -Ausstrom in erregbaren und unerregbaren Zellen (Nelson MT 1995). Negative Membranpotentiale

und hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen begünstigen die Aktivierung der K_{ir} -Kanäle (Rivers RJ 2001).

In glatten Gefäßmuskelzellen tragen K_{ir} -Kanäle zur Regulation des Ruhemembranpotentials und damit zum Ruhetonus bei (Ko EA 2008). Auf neuronale Aktivität folgt ein K^+ -Ausstrom aus den astrozytären Endfüßchen in den Extrazellularraum, was in kleinen zerebralen Arterien zu einer Dilatation führt (Nelson MT 1995, Knot et al. 1996, Zaritsky JJ 2000). Vermutlich sind aber auch weitere, von den glatten Gefäßmuskelzellen unabhängige Mechanismen an der K^+ -induzierten Vasodilatation beteiligt (Chrissobolis S 2000).

Nach einer SAB wird in vasospastischen glatten Gefäßmuskelzellen die Expression von K_{ir} -Kanälen hochreguliert (Weyer et al. 2006). Hierdurch kommt es, wie auch nach der oben beschriebenen Aktivierung der BK-Kanäle im Rahmen der SAB, zu einer Erhöhung der perivaskulären K^+ -Konzentration auf ein Niveau, das den Schwellenwert zur Vasokonstriktion überschreiten kann (Koide et al. 2012).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von K_{ir} -Kanälen stark von BK-Kanälen abhängig ist und beide K^+ -Kanäle in der neurovaskulären Einheit eng miteinander verbunden sind (Girouard et al. 2010). Um diese Interaktion weiterführend zu testen, wurden für diese Arbeit zwei K_{ir} -Kanal-Inhibitoren im etablierten *in vitro*-Experiment mit HDPs eingesetzt.

Bariumchlorid

Barium wirkt über eine Porenblockade inhibierend auf K_{ir} -Kanäle (Longden und Nelson 2015) und wird in der Verbindung mit Chlor als $BaCl_2$ seit vielen Jahren experimentell eingesetzt, um die K^+ -induzierte Vasodilatation zu hemmen (Dawes et al. 2002, Filosa et al. 2006). Bariumverbindungen sind in systemischen Dosen hochgradig toxisch (Johnson und VanTassell 1991) und finden daher vor allem *in vitro* Anwendung (van der Heyden 2011).

Unter anderem konnte in akuten Maushirnschnitten nachgewiesen werden, dass $BaCl_2$ zwar die Vasodilatation durch niedrige extrazelluläre K^+ -Konzentrationen hemmen konnte, die Vasokonstriktion durch Dosen von >20 mM extrazellulärem K^+ aber nicht beeinflusste (Chrissobolis S 2000, Girouard et al. 2010).

ML133

ML133 ist ein kleines synthetisches Molekül, das hochspezifisch den Kir2.1-Kanal hemmt (Wang et al. 2011). Wegen dieser Spezifität wurde ML133 unter anderem in Experimenten mit dem weniger spezifischen BaCl₂ als Kontrolle für die Wirkung an Kir2.1 eingesetzt (Ford und Baccei 2016). Verschiedene Publikationen weisen darauf hin, dass gerade die Expression des Kir2.1-Kanals essentiell für die K⁺-induzierte Dilatation zerebraler Arterien ist (Zaritsky JJ 2000). Die Hemmung dieser über ML133 konnte an isolierten hippokampalen Mausarteriolen nachgewiesen werden (Rosehart et al. 2019). Fraglich ist, ob eine Hemmung des Kir2.1-Kanals auch die durch höhere extrazelluläre K⁺-Konzentrationen ausgelöste Vasokonstriktion beeinflussen kann.

Die fast hundertprozentige Proteinbindung und die hohe intrinsische Ausscheidung (*clearance*) in Ratten und Menschen macht eine Anwendung von ML133 vorerst nur *in vitro* möglich (Wang et al. 2011).

1.4 Hämabbauprodukte (HPDs)

1.4.1 Entstehung

Neben den verschiedenen bisher erwähnten Substanzen, die nach einer SAB Einfluss auf die Entstehung von Vasospasmen nehmen, stehen seit einigen Jahren auch die Blutung an sich und ihre Abbauprodukte im Fokus der Vasospasmusforschung. Das Koagulat im Subarachnoidalraum aktiviert entzündliche Prozesse, die unter anderem zum Abbau der Erythrozyten beitragen (Clark und Sharp 2006). Das freigesetzte Hämoglobin wird in den umliegenden Zellen enzymatisch sowie im Extrazellularraum nicht-enzymatisch über Bildung von freien Radikalen abgebaut (Kranc KR 2000, Clark und Sharp 2006). Dabei entstehen über den Abbau von Häm zunächst Biliverdin und Bilirubin, die wiederum nicht-enzymatisch über Zwischenprodukte, die PDPs (Ritter et al. 2016), zu Bilirubin-Oxidationsprodukten (BOXes) (Kranc KR 2000) umgewandelt werden (Abb. 4). Die unterschiedlichen Isoformen beider Substanzklassen konnten im Liquor von SAB-Patienten identifiziert werden (Pyne-Geithman et al. 2005, Joerk et al. 2019) und scheinen bei der Entstehung des zerebralen Vasospasmus nach SAB eine wichtige Rolle zu spielen (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019).

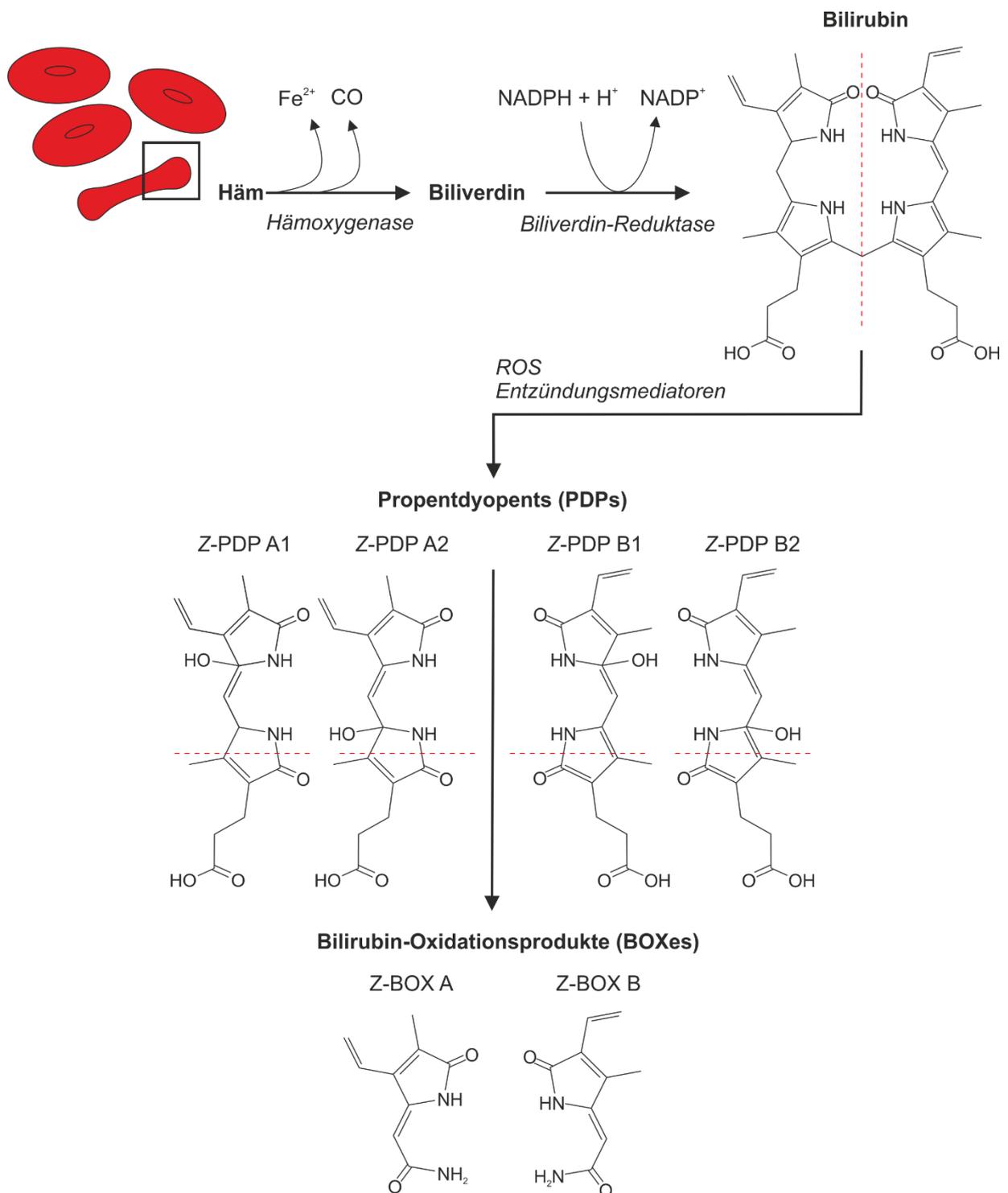


Abb. 4: Entstehung von HDPs. Lyse der Erythrozyten im Rahmen einer SAB. Anschließend enzymatischer Abbau von Häm zu Bilirubin **(A)**. Nichtenzymatischer Abbau von Bilirubin zu PDPs und BOXes **(B)**. Abb. nach Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019, Ritter et al. 2016, Kranc et al. 2000 und Clark & Sharp 2006.

1.4.2 Akuter Effekt (BK-Kanäle)

An dieser Stelle kommt der oben beschriebene BK-Kanal ins Spiel, denn seine Öffnungswahrscheinlichkeit wird durch Häm gehemmt (Tang XD 2003) und BOXes

stabilisieren den Kanal in geschlossen konformiertem Zustand (Hou et al. 2011). In der Theorie hat dies eine verlängerte Depolarisationszeit und dadurch eine verstärkte Muskelkontraktion in den betroffenen glatten Gefäßmuskelzellen zur Folge. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden an Slo1^{-/-}-Mäusen umfangreiche in-vitro und in-vivo Experimente durchgeführt. In ähnlichen Konzentrationen, wie sie auch im Liquor von SAB-Patienten auftraten, konnte sowohl für PDPs als auch für BOXes ein akuter und anhaltender vasokonstriktiver Effekt an zerebralen Arteriolen gezeigt werden. Dieser Effekt war an den Slo1-defizienten Mäusen nicht nachweisbar, was eine Hemmung des BK-Kanals über die α -Untereinheit wahrscheinlich macht. In Kombination mit dem BK-Kanal Aktivator NS1619 lösten HDPs keine Vasokonstriktion aus (Joerk et al. 2019).

Aus diesen Ergebnissen resultiert die Hypothese, dass HDPs akut BK-Kanäle hemmen und so zu verstärkter Vasokonstriktion nach SAB führen können.

Das Blut und seine Abbauprodukte verteilen sich dabei nicht nur im Subarachnoidalraum, sondern sind in der Lage, in das zerebrale Parenchym zu migrieren (Koide et al. 2012) und so auch an intraparenchymalen Arteriolen wirksam zu mikrovaskulären Konstriktionen zu führen.

1.4.3 Langzeitwirkung im Hirngewebe (Morphologie)

Durch eine SAB gelangen verschiedene Substanzen in den äußeren Liquorraum, die anhaltende phänotypische Veränderungen an den glatten Gefäßmuskelzellen der umliegenden Hirngefäße anstoßen. Dazu gehören auch die BOXes (Lyons et al. 2004). Bei großen extraparenchymalen Arterien (Ohkuma et al. 2001) und kleinen intraparenchymalen Widerstandsgefäßen (Ohkuma et al. 2003) konnten nach experimentell induzierter SAB und nach Exposition von BOXes Prozesse beobachtet werden, die man als vaskuläres *Remodeling* bezeichnet. Die glatten Gefäßmuskelzellen dieser Gefäße zeigten eine erhöhte Proteinbiosynthese von Aktinfasern und hypertrophisches Wachstum. Mikroskopisch wurden in beiden Gefäßtypen deutliche Gefäßwandverdickungen beobachtet. Diese genetischen und morphologischen Veränderungen traten nach einer Expositionszeit von zwei bis vier Tagen auf und erreichten ihr Maximum an den Tagen sieben bis 14. Weitere Experimente mit Basilararterien von Hunden zeigten Lumenverengungen und Gefäßwandverdickungen, die mit einer Versteifung der Arterien einhergingen und sich

erst 28 Tage nach induzierter SAB zurückgebildet hatten (Yamaguchi-Okada et al. 2005).

All diese Prozesse korrelieren damit eindeutig mit dem Auftreten von zerebralen Vasospasmen und erklären möglicherweise bisherige Misserfolge in der Vasospasmustherapie (Shimamura und Ohkuma 2014).

2 Ziele der Arbeit

Der verzögerte zerebrale Vasospasmus ist eine häufige Komplikation der aneurysmatischen SAB mit schwerwiegenden Folgen für das körperliche und psychische Wohl der Patienten. Das zeitlich verzögerte Auftreten bietet Anlass zur Entwicklung von bisher noch unzureichend vorhandenen pharmakologischen oder interventionellen Präventionsmöglichkeiten. Für diese ist ein umfassendes Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen essentiell, welches im Rahmen dieser Arbeit erweitert werden soll. Im Fokus standen hierbei die zwei Endprodukte des Hämabbaus, PDPs und BOXes, die über die Hemmung von BK-Kanälen zur Konstriktion zerebraler Arteriolen führen. Am akuten Maushirnschnitt wurde diese Gefäßdurchmesseränderung intrakortikaler Arteriolen mittels DIC-Mikroskopie analysiert. Mittels CLSM wurden am fixierten Maushirnschnitt Gefäßdurchmesser und Dichte der Aktinfaserschicht von großen zerebralen Arterien untersucht. Folgende zentrale Fragestellungen sollten dabei beantwortet werden:

- Wie beeinflussen Inhibitoren der K_{ir} -Kanäle und der Rho-Kinase die PDP A-induzierte, BK-Kanal-vermittelte Vasokonstriktion?
- Sind BK-Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen die spezifischen Vermittler der PDP A-induzierten Vasokonstriktion?
- Haben Alter und Expression des BK-Kanals Einfluss auf die neurovaskuläre Kopplung?
- Induzieren HDPs bei direktem Kontakt zu zerebralen Arterien morphologische Veränderungen an diesen Gefäßen?

Zentrales Ziel der Arbeit war es, das bestehende Wissen über die Wirkweise von HDPs am BK-Kanal und dessen Einbettung in die neurovaskuläre Einheit zu erweitern und so die Pathomechanismen des zerebralen Vasospasmus weiter zu vertiefen, um die Forschung nach Präventivmaßnahmen für SAB-Patienten mit Vasospasmen voranzutreiben.

3 Methoden

3.1 Mauslinien

Für die verschiedenen Teilprojekte wurden zwei unterschiedliche Inzucht-Mausstämme genutzt. Experimente zur Untersuchung der pharmakologischen Modulation an der neurovaskulären Einheit sowie die Altersstudie mit elektrischer Stimulation der Hirnschnitte wurden an FVB-Mäusen durchgeführt. Eine Experimentalreihe zum BK-Kanal der glatten Gefäßmuskulatur wurden mit Mäusen des Stamms C57BL/6 durchgeführt.

Die Narkotisierung und Tötung der Mäuse erfolgte durch fachkundiges Personal mit anerkannter Berufsausbildung (Biologe, Humanmediziner, Tiermediziner, Laborangestellte mit Hochschulstudium) und gültigem Sachkundenachweis (FELASA B, EU-Tätigkeitsgebiet A). Ziel der Tötung war die Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken (nach §7, Absatz 2, Tierschutzgesetz).

3.1.1 Slo1-Mäuse

Es wurden zwei Mauslinien getestet, die sich in der Expression des für die α -Untereinheit des BK-Kanals kodierenden Slo1-Gens unterschieden. Mittels Genotypisierung wurden homozygote WT-Tiere (Slo1^{+/+}) und homozygote KO-Tiere (Slo1^{-/-}) identifiziert. Heterozygote Tiere (Slo1^{+/-}) wurden für diese Arbeit nicht benötigt. Die Slo1^{+/+}-Mäuse wurden als unbelastet, die Slo1^{-/-}-Mäuse als gering belastet eingestuft. Besonders wichtig für diese Arbeit waren die phänotypischen vaskulären Besonderheiten der KO-Mäuse, wie die gestörte Autoregulation der Gefäße bei insgesamt erhöhtem Blutdruck sowie auch die höhere Sterblichkeitsrate.

Für die Experimente wurden sowohl juvenile Mäuse in einer Altersspanne von 20 bis 30 Tagen als auch gealterte Mäuse in einer Altersspanne von 365 bis 400 Tagen verwendet, jeweils ohne Geschlechtspräferenz.

Alle Tiere wurden in der Zentralen Experimentellen Tierhaltung im Forschungszentrum Lobeda (Am Klinikum 1, 07747 Jena) gezüchtet und täglich von den Tierpflegenden inspiziert. Die Tiere lebten dabei in offener Käfighaltung bei einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung

3.1.2 SM-BK-Mäuse

Für eine weitere Experimentalserie wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Peter Ruth (Pharmakologie, Universität Tübingen) initiiert. Aus Tübingen wurden C57BL/6/SV129-Mäuse mit zellspezifisch veränderter Expression des Slo1-Gens importiert (Sprossmann et al. 2009). Diese Tiere wurden über zwei Generationen im Cre/Lox P System gezüchtet (Abb. 5). In der ersten Generation wurden BK-WT-Tiere mit heterozygot gefloxtem Slo1-Gen mit Tieren gekreuzt, die in den glatten Muskelzellen das Cre-Gen exprimierten (Wirth et al. 2008). Die in der F1-Generation entstehenden BK-WT-Tiere mit heterozygot gefloxtem Slo1-Gen und Cre in den glatten Muskelzellen wurden mit homozygot geflochten BK-WT-Mäusen gekreuzt. In der F2-Generation entstanden so die beiden Gruppen, die für die Experimente genutzt wurden: Beide Gruppen exprimierten die Cre in glatten Gefäßmuskelzellen, die eine Gruppe war für das Slo1-Gen homozygot, die andere heterozygot gefloxt. Acht bis zehn Wochen nach Geburt dieser Tiere wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 mg Tamoxifen, gelöst in 50 µl Miglyol, intraperitoneal appliziert. Durch die so aktivierte Cre wurden die geflochten Allele in den glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*, SM) deletiert und die zwei in dieser Arbeit verwendeten Genotypen generiert: SM-BK-KO-Tiere mit Tamoxifen-induzierter Homozygotie (SM-BK^{-/-}) und heterozygote Tiere (SM-BK^{+/-}), bei denen die Tamoxifengabe die Expression der BK-Kanäle in glatten Muskelzellen um ca. 50 % reduzieren sollte.

C57BL/6-Mäuse ohne genetische Modifikationen wurden vom Hauptzüchter Charles River importiert und als Kontrollgruppe verwendet. Alle Tiere wurden im FZL in der Quarantäne in individuell ventilierten Käfigen (*individually ventilated cage*, IVC) gehalten. Tag-Nacht-Rhythmus sowie Futter- und Wasserbereitstellung erfolgte wie bei den Slo1-Mäusen.

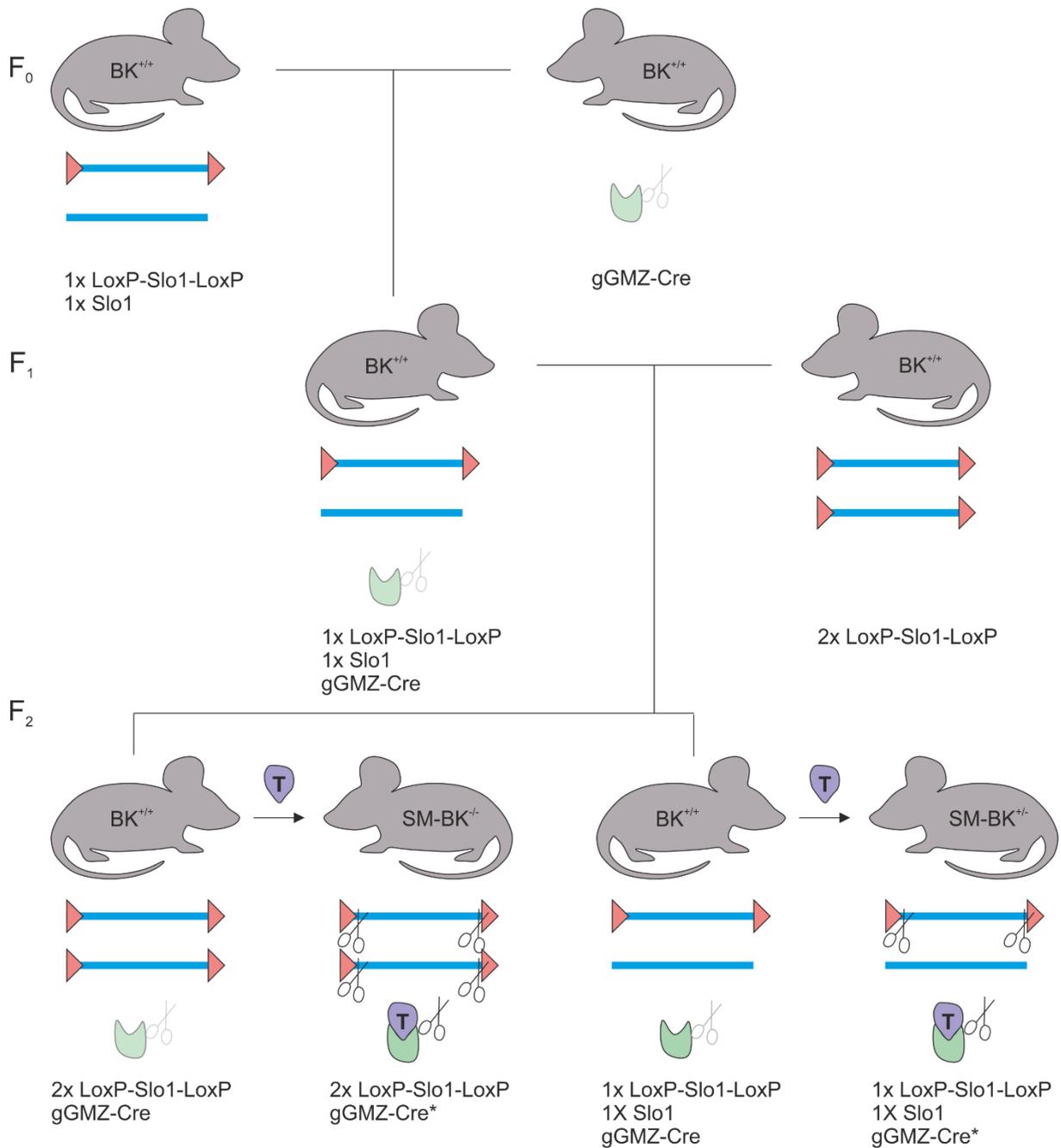


Abb. 5: Kreuzungsschema zur Generierung der Tamoxifen-induzierbaren, glatte Gefäßmuskelzellen-spezifischen BK-Kanal KO-Mauslinie (SM-BK-Mäuse). In der F₀-Generation wurden Mäuse mit einem geflochten Slo1-Allel mit Mäusen verpaart, deren glatte Gefäßmuskelzellen (gGMZ) die Information für eine zellspezifische Cre in sich trugen. Mäuse der Folgegeneration F₁ wurden mit Mäusen verpaart, die zwei geflochte Slo1-Allele hatten. Aus dieser Verpaarung gingen in der F₂-Generation Mäuse mit zwei bzw. einem geflochten Allel hervor, die bei Tamoxifen-Gabe (T) durch die aktivierte Cre (Cre*) herausgeschnitten wurden. Im Ergebnis entstanden Tamoxifen-induziert homozygote SM-BK-KO-Tiere (SM-BK^{-/-}) und heterozygote Tiere (SM-BK^{+/-}).

3.1.3 Genotypisierung

Slo1-Mäuse

Die Schwanzspitzenbiopsien zur Genotypisierung wurden bis zum Beginn der dritten Lebenswoche entnommen. Für eine Nachgenotypisierung erfolgte post mortem eine zweite Schwanzspitzenbiopsie. Bei Nichtübereinstimmung der beiden Ergebnisse wurde das Experiment am jeweiligen Individuum als nicht gültig gewertet.

Zunächst wurde die DNA aus der Schwanzspitze isoliert. Dafür wurde das Biopsat mit 180 µl Gewebe-Lyse-Puffer und 20 µl Proteinkinase K über ein bis drei Stunden bei 56°C und 450 rpm zentrifugiert. Nach dieser Inkubation wurden 200 µl Lyse-Puffer und 200 µl absolutes Ethanol hinzugegeben und so der Lysestopp eingeleitet.

Das Lysat wurde daraufhin auf eine Trennsäule (DNA Isolation Kit) pipettiert und eine Minute bei $8000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte eine Durchspülung der DNA in der Zentrifuge mit 500 µl Spül-Puffer 1 bei $8000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$ und eine zweite mit 500 µl Spül-Puffer 2 bei $16000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen.

Anschließend wurden 35 µl Elutions-Puffer hinzugegeben und die DNA über eine Minute bei $8000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$ aus der Trennsäule eluiert. Dieser Prozess wurde mehrmals wiederholt und das Eluat anschließend bei 4°C gelagert.

Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden die Proben in zwei Ansätze geteilt (Tab. 1). Der eine Ansatz wurde mit WT-Primern, der andere mit KO-Primern versetzt, um einer gegenseitigen Behinderung der Reaktionen durch die vier Primer (Tab. 2) vorzubeugen. Zu jedem Ansatz wurden 3 µl der eluierten DNA hinzugegeben.

Tab. 1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für WT und KO; Angaben in µl.

Stoff	WT	KO
Gibco Wasser (Qiagen)	2,7	2,7
5x Q-Buffer (Qiagen)	2	2
10x Puffer (Qiagen)	1	2
2,5 mM dNTPs (Qiagen)	0,2	0,2
Primer Neo 5'	-	0,5
Primer RA 14025 3'	-	0,5
Primer Exon1 5'	0,5	-

Primer WT 3'	0,1	-
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,1	0,1
Zugabe von 3 µl eluierter DNA		

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Primersequenzen (biomers).

GT	Primer	Sequenz
KO	Neo 5'	5'-ATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'
	RA 14025 3'	3'-CCTCAAGAAGGGGACTCTAAAC-5'
WT	Exon1 5'	5'-TTCATCATCTTGCTCTGGCGGACG-3'
	WT 3'	3'-CCATAGTCACCAATAGCCC-5'

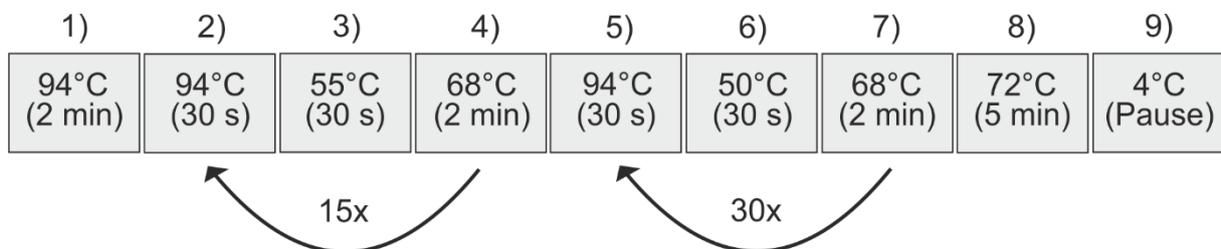


Abb. 6: Thermischer Ablauf bei PCR im Thermozykler. Die Schritte 2) bis 4) wurden 15-mal, die Schritte 5) bis 7) 30-mal wiederholt.

Die PCR wurde in einem Thermozykler durchgeführt (Abb. 6). Für die anschließende Gelelektrophorese wurde ein QIAxcel Advanced System mit dem entsprechenden DNA-Screening Kit als Kartusche verwendet. Alle Reaktionsansätze wurden zusammen in die Gelelektrophorese gegeben. Mithilfe der spezifischen Bandenmuster konnten die Genotypen WT (332 bp), KO (1000 bp) und heterozygot (beide) differenziert und mit den vier Kontrollen (WT, KO, heterozygot und Wasser) verglichen werden (Abb. 7).

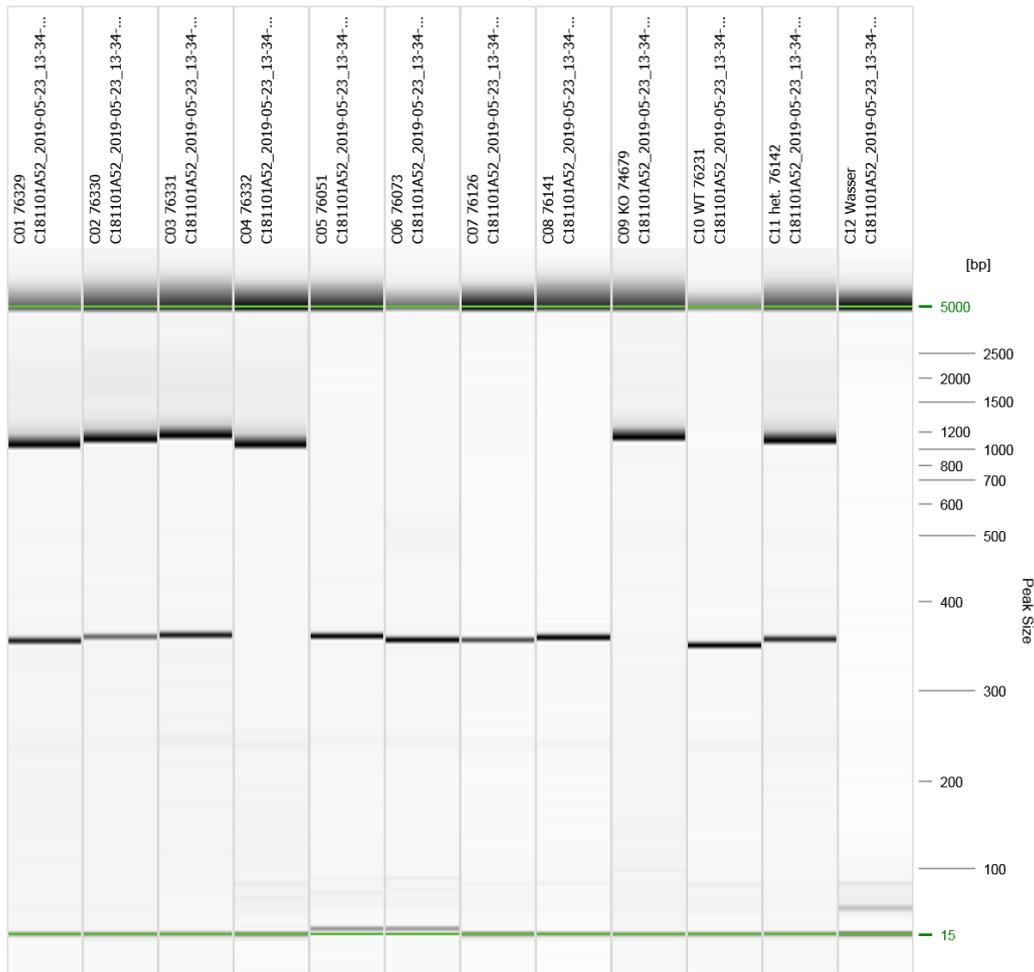


Abb. 7: Gelelektrophorese von acht Individuen (von links nach rechts): heterozygot (1-3), KO (4), WT (5-8) und vier Kontrollbanden (KO, WT, heterozygot und Wasser).

SM-BK-KO-Mäuse

In Tübingen wurden zur Genotypisierung Schwanzspitzenbiopsien entnommen. Post mortem erfolgte in Jena eine zweite Entnahme von Schwanzspitzenbiopsien, die zur Nachgenotypisierung nach Tübingen geschickt wurden.

3.2 Versuchsreihen und experimentelles Design

3.2.1 Pharmakologische Modulation

Für diese Versuchsreihe wurden drei vasoaktive Substanzen an juvenilen Slo1^{+/+}-Mauschirnschnitten getestet. Ziel war, herauszufinden, inwiefern diese Substanzen *in vitro* die etablierte Gefäßreaktion von zerebralen Arteriolen auf PDP A beeinflussen. Die unten beschriebenen Experimente wurden jeweils mit den vasoaktiven Substanzen allein und in Kombination mit PDP A durchgeführt. So ergaben sich sechs Gruppen mit einer jeweiligen Stärke von n = 5 (Tab. 3).

Tab. 3: Auflistung der Versuchsgruppen des Teilprojektes „Pharmakologische Modulation“.

Versuchsgruppe	Tiere
Fasudil	n = 5
PDP A & Fasudil	n = 5
Bariumchlorid	n = 5
PDP A & Bariumchlorid	n = 5
ML133	n = 5
PDP A & ML133	n = 5

3.2.2 BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen

Um die glatten Gefäßmuskelzellen als speziellen Wirkungsort der PDP A-vermittelten BK-Kanal-Hemmung zu identifizieren oder auszuschließen, wurde mit dem in Kapitel 3.1.2 beschriebenen zellspezifischen KO-Modell der Arbeitsgruppe von Professor Ruth aus Tübingen gearbeitet. An akuten Hirnschnitten dieser Mäuse wurden die etablierten *in vitro*-Experimente mit PDP A durchgeführt. Die drei Versuchsgruppen (Tab. 4) ergaben sich aus den verwendeten Mauslinien und wurden doppelt verblindet untersucht.

Tab. 4: Auflistung der Versuchsgruppen des Teilprojektes „BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen“.

Versuchsgruppe	Tiere
SM-BK ^{-/-}	n = 9
SM-BK ^{+/-}	n = 12
BK ^{+/+}	n = 10

3.2.3 Elektrostimulationsreihe

Ein weiteres Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage der altersabhängigen Reaktivität der neurovaskulären Einheit. An Hirnschnitten von Tieren verschiedener Altersgruppen und unterschiedlicher Genotypen wurden dafür Elektrostimulationsreihen durchgeführt. Es erfolgte keine Applikation von vasoaktiven Substanzen, sondern lediglich eine Umspülung der Hirnschnitte mit warmer artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF). Drei Versuchsgruppen wurden so getestet (Tab. 5).

Tab. 5: Auflistung der Versuchsgruppen des Teilprojektes „Elektrostimulation“.

Versuchsgruppe	Tiere
Elektroreihe: juvenil, Slo1 ^{+/+}	n = 5
Elektroreihe: alt, Slo1 ^{+/+}	n = 5
Elektroreihe: alt, Slo1 ^{-/-}	n = 5

3.2.4 HDPs und Gefäßmorphologie

Ziel dieses Teilprojekts war das Studium der Langzeitfolgen von HDPs auf die Gefäßmorphologie. Hierfür wurden fixierte Hirnschnittpräparate von Versuchstieren einer *in vivo*-Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe genutzt. Im Rahmen dieser Studie waren an Slo1^{+/+} und Slo1^{-/-}-Mäusen Injektionen von Eigenblut bzw. HDPs in den Subarachnoidalraum vorgenommen worden, während die Kontrollgruppe einer Scheinoperation unterzogen worden war (Joerk et al. 2019). Sieben bzw. 14 Tage nach dieser Mikrooperation war die Hirnentnahme erfolgt. Für diese Arbeit wurde in fixierten und immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitten die Arteria azygos pericallosa (*azygos pericallosal artery*, APA) mittels CLSM visualisiert und untersucht. Die sechs Versuchsgruppen ergaben sich aus den sechs Behandlungsgruppen innerhalb der *in vivo*-Studie. Für jede Versuchsgruppe wurden pro Tier alle auffindbaren Gefäßanschnitte untersucht (Tab. 6).

Tab. 6: Auflistung der Versuchsgruppen des Teilprojektes „HDPs und Gefäßmorphologie“. „n“ entspricht der Anzahl der Versuchstiere, „APA“ entspricht der Anzahl der untersuchten Anschnitte der Arteria azygos pericallosa.

Versuchsgruppe	Tiere	Datenpunkte
Kontrolle Slo1 ^{+/+}	n = 5	APA = 30
Eigenblut Slo1 ^{+/+}	n = 5	APA = 30
BOX Slo1 ^{+/+}	n = 5	APA = 28
PDP (7d) Slo1 ^{+/+}	n = 5	APA = 30
PDP (14d) Slo1 ^{+/+}	n = 5	APA = 30
PDP (14d) Slo1 ^{-/-}	n = 4	APA = 24

3.3 Chemikalien

Tab. 7: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Substanz (Schreibweise wie Etikett)	Hersteller	Artikelnummer
NaCl	Carl Roth	3957.1
KCl	Merck KGaA	1.049.360.500
NaHCO ₃	Merck KGaA	1.063.291.000
NaH ₂ PO ₄	Merck KgaA	1.063.461.000
CaCl ₂ *2 H ₂ O	Merck KgaA	1.023.820.250
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Carl Roth	2189.1
C ₆ H ₁₂ O ₆ *H ₂ O	Carl Roth	6780.1
HCl	Merck KgaA	4.80934.1000

NaOH	Riedel-de Haën	38214
Isofluran CP®	cp-pharma	31303
Norepinephrin bitartrate salt monohydrate	Sigma Aldrich	A9512-1G
Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	Sigma Aldrich	N5751-1G
Fasudil HA 1077 Dihydrochlorid	Sigma Aldrich	H139-5MG
Bariumchlorid	Sigma Aldrich	202738
ML133	Calbiochem	422689-5MG
Fluoromount-G	SouthernBiotech	0100-01
Ethylenglycol 99,5 % 2,5 l	Sigma Aldrich	1.096212.500
Glucose Monohydrat	Carl Roth	6780.1
D(+)-Saccharose	Carl Roth	4621.1
NaCl	Carl Roth	3957.1
Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	Merck	1.065.860.500
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck	1.065.801.000
Tris Ultra Qualität	Carl Roth	5429.3
Tris-hydrochlorid	Carl Roth	9090.3
Normal Donkey Serum	GeneTex (Biozol)	GTX73245
Triton X-100 zur Analyse	Merck	1.086.031.000
Chrom (III) Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Roth	3535.3
Formalin 4 % pH 7,4	SAV Liquid	F04-0004%PH7,4
Anti-alpha smooth muscle Actin antibody	Abcam	ab5694
Alexa Fluor 647 donkey anti rabbit	Dianova (Jackson Immunoresearch)	711- 606-152
CD31	Abcam	ab56299
Alexa Fluor 488 goat anti rat	MolecularProbes	A11006
DAPI	Sigma Aldrich	D9542-10MG

3.4 Technik

Tab. 8: Auflistung der verwendeten technischen Geräte.

Apparatur	Artikelname	Hersteller	Ort
DNA Isolation Kit	DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland

Thermocycler	Biometra TRIO 48	Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
System Gel- elektrophorese	QIAxcel Advanced System	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
DNA- Screening Kit	QIAxcel DNA Screening Kit (2400)	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
pH-Meter	pH-Meter 765 Calimatic	Welabo GmbH	Nettetal, Deutschland
HPLC	Shimadzu LC-8A	Shimadzu Deutschland GmbH	Jena, Deutschland
HPLC-Säule	C18 Htec	Macherey Nagel GmbH	Düren, Deutschland
Auflicht- Stereo- mikroskop	Kaps SOM 82	Karl Kaps	Aßlar, Deutschland
Skalpell	Präzisa Fig. 20	Dahlhausen Medizintechnik GmbH	Halberstadt, Deutschland
Sekunden- kleber	UHU	UHU GmbH & Co. KG	Bühl, Deutschland
Vibrotom	Leica VT1200 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nußloch, Deutschland
Rasierklinge	Superior Stainless Steel Double Edge	Astra	St. Petersburg, Russland
Peristaltik- pumpe	PLP380 behrotest Laborschlauchpumpe	behr Labor Technik GmbH	Düsseldorf, Deutschland
Wasserimmer- sionsobjektiv	Nikon LWD 16x/0.80W DIC N2	Nikon Instruments	Tokio, Japan
Durchlicht- mikroskop	Eclipse FN 1	Nikon Instruments	Tokio, Japan
Temperatur- regler	Badcontroller V	Luigs & Neumann	Ratingen, Deutschland
Kamera	C7500-11	Hamamatsu Photonics	Hamamatsu, Japan

Analog-Digital-Wandler	C2400-60	Hamamatsu Photonics	Hamamatsu, Japan
Stimulations-elektrode	Mini 25-ZR	Luigs & Neumann	Ratingen, Deutschland
isolierter Pulsstimulator	Unit MRE / MLE (3 axes Mini 25) Model 2100	Luigs & Neumann	Ratingen, Deutschland
Mikrotom	Microm HM 450	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Mikrotom-Kühleinheit	Microm KS 34	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Auffriergel	Tissue-Tek® Paraform® Tissue Orientation Gels	Sakura Finetek Europe B.V	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Zellkulturplatte	TC-Platte 24 Well Standard	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland

3.5 Lösungen

3.5.1 Artificielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF)

Essentiell für das erfolgreiche Experimentieren am akuten Hirnschnitt war die schonende Präparation und Aufbewahrung in aCSF, die mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) begast wurde. Aus vier Stammlösungen wurden täglich neu für jedes Experiment je 500 ml eisgekühlte Präparationslösung und 1000 ml Messlösung angesetzt.

Stammlösungen

Für die aCSF-Stammlösung wurden die aufgelisteten Substanzmengen (Tab. 9) in einem Messzylinder mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst. Endvolumen für die angegebenen Mengen waren 1000 ml Lösung.

Tab. 9: Zusammensetzung der aCSF-Stammlösung.

Substanz	Konzentration [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g/1000ml]
NaCl	1250	58,44	73,050
KCl	40	74,55	2,982
NaHCO₃	250	84,01	21,003

NaH₂PO₄	12,5	137,99	1,725
Lagerung im Kühlschrank bei 4-6°C			

Drei weitere Stammlösungen wurden ergänzend zur aCSF-Stammlösung angesetzt. Für 100 ml CaCl₂-Stammlösung, bzw. MgCl₂-Stammlösung wurden die genannten Substanzmengen (Tab. 10) jeweils in einem 100-ml-Messzylinder in ddH₂O gelöst. Die Glukose-Stammlösung wurde in einem 100 ml Becherglas angesetzt. Die angegebene Menge (Tab. 10) wurde bei 50°C in 80 ml ddH₂O gelöst. In einem 100-ml-Kolben wurde die Lösung mit ddH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Tab. 10: Zusammensetzung der Stammlösungen (CaCl₂, MgCl₂, Glukose).

Substanz	Konzentration [mM]	Molare Masse [g/mol]	Masse [g/100ml]
CaCl₂	1000	147,02	14,702
MgCl₂	1000	203,30	20,330
Glukose	2000	198,17	39,634
Lagerung im Kühlschrank bei 4-6°C			

Präparationslösung

Um Gewebeschäden durch Sauerstoffmangel weitestgehend vorzubeugen, wurde der protektive Effekt der Hypothermie genutzt. Die Hirnentnahme und das Anfertigen der Hirschnitte wurden in eisgekühlter Lösung durchgeführt. Die angegebenen Mengen der vier Stammlösungen (Tab. 11) wurden mit 4-6°C kaltem ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Die Präparationslösung wurde auf ca. 2 bis 4°C heruntergekühlt und mit Carbogen begast. Die pH-Einstellung aller Lösungen erfolgte nach mindestens 30-minütiger Carbogen-Begasung mit dem pH-Meter. Für die Einstellung des Zielwertes von 7,40 wurden HCl oder NaOH verwendet. Alle Lösungen wurden nach der pH-Einstellung weiterhin kontinuierlich begast.

Tab. 11: Zusammensetzung der Präparations- und Messlösung.

Substanz	Präparationslösung [500 ml]		Messlösung [1000 ml]	
	Konzentration [mM]	Volumen [ml]	Konzentration [mM]	Volumen [ml]
NaCl	125	50	125	100
KCl	4		4	
NaHCO₃	25		25	
NaH₂PO₄	1,25		1,25	
CaCl₂	0,5	0,25	2	2

MgCl₂	6	3	1	1
Glukose	10	2,5	10	5
ddH₂O		444,25		892
pH-Einstellung auf 7,40. Begasung mit Carbogen.				

Messlösung

Für die warmen Lösungen wurden die aufgelisteten Stammlösungsmengen (Tab. 11) mit raumtemperiertem ddH₂O auf 1000 ml Messlösung aufgefüllt. 200 ml dieser Lösung wurden in einem Becherglas bei Raumtemperatur begast und der pH-Zielwert eingestellt. In dieser Lösung wurden die Hirnschnitte bis zur Messung bei physiologischen Temperaturen aufbewahrt.

800 ml der Messlösung wurden in einer Glasflasche im Wärmebad bei 37°C begast, daraufhin erfolgte die pH-Einstellung bei mind. 35°C Lösungstemperatur.

3.5.2 Vasoaktive Substanzen

L-NAME

Für die *L*-NAME-Vorspannungslösung wurden 54 µg *L*-NAME abgewogen und in 200 ml warmer aCSF gelöst. Diese 100 µM-Lösung wurde während des Experiments mit Carbogen begast.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Vasoaktivität von *L*-NAME bereits getestet. Diese bereits bestehenden Daten wurden zur Kontrolle der für diese Arbeit erhobenen *in vitro*-Daten genutzt (*L*-NAME-Kontrolle).

Z-PDP A

PDPs sind als Zwischenprodukte des oxidativen Bilirubinabbaus direkte Vorstufen der BOXes. Die Aufreinigung und Bereitstellung der Substanzen erfolgte durch Hannes Richter vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena (IAAC).

Mithilfe der oxidativen Degradierung des Bilirubins wurde zunächst ein Gemisch der verschiedenen HDPs gewonnen. 5 g Bilirubin (8,6 mmol) wurden für 24 h in 2,5 l NaOH (5 M) suspendiert. Der pH-Wert wurde anschließend mithilfe konzentrierter HCl (2 M) auf 7,5 eingestellt. Die finale Konzentration von 1 % konnte durch die Zugabe einer 50 % H₂O₂ Lösung im Zeitrahmen von vier Stunden erreicht werden. Anschließend wurde das entstandene Gemisch für weitere 20 h gerührt. Zur Isolierung der bei diesem Prozess entstandenen Abbauprodukte wurden die BOXes durch Zugabe von Chloroform vom Hämoglobin extrahiert. Die PDPs konnten aus der

überstehenden wässrigen Phase mittels Festphasenextraktion (hydrophilic lipophilic balanced Kartuschen) weiter aufgereinigt werden. Die wässrige Phase der Chloroform-Extraktion wurde nach dem Auftragen mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden mit 20 % Acetonitril/Wasser die Intermediate eluiert. Die Trocknung der Einzelisomere erfolgte in einer Vakuum-Zentrifuge, die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) fand mit SPD-10AV UV/Vis-Detektion bei 280 nm statt. Die Notwendigkeit des direkten Gefrierens der HPLC-Fraktionen mit flüssigem Stickstoff (-196°C) im Anschluss der Chromatographie begründete sich in der raschen Isomerisierung der Einzelisomere zu ihrem jeweiligen Konstitutionsisomer. Um die Einzelisomere in der gewünschten Reinheit isolieren zu können, wurden die gewonnenen Proben ein weiteres Mal getrocknet. Die nun stabilen Einzelisomere konnten für die Verwendung im Experiment in der gewünschten Menge gemischt und konzentriert werden.

Die Lagerung der PDPs erfolgte im Kühlschrank bei 4 bis 6°C in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen. Ein solches Gefäß beinhaltete die bereits abgewogene Masse der PDPs für die Lösung in 30 ml L-Name-Perfusionslösung. Die Endkonzentration des verwendeten PDP-Isomerenpaares (Z-PDP A1/A2) im Perfusat betrug 0,5 µM. Das Isomerenpaar Z-PDP A1/A2 wird im Rahmen dieser Arbeit als PDP A bezeichnet.

Die Vasoaktivität der hier verwendeten Konzentration von PDP A wurde innerhalb der Arbeitsgruppe bereits getestet und publiziert (Joerk et al. 2019). Dieser bestehende Datensatz diente als Kontrolle für die hier beschriebenen *in vitro*-Experimente (PDP A-Kontrolle).

Fasudil

Der Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil wurde für das Teilprojekt der pharmakologischen Modulation eingesetzt. Um eine 10 mM-Stammlösung herzustellen wurden 5 mg des Pulvers in 1,37 ml aCSF-Stammlösung gelöst. Anschließend wurden 45 Aliquots à 30 µl abgefüllt und im Kühlschrank bei 4 bis 6°C gelagert. Durch Zugabe eines Aliquots in 30 ml L-NAME-aCSF ergab sich eine Zielkonzentration von 10 µM Fasudil. Im Experiment wurde entweder die Fasudil-Lösung oder eine Mischung aus Fasudil und PDP A appliziert.

Bariumchlorid

Bariumchlorid ist ein K_{ir} -Kanal-Inhibitor, der für die Testung der pharmakologischen Modulation genutzt wurde. Für die Experimente an akuten Hirnschnitten wurden

31,23 mg BaCl₂ abgewogen und durch Auflösen in 3 ml ddH₂O eine 50 mM Stammlösung hergestellt. Anschließend wurden 100 Aliquots à 30 µl abgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Durch Zugabe eines Aliquots in 30 ml L-NAME-aCSF-Lösung wurde eine Zielkonzentration von 50 µM BaCl₂ erreicht. Diese Lösung wurde im Versuch entweder allein oder in Kombination mit PDP A appliziert.

ML133

Der Kir2.1-Inhibitor ML133 wurde ebenfalls für die pharmakologische Modulation eingesetzt. Für eine 10 mM-Stammlösung wurden 5 mg des hydrophoben Pulvers in 1,803 ml DMSO gelöst. Anschließend wurden 60 Aliquots à 30 µl abgefüllt und im Gefrierfach bei -20°C gelagert. Für die Testung am akuten Hirnschnitt wurde ein Aliquot aufgetaut und anschließend in 30 ml L-NAME-aCSF-Lösung gegeben, sodass eine Zielkonzentration von 10 µM ML133 erreicht wurde. Im Experiment erfolgte eine Umspülung mit der ML133-Lösung allein oder in Kombination mit PDP A.

3.6 Präparation

Die Maus wurde mit Hilfe einer Papprolle in eine Narkoseglocke gesetzt, die anschließende Betäubung erfolgte mit 0,3 ml Isofluran, das mit einer Spritze auf Zellstoffpapier in die Narkoseglocke verteilt und von der Maus inhaliert wurde. Bei Einsetzen der Schnappatmung wurde der Zwischenzehenreflex getestet. Bei negativem Zwischenzehenreflex wurde die betäubte Maus aus der Glocke genommen und sofort dekapitiert. Fell und Haut wurden vom Schädel entfernt, dieser wurde mithilfe einer spitzen Pinzette an den Orbitahöhlen fixiert und anschließend in eine Petrischale mit kalter Präparationslösung gelegt. Die weitere Präparation erfolgte in kalter Präparationslösung unter Nutzung eines Auflicht-Stereomikroskops.

Nach einem Einstich hinter der Lambdanaht mit einer mittelgroßen Federschere wurde mit einer kleinen Federschere entlang der Pfeilnaht nach rostral die Schädelkalotte eröffnet. Es folgten je zwei seitliche Einschnitte vor der Kranz- und hinter der Lambdanaht. Die Kalotte wurde mit einer spitzen Pinzette zu beiden Seiten aufgeklappt und entfernt (Abb. 8). Das freiliegende Hirn wurde nun mit einem Skalpell kurz hinter der Kranz- und vor der Lambdanaht beschnitten. Der hintere Schnitt wurde in einem Winkel von ca. 110° gesetzt, um möglichst viel Hirnstamm zu entfernen. Riechkolben, Präfrontalhirn sowie Kleinhirn und Hirnstamm wurden verworfen. Das zugeschnittene Hirn wurde mit einem gebogenen Spatel aus dem Schädel gehoben,

mit Filterpapierstücken von Flüssigkeit befreit und mittels Sekundenkleber mit der rostralen Schnittfläche auf den Probenteller des Vibrotoms geklebt.

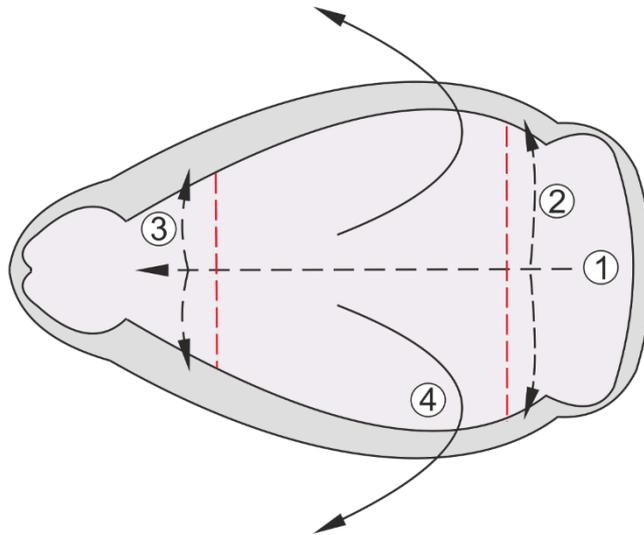


Abb. 8: Präparation des Maushirns. 1. Sagittaler Schnitt nach rostral, 2. und 3. seitliche Einschnitte und 4. seitliches Aufklappen der Kalottenanteile. Rote Linien verdeutlichen die Schnittsetzung mit dem Skalpell.

Für das Anfertigen der Hirnschnitte wurde ein Vibrotom benutzt. Der Probenteller wurde auf die magnetische Einfassung in der Wasserwanne gesetzt, welche nun mit der kalten Präparationslösung gefüllt wurde. Die Schnittgrenzen wurden festgelegt. Mit einer eingespannten Rasierklinge wurden bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,14 mm/s und einer Schwingungsamplitude von 1 mm acht 350 μm dicke Hirnschnitte hergestellt. Die Hirnschnitte wurden mit einer Saugpipette auf einem Haltenetz in der raumtemperierten Lösung platziert. Nach einer Anpassungszeit von mindestens 30 min konnte mit dem Experiment begonnen werden.

3.7 Transmissions-Mikroskopie der Hirnschnitte

Die Hirnschnitte wurden in einer Mikroskopierkammer von einer Peristaltikpumpe mit 5 ml begaster warmer aCSF pro Minute umspült. Mit einem Wasserimmersionsobjektiv wurden die Hirnschnitte in der 0,35x-Kalibrierung nach intrakortikalen Arteriolen mit einem Durchmesser von mindestens 15 μm abgesucht. Die Gefäßwände sollten in Kortexschicht II-III über einen Abschnitt von mindestens 50 μm gut darstellbar sein (Abb. 9 A). Das analoge Bild wurde mit Vergrößerungsfaktor von der Kamera aufgenommen (Abb. 9 B), mit einem Analog-Digital-Wandler in digitalen Datenstrom umgesetzt und im Programm View Creator Pro (AdLink, Version 1.7.3.0401) auf einem Standrechner geöffnet. Anschließend wurden mit einem Stift auf dem Bildschirm

wichtige Orientierungspunkte im Bild nachgezeichnet, die im Verlauf des Experiments helfen sollten, den Drift des Hirnschnitts bei der Bildaquisition auszugleichen.

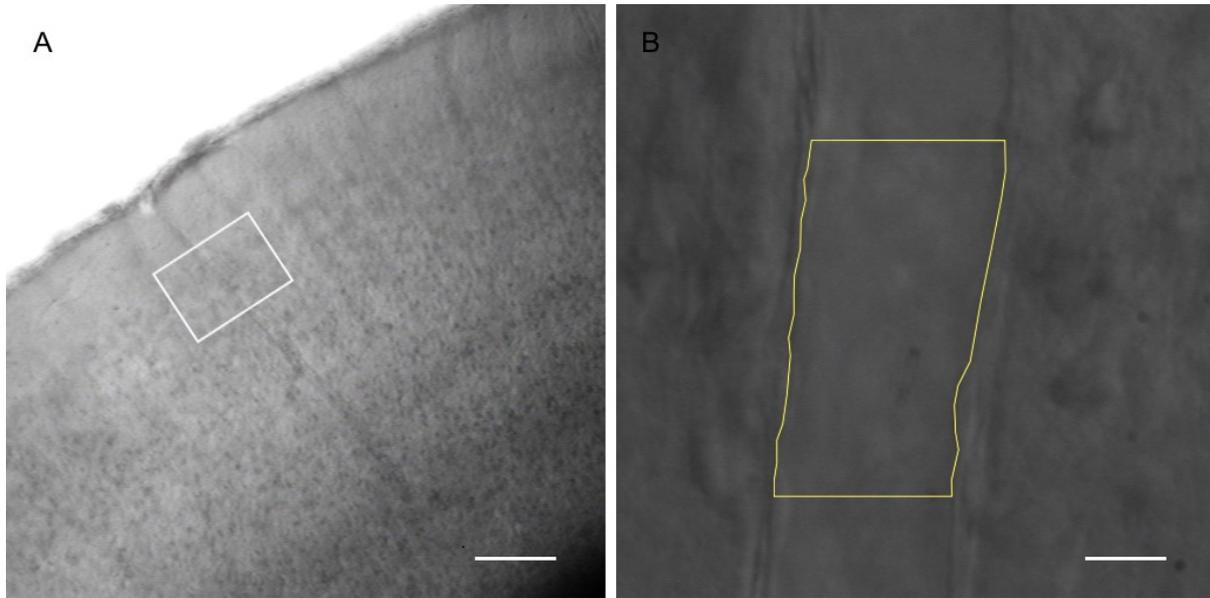


Abb. 9: DIC-mikroskopische Aufnahme einer zerebralen Arteriole. Übersichtsaufnahme des Kortex mit kolumnär in die Tiefe ziehender Arteriole (Maßstabsleiste 100 µm). Markiert ist ein Bereich in Kortexschicht II-III, innerhalb dessen ein geeigneter Abschnitt gesucht wurde **(A)**. 4x-Zoom auf Arteriole mit polygoner Gefäßwandmarkierung über 50 µm zur Flächeninhaltsberechnung (Maßstabsleiste 10 µm) **(B)**.

Im Verlauf aller Experimente am akuten Hirnschnitt erfolgte alle fünf Minuten eine Bildaufnahme der Arteriole. In Minute 10 startete nach Umsetzung des Zuflusses in die *L*-NAME-Lösung der 45-minütige Vorspannungszeitraum.

Zum Ende des Vorspannungszeitraums wurde die Lösung mit vasoaktiven Substanzen in einem Messzylinder angesetzt und lichtgeschützt neben dem Mikroskop platziert. Im Teilprojekt „Pharmakologische Modulation“ wurden sechs unterschiedliche Zusammensetzungen verwendet (Abb. 10), während die verschiedenen Genotypen des Teilprojekts „Spezifischer BK-Kanal Knockout“ immer mit einer PDP A-Lösung untersucht wurden (Abb. 11). Bei allen Experimenten der beiden Teilprojekte wurde der Zufluss des Pumpsystems in Minute 54 in die entsprechende Lösung gesetzt. Um eine Zirkulation der knapp bemessenen Lösung zu erwirken, wurde etwa drei Minuten später auch der Abfluss in den Messzylinder mit der Lösung gesetzt. Mit dieser Lösung wurde der Schnitt über weitere 90 Minuten perfundiert.

Im Anschluss an jedes Experiment wurde als Vitalitätstest eine Nachkontrolle mit Noradrenalin (NA) durchgeführt. Dafür wurde die Pumpe ausgeschaltet und in die Mikroskopierkammer mit dem Hirnschnitt wurden 10 µl NA gegeben. Die Gefäßreaktion auf diesen Reiz wurde über fünf Minuten beobachtet und jede Minute per Bildaufnahme dokumentiert. Die Fähigkeit des Hirnschnitts, am Ende des Experiments auf den stark vasokonstriktiv wirkenden Reiz des NA adäquat zu reagieren, wurde als notwendige Bedingung für ein erfolgreiches Experiment definiert. Bei einer sichtbaren starken Konstriktion der untersuchten Arteriole innerhalb von fünf Minuten nach NA-Gabe wurde die Positivkontrolle als erfolgreich bewertet und die Untersuchungsdaten des Experiments in die Auswertung aufgenommen.

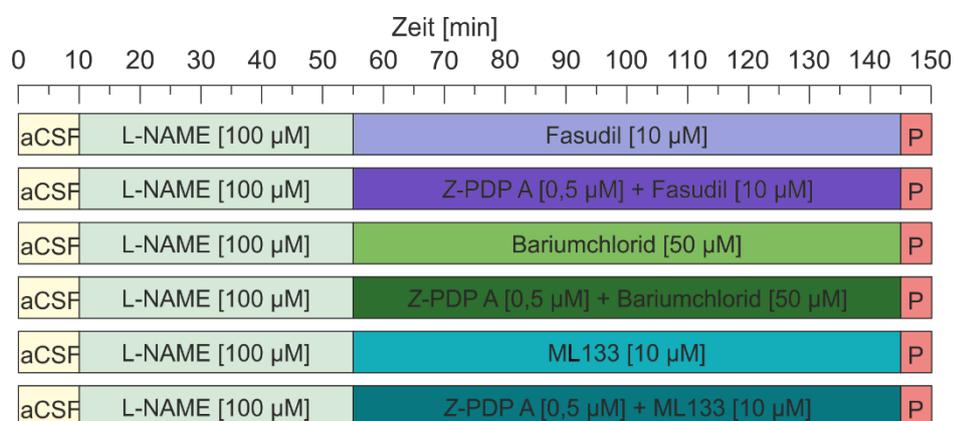


Abb. 10: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Experimente für die sechs Versuchsgruppen des Teilprojekts „Pharmakologische Modulation“. Als Versuchstiere wurden juvenile Slo1^{+/+}-Mäuse verwendet. Farblich differenziert sind die unterschiedlichen Substanzen, mit denen die Hirnschnitte ab Minute 55 umspült wurden. Am Ende jedes Experiments wurde eine Positivkontrolle (P) mit NA durchgeführt.

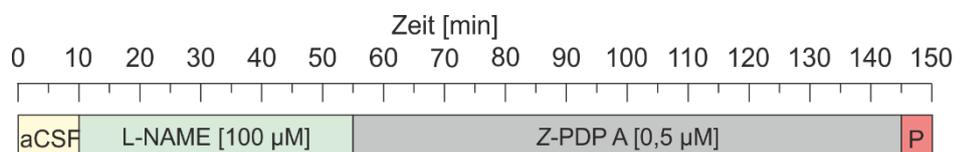


Abb. 11: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Experimente für das Teilprojekt „Spezifischer BK-Kanal Knockout“. Die Hirnschnitte von SM-BK^{+/+}-Mäusen, SM-BK^{-/-}-Mäusen und BK^{+/+}-Mäusen wurden ab Minute 55 mit PDP A umspült. Am Ende jedes Experiments wurde eine Positivkontrolle (P) mit NA durchgeführt.

3.7.1 Elektrische Stimulation akuter Hirnschnitte

Die elektrische Stimulation der Hirnschnitte von juvenilen und alten Mäusen erfolgte in vergleichbarem Versuchsdesign wie die oben beschriebenen *in vitro*-Versuche. Hier

wurde allerdings nicht die Vasoaktivität verschiedener Substanzen getestet. Stattdessen erfolgte durch elektrische Impulse die Induktion neuronaler Aktivität, die anhand der Gefäßreaktion gemessen wurde. Vor Beginn des Experiments wurde neben dem zu beobachtenden Gefäß eine konzentrische Elektrode in Kortexschicht VI platziert. Über diese Elektrode erfolgte später eine Stimulation des umliegenden Hirngewebes. Über einen isolierten Pulsstimulator wurde eine Burstlänge von 2 s, eine Pulsdauer von $2 \cdot 10^{-4}$ s und eine Inter-Puls-Periode von $2 \cdot 10^{-2}$ s festgelegt. Die Hirnschnitte wurden über insgesamt 190 min mit 37°C warmer aCSF umspült (Abb. 12). Nach den ersten zehn Minuten wurde der Zufluss und etwa drei Minuten später auch der Abfluss in einen Messzylinder mit 30 ml aCSF umgesetzt, wodurch eine Rezirkulation wie in den oben beschriebenen Experimenten erwirkt wurde.

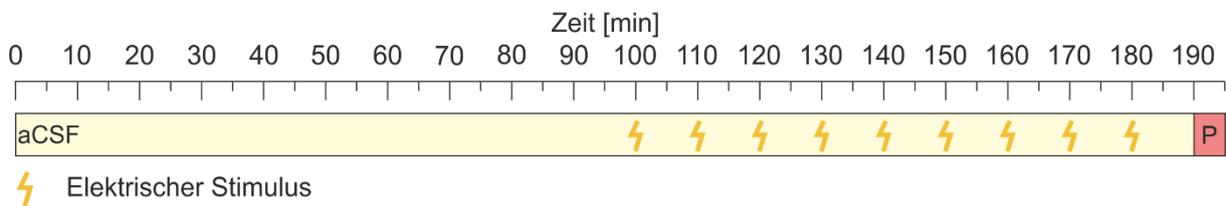


Abb. 12: Zeitlicher Ablauf der Experimente für das Teilprojekt „Elektrostimulationsreihe“. Die Hirnschnitte von juvenilen Slo1^{+/+}-Mäusen, alten Slo1^{+/+}-Mäusen und alten Slo1^{-/-}-Mäusen wurden über 190 min mit aCSF umspült. In Minute 100 begann jeweils die elektrische Stimulationsreihe. Am Ende jedes Experiments wurde eine Positivkontrolle (P) mit NA durchgeführt.

Nach Erreichen der Minute 100 wurden nacheinander neun elektrische Impulse mit zunehmender Stimulationsstärke gegeben, wobei die Spannungsgrößen von 1 V bis 9 V ansteigend erhöht wurden (Abb. 13). Zwischen den Impulsen lag jeweils eine zehninütige Erholungszeit des Hirngewebes. Innerhalb dieser zehn Minuten wurde jeweils in den ersten fünf Minuten alle 10 s und in den darauffolgenden fünf Minuten alle 15 s ein Bild aufgenommen. Nach insgesamt 190 min wurde eine wie oben beschriebene Positivkontrolle mit NA durchgeführt.

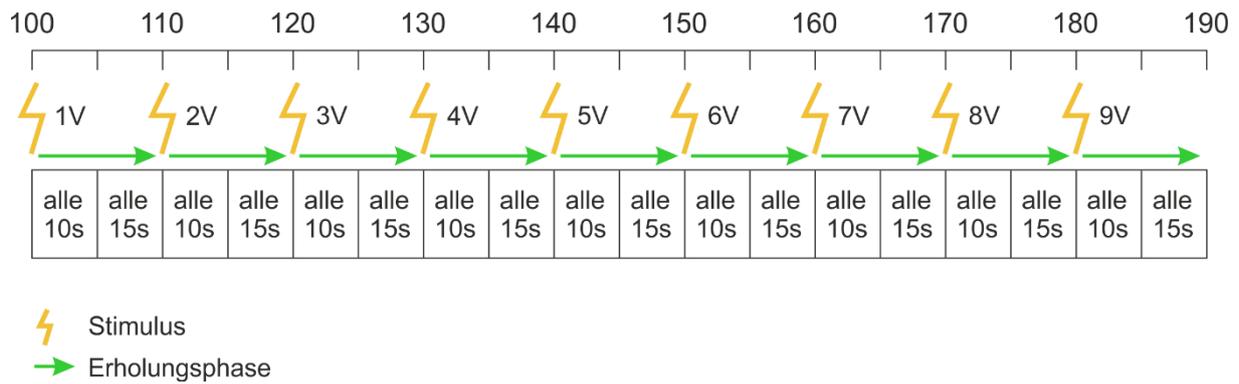


Abb. 13: Ablauf der Elektrostimulationsreihe. Durch Änderungen der Spannung von 1 - 9 V erfolgte die repetitive elektrische Stimulation mit ansteigender Stimulationsstärke. Die Erholungsphase nach Stimulation dauerte jeweils zehn Minuten. Innerhalb der ersten fünf Minuten wurde alle 10 s ein Bild aufgenommen, von Minute 6 bis 10 nach Stimulation alle 15 s.

3.7.2 Gefäßdurchmesserbestimmung am akuten Hirnschnitt

Am Ende eines Experiments der ersten beiden Teilprojekte bestanden die Rohdaten aus 33 Bildern. Diese wurden zur Auswertung in das Computerprogramm ImageJ (64-bit Java 1.8.0_122 Version) geladen. Über einen 50 μm langen Abschnitt des Gefäßes wurden entlang der Gefäßwände Markierungen gesetzt, wobei eine in jedem Bild auffindbare Struktur als Orientierungspunkt verwendet wurde. Im Programm wurde der Flächeninhalt des so entstandenen, exemplarisch in Abb. 9 B dargestellten, Polygons berechnet.

Die Rohdaten der elektrischen Stimulationsreihe umfassten je 480 Bilder pro Experiment. Mit einer alternativen teilautomatisierten Auswertungsstrategie wurden an drei festgelegten Positionen im Abstand von jeweils 25 μm mit dem Point tool die gegenüberliegenden Endothelgrenzen markiert. So wurde am Anfang, in der Mitte und am Ende eines 50 μm langen Gefäßabschnitts jeweils ein Gefäßdurchmesser erhoben. Daraus ergaben sich für jeden Datenpunkt drei Gefäßdurchmesser, die, gemittelt und in prozentuale Relation zum Ausgangswert gesetzt, die von der Stimulationsstärke abhängige Gefäßdurchmesseränderung über die Zeit beschrieben.

3.8 CLSM-Mikroskopie von fixierten Hirnschnitten

3.8.1 Kryokonservierung und Erstellen von Hirnschnitten

Nach Organentnahme wurden die Maushirne in PFA und PBS-haltigen Lösungen fixiert und kryokonserviert. Anschließend wurden mit einem Kryotom Hirnschnitte erstellt.

Zur Herstellung der PBS-Lösung (Tab. 12) wurden auf 3500 ml einfach destilliertes Wasser (dH₂O) 87,5 ml Stock 2 gegeben. Mit ca. 400 ml Stock 1 wurde der pH auf 7,4 titriert, anschließend wurde mit dH₂O auf ein Lösungsvolumen von 5000 ml aufgefüllt.

Tab. 12: 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	ca. 3000 ml
Stock 2-Acid	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	41,397 g
	NaCl	238,434 g
	dH ₂ O	ca. 3000 ml

Für die Saccharose-Lösungen (Tab. 13) wurde die nötige Menge an Saccharose jeweils in 50 ml PBS gelöst und anschließend mit PBS auf 100 ml Lösungsvolumen aufgefüllt.

Tab. 13: Zusammensetzung der Saccharose-Lösungen.

Saccharose-Lösung	Substanz	Menge
10%-Lösung	Saccharose	10 g
	PBS	100 ml
30%-Lösung	Saccharose	30 g
	PBS	100 ml

Für die Fixierung wurden die oben beschriebenen drei Lösungen genutzt. In 15 ml Falcon-Tubes wurde jeweils ein Hirn in 4 % Formalin gelagert. Zwei bis drei Tage später erfolgte die Umsetzung in ein weiteres Eppendorf-Tube mit 10 % Saccharose-Lösung. 24 h später wurde das Hirn in ein Eppendorf-Tube mit 30 % Saccharose-Lösung gelegt. Nach Absinken des Hirns auf den Boden des Tubes oder spätestens nach drei Tagen wurde das Hirn kryokonserviert. Dafür wurde Methylbutan in Trockeneis auf -25°C bis -30°C heruntergekühlt und das Hirn darin unter Bewegung vereist. Nach ca. einer Minute wurde das gefrorene Hirn in eine Präparat-Tüte verpackt und bei -80°C gelagert.

Das Anfertigen der Hirnschnitte erfolgte mit einem Mikrotom und der entsprechenden Kühleinheit. Dafür wurde das gefrorene Hirn mittels Auffriergel bei -40°C auf eine Platte geeist. Nach Einspannung des Messers und Positionierung des Objekts wurden

manuell 40 µm dicke Schnitte angefertigt. Essentiell für das Anfertigen von qualitativ hochwertigen Hirnschnitten war das kontinuierliche Schneiden. Alternativ zum manuellen Bedienen des Handrads gab es auch die Möglichkeit, die Schnitte automatisiert zu erstellen.

Vor dem Einfrieren wurden die Hirnschnitte mit Antifreeze-Lösung versetzt (Tab. 14). Für einen Liter Phosphatpuffer der Antifreeze-Lösung wurden auf 700 ml dH₂O 17,5 ml Stock 2 gegeben und mit Stock 1 auf pH 7,4 titriert. Anschließend wurde mit dH₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Tab. 14: Zusammensetzung der Antifreeze-Lösung

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

Für die Antifreeze-Lösung wurden die in der Tabelle angegebenen Mengen Ethylenglycol, Phosphatpuffer und Natriumacid gemischt. Anschließend wurde portionsweise unter Rühren die Glukose hinzugegeben und mit dH₂O auf 1000 ml verdünnt.

In die Vertiefungen einer Zellkulturplatte TC-Platte 24 Well Standard wurde 1 ml Antifreeze-Lösung gegeben. Die Hirnschnitte wurden mit einem Pinsel in die Antifreeze-Lösung gesetzt, je sieben Schnitte pro Vertiefung. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und bei -20° C gelagert.

3.8.2 Immunhistochemische Färbung

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden drei dafür notwendige TBS-Lösungen angefertigt (Tab. 15). Für TBS + wurden die angegebenen Substanzen miteinander gemischt. Für die Herstellung von TBS 10x wurden die in der Tabelle

angegebenen Chemikalien in einem Rührer gemischt und mit HCl auf pH 7,4 titriert. Anschließend wurde mit dH₂O auf ein Lösungsvolumen von 2000 ml aufgefüllt. Durch Verdünnung von einer Einheit TBS 10x mit neun Einheiten dH₂O erhielt man TBS für die folgenden Schritte.

Tab. 15: Zusammensetzung der TBS-Lösungen für die Immunfluoreszenz

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

Für die immunhistochemische Färbung wurden die in Antifreeze gelagerten Hirnschnitte sechsmal je 15 min lang auf einem Schüttler in TBS gewaschen und danach 30 min lang in TBS + inkubiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in TBS Plus mit den primären Antikörpern (anti-SMA, CD-31) gelagert. Am nächsten Tag wurden die Hirne dreimal je 10 min lang in TBS gewaschen und wieder 30 min lang in TBS Plus inkubiert. Anschließend wurden die Hirnschnitte 2 h lang bei Dunkelheit und Raumtemperatur in TBS Plus mit den sekundären Antikörpern (Alexa 647, Alexa 488) gelagert. Es folgten sechs Waschungen à 10 min in TBS.

Die Gelatine wurde mit den angegebenen Inhaltsstoffen (Tab. 16) gemischt und 10 min lang ruhen gelassen. Anschließend wurde die Mischung rührend auf 40°C erhitzt, in ein Gefäß gesiebt und bei 4°C gelagert.

Tab. 16: Zusammensetzung der Gelatine

Substanz	Menge
dH ₂ O	200 ml
Gelatine	1 g
Chrom-III Kaliumsulfat	0,1 g

Die Schnitte wurden in 0,5 % Gelatine auf Objektträger gezogen und die Objektträger zum Trocknen aufgestellt. Die Objektträger wurden dann in einer Küvette mit ca. 80 ml PBS 5 min lang gewaschen, danach 5 min lang mit DAPI gefärbt, anschließend dreimal je 5 min in PBS gewaschen und schließlich mit Fluoromount eingedeckt.

3.8.3 Aufnahme von CLSM Bildern

Das LSM 710 vereint Transmissionsmikroskopie mit Epifluoreszenzmikroskopie und CLSM. Die fixierten und immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte wurden zunächst mittels Okulars unter 10x-Vergrößerung nach der APA abgesehen. Queranschnitte waren mittig des Corpus callosum auffindbar. Das betreffende Gefäß wurde unter 20x-Vergrößerung scharf gestellt.

Im mit dem Mikroskop verbundenen Computerprogramm ZEN 2000 wurde von Transmissions- auf Laserscanmikroskopie umgestellt. Für den DNA-Farbstoff DAPI lag die spezifische Anregungswellenlänge bei 364 nm und das Emissionsmaximum bei 454 nm, wodurch sich Zellkerne blau darstellten. Alexa 488 färbte an Endothelzellen gebundenes CD31 an, wurde mit 500 nm angeregt und fluoreszierte mit einer Emissionswellenlänge von 520 nm grün. Der für diese Arbeit entscheidende Farbstoff, Alexa 647, markierte an Aktinfasern glatter Gefäßmuskulatur gebundenes anti-SMA. Durch eine Anregungswellenlänge von 650 nm wurden rote Fluoreszenzsignale mit einer Wellenlänge von 670 nm emittiert.

Im hochauflösenden digitalen Bild wurde die vom Laser evozierte Fluoreszenz der mit anti-SMA-markierten Aktinfasern dargestellt. Von jedem per Durchlichtmikroskopie gefundenen Gefäß konnten per Laserscanning die beiden Seiten des Gefäßanschnitts identifiziert werden, wodurch für jede Arterie zwei Messungen erfolgen konnten.

Ziel war es, Gesamtbilder aus sechs bis zehn Einzelbildern in verschiedenen Ebenen, als sogenannten *stack*, aufzunehmen. Dafür wurde die Gewebetiefe, in der aufgenommen wurde, festgelegt und das Bild so weit zugeschnitten, dass möglichst wenig Gewebe außerhalb des gewünschten Aufnahmebereichs belichtet wurde, um die Scan-Zeiten so kurz wie möglich zu halten. Auf diese Art entstanden sechs bis zehn konfokale Bilder, die, zu einem Stapel zusammengefasst, einen fast dreidimensionalen Querschnitt des Gefäßes darstellten (Abb. 14).

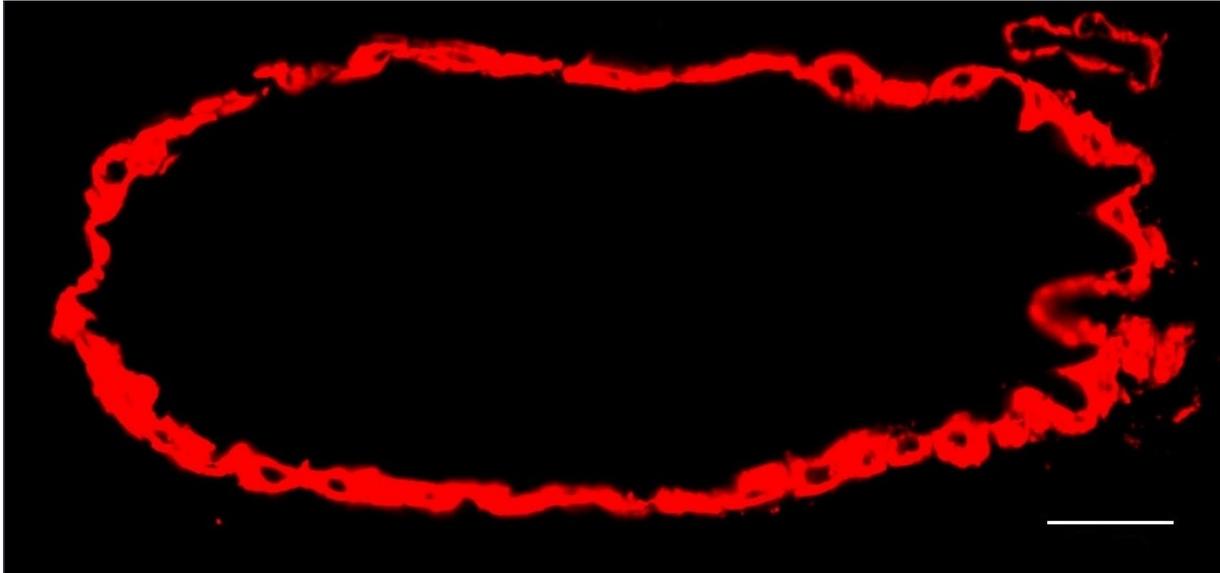


Abb. 14: CLSM-Aufnahme einer mit anti-SMA gefärbten Arteria azygos pericallosa (Maßstabsleiste 20 μm).

3.8.4 Messungen am fixierten Hirnschnitt

In ImageJ wurden die Bilderstapel ausgewertet. Zielparameter war dabei die Dicke der Gefäßwand. Um diese zu berechnen, wurden im ImageJ zwei Werte erhoben: der Flächeninhalt des Gefäßlumens sowie der Flächeninhalt des gesamten Gefäßes einschließlich der Aktinfaserschicht. Durch Subtraktion der Lumenfläche vom Flächeninhalt des gesamten Gefäßes wurde der Flächeninhalt der Aktinfaserschicht ermittelt. Zur Berechnung des Gefäßdurchmessers und der mittleren Gefäßwanddicke wurde ein idealer Kreis des Gefäßquerschnitts angenommen.

3.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

3.9.1 HDP-Experimente

Die berechneten Flächeninhalte aus den *in vitro*-Versuchen wurden tabellarisch in Origin9.0 (OriginLab) dokumentiert. Normalisiert wurde auf das über 45 min durch L-Name vorgespannte Gefäß. Dafür wurden die entsprechenden Zahlenwerte von Minute 45, 50 und 55, unmittelbar vor Einwaschen der vasoaktiven Substanzen, gemittelt und dienten als Ausgangswert. Alle folgenden Werte wurden in Relation zum Ausgangswert gesetzt und als prozentuale Abweichung von diesem interpretiert.

Für diese prozentuale Abweichung wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet und in einem Zeitverlaufdiagramm aufgetragen. Im Diagramm wurden die hier erhobenen Daten dem PDP A-Kontrolldatensatz gegenübergestellt.

Für die statistische Auswertung wurden die jeweils letzten drei Datenpunkte jedes Experiments gemittelt. Diese Datenpunkte wurden mit dem L-Name- und dem PDP A-Kontrolldatensatz der Arbeitsgruppe verglichen und im *t*-Test für unverbundene Stichproben auf eine Signifikanz von $p < 0,05$ geprüft. Getestet wurde also der Endwert des Flächeninhalts des Lumens nach Einfluss von vasoaktiven Substanzen über 90 Minuten. Diese Endpunkte wurden in Relation zu Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der Versuchsgruppen in einem Box-Plot dargestellt. Pro Maus wurde ein Experiment mit je einem Hirnschnitt durchgeführt. Der Parameter „n“ steht also für die Anzahl der Hirnschnitte sowie für die Anzahl der Mäuse, die untersucht wurden. Die Signifikanzbezeichnung erfolgte folgendermaßen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Die Basisdiagramme wurden jeweils in Origin erstellt und anschließend mit CorelDRAW X7 bearbeitet.

3.9.2 Elektrostimulationsreihe

Um die von der Stimulationsstärke abhängige Entwicklung des Gefäßdurchmessers über die Zeit sowohl interindividuell als auch zwischen den Gruppen vergleichen zu können, wurden vier für relevant befundene beschreibende Parameter identifiziert. Abhängig von der Stimulationsstärke war zunächst eine Vasokonstriktion, anschließend eine langsam progrediente Vasodilatation zu beobachten. Als wichtige Parameter wurden daher die maximale prozentuale Verengung und der Zeitpunkt dieser Verengung festgelegt. Zudem wurde über einen für die Gefäßdurchmesser-Zeitverlaufskurven individuell erstellten Fit die Zeitkonstante τ (Tau) identifiziert, mit der die abfallende Geschwindigkeit der anschließenden Vasodilatation beschrieben wird. Ein anderer Parameter zur Darstellung der bisher genannten war die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC), die sich aus der Summe der für alle Abschnitte mit der Formel $\frac{1}{2} \cdot (x_1 + x_2) \cdot (t_2 - t_1)$ berechneten Fläche ergibt. τ und AUC wurden für diejenigen Kurven berechnet, die eine maximale Vasokonstriktion von mindestens 5 % innerhalb der ersten 350 s nach Stimulation aufwiesen.

Für jede Stimulationsstärke an jedem Hirnschnitt aus allen drei Gruppen ergab sich nach dieser Auswertung ein Datenpunkt.

Die statistische Auswertung der so erhobenen Daten erfolgte nicht mit dem sonst in dieser Arbeit genutzten *t*-Test. Um diese große Menge an nicht normalverteilten Daten in Abhängigkeit von verschiedenen Variablen miteinander zu vergleichen, wurde

stattdessen eine explorative Datenanalyse im SPSS durchgeführt. Die vier Parameter wurden zwischen den Slo1^{+/+}-Mäusen in Abhängigkeit vom Alter und zwischen den alten Mäusen in Abhängigkeit vom Genotyp der Tiere miteinander verglichen. Die Stimulationsstärke wurde jeweils als Kovariate festgelegt. Da es sich bei den vorliegenden Daten um nicht normalverteilte Daten handelte, wurde eine verallgemeinerte Schätzungsgleichung nach dem Gamma-Modell durchgeführt. Auf diese Art und Weise wurde analysiert, inwiefern Unterschiede des Alters bzw. des Genotyps der Tiere und der Stimulationsstärke signifikante Unterschiede der Parameter zur Folge haben.

Um die Ergebnisse der aufwändigen Auswertung möglichst übersichtlich darzustellen, wurde ein Grafikkonzept gewählt, das einen direkten optischen Vergleich zwischen den Gruppen wie auch zwischen den Stimulationsstärken ermöglicht. Innerhalb jeder Gruppe wurden Mittelwert und Standardabweichung pro Stimulationsstärke berechnet und nebeneinander dargestellt. Für jeden Parameter wurde demnach ein Diagramm erstellt, in dem alle Ergebnisse gesammelt sind.

3.9.3 LSM-Daten

Die berechneten Daten zu Gefäßdurchmesser und Gefäßwanddicke wurden in Origin9.0 (OriginLab) übertragen. Für die statistische Auswertung wurden alle zu einem Tier gehörigen Datenpunkte von Gefäßdurchmesser und Gefäßwanddicke jeweils gemittelt. Mit diesen Werten wurden anschließend für jede Versuchsgruppe Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Diese wurden im *t*-Test auf eine Signifikanz von $p < 0,05$ geprüft. Für beide Zielparameter wurden jeweils alle Datenpunkte in Relation zu Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der Versuchsgruppen in einem Box-Plot dargestellt, wobei jeder Datenpunkt einen Anschnitt der APA repräsentiert. Der Parameter „n“ steht in diesem Teilprojekt also für die Anzahl der untersuchten Gefäßanschnitte.

Mit den zuvor arbeitsgruppenintern erhobenen Messungen an der Arteria basilaris (Basilararterie, BA) und der Arteria communicans posterior (*posterior communicating artery*, PCA) wurde ebenfalls so verfahren. Diese Daten werden im Diskussionsteil präsentiert, um anschließend im Vergleich mit den an der APA erhobenen Daten diskutiert zu werden.

4 Ergebnisse

4.1 Pharmakologische Modulation

In diesem Teilprojekt sollte untersucht werden, ob die PDP A-vermittelte Vasokonstriktion an Hirnschnitten juveniler Mäuse durch Kofaktoren der Rho-Kinase- und K_{ir} -Kanal-vermittelten Vasoregulation gehemmt bzw. verstärkt werden kann. Der Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil, der K_{ir} -Kanal-Inhibitor Bariumchlorid ($BaCl_2$) und der $K_{ir2.1}$ -Kanal-Inhibitor ML133 wurden jeweils einzeln oder simultan mit PDP A appliziert.

4.1.1 Fasudil

Um die Wirkung von Fasudil zu testen, wurde die Umspülung mit Fasudil bzw. Fasudil + PDP A untersucht und mit der PDP A-Kontrolle verglichen (Abb. 15). Im Vergleich zur PDP A-Kontrolle ($85 \pm 5,2 \%$; $n = 6$) verengten sich die Gefäße in der Gruppe mit der kombinierten Applikation von Fasudil und PDP A signifikant schwächer ($94 \pm 6,9 \%$; $n = 5$; $p < 0,05$). Fasudil allein zeigte im Mittel keine Durchmesseränderung ($100 \pm 6,1 \%$; $n = 5$), womit sich die Werte dieser Versuchsgruppe ebenfalls signifikant von der PDP A-Kontrollgruppe unterschieden ($p < 0,01$). Die beiden Fasudil-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,17$). Im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle wirkten weder Fasudil ($p = 0,14$) noch Fasudil in Kombination mit PDP A ($p = 0,73$) vasodilatierend.

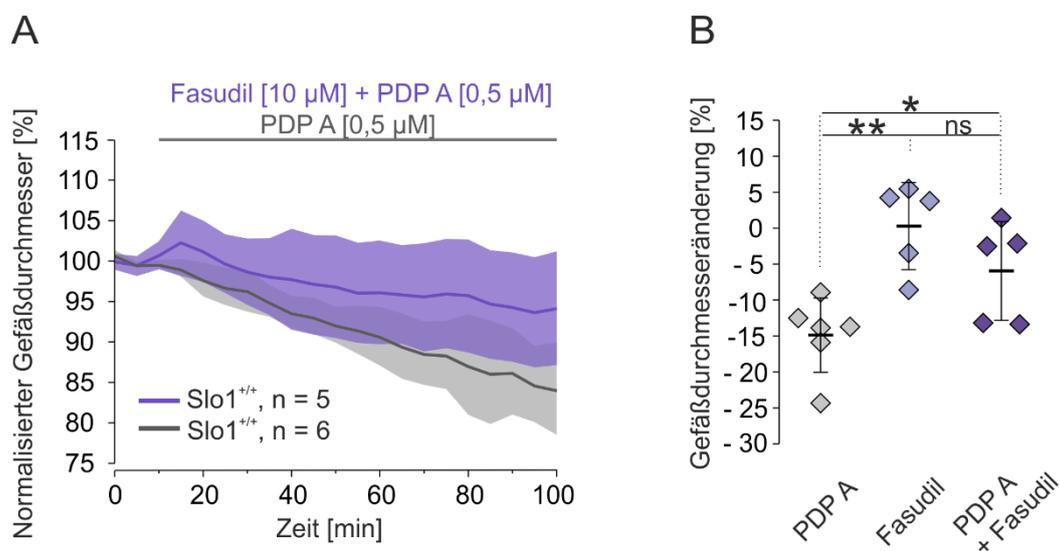


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers von juvenilen Slo1^{+/+}-Maushirnschnitten über 100 min bei Applikation von Fasudil [10 μ M] + PDP A [0,5 μ M] verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (**A**). Punktauftragung der gemittelten Endwerte

nach 80- bis 90-minütiger Applikation von Fasudil sowie Fasudil + PDP A verglichen mit der PDP A -Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

4.1.2 Bariumchlorid

Die Testung der pharmakologischen Modulation durch BaCl₂ erfolgte durch Umspülung des Hirngewebes mit BaCl₂ bzw. BaCl₂ + PDP A im Vergleich zu PDP A allein (Abb. 16). In der Gruppe der kombinierten Applikation fiel die Vasokonstriktion im Vergleich zur PDP A-Kontrollgruppe (85 ± 5,2 %; n = 6) signifikant schwächer aus (p < 0,05) und erreichte im Mittel 94 ± 5,5 % des Ausgangsdurchmessers (n = 5). Die Kombinationsgruppe unterschied sich nicht signifikant von der L-NAME-Kontrolle (p = 0,81). Die Umspülung mit BaCl₂ allein hatte im Mittel eine Vasokonstriktion von (92 ± 15,3 %; n = 5) zur Folge, die sich in der statistischen Testung weder zu den Kontrollgruppen L-NAME (p = 0,63) und PDP A (p = 0,29) noch zur Gruppe der Kombination aus BaCl₂ und PDP A unterschied (p = 0,78).

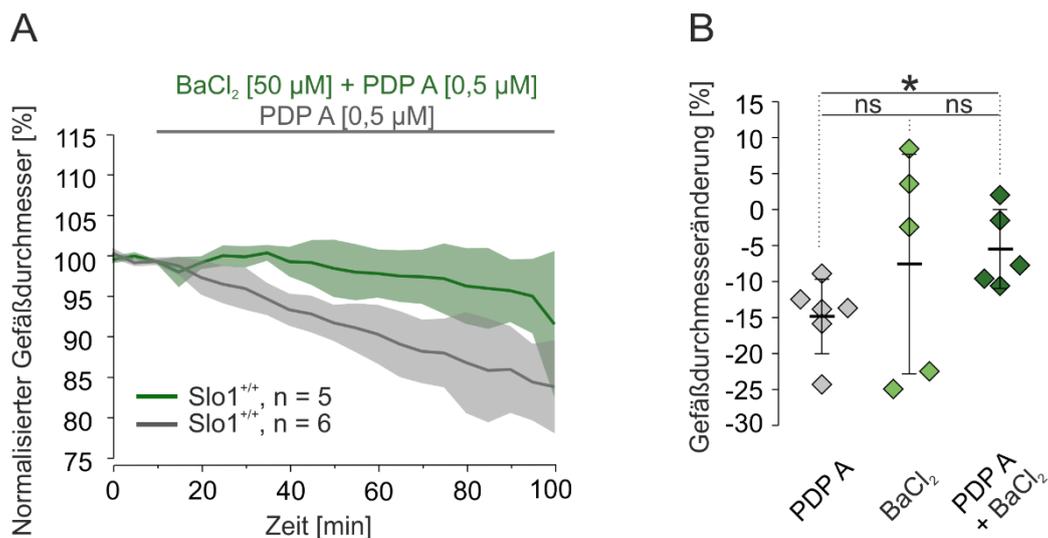


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers von juvenilen Slo1^{+/+}-Maushirnschnitten über 100 min bei Applikation von BaCl₂ [50 μM] + PDP A [0,5 μM] verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte nach 80- bis 90-minütiger Applikation von BaCl₂ sowie BaCl₂ + PDP A verglichen mit der PDP A -Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

4.1.3 ML133

Um die in der Literatur beschriebene vasokonstriktive Potenz des Wirkstoffs ML133 unter dem Einfluss von PDP A zu testen, wurden Maushirnschnitte mit ML133 bzw.

ML133 + PDP A umspült und mit der bereits bestehenden Messreihe von PDP A verglichen (Abb. 17). Nach Applikation von ML133 in Kombination mit PDP A ($n = 5$) verengten sich die Gefäße leicht auf im Mittel $96 \pm 3,5\%$ des Ausgangsdurchmessers. Verglichen mit der PDP A-Kontrolle war diese Durchmesserabnahme signifikant schwächer ($p < 0,01$). Die Umspülung mit ML133 allein ($n = 5$) resultierte in einer Vasokonstriktion von $94 \pm 5,8\%$ des Ausgangswertes und unterschied sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Beide ML133-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,49$) und auch im Vergleich zur L-NAME-Kontrolle war weder bei ML133 allein ($p = 0,81$), noch in Kombination mit PDP A ($p = 0,61$) eine Vasoaktivität feststellbar.

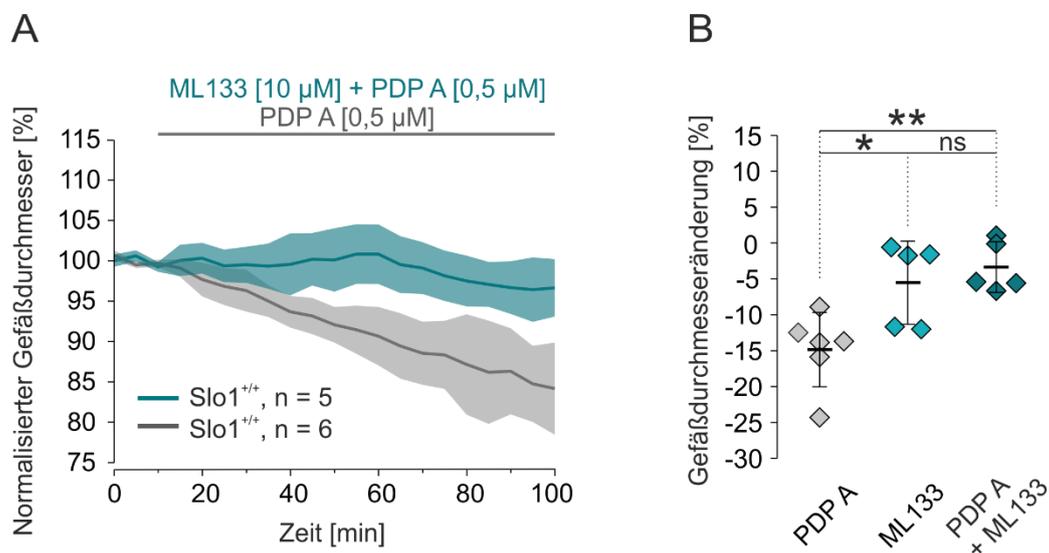


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers von juvenilen Slo1^{+/+}-Maushirnschnitten über 100 min bei Applikation von ML133 [10 μ M] + PDP A [0,5 μ M] verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) **(A)**. Punktauftragung der gemittelten Endwerte nach 80- bis 90-minütiger Applikation von ML133 sowie ML133 + PDP A verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar **(B)**.

4.2 BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen

In diesem Projekt wurde an Mäusen mit spezifischem BK-Kanal-KO in glatten Gefäßmuskelzellen die vasoaktive Wirkung von PDP A getestet.

Um zu überprüfen, ob die Ausschaltung des BK-Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen ein Ausbleiben der PDP A-vermittelten Vasokonstriktion zur Folge hat, wurden Maushirnschnitte mit einem vollständigen (SM-BK^{-/-}) bzw. einem heterozygoten (SM-BK^{+/-}) KO des BK-Kanals in den glatten Gefäßmuskelzellen getestet (Abb. 18). Weder beim vollständigen KO (98 ± 10,1%; n = 9) noch beim heterozygoten KO (97 ± 7,9%; n = 12) löste die Applikation von PDP A eine Vasokonstriktion aus. Im Vergleich mit den WT-Mäusen desselben Stammes (BK^{+/+}; 96 ± 7,2%; n = 11) zeigte weder die SM-BK^{+/-}-Gruppe (p = 0,76) noch die SM-BK^{-/-}-Gruppe (p = 0,69) einen signifikanten Unterschied. Auch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden KO-Linien untereinander (p = 0,89).

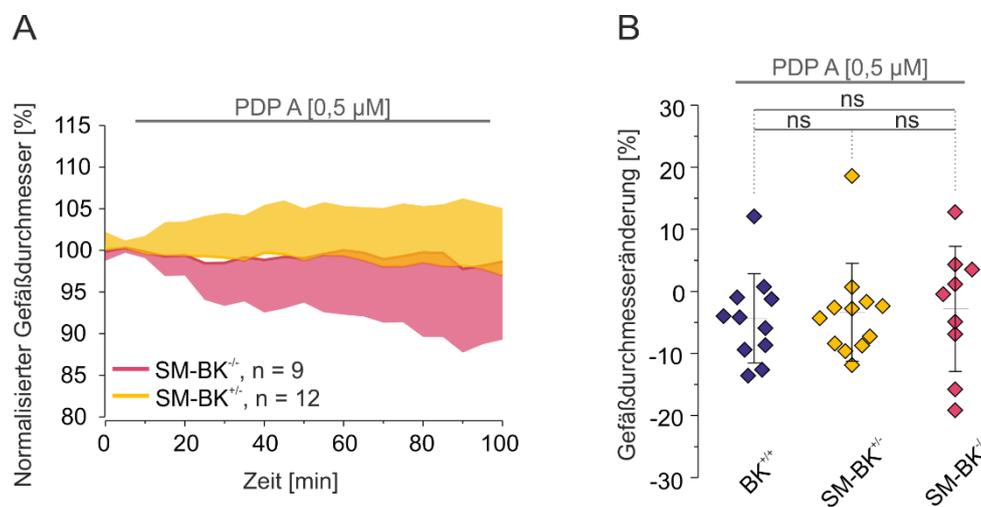


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers von juvenilen SM-BK^{-/-}-Maushirnschnitten verglichen mit Hirnschnitten von juvenilen SM-BK^{+/-}-Mäusen über 100 min, jeweils bei Applikation von PDP A [0,5 µM]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich). Zwecks Übersichtlichkeit wurde für die SM-BK^{-/-}-Gruppe nur die Standardabweichung nach unten (-SD) und für die SM-BK^{+/-}-Gruppe nur die Standardabweichung nach oben (+SD) aufgetragen (**A**). Punktauftragung der gemittelten Endwerte nach 80- bis 90-minütiger Applikation von PDP A an juvenilen Maushirnschnitten von SM-BK^{+/-}-Mäusen und SM-BK^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu BK^{+/+}-Mäusen. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (**B**).

Um zu überprüfen, ob Hirnarteriolen des C57BL/6-Stamms unter gleichbleibenden experimentellen Bedingungen ähnlich wie die des FVB-Stamms reagieren, wurden die erhobenen Daten zu den BK^{+/+}-Mäusen mit dem bereits bestehenden Kontrolldatensatz der Slo1^{+/+}-Mäuse verglichen (Abb. 19). Der C57BL/6-WT (BK^{+/+}; 96 ± 7,2%; n = 11) zeigte dabei eine geringere Vasokonstriktion im Vergleich zum

FVB-WT ($Slo1^{+/+}$; $85 \pm 5,2\%$; $n = 6$). Zwischen den beiden Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) identifiziert werden.

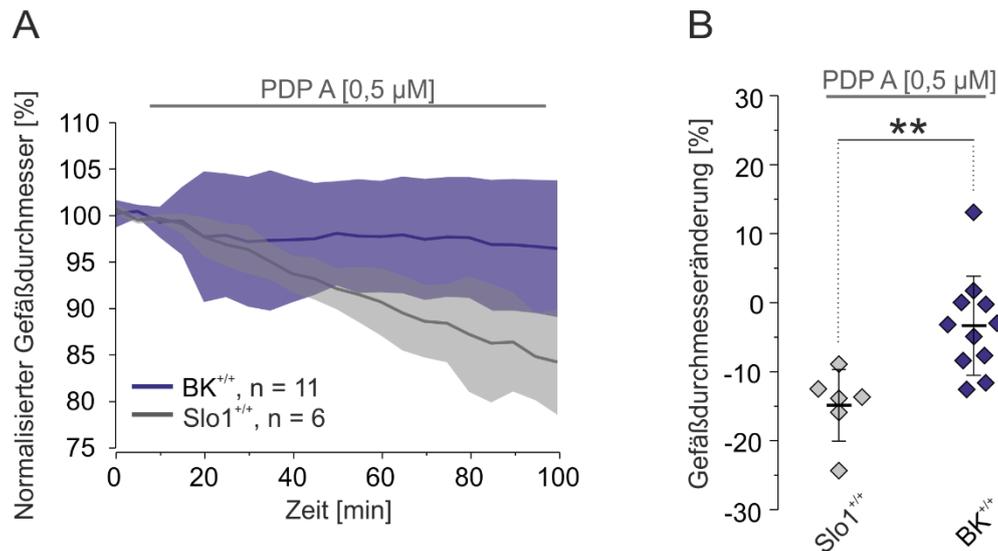


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers von juvenilen BK^{+/+}-Maushirnschnitten verglichen mit Hirnschnitten von juvenilen Slo1^{+/+}-Mäusen über 100 min, jeweils bei Applikation von PDP A [0,5 µM]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) **(A)**. Punktauftragung der gemittelten Endwerte nach 80- bis 90-minütiger Applikation von PDP A an juvenilen Maushirnschnitten von BK^{+/+}-Mäusen im Vergleich zu Slo1^{+/+}-Mäusen. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar **(B)**.

4.3 Elektrostimulationsreihe

Ziel dieses Teilprojekts war die Untersuchung der Reaktivität der neurovaskulären Einheit auf elektrische Stimulationen mit ansteigender Stimulationsstärke in Abhängigkeit von Alter und BK-Kanal-Expression. Aus den gemessenen Gefäßdurchmessern über die Zeit wurden als Zielparameter Amplitude (Abb. 20) und Zeitpunkt der maximalen Vasokonstriktion (Abb. 21), die Zeitkonstante τ (Abb. 22) und die AUC (Abb. 23) identifiziert. Im Rahmen einer Multivarianzanalyse wurde detektiert, dass Unterschiede im Alter im Gegensatz zu Unterschieden im Genotyp signifikante Differenzen der Parameter zur Folge haben. Die jungen Slo1^{+/+}-Mäuse ($n = 5$) unterschieden sich in Bezug auf die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion und die Zeitkonstante τ signifikant von den alten Slo1^{+/+}-Mäusen ($n = 5$). Die alten Mäuse mit BK-Kanal-KO (alt, Slo1^{-/-} $n = 5$) unterschieden sich in Bezug auf keinen Parameter von den alten WT-Mäusen (alt, Slo1^{+/+}).

Auch der Einfluss der Stimulationsstärke auf die vier Parameter wurde geprüft. Änderungen der Stimulationsstärke hatten signifikante Unterschiede der Amplitude der maximalen Vasokonstriktion sowie der Zeitkonstante τ zur Folge.

4.3.1 Amplitude

Die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion wurde in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke zwischen den drei Gruppen verglichen. In der Gruppe der jungen Slo1^{+/+}-Mäuse waren abhängig von der Stimulationsstärke mittlere Vasokonstriktionen zwischen $8 \pm 7,4$ % bei 1 V und $23 \pm 8,8$ % bei 3 V zu beobachten. Die alten Slo1^{+/+}-Mäuse zeigten Gefäßreaktionen zwischen $2 \pm 1,0$ % bei 1 V und $10 \pm 12,5$ % bei 6 V, während die Gefäße der alten Slo1^{-/-}-Mäuse sich von $2 \pm 0,9$ % bei 2 V bis zu $11 \pm 5,0$ % bei 9 V verengten. Im Vergleich der jungen und alten Slo1^{+/+}-Mäuse nahm der Faktor des Alters signifikanten Einfluss auf die Amplitude der maximalen Konstriktion ($p < 0,05$). Die Amplitude unterschied sich nicht signifikant zwischen alten Slo1^{+/+}- und Slo1^{-/-}-Mäusen ($p = 0,84$). Die Stimulationsstärke nahm signifikanten Einfluss auf die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion ($p < 0,05$). Datenpunkte mit weniger als 5 % Vasokonstriktion wurden von der Bestimmung von τ und AUC ausgeschlossen.

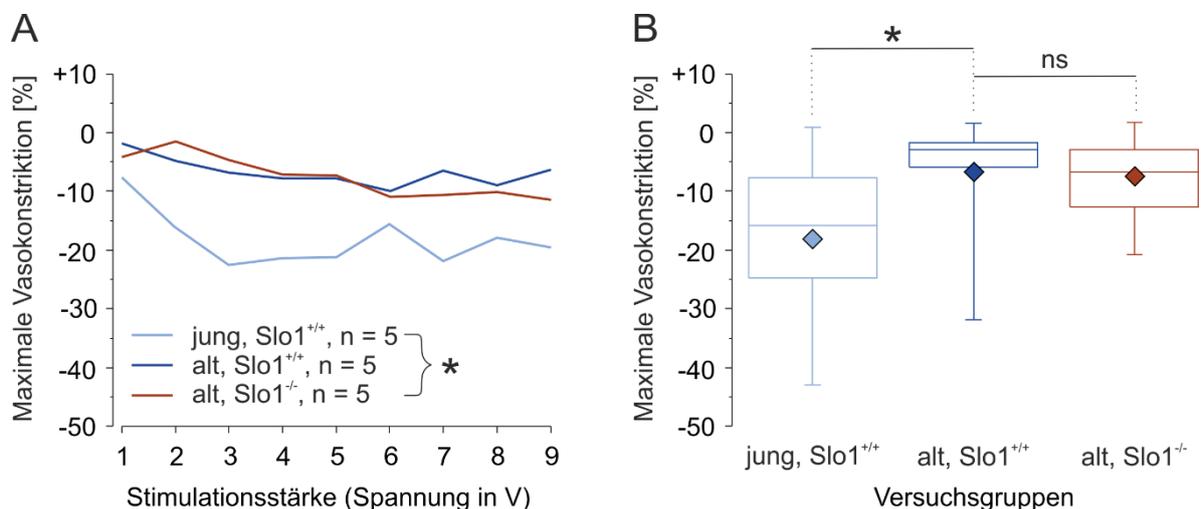


Abb. 20: Verlauf der Amplitude der maximalen Vasokonstriktion in Abhängigkeit von der aufsteigenden Stimulationsstärke der elektrischen Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte pro untersuchter Gruppe (**A**). Kastengrafik der Einzelwerte im Vergleich zwischen jungen und alten Slo1^{+/+}-Mäusen sowie zwischen alten Slo1^{+/+} und Slo1^{-/-}-Mäusen. Dargestellt sind Interquartilsabstand (Kasten), Median (Teilung Kasten), Mittelwert (Raute) sowie Minimal- und Maximalwerte (Antennen) in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit (**B**).

4.3.2 Zeitpunkt

Abhängig von der Stimulationsstärke wurde auch der Zeitpunkt der in Abb. 20 aufgeführten maximalen Vasokonstriktion zwischen den Gruppen verglichen. Die Gefäße der jungen $Slo1^{+/+}$ -Mäuse erreichten ihre maximale Konstriktion im Durchschnitt zwischen $170 \pm 120,8$ s bei 7 V und $330 \pm 203,9$ s bei 5 V. An Arteriolen der alten $Slo1^{+/+}$ -Mäuse wurde die maximale Konstriktion zwischen $140 \pm 83,7$ s bei 7V und $435 \pm 189,7$ s bei 1 V erreicht. Dieser Zeitpunkt lag bei alten $Slo1^{-/-}$ -Mäusen zwischen $116 \pm 125,8$ s bei 4 V und $426 \pm 169,2$ s bei 1 V. Zwischen den untersuchten Gruppen wurden jeweils keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Weder das Alter ($p = 0,29$) noch der Genotyp ($p = 0,71$) hatten signifikante Modelleffekte auf den Zeitpunkt der maximalen Vasokonstriktion. Auch die Stimulationsstärke stellte keinen Effektor signifikanter Unterschiede in Bezug auf den Zeitpunkt dar ($p = 0,13$). Datenpunkte mit maximaler Vasokonstriktion mehr als 300 s nach Stimulation wurden von der Bestimmung von τ und AUC ausgeschlossen.

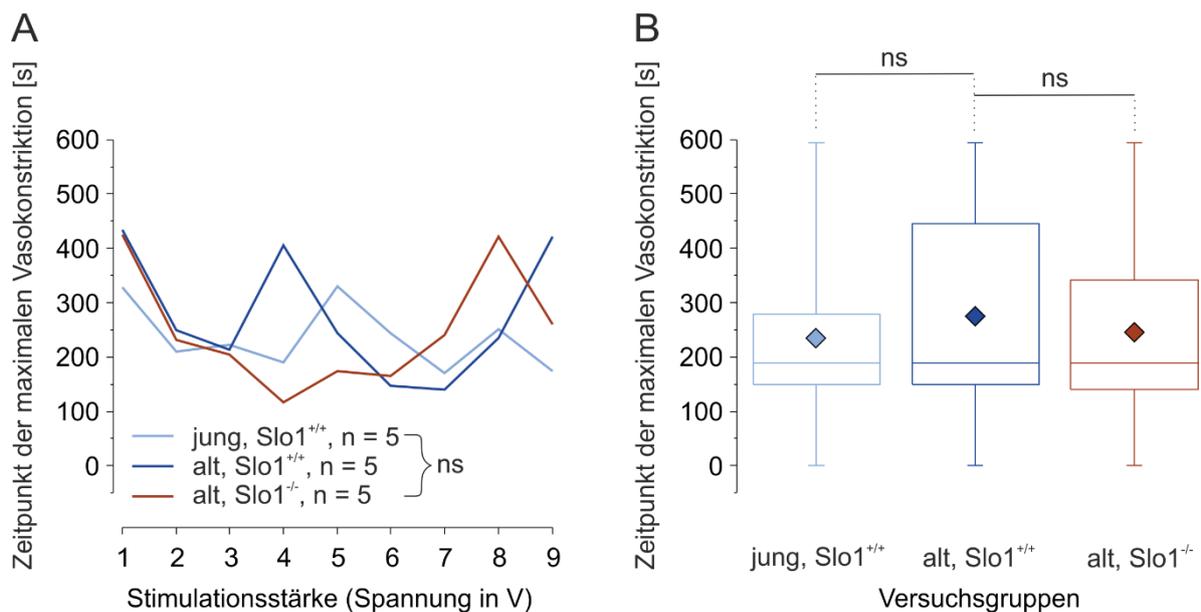


Abb. 21: Verlauf des Zeitpunkts der maximalen Vasokonstriktion in Abhängigkeit von der aufsteigenden Stimulationsstärke der elektrischen Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte pro untersuchte Gruppe (**A**). Kastengrafik der Einzelwerte im Vergleich zwischen jungen und alten $Slo1^{+/+}$ -Mäusen sowie zwischen alten $Slo1^{+/+}$ und $Slo1^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind Interquartilsabstand (Kasten), Median (Teilung Kasten), Mittelwert (Raute) sowie Minimal- und Maximalwerte (Antennen) in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit (**B**).

4.3.3 Zeitkonstante τ

Für die Ermittlung von τ wurden nur die Datenpunkte einbezogen, die eine maximale Vasokonstriktion von mind. 5 % innerhalb der ersten 300 s nach Stimulation aufwiesen. Diese Bedingungen wurden in keinem Hirnschnitt bei der Stimulation mit 1 V erfüllt. Die Zeitkonstante des Geschwindigkeitsabfalls der Dilatation nach maximaler Konstriktion betrug in der Gruppe der jungen $Slo1^{+/+}$ -Mäuse zwischen $102 \pm 40,9$ s bei 9 V und $560 \pm 414,6$ s bei 4 V. In der Gruppe der alten $Slo1^{+/+}$ -Mäuse betrug τ zwischen $139 \pm 94,75$ s bei 3 V und $744 \pm 794,9$ s bei 7 V, während die Zeitkonstante in der Gruppe der alten $Slo1^{-/-}$ -Mäuse zwischen $181 \pm 181,9$ bei 5 V und $1018 \pm 1049,4$ s bei 3 V lag. Die Zeitkonstante τ wurde beim Vergleich junger und alter $Slo1^{+/+}$ -Mäuse signifikant durch das Alter ($p < 0,05$) beeinflusst. Der Genotyp stellte keinen Effektor signifikanter Unterschiede im Vergleich alter $Slo1^{+/+}$ - und $Slo1^{-/-}$ -Mäuse dar ($p = 0,52$). Die Stimulationsstärke hatte einen signifikanten Modelleffekt auf die Zeitkonstante τ ($p < 0,001$).

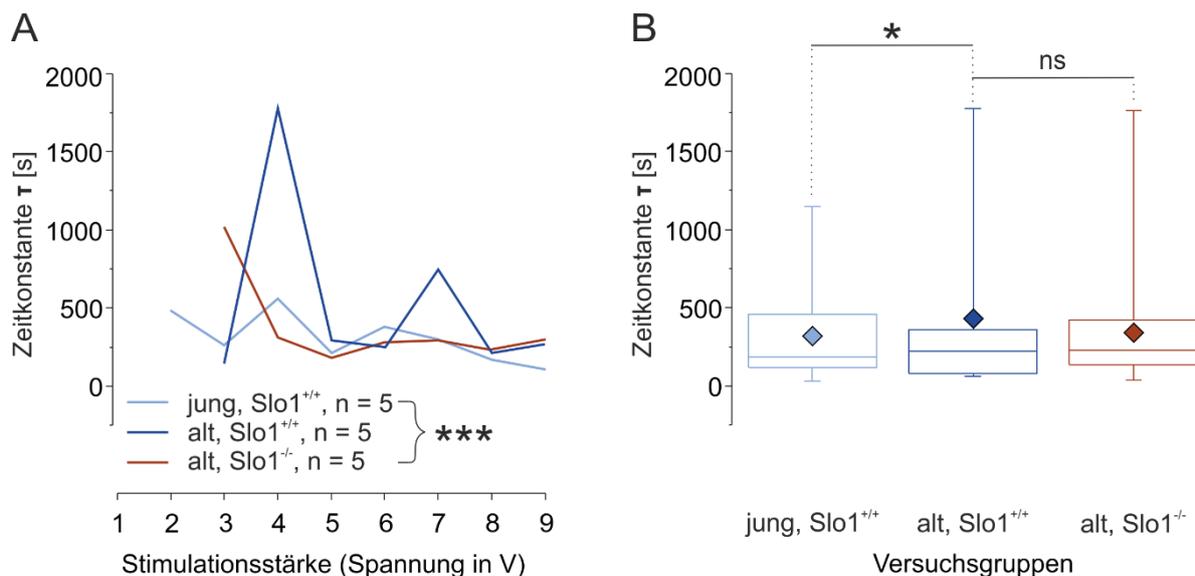


Abb. 22: Verlauf der Zeitkonstante τ in Abhängigkeit von der aufsteigenden Stimulationsstärke der elektrischen Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte pro untersuchte Gruppe (A). Kastengrafik der Einzelwerte im Vergleich zwischen jungen und alten $Slo1^{+/+}$ -Mäusen sowie zwischen alten $Slo1^{+/+}$ und $Slo1^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind Interquartilsabstand (Kasten), Median (Teilung Kasten), Mittelwert (Raute) sowie Minimal- und Maximalwerte (Antennen) in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit (B).

4.3.4 Area under the curve

Die AUC ist als für sich allein stehender Parameter nicht aussagekräftig, sondern gibt einen generellen Überblick über die erhobenen Daten, da die AUC von mehreren

Parametern, wie der Amplitude der maximalen Vasokonstriktion und τ , abhängig ist. Aus diesem Grund wurden hier nur diejenigen Datenpunkte einbezogen, die auch für die Berechnung von τ genutzt wurden. Die AUC der jungen $Slo1^{+/+}$ -Mäuse lag zwischen $51 \pm 4,2$ a.u./1000 bei 3 V und $56 \pm 1,5$ a.u./1000 bei 5 V. Bei den alten $Slo1^{+/+}$ -Mäusen wurden AUC zwischen $55 \pm 5,9$ a.u./1000 bei 3 V und $57 \pm 2,3$ a.u./1000 bei 7 V gemessen, während die AUC-Werte der alten $Slo1^{-/-}$ -Mäuse zwischen $59 \pm 1,1$ a.u./1000 bei 3 V und $54 \pm 1,6$ a.u./1000 bei 8 V lagen. Weder Alter ($p = 0,72$), noch Genotyp ($p = 0,59$) und Stimulationsstärke ($p = 0,49$) hatten signifikanten Einfluss auf die AUC.

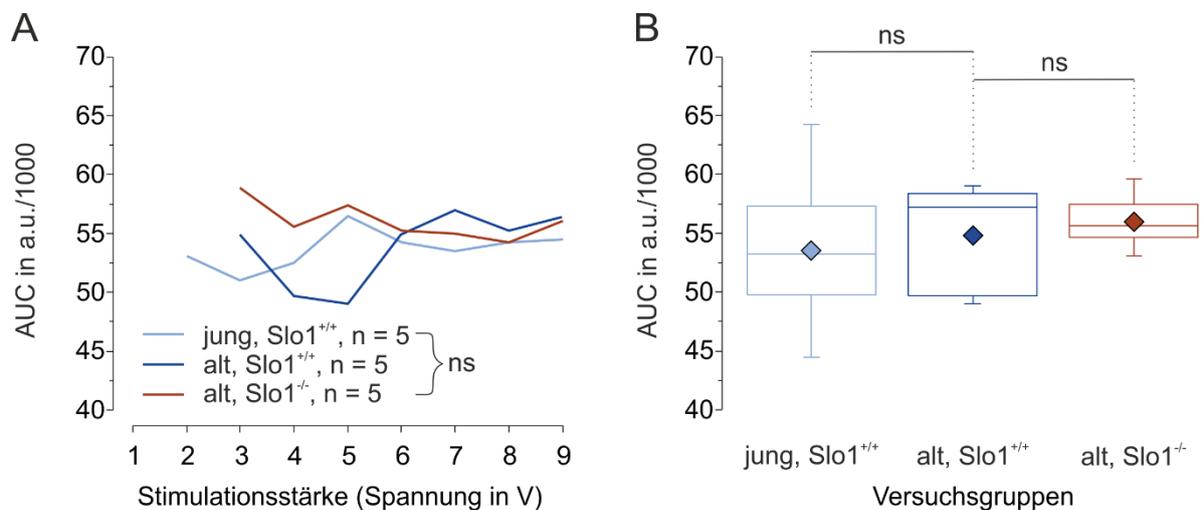


Abb. 23: Verlauf der AUC in Abhängigkeit von der aufsteigenden Stimulationsstärke der elektrischen Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte pro untersuchte Gruppe **(A)**. Kastengrafik der Einzelwerte im Vergleich zwischen jungen und alten $Slo1^{+/+}$ -Mäusen sowie zwischen alten $Slo1^{+/+}$ und $Slo1^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind Interquartilsabstand (Kasten), Median (Teilung Kasten), Mittelwert (Raute) sowie Minimal- und Maximalwerte (Antennen) in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit **(B)**. Zur Achsenbeschriftung: a.u. entspricht *arbitrary units* (beliebige Einheit)

4.4 HDPs und Gefäßmorphologie

Die gefäßmodulierende Wirkung von Blut und seinen Abbauprodukten nach sieben- bzw. 14-tägiger Exposition wurde an Arterien von fixierten und immunfluoreszent gefärbten Maushirnschnitten untersucht. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden bereits für zwei extraparenchymale Gefäße, die BA und die PCA Daten erhoben, die im Diskussionsteil zum Vergleich präsentiert werden. Das für diese Arbeit untersuchte intraparenchymale Gefäß, die APA, dient als Negativkontrolle der bereits bestehenden

Datensätze. Ermittelt wurden die Wanddicke (Abb. 24) sowie der Innendurchmesser der Arterie (Abb. 25).

Die Untersuchung ergab keine signifikanten Unterschiede der mittleren Gefäßwanddicke ($p = 0,24$) zwischen der Kontrollgruppe ($3,8 \pm 0,61 \mu\text{m}$; $n = 30$) und der Eigenblutgruppe ($4,2 \pm 0,18 \mu\text{m}$; $n = 30$). Die Kontrollgruppe unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der Gruppe mit siebentägiger PDP-Exposition (PDP 7d; $3,8 \pm 0,37 \mu\text{m}$; $n = 30$; $p = 0,93$), von der Gruppe mit 14-tägiger PDP-Exposition (PDP 14d; $4,4 \pm 0,17 \mu\text{m}$; $n = 30$; $p = 0,06$) und von der KO-Gruppe mit 14-tägiger PDP-Exposition (PDP KO; $4,5 \pm 0,81 \mu\text{m}$; $n = 24$; $p = 0,18$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der BOX-Gruppe ($4,3 \pm 0,14 \mu\text{m}$; $n = 28$; $p = 0,09$). Die PDP 7d-Gruppe unterschied sich signifikant von der PDP 14d-Gruppe ($p < 0,01$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der PDP 14d-Gruppe und der PDP KO-Gruppe ($p = 0,82$).

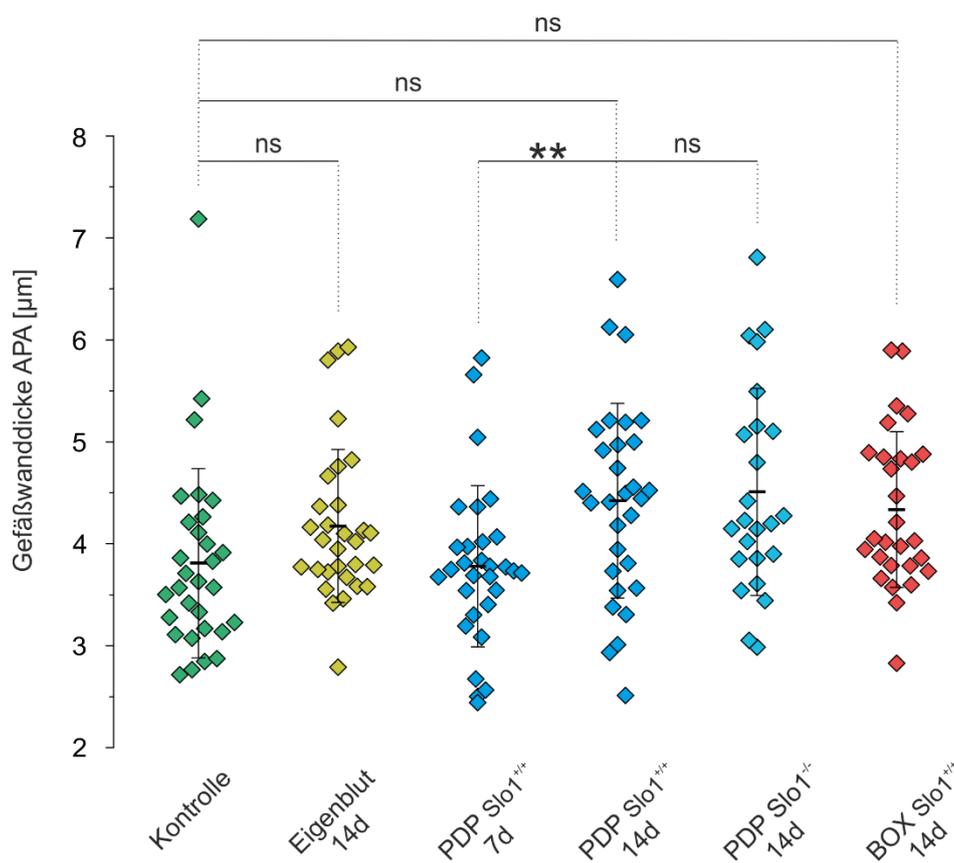


Abb. 24: Punktauftragung der absoluten Gefäßwanddicke der Arteria azygos pericallosa (APA) im Vergleich zwischen Kontrolle (grün), Eigenblut (gelb), PDP-Gruppe (jeweils blau) nach sieben Tagen (7 d) und 14 Tagen (14 d), PDP KO-Gruppe (hellblau) und BOX-Gruppe (rot).

Bei der Untersuchung des Gefäßinnendurchmessers gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ($96 \pm 22,9 \mu\text{m}$; $n = 30$) und der Eigenblutgruppe ($75 \pm 14,9 \mu\text{m}$; $n = 30$; $p = 0,12$). Die Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von der PDP 7d-Gruppe ($94 \pm 12,8 \mu\text{m}$; $n = 30$; $p = 0,82$), von der PDP 14d-Gruppe ($86 \pm 10,3 \mu\text{m}$; $n = 30$; $p = 0,39$) und von der PDP KO-Gruppe ($73 \pm 6,4 \mu\text{m}$; $n = 24$; $p = 0,09$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der BOX-Gruppe ($77 \pm 11,3 \mu\text{m}$; $n = 28$; $p = 0,12$). Sowohl die Vergleiche zwischen den Gruppen PDP 7d und PDP 14d ($p = 0,34$) als auch zwischen PDP 14d und PDP KO ($p = 0,07$) fielen nicht signifikant aus.

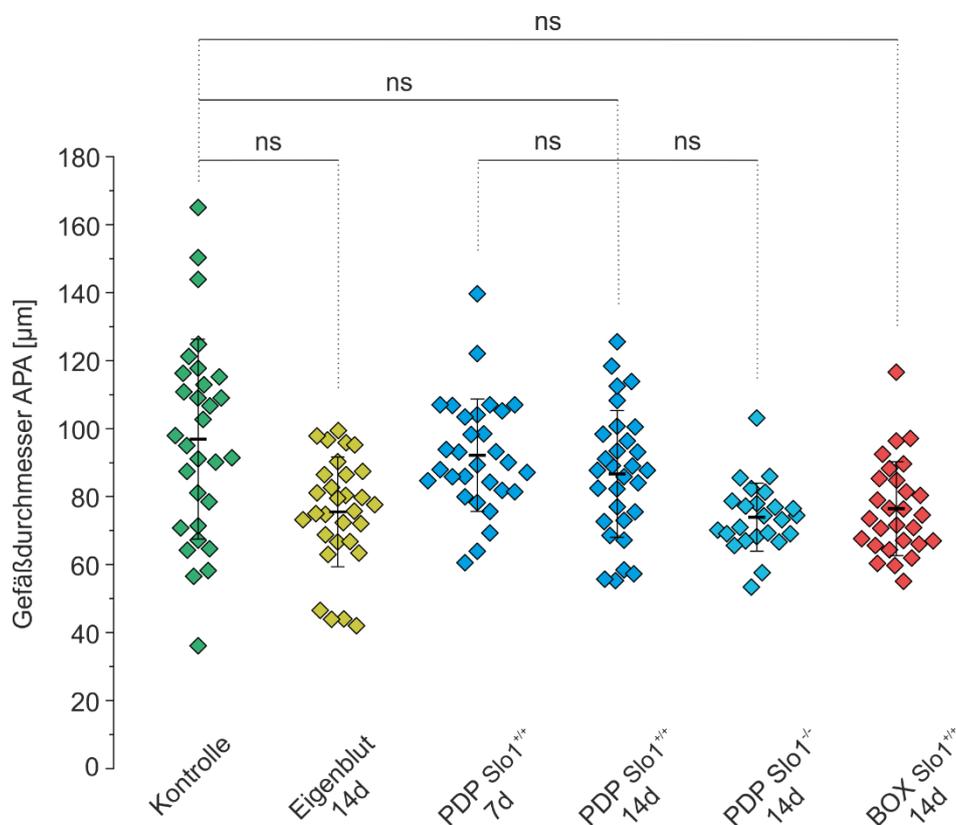


Abb. 25: Punktauftragung des Gefäßdurchmessers der Arteria azygos pericallosa (APA) im Vergleich zwischen Kontrolle (grün), Eigenblut (gelb), PDP-Gruppe (jeweils blau) nach sieben Tagen (7 d) und 14 Tagen (14 d), PDP KO-Gruppe (hellblau) und BOX-Gruppe (rot).

5 Diskussion

Diese Promotionsarbeit umfasste vier Teilprojekte. Im Teilprojekt „Pharmakologische Modulation“ wurden der Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil und die K_{ir} -Kanal-Inhibitoren $BaCl_2$ und ML133 jeweils in Kombination mit dem vasokonstriktiv wirkenden PDP A an juvenilen Maushirnschnitten getestet. Diese kombinierte Applikation hatte in allen drei Fällen eine Vasokonstriktion zur Folge, die jedoch signifikant schwächer ausfiel als bei alleiniger Applikation von PDP A.

Das zweite Teilprojekt, „BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen“, untersuchte die vasoaktive Wirkung in akuten Hirnschnitten von C57BL/6-Mäusen mit homozygotem und heterozygotem BK-Kanal-KO in glatten Gefäßmuskelzellen. Die Applikation von PDP A hatte in keiner der Gruppen eine signifikante Vasokonstriktion zur Folge. Beim Gegenüberstellen der Ergebnisse mit den bereits erhobenen Kontrolldaten FVB-WT-Mäusen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen.

Im Teilprojekt „Elektrostimulationsreihe“ wurden Hirnschnitte von juvenilen und alten Mäusen, darunter WT- und KO-Tiere, mit einer Elektrode elektrisch stimuliert. Dies führte zu biphasisch verlaufenden Gefäßreaktionen aus einer schnellen Vasokonstriktion und einer anschließenden Vasodilatation. An den Arteriolen junger Mäuse wurden größere Vasokonstriktionen und schnellere Redilatationen als an denen alter Mäuse beobachtet. Zwischen den beiden Genotypen wurden diesbezüglich keine Unterschiede identifiziert.

Schließlich wurden im Teilprojekt „HDPs und Gefäßmorphologie“ die Aktinfasern der APA in fixierten, immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitten dargestellt. Die vorher mit unterschiedlichen Blutabbauprodukten behandelten Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander in Bezug auf absolute Gefäßwanddicke und Gefäßdurchmesser.

5.1 Pharmakologische Modulation

5.1.1 Methodik

Die pharmakologische Modulation der PDP A-induzierten Vasoaktivität von kortikalen Arteriolen ist seit Jahren ein etabliertes Konzept in der Arbeitsgruppe. Mit diesem Versuchsdesign wurden verschiedene Substanzklassen, unter anderem Aktivatoren und Inhibitoren des BK-Kanals, Modulatoren der Proteinkinase C und der Neurotransmitter 20-HETE getestet. Ziel dieser umfangreichen Versuchsreihen ist es,

die Rolle des BK-Kanals in Interaktion mit den HDPs immer besser in das komplexe Netzwerk der Gefäßtonusregulation von Hirnarteriolen einordnen zu können.

Versuchstiere

Das Mausmodell hat sich in den bisher durchgeführten Versuchsreihen als sicher und praktikabel erwiesen. Um die Vergleichbarkeit mit früheren Versuchen zu gewährleisten, ist eine Verwendung des gleichen Tiermodells sinnvoll.

Die Maus als Modellorganismus ist auch insgesamt in der SAB-Forschung etabliert. Die große Ähnlichkeit zum menschlichen Genom, die Möglichkeit der Züchtung transgener Tiere mit dem Vorteil einer kurzen Generations- und Tragzeit sowie die vergleichsweise kostengünstigen Haltungsbedingungen machen die Maus zu einem hervorragenden und praktikablen Versuchstier für die Laborarbeit.

Die Bildung von Alterskohorten ist entscheidend für die Vergleichbarkeit verschiedener Versuchsreihen. Für das Teilprojekt der pharmakologischen Modulation wurden nur juvenile Tiere, die als Tiere im Alter von 20 - 30 Tagen definiert wurden, untersucht. Das Hirngewebe juveniler Tiere weist mutmaßlich eine höhere Ischämietoleranz auf und sichert eine gewisse Stabilität des Gewebes während des Experiments.

Vorspannung mit L-Name

Im etablierten Versuchsdesign der Arbeitsgruppe nimmt der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME eine wichtige Rolle ein. Ziel der Einwaschung von L-NAME nach einer zehnmütigen Anpassungsphase der Hirnschnitte ist eine Simulation des physiologischen Blutdrucks, der für die Autoregulation der Blutversorgung des Hirns essentiell ist. Hier wird der Bayliss-Effekt genutzt, der die aus einer Zunahme des Blutflusses resultierende Kontraktion von Arteriolen beschreibt. Der zugrunde liegende Mechanismus beinhaltet die Aktivierung von mechanosensiblen Kationenkanälen in glatten Gefäßmuskelzellen von Widerstandsgefäßen. Die daraus resultierende Depolarisation hat den Einstrom von Ca^{2+} zur Folge, was durch Komplexbildung mit Calmodulin den Querbrückenzyklus aktiviert.

Im mit warmer aCSF umspülten Hirnschnitt fehlt der natürliche Blutfluss und damit der Bayliss-Effekt. Die glatten Gefäßmuskelzellen sind in der Konsequenz vollkommen relaxiert und durch pharmakologische Modulatoren erschwert aktivierbar. Um dieser vollständigen Relaxation entgegenzuwirken, wird L-NAME zur gezielten Synthesehemmung des vasodilatierenden NO eingesetzt. Die Folge ist eine stabile

Vasokonstriktion um ca. 7 %, die über die Dauer eines Experiments von 145 min anhält (Joerk et al. 2014).

Andere Substanzen wie der Thromboxan A2 Rezeptorantagonist U-46619 sind ebenfalls in der Lage, die Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen zu steigern (Girouard et al. 2010), eine Testung im etablierten experimentellen Setting steht allerdings noch aus.

Vasoaktive Substanzen

Fasudil stellt als bereits beim Patienten eingesetztes Medikament den prominentesten Vertreter der hier verwendeten Pharmaka dar. Die hemmende Wirkung von Fasudil auf die Rho-Kinase, die bei der Vermittlung von Vasokonstriktion eine wichtige Rolle spielt, macht das Medikament zu einem geeigneten Kandidaten, um auch den Einfluss der Rho-Kinase auf die PDP A-vermittelte Vasokonstriktion zu testen. Dass das Medikament bereits für die Anwendung am Menschen zugelassen ist und dort antivasospastisch wirkt, macht es umso interessanter, die Interaktion mit PDP A zu testen.

Die Hemmung der Rho-Kinase hat eine zunehmende Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, eine Dephosphorylierung von Myosin und damit eine Unterbrechung des Querbrückenzyklus in glatten Gefäßmuskelzellen zur Folge. Das Resultat ist eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und eine Vasodilatation. Zusätzliche vasodilatatorische Eigenschaften hängen mit der Fähigkeit von Hemmern der Rho-Kinase zusammen, eNOS-mRNA zu stabilisieren (Takemoto et al. 2002).

K_{ir}-Kanäle spielen als leistungsfähige Regulatoren des Membranpotentials eine herausragende Rolle in der neurovaskulären Einheit. Um das komplexe Netzwerk um den BK-Kanal weiter zu ergründen, wurden in diesem experimentellen Setting zum ersten Mal etablierte spezifische Inhibitoren der K_{ir}-Kanäle auf ihre Interaktion mit der PDP A-vermittelten Vasokonstriktion geprüft.

BaCl₂ wurde am akuten Hirnschnitt in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt. In Konzentrationen zwischen 30 und 100 µM hemmt Ba²⁺ spezifisch die K_{ir}-Kanäle in glatten Gefäßmuskelzellen, ohne Einfluss auf die Funktion der BK-Kanäle zu nehmen (Chrissobolis S 2000, Ko EA 2008, Nelson MT 1995). Eine Konzentration von 50 µM Ba²⁺ führte an zerebralen Arteriolen von Ratten zu einer Hemmung der Vasodilatation (Quayle et al. 1993) und am menschlichen Unterarm zu einer signifikanten Erhöhung

des Gefäßwiderstands. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde diese Konzentration auch hier angewandt (Dawes et al. 2002).

Für ML133 wurde im *patch clamp*-Versuch die pH-abhängige Inhibition der Kir2.1-Kanäle getestet (Wu et al. 2010). Anhand der hier vorgestellten Dosis-Wirkungskurve wurde die Konzentration von 10 µM gewählt, um bei dem im Experiment eingestellten pH von 7,4 eine nahezu hundertprozentige Hemmung zu erwirken.

5.1.2 Ergebnisse

Die drei getesteten Pharmaka führten im *in vitro*-Experiment jeweils bei simultaner PDP A-Applikation zu einer weniger stark ausgeprägten Vasokonstriktion, als es in der PDP A-Kontrollgruppe beobachtet wurde.

Fasudil

Der Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil wirkt über die Dephosphorylierung von Myosin relaxierend, also vasodilatierend. Den hier durchgeführten Experimenten lag die Hypothese zugrunde, dass diese Vasodilatation der PDP A-vermittelten Vasokonstriktion entgegenwirkt.

Tatsächlich führte die simultane Applikation von Fasudil und PDP A zu einer abgeschwächten Vasokonstriktion im Vergleich zur alleinigen PDP A-Gabe (Abb. 15). Der erwartete vasodilatative Effekt blieb unter alleiniger Fasudil-Applikation am Hirnschnitt jedoch aus. Stattdessen verharrte der Gefäßdurchmesser ungefähr auf Ausgangsniveau und unterschied sich nicht zur Kontrollgruppe unter der Vorspannung von L-NAME.

Die durch L-NAME vorgenommene Vorspannung des Gefäßes sorgt für eine geringe kontinuierliche Vasokonstriktion, die sich nicht signifikant vom Ausgangsniveau unterscheidet und unter der eine Vasokonstriktion durch PDP A-Gabe deutlich erkennbar ist. Der unter L-NAME eingestellte Vasotonus ermöglicht somit eine Gefäßreaktion in zwei entgegengesetzte Richtungen, sowohl eine konstriktive als auch eine dilatative. Möglicherweise reicht diese geringe Vorspannung jedoch nicht aus, um den dilatierenden Effekt von Fasudil ausreichend widerzuspiegeln. Unter dieser Voraussetzung würden erst die durch PDP A-Applikation am Gefäß erzeugten stärker konstringierenden Kräfte die entgegengesetzte Wirkung von Fasudil sichtbar machen.

Die Vorspannung des zu untersuchenden Gefäßes ist offenbar ein sehr wichtiger zugrunde liegender Parameter für *in vitro*-Experimente am akuten Hirnschnitt. Ohne

eine angemessene Vorspannung sind Untersuchungen, die druckabhängige Prozesse wie Gefäßreaktionen zum Objekt haben, von vornherein kompromittiert. Ein gutes Beispiel für diesen Zusammenhang sind die Ergebnisse der Experimente mit den K_{ir} -Kanal-Inhibitoren.

Interessant wäre eine Reihe von Kontrollexperimenten mit stärkerer Vorspannung durch Anpassung der *L-NAME*-Dosis. Nur nach eindeutiger Vasodilatation durch Fasudil in dem hier verwendeten experimentellen Setting könnte Sicherheit darüber bestehen, ob Fasudil der PDP A-vermittelten Vasokonstriktion durch seine dilatierenden Eigenschaften entgegenwirkt. Andernfalls kommen weitere Erklärungen für die fehlende Dilatation unter Fasudil-Applikation infrage. Die Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase ist Hintergrund der Fasudil-vermittelten Vasodilatation. Ein Teil des vasodilatativen Effekts von NO wird über den gleichen Signalweg, die Reaktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, vermittelt (Nakamura et al. 2007). Wird die NO-Produktion und damit dieser Signalweg durch *L-NAME* gehemmt und parallel dazu eine Aktivierung des gleichen Signalwegs über Fasudil induziert, finden im Experiment zwei einander entgegengesetzte Prozesse statt. Eine vollständige Entfaltung des vasodilatativen Potentials von Fasudil wäre somit aufgrund der Wirkweise von *L-NAME* nicht möglich und eine deutlich abgeschwächte dilatierende Wirkung von Fasudil mit dieser Methode unumgänglich. Aus diesem Grund wäre auch eine Testreihe mit einer alternativ wirkenden Substanz für die Vorspannung, wie zum Beispiel U-46619, von Nutzen.

BaCl₂ und ML133

Die K_{ir} -Kanal-Inhibitoren BaCl₂ und ML133 wirken über eine Hemmung der Hyperpolarisation an der Zellmembran kontraktile auf Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und haben somit einen vasokonstringierenden Effekt. Da die Hemmung von BK-Kanälen durch PDP A ebenfalls eine Vasokonstriktion zur Folge hat, wurde hypothetisiert, dass eine simultane Hemmung beider Signalwege eine verstärkte Vasokonstriktion auslöst. Beide Substanzen unterschieden sich in ihrer Wirkweise im experimentellen Setting nicht voneinander, weswegen sie als Einheit diskutiert werden.

Die alleinige Applikation der K_{ir} -Kanal-Inhibitoren löste an den hier untersuchten Hirnschnitten keine signifikante Vasokonstriktion im Vergleich zur Kontrolle unter Vorspannung durch *L-NAME* aus (Siehe Abb. 16 und 17). Es muss deswegen davon

ausgegangen werden, dass die hier verwendete Vorspannung keine Aktivierung der K_{ir} -Kanäle zur Folge hat. Der gleiche Effekt wurde in frühen Experimenten der Arbeitsgruppe beobachtet, als der BK-Kanal aufgrund von mangelnder Vorspannung der Gefäße und damit geringer Aktivität der Kanäle nicht gehemmt werden konnte. Daraufhin wurden die BK-Kanäle über die Vorspannung mit *L*-NAME in einen aktivierbaren Zustand versetzt, um den Unterschied zwischen aktiven und gehemmten BK-Kanälen sichtbar zu machen. Diese Methodik scheint für die Untersuchung der K_{ir} -Kanäle nicht geeignet zu sein. Im Gegensatz zum BK-Kanal spielt der K_{ir} -Kanal in diesem experimentellen Zusammenhang offenbar keine wichtige tonuswirksame Rolle. Möglicherweise könnte aber auch hier eine *L*-NAME-Dosiserhöhung bzw. der Einsatz einer anderen Vorspannungsmethode Informationen zur Funktion der K_{ir} -Kanäle Ergebnisse liefern. Filosa et al. erzielten bei der Untersuchung der K_{ir} -Kanal-Funktion am akuten Hirnschnitt mit U-46619 gute Erfolge (Filosa et al. 2006), weswegen in unserer Arbeitsgruppe erste Testungen mit U46619 begonnen wurden. Andererseits wird berichtet, dass eine K_{ir} -Kanal-Hemmung durch Ba^{2+} in verschiedenen experimentellen Zusammenhängen, auch an Hirnschnitten sowie *in vivo* an der anästhesierten Maus, nicht erfolgreich war und demnach offensichtlich stark von den jeweiligen experimentellen Bedingungen abhängig ist (Tykocki et al. 2017). Eine Erweiterung der Methode um die Messung der extrazellulären K^{+} -Konzentration während der Gabe von K_{ir} -Kanal-Inhibitoren könnte als Kontrollinstanz für die Wirksamkeit der applizierten vasoaktiven Substanzen fungieren.

Mit dem oben beschriebenen Wissen erscheint es nicht verwunderlich, dass eine simultane Applikation von PDP A und den K_{ir} -Kanal-Inhibitoren im Gegensatz zur Ausgangshypothese keine verstärkte Vasokonstriktion zur Folge hatte. Es war jedoch nicht zu erwarten, dass die Simultanapplikation stattdessen zu einer weniger starken Vasokonstriktion als in der Kontrollgruppe unter PDP A-Perfusion führen würde. Den Ergebnissen zufolge wird der von PDP A vermittelte vasokonstriktorische Effekt durch die K_{ir} -Kanal-Inhibitoren scheinbar abgeschwächt. Eine Interaktion der Substanzen am BK-Kanal im Sinne einer kompetitiven Hemmung ist indes hochgradig unwahrscheinlich, da sowohl $BaCl_2$ als auch ML133 spezifische Inhibitoren der K_{ir} -Kanäle sind. Zudem ist der molekulare Aufbau der beiden Substanzen grundsätzlich verschieden, was die Existenz einer gemeinsamen Angriffsstelle am BK-Kanal, die sie zudem mit PDP A teilen, zweifelhaft erscheinen lässt. Möglicherweise werden durch die Anwesenheit der Inhibitoren beider Kanaltypen nicht genauer identifizierbare

Prozesse angestoßen, die in diesem Modell einen vasorelaxierenden Effekt haben. Es ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, den hier beobachteten Effekt ausreichend zu erklären.

Fazit

Die fortlaufenden Untersuchungen von vasoaktiven Agenzien in Kombination mit dem BK-Kanal-Inhibitor PDP A bestätigen immer wieder, wie komplex das Netzwerk ist, in das der BK-Kanal als Regulator des Gefäßtonus eingebettet ist. Zwar liefern die hier präsentierten Ergebnisse in Bezug auf die Rolle der K_{ir} -Kanäle mehr Fragen als Antworten. Die Ergebnisse der Fasudil-Testreihe weisen aber darauf hin, dass zumindest die Rho-Kinase einen nicht ganz unerheblichen Einfluss auf die durch PDP A am BK-Kanal induzierte Vasokonstriktion hat.

Ansätze zur Forschung und Behandlung am zerebralen Vasospasmus müssen daher dringend die Anerkennung dieses komplexen Netzwerks beinhalten. Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Akteure bei der Entstehung des Vasospasmus bleibt nach wie vor zu wenig ergründet. Es steht noch aus, genauer zu untersuchen, was die Ausschaltung eines Signalwegs, in diesem Fall der BK-Kanal-vermittelten Hyperpolarisation, zur Folge hat, was für biochemische Kollateralsignalwege und Kompensationsmechanismen dadurch möglicherweise induziert werden und welcher Art diese Mechanismen sind.

Dafür ist die Testung weiterer pharmakologischer Akteure im gleichen experimentellen Setting eine mögliche Herangehensweise. Andererseits ist Fasudil in der Vasospasmusforschung und -behandlung zumindest mancherorts schon so etabliert, dass auch eine genauere Fokussierung auf die Rho-Kinase als Agonist des BK-Kanals denkbar wäre. Die vielfältigen Funktionen der Rho-Kinase für die Zelle bringen dabei die Schwierigkeit mit sich, dass durch eine Ausschaltung auch Funktionen ausfallen, deren Beeinflussung nicht erwünscht ist. Insofern ist Fasudil nicht nur der vielversprechendste, sondern auch der unvorhersehbarste Kandidat aus dieser Reihe, um ihn für derartige Forschungsansätze zu nutzen.

5.2 BK-Kanal-Knockout in glatten Gefäßmuskelzellen

5.2.1 Methodik

Versuchstiere

Im etablierten *in vitro*-Setting unter PDP A-Einfluss erfolgte die Testung von SM-BK-Mäusen. Im Gegensatz zu Mäusen mit ubiquitärem BK-Kanal-KO (BK-/-),

deren gesamte embryonale, fetale und postpartale Entwicklung mit dem KO stattfindet, wurde dieser bei den SM-BK-Mäusen erst kurz vor Beginn der Experimente durch Zufütterung von Tamoxifen induziert. In vergleichenden Untersuchungen an der Harnblase wurden starke phänotypische Unterschiede zwischen diesen beiden Mauslinien nachgewiesen. Im Vergleich zu den BK^{-/-}-Mäusen wurde an den SM-BK^{-/-}-Mäusen eine deutlich gesteigerte Kontraktilität der Detrusormuskulatur detektiert und die Vermutung aufgestellt, dass durch die plötzliche Induktion im konditionellen KO funktionelle Kompensationsmechanismen entfallen, die BK^{-/-}-Mäuse im Laufe der Entwicklung adaptieren (Sprossmann et al. 2009). Mutmaßlich treten ähnliche Kompensationsmechanismen nicht nur in der Harnblase, sondern auch in der restlichen glatten Muskulatur des Körpers, wie zum Beispiel in zerebralen Arteriolen auf. Da diese Kompensationsmechanismen auch bei den bisher im HDP-Experiment getesteten Slo1^{-/-}-Mäusen des FVB-Stammes nicht auszuschließen sind, wurden die gleichen Experimente nun erstmals mit SM-BK-Mäusen des C57BL/6-Stammes durchgeführt und so deren Gefäßreaktivität auf PDP A-Gabe untersucht.

In Bezug auf die oben genannten phänotypischen Unterschiede zwischen den beiden KO-Mauslinien ist selbstverständlich infrage zu stellen, inwieweit ein Vergleich mit den zuvor getesteten Slo1^{-/-}-Mäusen möglich und die eigentliche Fragestellung nach der spezifisch in glatten Gefäßmuskelzellen vermittelten PDP A-induzierten Vasokonstriktion in diesem Setting beantwortbar ist. Eine zu diesem Zweck entworfene Testreihe durchzuführen wäre nur dann sinnvoll, wenn man mögliche Kompensationsmechanismen der zerebralen Blutflussregulation für so gering hielte, dass sie im Vergleich zur Wirkungsweise von PDP A kaum nennbar ins Gewicht fallen.

Einen weiteren potentiell konfundierenden Parameter stellte das Alter der Tiere dar. Während alle zuvor getesteten Slo1- sowie die von Charles River importierten BK^{+/+}-Mäuse 20 - 30 Tage alt waren, war die SM-BK-Kohorte aus organisatorischen Gründen hinsichtlich des Alters der Tiere durchaus heterogen (53-114 d). Für zukünftige Projekte wäre es optimal, die zu vergleichenden Gruppen in Bezug auf diesen Parameter aufeinander abzustimmen. In dieser orientierenden Testreihe reagierten jedoch bereits die Hirnschnitte der gleichaltrigen jüngeren Tiere derartig heterogen, dass das Alter für die statistische Auswertung nicht ins Gewicht fällt.

Das Teilprojekt stellte somit einen ersten Versuch dar, verschiedene Forschungsprojekte miteinander zu verbinden, deren übergeordnetes Ziel ein

umfassendes Verständnis der Wirkungsweise und des Stellenwerts des BK-Kanals in der PDP A-vermittelten Gefäßreaktion ist.

Verblindung

Das Pharmakologische Institut in Tübingen stellte drei Sendungen von jeweils zehn Mäusen mit gemischten Genotypen zur Verfügung. Erst nach abgeschlossener Auswertung der Experimente wurden die Ergebnisse der Erst- und Zweitgenotypisierung bekannt gegeben. Diese Verblindung sicherte in den Experimenten mit den SM-BK-Mäusen ein sicher verzerrungsfreies Arbeiten, das in dieser Form mit den von Charles River bestellten BK^{+/+}-Mäusen sowie mit den Slo1-Mäusen aus dem eigenen Haus aus organisatorischen Gründen nicht möglich war.

5.2.2 Ergebnisse

Die Perfusion mit PDP A führt bei Slo1^{+/+}-Tieren über den BK-Kanal zu einer verstärkten Vasokonstriktion, nicht aber bei Slo1^{-/-}-Tieren. Die der SM-BK-Testreihe zugrunde liegende Hypothese beinhaltete, dass PDP A spezifisch an den BK-Kanälen der glatten Gefäßmuskelzellen hemmend wirkt und so eine Vasokonstriktion auslöst. Ein die Hypothese unterstützendes Ergebnis wäre dementsprechend das Ausbleiben einer Vasokonstriktion bei den SM-BK^{-/-}-Tieren unter PDP A-Perfusion sowie eine Vasokonstriktion in der Kontrollgruppe SM-BK^{+/-} gewesen. Tatsächlich wurde an den SM-BK^{-/-}-Mäusen nach PDP A-Gabe keine signifikante Vasokonstriktion beobachtet (Abb. 18). Eine Vasokonstriktion blieb allerdings auch in der Kontrollgruppe, bei den heterozygoten SM-BK^{+/-}-Mäusen, aus. Da die beiden Gruppen in ihrer Gefäßreaktion auf PDP A keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, war eine Beurteilung der Hypothese mit diesen Ergebnissen nicht möglich. Vielmehr wurde es für essentiell befunden, eine weitere Testreihe mit WT-Tieren des verwendeten Stammes durchzuführen.

Die gleiche experimentelle Testung wurde deswegen mit BK^{+/+}-Mäusen des C57BL/6-Stammes durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit bereits zuvor erhobenen Daten von Slo1^{+/+}-Mäusen des FVB-Stammes verglichen. Die bei den Slo1^{+/+}-Mäusen beobachtete PDP A-vermittelte Vasokonstriktion blieb auch bei den BK^{+/+}-Mäusen aus (Abb. 19). Die derart unterschiedliche Reaktivität der beiden Mausstämme im selben Experimentalablauf legt die These nahe, dass grundsätzliche genetische Differenzen

zwischen diesen beiden Stämmen bestehen, die den hier *in vitro* untersuchten Prozess kaschieren.

Auch in anderen medizinischen Zusammenhängen wurden bereits phänotypische Differenzen zwischen den beiden Mausstämmen identifiziert. Die schwarzen C57BL/6-Mäuse unterscheiden sich von den weißen FVB-Tieren zum Beispiel in ihrer Reaktion auf bestimmte Anästhetika (Sato et al. 2006), in der Wundheilung nach Myokardinfarkt (van den Borne et al. 2009) und der Anfälligkeit für Diät-induzierte Fettleibigkeit (Kim et al. 2013). Die Ergebnisse dieses Teilprojektes deuten darauf hin, dass ein weiterer phänotypischer Unterschied die Reaktion der BK-Kanäle auf HDPs ist.

Die Hypothese, dass der BK-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen der Hauptmediator der PDP A-vermittelten zerebralen Vasokonstriktion ist, wurde durch diese Ergebnisse weder bestätigt noch widerlegt. Die Tatsache, dass die WT-Tiere der verglichenen Mausstämme sich so stark in ihrer Reaktion auf PDP A unterscheiden, macht einen Vergleich auf der Basis der aktuellen Datenlage unmöglich. Sollte der BK-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen der spezifische Mediator der bei FVB-Mäusen beobachteten Vasokonstriktion nach PDP A-Gabe sein, könnte man dies nur innerhalb desselben Mausstammes nachweisen. Eine erneute Durchführung der Experimente an FVB-Mäusen mit für glatte Gefäßmuskelzellen spezifischem BK-Kanal-KO wäre nötig, um die zugrunde liegende Hypothese zu überprüfen. Bei einer solchen Testung wäre es außerdem günstig, von Beginn an Mäuse des Alters von 20 - 30 Tagen zu untersuchen, um Störfaktoren weitestgehend zu eliminieren und die Vergleichbarkeit mit den bisherigen Testreihen innerhalb der Arbeitsgruppe zu gewährleisten.

Eine Testreihe mit dem BK-Kanal-Inhibitor Iberiotoxin an C57BL/6-Mäusen könnte weitere Erkenntnisse dazu liefern, wie entscheidend der BK-Kanal bei diesen Tieren zur Blutflussregulation beiträgt. Ein Hinweis für die essentielle Rolle des Kanals in diesem Zusammenhang wäre eine Iberiotoxin-induzierte Konstriktion zerebraler Arteriolen, wie sie auch bei Tieren vom FVB-Stamm beobachtet wurde. Folglich wären die Ergebnisse der hier beschriebenen Testreihe Hinweis für eine geringere Anfälligkeit der BK-Kanäle von C57BL/6-Mäusen für Hemmung durch PDP A.

Auch wenn die Ergebnisse dieses Teilprojektes keine ausreichende Beantwortung der ursprünglichen Fragestellung liefern, werfen sie doch interessante neue Perspektiven für Forschungsansätze auf. Das Wissen um die Variabilität des BK-Kanals aufgrund

von Splicing könnte die Basis für ausführliche molekulargenetische Untersuchungen an FVB-Mäusen mit PDP A-induzierter Vasokonstriktion bieten. Diesen zugegebenermaßen weit voraus greifenden Ansatz auf den Menschen zu übertragen und auch hier nach potentiell prädisponierenden bzw. protektiven genetischen Sequenzen zu suchen, könnte die Pathogenese des Vasospasmus weiter entschlüsseln.

5.3 Elektrostimulationsreihe

5.3.1 Methodik

Versuchsaufbau

Für ein besseres Verständnis der Funktion und Bedeutung des BK-Kanals bei der Vermittlung des Vasospasmus ist neben der Testung verschiedener pharmakologischer Interaktionspartner auch eine grundsätzliche Untersuchung der neurovaskulären Einheit und der Bedeutung des BK-Kanals innerhalb dieser von Bedeutung. Aus diesem Grund wurde ein neues Protokoll für Hirnschnittexperimente mit einer elektrischen Stimulationsreihe entworfen. Die Konzeption basierte auf vorherigen Experimenten (Holthoff et al. 1994, Holthoff und Witte 1996) und wurde durch die Erfahrung aus früheren arbeitsgruppeninternen Experimenten ergänzt und darauf ausgerichtet, eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit zukünftigen Experimenten zu gewährleisten.

In präliminären Experimenten von Alexander Jörk aus unserer Arbeitsgruppe wurden akute, native Hirnschnitte beginnend mit 9 V und nachfolgend mit absteigenden Stimulationsstärken bis zu 1 V nacheinander stimuliert. Dabei wurden bei hohen Stimulationsstärken transiente Vasokonstriktionen und bei der niedrigsten Stimulationsstärke transiente Vasodilationen beobachtet. Marvin Ritter stimulierte in seiner medizinischen Dissertation jeden Hirnschnitt jeweils einmal mit einer niedrigen und einmal mit einer hohen Stimulationsstärke. Diese Hirnschnitte waren jeweils mit L-NAME präinkubiert. In Ritters Experimenten wurde jedoch bei kleinen Stimulationsstärken keine Vasodilatation beobachtet, damals mutmaßlich aufgrund der Verwendung von L-NAME vor Beginn der Stimulation.

Um den möglichst unverfälschten Effekt niedriger Stimulationsstärken zu testen, wurde in der vorliegenden Arbeit bei 1 V angefangen mit aufsteigender Stimulationsstärke stimuliert. Dabei wurde die Einwaschung von L-NAME ausgelassen, da diese vasokonstriktiv wirkende Substanz die zu untersuchende Änderung des Vasotonus

nach elektrischer Stimulation mutmaßlich beeinflusst hätte. Bei vergleichbaren Experimenten mit mehreren aufeinanderfolgenden Stimulationen gab es zwischen den Stimulationen jeweils eine fünfminütige Erholungszeit, innerhalb derer die Messungen vorgenommen wurden (Holthoff et al. 1994). Diese Vorgehensweise lieferte stabile Ergebnisse für die Auslösung der intrinsischen optischen Signale innerhalb der gesamten Stimulationsreihe (Holthoff et al. 1994). Um eine vollständige Erholung des Hirngewebes zu gewährleisten, wurde für das Protokoll dieser Arbeit jedoch nach jeder Stimulation jeweils ein Messintervall von 10 Minuten eingehalten. Damit in zukünftigen Experimenten eine Perfusion mit PDP A wie in den oben beschriebenen Experimenten (Kap. 3.7) erfolgen kann, wurde erst nach 100 Minuten Beobachtung mit der elektrischen Stimulationsreihe begonnen. Dieses Vorgehen zugunsten der Vergleichbarkeit brachte selbstverständlich den Nachteil mit sich, dass die Hirnschnitte zu Beginn des eigentlichen Experiments metabolisch verbraucht waren, andererseits konnten so fast vollständig relaxierte Gefäße untersucht werden.

Um vor dem Hintergrund der 3R-Regel die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, wurde pro Experiment eine sehr große Datenmenge erhoben. Das bedeutete eine hochfrequente Bildaufnahme sowie die Durchführung von neun aufeinanderfolgenden Stimulationen pro Hirnschnitt.

Durch die Anwendung des neuen Stimulationsprotokolls konnte eine Vielzahl wertvoller Daten erhoben werden. Um die Anfälligkeit für potentielle Störfaktoren einzugrenzen, sollten bei der Weiterführung dieser Untersuchungsreihe jedoch nachfolgende Aspekte berücksichtigt werden.

Ein adäquater Umgang mit der Elektrode inklusive gründlicher Reinigung ist unabdingbar für den Erfolg der damit durchgeführten Experimente. Verformungen oder Verschmutzungen der konzentrischen Elektrode stehen der gewünschten Erregungsleitung und -ausbreitung im Hirnschnitt entgegen. Nicht außer Acht zu lassen ist außerdem, dass das Platzieren der Elektrode in den Hirnschnitt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Vielzahl an Zellen zerstört und bereits dadurch eine starke lokale Freisetzung von K^+ in den Extrazellularraum ausgelöst wird. Zwischen dem Platzieren der Elektrode und dem Beginn der Stimulationsreihe und der damit verbundenen Untersuchung sollte daher, wie hier durchgeführt, ausreichend Zeit eingeplant werden, in der sich die extrazelluläre K^+ -Konzentration auf das Ausgangsniveau zurückbilden kann.

Aus der Erfahrung der drei arbeitsgruppeninternen Stimulationsprotokolle geht hervor, dass mehr als sechs aufeinanderfolgende Stimulationen mit mehreren hohen Stimulationsstärken an den Hirnschnitten zu interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägten Ermüdungserscheinungen führen, die die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Mit jeder Stimulation werden große Ionenumverteilungen ausgelöst, die im Durchschnitt immer geringer ausfallende Gefäßreaktionen zur Folge haben, je häufiger stimuliert wird. Dies hängt auch damit zusammen, dass das Ausgangsniveau des arteriellen Durchmessers sich mit jeder Stimulation schlechter wiederherstellen lässt. Es muss deswegen davon ausgegangen werden, dass auch die ursprüngliche K^+ -Konzentration im Extrazellularraum mit jeder weiteren Stimulation schlechter wiederherstellbar wird.

Um durch nicht vollständig vermeidbare Erschöpfungserscheinungen des Hirnschnitts manipulierten Ergebnissen sowie unnötig langen Experimentierzeiten vorzubeugen, sollten daher Art und Dauer der Stimulationen angepasst werden. Vorteilhaft wäre ein Protokoll mit wenigen Stimulationen, damit der Hirnschnitt über die Dauer des gesamten Experiments vital bleibt. Die Erholungszeit zwischen den Stimulationen sollte nicht weniger als die hier gewählten 10 min betragen, da bereits in dieser langen Erholungsphase, unabhängig von der Stimulationsstärke, keine vollständige Dilatation auf das Ausgangsniveau zu beobachten war. Deutlich länger sollte diese Zeitspanne jedoch auch nicht sein, vielmehr sollte bei der Auswertung berücksichtigt werden, dass der Vasotonus mit steigender Anzahl der Stimulationen kontinuierlich zunehmen kann. Eine simultane Messung der extrazellulären K^+ -Konzentration könnte von Vorteil sein, um den metabolischen Hintergrund dieses gesteigerten Vasotonus zu ergründen, sowie zur besseren Beurteilung der interindividuellen Unterschiede in der Reaktivität des Hirngewebes.

Auch die verwendeten Stimulationsstärken sollten angepasst werden, wenn man die Zahl der Stimulationen reduziert. In Anlehnung an Holthoffs Experimente wäre eine Stimulationsreihe mit 2, 4, 6 und 8 V denkbar. Ausgehend davon, dass ein stärkerer elektrischer Reiz stärkere Auslenkungen des Gefäßdurchmessers bewirkt, wäre jedoch eine absteigende Reihenfolge der Stimulationen vorteilhaft. Den unverbrauchten Hirnschnitt zuerst mit 8 V zu stimulieren, hätte den Vorteil, dass die mutmaßlich stärkste Vasokonstriktion der Versuchsreihe am wenigsten durch Erschöpfungserscheinungen verfälscht würde. Die metabolische Belastung, die sich

während der Mehrfachstimulation kaum vermeiden lässt, würde bei dieser Vorgehensweise die niedrigste Stimulation, von der das kleinste Signal zu erwarten ist, am stärksten betreffen. Überlegenswert wäre, diese Störgröße durch zufällige Alternierung der Stimulationsreihenfolge zu charakterisieren. Um in einem solchen Aufbau die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten gewährleisten zu können, müsste jedoch ein Vielfaches an Versuchen durchgeführt werden, selbst bei nur drei aufeinanderfolgenden Stimulationen. Stattdessen wird zukünftigen Untersuchenden geraten, zunächst mit 8 V, dann mit 6, 4 und 2 V zu stimulieren, nach jeder Stimulation über 10 min Erholungszeit den Gefäßdurchmesser zu analysieren wie oben beschrieben und dabei optimalerweise ein automatisiertes Verfahren zur Bildaufnahme zu nutzen.

Auswertung

Die Auswertung der Rohdaten mit der etablierten Flächeninhaltsberechnung im ImageJ wäre aufgrund der Fülle zeitlich nicht durchführbar gewesen. Stattdessen wurde eine in der Arbeitsgruppe entwickelte halbautomatisierte Methode verwendet, die drei Lumendurchmesser mit gleichen Abständen von 25 μm zueinander berechnete. Da alle Ergebnisse dieses Teilprojektes mit derselben Methodik ausgewertet wurden, wurde auf einen direkten Vergleich mit der Flächeninhaltsauswertung verzichtet. Eine Validierung dieser Auswertungsform erfolgte durch die medizinischen Dissertationen von Niklas Langguth (Langguth 2019) und Anna Schaefgen (Schaefgen 2020).

Die anschließend aus den Rohdaten erhobenen Parameter beschreiben das der Gefäßreaktion zugrunde liegende angenommene mathematische Modell. Nach diesem Modell führt eine Stimulation zunächst zu einer Vasokonstriktion, auf die nach einer kurzen Plateauphase ein exponentieller Anstieg des Gefäßdurchmessers folgt. Die Geschwindigkeit, mit der diese Vasodilatation stattfindet, wird durch die Zeitkonstante τ beschrieben. Die Mehrheit der Stimulationen ab 2 V löste, diesem Modell entsprechend, innerhalb von 300 s eine Vasokonstriktion von mind. 5 % aus. Um die anschließende Vasodilatation beurteilen zu können, wurden Datenpunkte ausgeschlossen, die dem Modell nicht entsprachen. Dazu zählten Stimulationen, die keine ausreichende oder aber eine zeitlich stark verzögerte Vasokonstriktion auslösten, wodurch anschließend keine oder keine vollständige Vasodilatation hätte stattfinden können. Nur für Datenpunkte, bei denen die Stimulation eindeutig eine dem

Modell entsprechende Vasokonstriktion von mind. 5 % innerhalb der ersten 300 s auslöste, wurde τ identifiziert.

Versuchstiere

Für die Experimente dieses Teilprojekts wurden drei Versuchsgruppen ausgewählt. Ziel war es, bereits mit diesen drei Gruppen einen Vergleich zwischen jungen und alten Tieren sowie WT- und KO-Mäusen anstellen zu können. Junge Slo1^{+/+}-Mäuse sollten mit alten Slo1^{+/+}-Mäusen verglichen werden und diese wiederum mit alten Slo1^{-/-}-Mäusen. Gerade die Frage nach einer altersabhängigen Reaktivität der neurovaskulären Einheit stellt einen direkten Bezug zu einer wichtigen SAB-Patientengruppe dar. Die Vasospasmusinzidenz im Alter ist geringer als in jüngeren Patientenkohorten (Charpentier et al. 1999), Vasospasmen setzen aber schon bei geringeren Schwankungen des zerebralen Blutflusses ein (Torbey et al. 2001). Im alten Hirn ist der zerebrale Blutfluss nach SAB insgesamt geringer als bei jungen Patienten, was das gealterte Hirn störanfälliger für zerebrale Ischämien macht (Meyer et al. 1982). Bekannt ist außerdem, dass im Alter auf zellulärer Ebene funktionelle, strukturelle und phänotypische Veränderungen stattfinden können, die eine Dysregulation des zerebralen Blutflusses und Störungen innerhalb der neurovaskulären Einheit zur Folge haben (Ungvari et al. 2020). Die steigende Zahl an multimorbiden Patienten, deren Grunderkrankungen auf Inzidenz und Behandlungserfolg von SAB Einfluss nehmen, muss Anlass zur Entwicklung neuer Forschungs- und Therapieansätze geben. Aus diesem Grund sollte auch ein Vergleich von Alterskohorten in diese Untersuchung eingehen - mit der Grundhypothese, dass die elektrische Stimulation in altem Hirngewebe weniger starke Vasokonstriktionen auslöst als in dem von jungen Tieren.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Alterskohorten stellen einen Kompromiss zwischen einem möglichst großen Altersunterschied der Kohorten und technischen Einschränkungen in der Durchführbarkeit der Experimente dar. Die als juvenil bezeichneten Mäuse im Alter von 20 - 30 Tagen werden innerhalb der Arbeitsgruppe typischerweise als Versuchstiere genutzt und repräsentieren am ehesten Patientenkohorten im pubertären Alter, mit hoher Vasoreaktivität und hohem Vasospasmusrisiko nach SAB. Das Hirngewebe dieser Tiere erweist sich unter den experimentellen Bedingungen als ausdauernd und stabil. Die korrekte Wahl der Altersgrenze für die alte Kohorte ist diskutabel. Im Vergleich zu den juvenilen Tieren

können die hier verwendeten mindestens 365 Tage alten Tiere zweifellos als „gealtert“ bezeichnet werden und entsprechen einer Patientenkohorte zwischen 50 und 60 Jahren. Auf eine dritte Alterskohorte mit zwei Jahre alten Mäusen wurde aus mehreren Gründen verzichtet: Zum einen liegt die mittlere Lebenserwartung der Slo1^{-/-}-Tiere bei unter zwei Jahren, weshalb eine gleichstarke Gruppengröße zwischen den alten Mäusen verschiedener Genotypen nicht zu garantieren gewesen wäre. Weiterhin weist Hirngewebe von alten Mäusen eine fortschreitend gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel auf, die häufiger als bei Hirnschnitten juveniler Mäuse zum frühzeitigen Absterben des Gewebes und dem dadurch erzwungenen Abbruch des Experiments führt. Des Weiteren wird durch die niedrigere Transparenz der Hirnschnitte alter Tiere im Vergleich zu denen juveniler Mäuse die DIC-Mikroskopie beeinträchtigt. Einzelne Zellen und die Wände der Arteriolen stellen sich im Vergleich weniger stark kontrastiert dar. Die herabgesetzte Bildqualität beim Experimentieren mit altem Hirngewebe erschwert in der Folge die Auswertung der Gefäßdurchmesseränderung über die Zeit. Bereits beim Experimentieren mit etwa ein Jahr alten Mäusen stellten diese Veränderungen einen deutlich höheren Anforderungsgrad dar als die Versuche mit der juvenilen Kohorte. Die Testung der Hirnschnitte doppelt so alter Tiere hätte eine noch imponderablere Herausforderung bedeutet. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente hätten im eigenen Tierstall nicht ausreichend Mäuse im Alter von zwei Jahren zur Verfügung gestanden, weswegen eine Versuchsreihe mit sehr alten Tieren nicht durchführbar gewesen wäre. Zudem ist die Grenze von ungefähr einem Jahr bei vergleichenden Altersstudien an Nagetieren seit langem etabliert (Hongo et al. 1988, Yin et al. 2014). In Abwägung der oben genannten Einflussgrößen wurden schließlich Mäuse ab dem Alter von einem Jahr in die Kohorte alter Tiere eingeschlossen.

5.3.2 Ergebnisse

Die elektrische Stimulation akuter Hirnschnitte von Mäusen unterschiedlichen Alters und Genotyps löste an den untersuchten penetrierenden Arteriolen Konstriktionen aus, die mit vier Parametern beschrieben wurden: Amplitude und Zeitpunkt der maximalen Vasokonstriktion, die Zeitkonstante τ , mit der die Arteriolen redilatierten, sowie die AUC. Arteriolen junger Mäuse verengten sich mit größeren Amplituden und weiteten sich anschließend schneller auf als die Arteriolen alter Mäuse. Mit zunehmender

Stimulationsstärke nahmen die Amplituden der Vasokonstriktionen zu und die Zeitkonstante τ ab.

Amplitude

Die elektrische Stimulation an Hirnschnitten junger Tiere löste stärkere Vasokonstriktionen als an den Hirnschnitten der alten Tiere aus. Die Stimulationsstärke spielte im Vergleich zum Alter eine untergeordnete Rolle. Dieses Ergebnis bestätigt die Ausgangshypothese, nach der die Gefäßantwort auf große K^+ -Umverteilungen an Hirnschnitten alter Tiere aufgrund von strukturellen und funktionellen Veränderungen der Arteriolen geringer ausfällt als an jungem Hirngewebe.

Altersbedingte Veränderungen der arteriellen Gefäße sind seit vielen Jahren bekannt. Morphologische Veränderungen der Tunica media, wie die Umkehr des Kollagen/Elastin-Verhältnisses in Kombination mit der Abnahme der Zahl der glatten Gefäßmuskelzellen bei verschiedenen Spezies, sowie Kalzifizierungen führen im Alter zu steiferen Arterien (Tesauro et al. 2017). Zudem geht der Alterungsprozess sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren mit Funktionsstörungen des Endothels einher, die eine Überproduktion von vasokonstriktiv wirkenden Substanzen wie Endothelin-1 auf der einen und eine verminderte Produktion von vasodilatierenden Substanzen wie NO und EDHF auf der anderen Seite zur Folge haben (Najjar et al. 2005).

Insbesondere das durch altersbedingte endotheliale Dysfunktion gestörte Verhältnis von vasokonstriktiven zu vasodilatierenden Substanzen schien die hier durchgeführten Experimente maßgeblich zu beeinflussen. An den Hirnschnitten der alten Mäuse war das Auffinden einer für den Versuch geeigneten penetrierenden Arteriole dadurch erschwert, dass die Mehrheit der Arteriolen, im Vergleich zu den Hirnschnitten junger Mäuse, deutlich kleinere Innendurchmesser aufwies, die meist unterhalb der Mindestgrenze von 15 μm (siehe Abschnitt 3.7) lagen. Es war erwartbar, dass Arteriolen mit derartig hohem Tonus und altersbedingt erhöhter Rigidität durch elektrische Stimulationen weniger wirksam konstringieren würden als die Arteriolen junger Mäuse mit durchschnittlich deutlich größerem Durchmesser und physiologisch flexiblerer Gefäßwand.

Zwischen alten Mäusen mit und ohne BK-Kanal-Expression gab es diesbezüglich keine Unterschiede. Zuvor wurde hypothetisiert, dass das Fehlen der BK-Kanäle an den Hirnschnitten der Slo1^{-/-}-Mäuse zu einem langsameren und weniger stark

ausgeprägten K^+ -Transport in den Extrazellarraum und damit zu verzögerten und weniger starken Konstriktionen der Arteriolen führen würde als an den Hirnschnitten der Slo1^{+/+}-Mäuse. Um diese Hypothese ausdrücklich zu widerlegen, reichen die hier vorgelegten Ergebnisse jedoch nicht aus. Die bereits oben beschriebenen Auswirkungen des Alters kaschieren möglicherweise subtilere Unterschiede in der Reagibilität von Slo1^{-/-}- und Slo1^{+/+}-Mäusen. Im Rahmen einer vergleichenden Testreihe mit jungen Slo1^{-/-}-Mäusen könnte überprüft werden, ob sich die Kontraktionsfähigkeit dieser Arteriolen signifikant von der der Slo1^{+/+}-Mäuse unterscheidet und dementsprechend die Expression des BK-Kanals auf den hier untersuchten Zusammenhang stärkeren Einfluss nimmt, als diese Ergebnisse es vermuten lassen.

Für alle untersuchten Gruppen konnte verzeichnet werden, dass auch die Stimulationstärke Einfluss auf die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion nahm. Bei den Experimenten an alten Mäusen nahm mit zunehmender Stimationsstärke auch die Stärke der Vasokonstriktion, also die prozentuale Gefäßverengung zu. Die grundsätzlich größer ausfallenden Amplituden der Vasokonstriktionen in den Experimenten an jungen Mäusen blieben ab der Stimulation mit 3 V stabil.

Zeitpunkt

Neben der Amplitude der maximalen Vasokonstriktion wurde auch der Zeitpunkt, an dem diese maximale Amplitude erreicht wurde, untersucht. Dieser müsste laut der zugrundeliegenden Hypothese von der Geschwindigkeit der Reizweiterleitung innerhalb der neurovaskulären Einheit beeinflusst werden. Bekannt ist, dass die Geschwindigkeit der neuronalen Reizweiterleitung unter anderem vom Myelinisierungszustand der betreffenden Axone abhängt (Schmidt und Thews 1997). Die Myelinisierung des zentralen Nervensystems wird durch Alterungsprozesse beeinträchtigt. An den Myelinscheiden im alternden Hirn finden sowohl Degenerationsprozesse als auch Remyelinisierungen statt. Die remyelinisierten Axone zeichnen sich durch dickere Myelinscheiden und eine erhöhte Anzahl von Ranvier-Schnürringen aus, insgesamt erfolgt die Reizweiterleitung im alten Hirn aber etwas langsamer als im jungen Hirn (Peters 2009). Dementsprechend war zu erwarten, dass das Amplitudenmaximum an den Hirnschnitten der alten Mäuse im Vergleich zu den jungen Tieren zeitlich verzögert erreicht würde.

Der Zeitpunkt der maximalen Vasokonstriktion unterschied sich jedoch weder zwischen den jungen und alten Slo1^{+/+}-Mäusen, noch zwischen den alten Slo1^{+/+}- und Slo1^{-/-}-Mäusen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Verteilung der Daten, die gerade bei den alten Tieren stark streuten. 29 von 90 Datenpunkten, die an alten Tieren erhoben wurden, mussten allein aufgrund des späten Erreichens der maximalen Amplitude aus der Auswertung für die Zeitkonstante ausgeschlossen werden. Dies wird als Ausdruck der Sensibilität und Störanfälligkeit von gealtertem Hirngewebe interpretiert. An dieser Stelle sei erneut darauf hingewiesen, dass das Experimentieren mit gealtertem Hirngewebe noch mehr als mit jungem Hirngewebe hohe Anforderungen an die experimentellen Bedingungen stellt und bereits geringe Störgrößen einen großen Effekt auf die Ausdauer des Präparats haben können.

Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die neuronale Reizweiterleitung für die hier beobachtete Gefäßreaktion eine untergeordnete Rolle spielt und stattdessen eine Reizweiterleitung entlang der Arteriole, wie unten beschrieben, stattfand.

Unterschiede in der Stimulationsstärke hatten keine signifikanten Unterschiede des Zeitpunkts der Amplitude der maximalen Vasokonstriktion zur Folge.

Zeitkonstante τ

Die Zeitkonstante τ beschreibt den Abfall der Geschwindigkeit, mit der sich eine Arteriole nach dem Erreichen der maximalen Amplitude redilatiert. Abgeleitet von den Gesetzen der potentiellen Energie hat der erhöhte Spannungszustand eines Systems ein erhöhtes Ausdehnungspotential zur Folge. Hierauf basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass auf stärkere Vasokonstriktionen der Arteriolen schnellere Dilatationen folgen und dementsprechend Werte für τ bei jungen Tieren kleiner ausfallen würden als bei alten Tieren. In der Tat fand die Dilatation an den Hirnschnitten junger Tiere im Vergleich schneller statt als an den Hirnschnitten der alten Tiere. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit den oben beschriebenen altersbedingten morphologischen und metabolischen Veränderungen, von denen die hier untersuchten alten Mäuse mutmaßlich betroffen sein könnten. Insbesondere für den verlangsamten Ablauf der Dilatation könnte ein relativer Mangel an Vasodilatoren eine Erklärung sein.

Trotz der Vorauswahl der Daten, für die τ ermittelt wurde, gab es einzelne Ausreißer, die zu einer starken Streuung der Daten führten. Dies war insbesondere bei den beiden Gruppen mit alten Tieren zu beobachten, wodurch die Beurteilung der Bedeutsamkeit der BK-Kanal-Expression für die Zeitkonstante τ erschwert wird.

Da ein Ausfall des BK-Kanals zu verlängerten Depolarisationszeiten führt, wurde hypothetisiert, dass für die Slo1^{-/-}-Mäuse größere τ -Werte ermittelt würden als für die Slo1^{+/-}-Mäuse. Zwischen den beiden Gruppen wurden in Bezug auf die Zeitkonstante τ allerdings keine Unterschiede detektiert. Die BK-Kanal-Expression hatte in diesen Experimenten somit weder auf die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion noch auf die anschließende Dilatation Einfluss. Da jedoch unklar ist, wie viele unterschiedliche Signalwege durch die elektrische Stimulation aktiviert werden, ist ein abschließendes Urteil über die Bedeutung des BK-Kanals für die hier beobachtete biphasische Gefäßreaktion nicht möglich. Eine vergleichbare Gefäßantwort wird zum Beispiel durch die Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) an P_{2X}- und P_{2Y}-Rezeptoren vermittelt. Es gibt Hinweise darauf, dass der BK-Kanal, als einer von mehreren vasodilatativ wirkenden Mediatoren dieses Signalwegs, bedeutend für die Hyperpolarisation und die damit eingehende Vasodilatation ist (Dietrich et al. 2009). Die gleichermaßen bei Slo1^{+/-}- und Slo1^{-/-}-Mäusen stattfindende schnelle Vasokonstriktion mit anschließender langsamer Dilatation deutet jedoch darauf hin, dass auch von der Expression des BK-Kanals unabhängige Signalwege in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Neben bereits genannten Transmittern wie NO und EDHF kommen auch metabolische Produkte wie Adenosin (Lindauer et al. 2010), Prostanoiden und Epoxyeicosatriensäuren (Mishra et al. 2016) infrage. Wahrscheinlich werden durch die hohen extrazellulären K⁺-Konzentrationen auch K_{ir}-Kanäle aktiviert (Attwell et al. 2010), die hyperpolarisierend wirken und somit möglicherweise den BK-Kanal-KO der Slo1^{-/-}-Mäuse kompensieren.

Der Einfluss der Stimulationsstärke auf die Redilatationsgeschwindigkeit konnte in allen untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. Sowohl bei den jungen als auch bei den alten Mäusen ging die Zunahme der Stimulationsstärke über die Dauer des Experiments mit einer Abnahme der Zeitkonstante τ einher. Des Weiteren näherten sich die Mittelwerte der drei untersuchten Gruppen mit zunehmender Stimulationsstärke einander an. Zum einen scheinen größere Stimulationsstärken also mit stärkeren Vasokonstriktionen und schnelleren Redilatationen einherzugehen, zum anderen scheint die Differenz in der Schnelligkeit der Redilatation zwischen jungen und alten Tieren bei höheren Stimulationsstärken weniger stark ausgeprägt zu sein als in den Bereichen schwächerer Stimulationen.

AUC

In Bezug auf die AUC wurden zwischen den untersuchten Gruppen keine Unterschiede detektiert, weder beim Vergleich der jungen und alten Slo1^{+/+}-Mäuse, noch beim Vergleich der alten Slo1^{+/+}- und Slo1^{-/-}-Mäuse. Jedoch hat die AUC als einzelner Parameter deutlich weniger Aussagekraft als die anderen hier untersuchten Parameter. Da die verwendeten Kurven einen Verlauf des arteriellen Gefäßdurchmessers über die Zeit darstellen, fließen in die dazu angestellten Flächenberechnungen sowohl die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion als auch die Zeitkonstante τ ein. Die statistische Auswertung der AUC diente maßgeblich dazu, einen Überblick über die Verhältnisse der Daten zueinander zu erlangen. Statistisch signifikante Unterschiede der AUC zwischen den jungen und alten Tieren, bzw. zwischen den Slo1^{+/+}- und den Slo1^{-/-}-Mäusen wären Hinweise auf hochgradig signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden Gruppen in Bezug auf Amplitude und Zeitkonstante τ gewesen. Für die Identifizierung der Unterschiede zwischen jungen und alten Mäusen in Bezug auf die Amplitude der maximalen Vasokonstriktion sowie auf die Zeitkonstante τ war die AUC jedoch offenbar ein zu grober Untersuchungsparameter, da dieser sich aus mehreren anderen Parametern ergab und hier keinerlei signifikante Unterschiede erkannt wurden.

Auch die Stimulationsstärke nahm keinen signifikanten Einfluss auf die AUC.

Fazit

Die neurovaskuläre Einheit koordiniert die hämodynamische Antwort des zerebralen Gefäßbettes auf eine Änderung der Hirnaktivität über komplexe, einander gegenseitig beeinflussende Prozesse, die zu einer räumlich und zeitlich begrenzten Änderung des zerebralen Blutflusses führen. An diesen Prozessen sind von den großen Arterien bis zu den Kapillaren alle Ebenen des zerebralen Gefäßbaumes beteiligt, weswegen die Untersuchung von einzelnen Abschnitten nicht das gesamte Wirken der neurovaskulären Einheit widerspiegeln kann. In dieser Arbeit wurde anhand von penetrierenden Arteriolen beispielhaft die Weiterleitung eines in Kortexebene VI gegebenen Stimulus in Kortexebene II-III untersucht. Auf dieser Ebene setzen die in dieser Arbeit häufig erwähnten glatten Gefäßmuskelzellen als kontraktilem Apparat die Gefäßantwort auf Signale von Neuronen, Interneuronen, Astrozyten und Endothelzellen um (Iadecola 2017). Bei neuronaler Aktivität wird auf unterschiedlichen Signalwegen die Synthese von Adenosin, NO, Prostaglandinen und Epoxyeicosatriensäuren in Neuronen und Astrozyten gesteigert, während über

interneurone Signalwege Acetylcholin, NA und γ -Aminobuttersäure (*γ -aminobutyric acid*, GABA) ausgeschüttet werden (Iadecola 2004). Über Änderungen des pH-Werts, der O₂- und CO₂-Konzentration werden K_{ATP}-Kanäle aktiviert (Jacob et al. 2016), während Änderungen der extrazellulären K⁺-Konzentrationen und damit einhergehende Änderungen des Membranpotentials zur Aktivierung von K_v-, K_{ir}-, und BK-Kanälen führen (Nelson MT 1995).

Die Änderung des Gefäßdurchmessers einer penetrierenden Arteriole auf ein elektrisches Signal ist demnach nicht auf einen einzelnen Botenstoff, eine einzelne Zellart, nicht einmal auf eine einzelne Ebene des Gefäßbaumes zurückführbar. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird durch die elektrische Stimulation nicht nur ein einzelner Signalweg aktiviert, sondern mehrere, unterschiedlich schnell ablaufende. Aufgrund der typischen biphasischen Dynamik aus einer schnellen vasokonstriktiven und einer langsamen vasodilatativen Komponente ist jedoch davon auszugehen, dass die hier beobachtete Gefäßreaktion maßgeblich vaskulär vermittelt wird und es sich dementsprechend um eine vaskulär vermittelte Gefäßantwort (*vascular conducted response*) handelt.

Die vaskulär vermittelte Gefäßantwort bezeichnet eine von den umliegenden Nerven und dem arteriellen Blutdruck unabhängige Fortleitung von lokalen Stimuli innerhalb weniger Sekunden (Jensen und Holstein-Rathlou 2013). Diese Stimuli können nicht nur entlang von Arteriolen, sondern auch von nachgeschalteten Kapillaren und Venen ausgehend weitergeleitet werden (Collins et al. 1998).

In diesem Fall löst die elektrische Stimulation in Kortexschicht VI schnell einen starken Anstieg der extrazellulären K⁺-Konzentration aus (Holthoff und Witte 1996). Entsprechend der Nernst-Gleichung kommt es dadurch zu einer lokalen Depolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen, die eine Vasokonstriktion und anschließend eine diese überlagernde Hyperpolarisierung und Vasodilatation auslöst (Horiuchi et al. 2002). Die Fortleitung dieser Signale findet über *Gap Junctions* zwischen glatten Gefäßmuskelzellen (Gustafsson und Holstein-Rathlou 1999), aber auch über myoendotheliale *Gap Junctions* zwischen glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen statt (Aydin et al. 1991, Sandow et al. 2003). An diesem Prozess sind mutmaßlich verschiedene K⁺-Kanäle, darunter die Na⁺/K⁺-ATPase (Horiuchi et al. 2002), K_{ir}-Kanäle (Jantzi et al. 2006) und BK-Kanäle (Dietrich et al. 2009) beteiligt. Insbesondere den K_{ir}-Kanälen wurde für die vaskulär vermittelte Gefäßantwort an

zerebralen Gefäßen ein entscheidender Beitrag zuerkannt (Longden et al. 2017). Die indifferenten Ergebnisse zwischen den Mäusen mit und ohne BK-Kanal-KO sind möglicherweise mit dieser Pluralität an Effektoren erklärbar, die das Fehlen eines zugegebenermaßen potenten K^+ -Kanals auszugleichen in der Lage sind. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die zerebrovaskuläre BK-Kanal-Expression mit dem Alter abnimmt, dies wurde bisher jedoch nur für weibliche Tiere nachgewiesen (Reed et al. 2020). Sollte dieser altersbedingte Prozess für beide Geschlechter nachgewiesen werden, wäre die Sinnhaftigkeit eines altersspezifischen vergleichenden BK-Kanal-KO-Modells diskutabel. Um diesen potentiellen Störfaktor zu überprüfen, wäre im Rahmen der hier vorgenommenen Untersuchung eine zusätzliche Testreihe mit jungen $Slo1^{-/-}$ -Mäusen zwingend erforderlich. Jedoch lassen sich weder bei jungen noch bei alten $Slo1^{-/-}$ -Mäusen KO-bedingte Kompensationsmechanismen ausschließen, weswegen auch eine Testreihe mit Tamoxifen-induzierten KO-Mäusen von Vorteil wäre, um die Bedeutung des BK-Kanals für diese Untersuchung zu ermitteln.

Während die Bedeutung des Genotyps für die hier untersuchte vaskulär vermittelte Gefäßantwort nicht abschließend geklärt werden kann, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass diese entscheidend durch das Alter des Versuchstiers beeinflusst wird. Ein erstes Indiz hierfür war die Tatsache, dass viele Daten, die an alten Tieren erhoben wurden, aufgrund zu geringer oder zu spät stattfindender Vasokonstriktion nicht in die Auswertung der Zeitkonstante τ und der AUC miteinbezogen werden konnten. Im Ergebnis fiel die Gefäßreaktion bei den alten Mäusen deutlich schwächer aus und die anschließende Dilatation der Arteriolen erstreckte sich über einen längeren Zeitraum als bei den jungen Mäusen. Insbesondere altersassoziierte Endothelschäden könnten diesen Zusammenhang weitestgehend erklären, da für die vaskulär vermittelte Gefäßantwort ein intaktes Endothel essentiell ist (Horiuchi et al. 2002).

Passend dazu zeigten verschiedene Studien, dass die im Vergleich zu jungen Patienten deutlich schlechtere Erholung neurologischer Funktionen älterer SAB-Patienten unabhängig von der Behandlungsmethode war, sondern vielmehr dem altersbedingt häufig schlechten klinischen Allgemeinzustand zuzuordnen ist (Park et al. 2014, Ido et al. 2020). Da eine neurochirurgische Behandlung mit Ausräumung der Blutung im Vergleich zum endovaskulären Eingriff ohne diese Interventionsmöglichkeit keine niedrigere Inzidenz an Komplikationen wie Vasospasmen zeigte, wurde

hypothetisiert, dass die Entfernung des Blutgerinnsels für ältere SAB-Patienten weniger bedeutend als bisher angenommen sein könnte (Ryttlefors et al. 2008). Die schlechte Erholung der neurologischen Funktionen alter SAB-Patienten ist demnach möglicherweise weniger auf die Entwicklung von Vasospasmen als auf andere Faktoren wie Komorbiditäten zurückzuführen.

Neben den altersbedingten Veränderungen der Gefäße nehmen eine Vielzahl von bereits genannten neuronalen und metabolischen Transmittern möglicherweise Einfluss auf die vaskulär vermittelte Gefäßreaktion (Dietrich et al. 2009). Da dieser Einfluss auch bei vollständiger Aufschlüsselung aller parallel ablaufenden Signaltransduktionen kaum zu eliminieren wäre, sollten bei zukünftigen Untersuchungen dieser Art die Störfaktoren möglichst gering ausfallen. Aus diesem Grund sollten Konzept und Durchführung der Experimente kritisch hinterfragt werden, um gegebenenfalls Änderungen vorzunehmen, wenn ein solches Protokoll weiterhin für dieselbe Fragestellung verwendet werden soll.

5.4 HDPs und Gefäßmorphologie

Während in bisherigen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten lediglich kurzfristige Gefäßreaktionen auf Blutabbauprodukte untersucht wurden, schlug dieses Projekt eine Brücke zur Untersuchung von Langzeiteffekten von HDPs. Eine weitere Besonderheit war die Entfernung vom *in vitro*-Versuch, da hier die Untersuchung fixierter Hirnschnitte mittels CLSM im Vordergrund stand. Schließlich wurde mit diesem Projekt eine bereits veröffentlichte *in vivo*-Studie mit daraus stammenden fixierten Hirnschnittpräparaten weitergeführt und damit die Möglichkeit eröffnet, bereits erhobene Daten neu einzuordnen

5.4.1 Methodik

Wahl der Gefäße

Bei der Untersuchung von Gefäßwanddicke und Durchmesser der APA war besonders auffällig, dass die Interventionsgruppen keine signifikanten Unterschiede untereinander sowie zur Kontrollgruppe aufwiesen (Kapitel 3.4). Im Folgenden soll erläutert werden, warum die APA als Kontrollgefäß für zuvor erhobene Daten diene.

Zum einen stellt die APA eine wichtige versorgende Arterie des Mäusehirns dar, die zudem durch ihre prominente Lage auch im interindividuellen Vergleich gut auffindbar

ist. Ihren Ursprung hat sie in der Arteria carotis interna. Die paarige Arteria cerebri anterior aus den Arteriae caroticae internae fusioniert bei der Maus vor dem Chiasma opticum zu einer Arteria azygos, die beim Menschen nicht vorkommt. Aus dieser geht die APA hervor, die zwischen den Großhirnhemisphären über den dorsalen Anteil des Corpus callosum zieht und die anterior-medialen Anteile des Frontallappens versorgt (Dorr et al. 2007). Dieser Verlauf ist am ehesten mit der beim Menschen bekannten paarigen Arteria pericallosa vergleichbar (Dorr et al. 2007). Durch die intraparenchymale Lage besteht bei einer Hirnblutung bzw. bei einer künstlich induzierten SAB kein direkter Kontakt der HDPs zum Gefäß, was einen weiteren Grund für die Wahl der APA darstellte. Ein Nebeneffekt dieser im Hirn zentral gelegenen Position nahe dem Corpus callosum ist die Tatsache, dass die APA durch Manipulationen infolge von Präparation, Fixierung und Färbung wenig Schäden nimmt und daher meist gut erhalten ist.

Die APA stellte somit eine geeignete Kontrolle für bereits erhobene Vordaten an zwei weiteren wichtigen hirnversorgenden Arterien dar: der paarigen Arteria communicans posterior (PCA) und der Basilararterie (Arteria basilaris, BA). Beide Gefäße verlaufen bei Maus und Mensch ähnlich und sind typische Untersuchungsobjekte nach künstlich induzierter SAB an Ratten (Gules et al. 2002).

Die PCA verbindet die Arteria carotis interna mit der Arteria cerebri posterior. Sie ist Teil des bei Mensch und Maus aus den gleichen Arterien bestehenden Circulus arteriosus Willisii, der als Anastomosesystem eine wichtige anatomische Verbindung des karotidalen und vertebrobasilären Stromgebiets darstellt. Die kurze PCA der Maus liegt ventral-posterior am Großhirn und umrahmt das posteriore Ende des Hypothalamus (Dorr et al. 2007). Die BA entspringt aus den Arteriae vertebrales und fusioniert am ventral-posterioren Ende des Hirnstamms zur mittigen Basilararterie. PCA und BA haben im Gegensatz zur APA also eine extraparenchymale Lage und somit direkten Kontakt zu den nach SAB im Subarachnoidalraum befindlichen Substanzen. Dementsprechend fallen auch die Ergebnisse aus, die hier zur Einordnung der für die APA erhobenen Daten erstmals zusammengefasst präsentiert werden.

Fixierung

Für die Hirnfixierung nach Entnahme kommen prinzipiell zwei verschiedene Methoden infrage: die Nativfixierung und die Fixierung in Formalin bzw. dem hier verwendeten

mit 4 % Paraformaldehyd (PFA). Für die Nativfixierung ist ein schnelles Einfrieren, zum Beispiel mit dem Kontaktkryogen Methylbutan, besonders wichtig, um der Bildung von Eiskristallen vorzubeugen (Fix und Garman 2000). Diese Methode beinhaltet nämlich ein Verbleiben der Wasseranteile im Hirngewebe, was Schrumpfarmefakten und Denaturierungsprozessen, die bei PFA-Fixierung entstehen (Fix und Garman 2000), vorbeugt. Diese Schrumpfarmefakte beeinflussen selbstverständlich den hier untersuchten Gefäßdurchmesser, weswegen die PFA-Fixierung in Bezug auf diesen Parameter nicht die optimale Methode darstellt. Ein Vergleich zwischen den Versuchsgruppen und zwischen den extra- und intraparenchymalen Arterien ist dennoch möglich, da alle Hirne in gleichem Maße dieser Störgröße ausgesetzt waren.

Nativ fixierte Schnitte werden mit einem Kryostat angefertigt, während PFA-fixierte Hirne an Mikrotomen geschnitten werden. Die Qualität der Hirnschnitte hängt allerdings weniger von der Apparatur als vielmehr von der Erfahrung des Schneidenden ab. PFA-fixierte Hirnschnitte können vor dem Aufziehen länger gelagert werden, was in diesem Fall ermöglicht, die Hirnschnitte auch Jahre nach Abschluss der *in vivo*-Studie gezielt anzufärben.

Der Standard für die hier verwendete anti-SMA-Färbung ist die Fixierung mit Formalin bzw. PFA. Die Fixierung in PFA macht eine anschließende immunhistochemische Anfärbung von beiden Seiten des Hirnschnitts möglich, was ein stärkeres Fluoreszenzsignal als bei der Färbung von Nativpräparaten zur Folge hat. Dies ist bei der Darstellung mit CLSM eindeutig von Vorteil, da mit stärkeren Signalen eine bessere Bildqualität und damit die Möglichkeit einer genaueren Auswertung einhergeht. Dem Hersteller der hier verwendeten Antikörper (abcam) zufolge führt eine Fixierung durch Einbettung in Aldehyde, wie hier durchgeführt, häufig zu adäquaten Ergebnissen. Für eine schnellere und einheitlichere Fixierung könne aber auch die Perfusionsfixierung verwendet werden.

Für diese Methodik wird bei gleichbleibendem Blutdruck des anästhesierten Versuchstieres mit einer transthorakalen Kanüle PFA in den linken Ventrikel injiziert (Gules et al. 2002). Das Fixiermittel durchspült den gesamten Blutkreislauf, das Blut wird aus dem rechten Vorhof abgelassen (Yamaguchi-Okada et al. 2005). Anschließend erfolgt die Entnahme des Hirns, das dann in die gleiche Fixierlösung eingebettet wird.

Die Perfusionsfixierung stellt verglichen mit der Immersionsfixierung eine elegante und schnelle, allerdings auch aufwändige und störanfällige Fixiermethode dar. Typische Probleme bei der Ganzkörperperfusion sind unter anderem ein systolischer Blutdruckabfall, wodurch periphere Gefäße kollabieren, und das Austreten von Fixierlösung aus natürlichen oder akzidentell verursachten Körperöffnungen des Versuchstieres durch inkorrekte Einführung der Nadel. Die Konsequenz ist eine unvollständige Perfusion des Gewebes und eine dadurch mangelhafte Fixierung (Fix und Garman 2000).

Die hier verwendete Immersionsfixierung mittels 4% PFA stellt somit eine zuverlässige praktikable Methode für die Fixierung von Hirngewebe sowie eine adäquate Vorbereitung auf die verwendete Färbung dar.

Färbung

Jede Färbemethode hat, abhängig von der Fragestellung, ihre Vor- und Nachteile. Davon ist die hier verwendete immunhistochemische Färbung zur Untersuchung von morphologischen Veränderungen an ganzen Gefäßen nicht ausgeschlossen.

Gefärbt und visualisiert wurden hier die Aktinfasern der zerebralen Gefäße. Die Untersuchung mit CLSM ermöglichte eine Darstellung dieser Fasern in sehr dünnen Schichten. Dadurch waren gezieltere und akkuratere Messungen möglich, als es mit auflichtmikroskopischer Darstellung von kompletten Hirnschnitten über die gesamte Präparatdicke möglich gewesen wäre. Mit dieser Methode wurden nur die Aktinfasern, also die kontraktile Anteile der glatten Gefäßmuskelzellen dargestellt. Nicht dargestellt wurden unter anderem Kollagenanteile und Endothelzellen. Die Auswertung der Positivsignale der anti-SMA-Färbung setzte also den Muskelanteil der zerebralen Gefäße in den Fokus, den Anteil, der beim Vasospasmus pathologisch verlängert kontrahiert. Untersuchungen an humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Tiermodellen zeigten bereits den Einfluss von Blut und HDPs auf Aktin-Expressionsregulation und Zelltransformation (Shimamura und Ohkuma 2014, Ohkuma et al. 2001, Lyons et al. 2004). Einige Studien untersuchten bereits Gefäßdurchmesser und Gefäßwandverdickung von BA und PCA im SAB-Modell (Gules et al. 2002), jedoch nicht den Aktinanteil im Speziellen, sondern alle Gefäßwandanteile zusammen. Der Fokus auf die Aktinfasern soll diesem Forschungsgebiet eine neue Facette hinzufügen, ohne dabei die Betrachtung des gesamten Gefäßes geringzuschätzen.

Die Darstellung der gesamten Tunica media wird in anderen Untersuchungen mit Auflichtmikroskopie nach HE- und van Gieson-Färbung durchgeführt (Ohkuma et al. 2001, Chen et al. 2011). Eine Weiterführung der hier vorgestellten Ergebnisse mit dieser Methodik ist nicht nur möglich, sondern auch durchaus sinnvoll für eine noch vielseitigere Beurteilung der morphologischen Veränderungen zerebraler Gefäße durch HDPs und eine Einordnung in die Reihe der oben erwähnten bisher erhobenen Daten zum Thema.

Zielparameter

In dieser Arbeit wurden zwei Zielparameter untersucht, die bei der Charakterisierung des vaskulären Remodelings nach SAB bereits etabliert sind: die Größe des Lumens und die Dicke der Wand von zerebralen Arterien. Für beide Parameter gibt es verschiedene Untersuchungsansätze.

Die Erhebung der Lumengröße erfolgt in einigen Studien an fixierten Gefäßen durch Messung des Innenumfangs (Gules et al. 2002). Bei manchen wird mit diesem anschließend eine Flächeninhaltsbestimmung (Chen et al. 2011) bzw. eine Durchmesserberechnung (Zhang et al. 2017) mit der allgemeinen Kreisformel durchgeführt. Andere Studien führen *in vivo* zu verschiedenen Zeitpunkten angiografische Lumenmessungen durch (Ohkuma et al. 2001, Yamaguchi-Okada et al. 2005).

Für die Bestimmung der Gefäßwanddicke werden in einigen Studien an (vier) verschiedenen Punkten Messungen der Strecke zwischen Lumen und Mediaaußengrenze (ohne die Adventitia) vorgenommen (Chen et al. 2011, Gules et al. 2002, Zhang et al. 2017). Andere Studien führen Flächeninhaltsberechnungen der gesamten Tunica media durch (Ohkuma et al. 2001).

In diesem Projekt wurde mittels CLSM ausschließlich der Aktinfaseranteil der Arterienwände dargestellt. Daher konnten aus den digital gemessenen Flächeninhalten von Aktinfaseraußengrenze und Lumen sowohl Durchmesser als auch Wanddicke mit der allgemeinen Kreisformel berechnet und zwischen den Versuchsgruppen verglichen werden. Diese Ergebnisse liefern zusätzliche Perspektiven für die Interpretation der unter *in vivo*-Bedingungen erhobenen MRT-Perfusionsdaten.

In vivo-Studie

Die Hirnschnitte, die in diesem Teilprojekt untersucht wurden, stammen von Versuchstieren einer abgeschlossenen Studie von Alexander Jörk, deren Daten zum Teil bereits veröffentlicht wurden (Joerk et al. 2019). Ziel der Studie war es, den längerfristigen Einfluss von HDPs auf die kortikale Durchblutung zu untersuchen.

Dafür wurden Slo1^{+/+} und Slo1^{-/-}-Mäuse einer Mikrooperation unterzogen, die eine SAB simulieren sollte. Abhängig von der Versuchsgruppe bekamen die Tiere jeweils 30 µl Eigenblut, PDPs oder BOXes injiziert. Die Kontrollgruppe wurde einer Scheinoperation ohne Injektion unterzogen. Die Tiere wurden innerhalb der nachfolgenden 14 Tage zu mehreren Zeitpunkten im Kleintier-MRT untersucht. Mittels echo-planarer Bildgebung und Gadolinium-basiertem Kontrastmittel wurde die kortikale Durchblutung visualisiert. Als zu untersuchende Größe wurde die *time to peak* (Zeit bis zum Gipfel) festgelegt, ein funktionaler Perfusionsparameter, der den zeitlichen Unterschied zwischen dem Beginn einer Signalveränderung in zerebralen Arterien und dem maximalen Signalabfall im Kortex beschreibt.

Die *time to peak* vor dem operativen Eingriff wurde jeweils mit der in den darauffolgenden Tagen erhobenen *time to peak* verglichen. In der Gruppe der Slo1^{+/+}-Mäuse, die PDPs injiziert bekommen hatten, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikantes zeitlich verzögertes Perfusionsdefizit, das an Tag sieben nach Injektion am stärksten ausgeprägt und danach rückläufig war. Bei den Slo1^{-/-}-Mäusen zeigte sich dieser Effekt nach PDP-Injektion nicht. Auch der Injektion von Eigenblut bzw. BOXes folgte kein solcher Effekt in den darauffolgenden Tagen. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass PDPs *in vivo* einen langfristigen globalen Einfluss auf die Hirndurchblutung haben und dass der BK-Kanal diesen Einfluss mediiert.

Die Mäuse wurden nach Abschluss der Studie getötet, ihre Hirne wie oben beschrieben fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Bei fünf Mäusen erfolgte die Tötung bereits an Tag sieben nach PDP-Injektion, wodurch sich insgesamt fünf Interventionsgruppen und eine Kontrollgruppe für die Untersuchung von Gefäßwanddicke und Gefäßdurchmesser ergaben.

5.4.2 Ergebnisse

Um die Untersuchungsergebnisse der APA im Kontext der Vordaten zur BA und PCA diskutieren zu können, werden diese zunächst präsentiert.

Vordaten zu Basilararterie und Arteria communicans posterior

Wie für die APA wurden auch für die BA und die PCA die Parameter Gefäßwanddicke (Abb. 26 und 27) und Innendurchmesser (Abb. 28 und 29) in einer Kontrollgruppe und fünf Behandlungsgruppen erhoben.

Bezogen auf die Gefäßwanddicke wurden für beide extraparenchymalen Arterien signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (BA: $5,3 \pm 0,46 \mu\text{m}$; $n = 19$; PCA: $7,4 \pm 1,19 \mu\text{m}$; $n = 42$) und der BOX-Gruppe (BA: $7,7 \pm 1,43 \mu\text{m}$; $n = 21$; PCA: $10,6 \pm 1,93 \mu\text{m}$; $n = 33$) gemessen (BA: $p < 0,01$; PCA: $p < 0,001$). Auch die Eigenblutgruppe (BA: $6,1 \pm 0,38 \mu\text{m}$; $n = 20$; PCA: $10,1 \pm 1,99 \mu\text{m}$; $n = 42$) unterschied sich bei beiden Gefäßen signifikant von der Kontrolle (BA: $p < 0,05$; PCA: $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der PDP 7d-Gruppe (BA: $6,1 \pm 1,15 \mu\text{m}$; $n = 12$; PCA: $6,3 \pm 1,87 \mu\text{m}$; $n = 21$) und der Kontrolle (BA: $p = 0,20$; PCA: $p = 0,18$), der PDP 14d-Gruppe (BA: $7,1 \pm 1,82 \mu\text{m}$; $n = 18$; PCA: $7,8 \pm 1,84 \mu\text{m}$; $n = 49$) und der Kontrolle (BA: $p = 0,07$; PCA: $p = 0,50$) und der PDP KO-Gruppe (BA: $6,4 \pm 1,47 \mu\text{m}$; $n = 17$; PCA: $8,3 \pm 0,99 \mu\text{m}$; $n = 32$) und der Kontrolle (BA: $p = 0,15$; PCA: $p = 0,13$). Sowohl der Vergleich zwischen den Gruppen PDP 7d und PDP 14d (BA: $p = 0,37$; PCA: $p = 0,12$) als auch zwischen den Gruppen PDP 14d und PDP KO (BA: $p = 0,56$; PCA: $p = 0,61$) fiel nicht signifikant aus.

Als einzige der drei untersuchten Arterien ist die PCA paarig angelegt. Der Seitenvergleich der PCA (r: $n = 113$; l: $n = 106$) zeigte keine signifikanten Unterschiede, weder in der Kontrollgruppe ($p = 0,12$), noch in der Eigenblutgruppe ($p = 0,90$), der PDP 7d-Gruppe ($p = 0,53$), der PDP 14d-Gruppe ($p = 0,97$), der PDP KO-Gruppe ($p = 0,63$) und der BOX-Gruppe ($p = 0,76$).

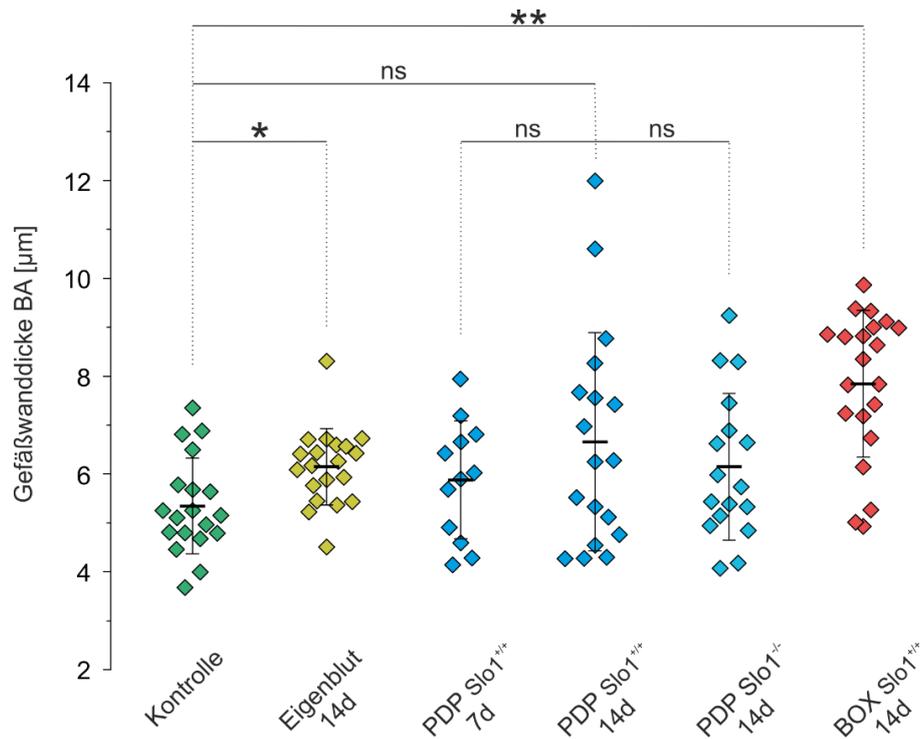


Abb. 26: Punktauftragung der absoluten Gefäßwanddicke der Basilararterie (BA) im Vergleich zwischen Kontrolle (grün), Eigenblut (gelb), PDP-Gruppe (jeweils blau) nach sieben Tagen (7 d) und 14 Tagen (14 d), PDP KO-Gruppe (hellblau) und BOX-Gruppe (rot).

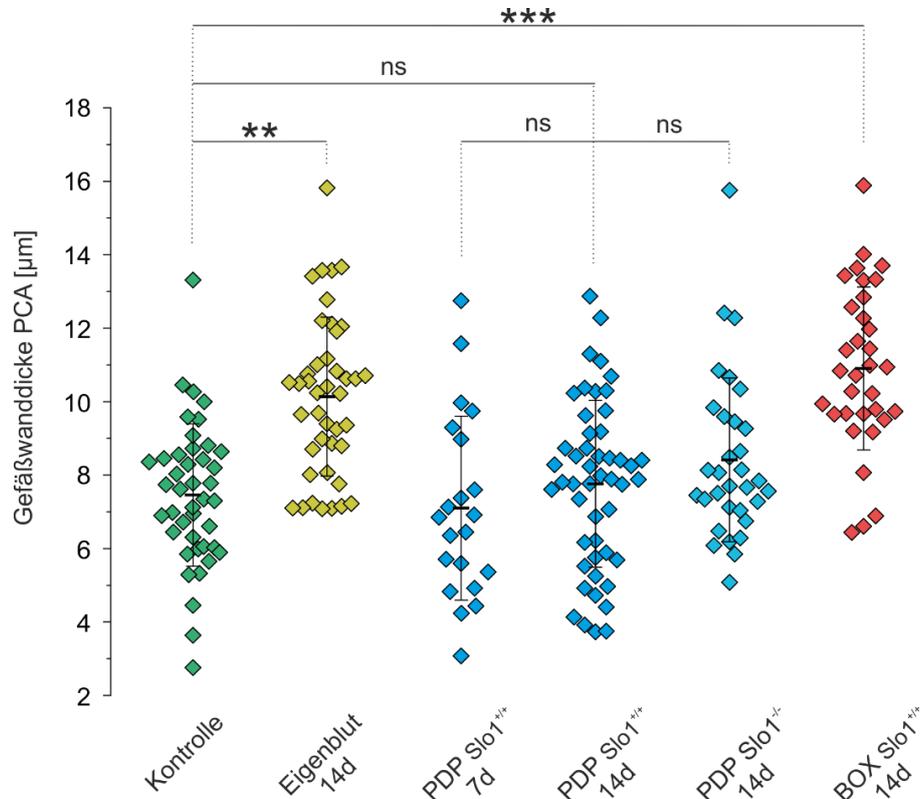


Abb. 27: Punktauftragung der absoluten Gefäßwanddicke der Arteria communicans posterior (PCA) im Vergleich zwischen Kontrolle (grün), Eigenblut (gelb), PDP-Gruppe (jeweils blau)

nach sieben Tagen (7 d) und 14 Tagen (14 d), PDP KO-Gruppe (hellblau) und BOX-Gruppe (rot).

Der Durchmesser der BA unterschied sich in den Interventionsgruppen (Eigenblut: $152 \pm 26,6 \mu\text{m}$ $p = 0,08$; PDP 7d: $104 \pm 14,3 \mu\text{m}$ $p = 0,58$; PDP 14d: $147 \pm 28,2 \mu\text{m}$ $p = 0,16$; PDP KO: $109 \pm 22,9 \mu\text{m}$ $p = 0,80$; BOX: $107 \pm 22,6 \mu\text{m}$ $p = 0,69$) nicht von der Kontrollgruppe ($114 \pm 33,0 \mu\text{m}$). Allerdings waren die Gefäße der PDP 7d-Gruppe signifikant enger als die der PDP 14d-Gruppe ($p < 0,05$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der PDP 14d-Gruppe und der PDP KO-Gruppe ($p = 0,08$).

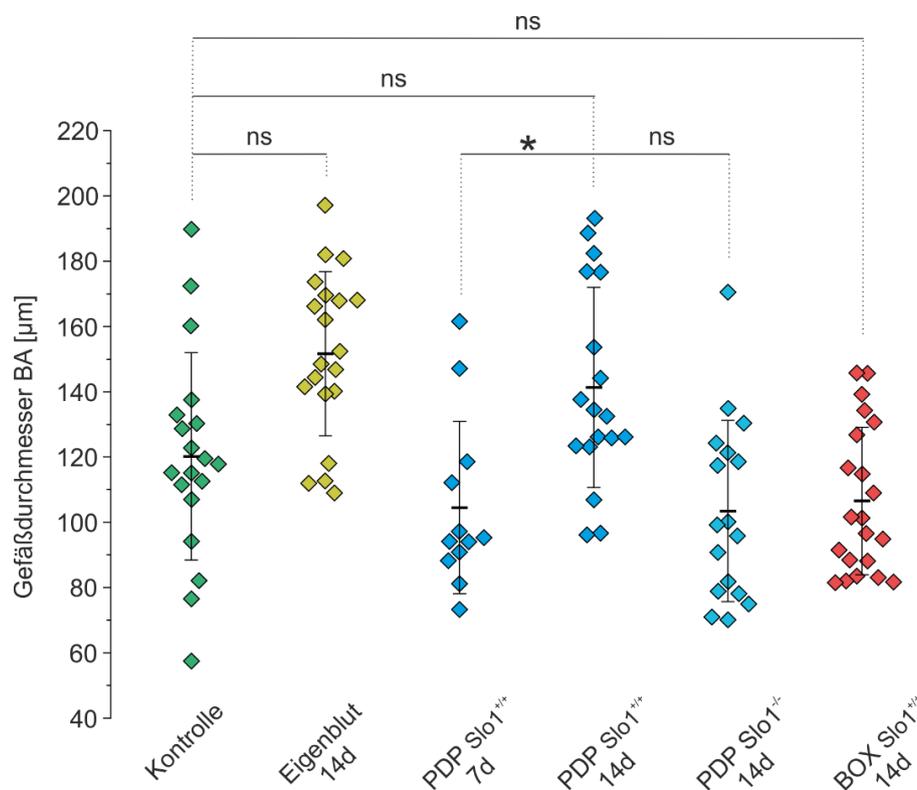


Abb. 28: Punktauftragung des Gefäßdurchmessers der Basilararterie (BA) im Vergleich zwischen Kontrolle (grün), Eigenblut (gelb), PDP-Gruppe (jeweils blau) nach sieben Tagen (7 d) und 14 Tagen (14 d), PDP KO-Gruppe (hellblau) und BOX-Gruppe (rot).

Zwischen den Gruppen der PCA gab es stärkere Unterschiede. Die Kontrollgruppe ($95 \pm 12,1 \mu\text{m}$) unterschied sich signifikant von der Eigenblutgruppe ($72 \pm 7,8 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Sie unterschied sich signifikant von der PDP 7d-Gruppe ($43 \pm 23,8 \mu\text{m}$; $p < 0,001$), der PDP 14d-Gruppe ($75 \pm 7,3 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) und von der BOX-Gruppe ($78 \pm 10,5 \mu\text{m}$; $p < 0,01$). Die PDP 7d-Gruppe hatte einen signifikant kleineren mittleren Durchmesser als die PDP 14d-Gruppe ($p < 0,001$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der PDP 14d-Gruppe und der PDP KO-Gruppe

($p = 0,86$). Im Seitenvergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Daten, weder in der Kontrollgruppe ($p = 0,32$), noch in der Eigenblutgruppe ($p = 0,38$), der PDP 7d-Gruppe ($p = 0,89$), der PDP 14d-Gruppe ($p = 0,60$), der PDP KO-Gruppe ($p = 0,10$) und der BOX-Gruppe ($p = 0,45$).

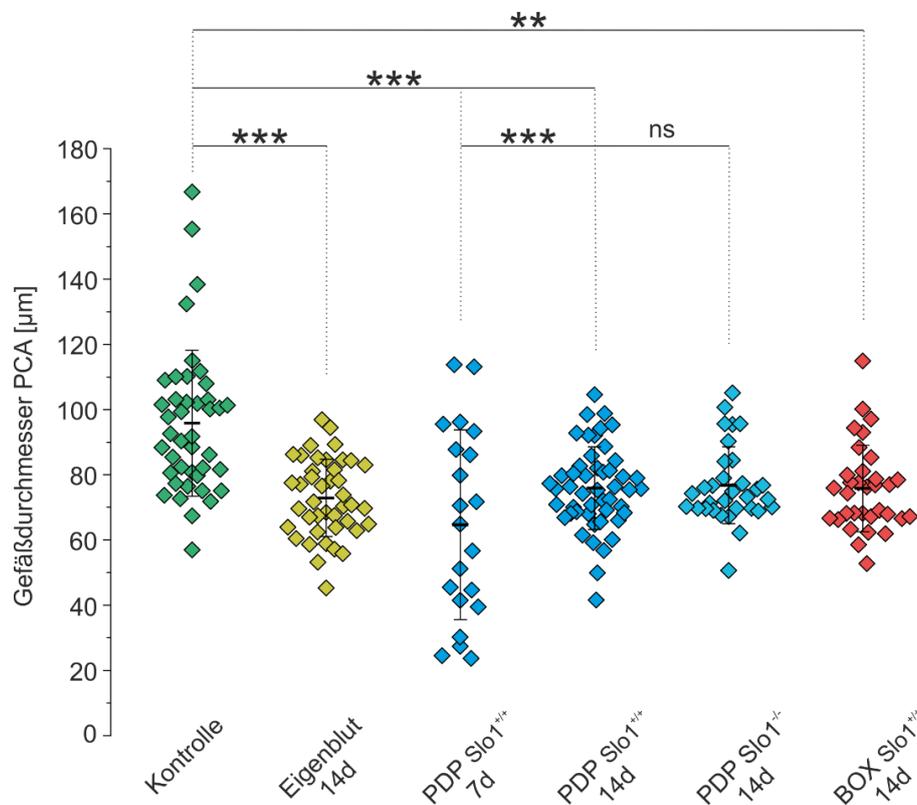


Abb. 29: Punktauftragung des Gefäßdurchmessers der Arteria communicans posterior (PCA) im Vergleich zwischen Kontrolle (grün), Eigenblut (gelb), PDP-Gruppe (jeweils blau) nach sieben Tagen (7 d) und 14 Tagen (14 d), PDP KO-Gruppe (hellblau) und BOX-Gruppe (rot).

Zunächst fällt auf, dass es, unabhängig vom untersuchten Parameter, mehr signifikante Unterschiede bei der BA und der PCA als bei der APA gibt. Die extraparenchymale Lage der ersten beiden und die intraparenchymale Lage der letzteren stellen für diesen auffällenden Unterschied den offensichtlichsten Grund dar und bestätigen die Hypothese, dass die APA für die in den extraparenchymalen Gefäßen beobachteten Veränderungen eine geeignete Kontrolle darstellt.

Gefäßwanddicke

Unter den Ergebnissen zur Gefäßwanddicke der BA und PCA heben sich die Eigenblutgruppe und die BOX-Gruppe deutlich hervor. In diesen Gruppen traten Gefäßwandverdickungen auf, die sich signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden. Dass BOXes morphologische Veränderungen in glatten Gefäßmuskelzellen auslösen, die daraufhin Stressfasern ausbilden, anschwellen und dadurch ihre Spindelform verlieren, zeigten Lyons et al. bereits 2004. Das Ergebnis überrascht dennoch vor dem Hintergrund der *in vivo*-Studie, in der BOXes nach 14 Tagen keine signifikanten Perfusionsdefizite auslösten (unveröffentlichte Daten). Die hier gezeigte Verdickung der Gefäßwand hatte bei den MRT-Untersuchungen also keinen durchblutungsmindernden Effekt. Rapoport fasste 2018 die Mechanismen der BOXes-induzierten Vasokonstriktion zusammen und hob deren lipophile Eigenschaften besonders hervor. Aufgrund dieser würden BOXes die Zellmembran passieren, in diese integriert werden und durch eine verzögerte Elimination über längere Zeit die BK-Kanäle hemmen. Der oxidative Abbau der BOXes würde durch deren Position in der Zellmembran außerdem langsamer ablaufen, was zu einer länger anhaltenden Vasokonstriktion führe (Rapoport 2018). Es erscheint plausibel, davon auszugehen, dass auch die von Lyons et al. beschriebenen morphologischen Veränderungen durch eine längere Verweildauer der BOXes in der glatten Gefäßmuskulatur stärker ausfallen als bei den hydrophileren PDPs.

Auch die Behandlung mit Eigenblut führte bei BA und PCA zu signifikanten Gefäßwandverdickungen, während dieser Effekt in den PDP-Gruppen nicht zu beobachten war. Wandverdickungen der BA innerhalb des gleichen zeitlichen Rahmens beobachteten auch Ohkuma et al. 2001 nach künstlich induzierter SAB an Hunden. Die dort beobachtete Verdickung begann am Tag zwei bis vier und erreichte ihr Maximum am Tag sieben und 14 nach SAB. Möglicherweise wurde zu Lebzeiten der Mäuse innerhalb der 14 Tage nach Injektion ein ausreichend großer Anteil Eigenblut zu BOXes metabolisiert, um ähnlich starke Effekte auf die Gefäßwandmorphologie zu entfalten. Andernfalls fallen beim Abbau von Häm verschiedenste vasoaktive Substanzen an, die möglicherweise ebenfalls Einfluss auf die Gefäßwandmorphologie nehmen.

Unerwartete Ergebnisse waren in den PDP-Gruppen zu verzeichnen. Während in der *in vivo*-Studie die größten Effekte in diesen Gruppen auftraten, hatte die PDP-Injektion keine signifikanten Veränderungen der Gefäßwanddicke zur Folge. Das *in vivo*

gezeigte Perfusionsdefizit scheint weniger durch eine Gefäßwandverdickung als vielmehr durch eine anhaltende Vasokonstriktion zustande zu kommen. Zu dieser Annahme passt auch, dass die BOXes-Injektion zwar eine Gefäßwandverdickung, aber an der BA keine Vasokonstriktion auslöste und *in vivo* kein Perfusionsdefizit zur Folge hatte. Zudem wurde bei der Auswertung der Gefäßdurchmesser deutlich, dass die PDP-Injektion erheblichen Einfluss auf diesen Parameter nimmt. Morphologische Veränderungen wie durch die BOXes scheinen durch PDPs allerdings nicht ausgelöst zu werden.

Im Gegensatz zu den beiden extraparenchymalen Gefäßen wurden an der APA keine Gefäßwandverdickungen nach Eigenblut- oder BOXes-Injektion nachgewiesen. Für diese morphologischen Veränderungen scheint der direkte Kontakt zum Gefäß eine notwendige Bedingung zu sein. Gerade deshalb scheint es paradox, dass ausgerechnet an der APA signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten, die sich an den extraparenchymalen Gefäßen nicht von der Kontrollgruppe unterschieden. Dass sich die Gruppe mit siebentägiger PDP-Exposition signifikant von der Gruppe mit 14tägiger PDP-Exposition unterscheidet, ist ein Ergebnis, das sämtlichen im Voraus getroffenen Annahmen widerspricht und im krassen Gegensatz zu allen hier getroffenen Schlussfolgerungen steht.

Gefäßdurchmesser

Bei der Auswertung der Gefäßdurchmesserdaten war auffallend, dass die beiden extraparenchymalen Gefäße sich in Bezug auf fast alle Interventionsgruppen unterschieden. An der BA löste keine Intervention eine signifikante Änderung des Gefäßdurchmessers aus. An dieser größten untersuchten Arterie wurde lediglich die oben beschriebene Gefäßwandverdickung nachgewiesen. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Gefäßdurchmesser der PCA in allen Interventionsgruppen signifikant von der Kontrollgruppe.

Gleichzeitig ist aufgrund der Ergebnisse, die im vorherigen Kapitel diskutiert wurden, nicht davon auszugehen, dass Blut und HDPs grundsätzlich unterschiedlich auf BA und PCA wirken. Gemeinsamkeiten der beiden extraparenchymalen Gefäße werden bei Betrachtung der PDP-Gruppen deutlich: An beiden Gefäßen löste die siebentägige PDP-Exposition eine signifikant stärkere Verengung des Gefäßdurchmessers aus als die 14tägige. An keinem der beiden Gefäße bestand ein signifikanter Unterschied der PDP 14d- und der PDP KO-Gruppe.

Die Injektion von PDPs scheint innerhalb von zwei Wochen eine biphasische Gefäßdurchmesseränderung zur Folge zu haben, die sich durch eine kontinuierliche Vasokonstriktion innerhalb der ersten sieben Tage auszeichnet, welche innerhalb der darauffolgenden sieben Tage rückläufig ist. Für diese Schlussfolgerung würden auch die MRT-Daten sprechen, die für die Tage drei/vier und sieben nach Injektion stärkere Perfusionsdefizite verzeichneten als nach 14 Tagen (Joerk et al. 2019). Auch beim Vergleich mit den 2001 von Ohkuma et al. vorgestellten Daten fällt auf, dass die dort gezeigte Vasokonstriktion der BA nach künstlich induzierter SAB bis Tag 14 fast vollständig rückläufig war (Ohkuma et al. 2001). In diversen Veröffentlichungen wurden die Untersuchungen auf die erste Woche nach induzierter SAB beschränkt, innerhalb welcher deutliche Verengungen des BA-Durchmessers zu erkennen waren (Chen et al. 2011, Chen et al. 2016). Eine Untersuchung der Datenpunkte an den Tagen vier und sieben nach SAB würde möglicherweise andere Ergebnisse liefern. Andererseits ließe sich diese Rückläufigkeit auch durch die chemischen Eigenschaften der PDPs erklären. Der im Vergleich zu den BOXes hydrophilere Charakter der PDPs führt möglicherweise zu einer schnelleren „Auswaschung“ aus dem Hirngewebe, zumal insgesamt weniger Diffusion in die tiefen Gefäßstrukturen als bei den BOXes stattfindet. In diesem Fall wäre zwei Wochen nach Injektion eine deutlich geringere Konzentration an PDPs im Subarachnoidalraum zu finden. Eine umfangreiche Studie, in der in regelmäßigen Abständen Liquorproben von SAB-Patienten entnommen und die Konzentrationen der HDPs darin gemessen werden sollen, ist bereits in Planung und wird zu dieser Thematik sicherlich einen entscheidenden Beitrag leisten.

Für den angenommenen kontinuierlich vasokonstriktiven Effekt der PDPs scheint die Expression des BK-Kanals unerheblich zu sein, da die Gefäße der KO-Gruppen nicht abweichend zu denen der WT-Gruppen reagierten. Da die PDP-Exposition über 14 d an der BA weder bei Slo1^{+/+}-Mäusen, noch bei Slo1^{-/-}-Mäusen eine Gefäßdurchmesseränderung auslöste und an der PCA beider Mauslinien signifikante Gefäßdurchmesseränderungen auftraten, spielt der genetische Hintergrund für die Induktion dieser morphologischen Veränderungen offenbar keine Rolle.

Unklar bleibt, warum die BA und die PCA in Bezug auf die Durchmesseränderung so unterschiedlich reagierten, aber gleichermaßen die Wandverdickungen nach Eigenblut- und BOXes-Exposition aufwiesen. Gules et al. hypothetisierten, dass sich aufgrund der Lage mehr Blut um die PCA als um die BA sammeln und aus diesem

Grund dort eine stärkere Vasokonstriktion stattfinden würde (Gules et al. 2002). Andere Studien untersuchten nur die BA und detektierten deutliche Vasokonstriktionen (s.o.). Da innerhalb dieses Projektes alle Daten an den gleichen Tieren erhoben wurden, wirkt es unwahrscheinlich, dass diese beiden, als Einheit betrachteten Gefäße sich in Bezug auf einen Parameter gleichen und in Bezug auf den anderen gegensätzlich reagieren. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass dieser Unterschied zu nicht unerheblichen Teilen daraus resultiert, dass für die paarige PCA fast doppelt so viele Stichproben pro Gruppe erhoben wurden, wie für die BA. Mit steigender Anzahl an Datenpunkten nimmt der Einfluss einzelner Ausreißer ab und die Wahrscheinlichkeit für statistisch signifikante Unterschiede zu. Um in Bezug auf die Vergleichbarkeit von BA und PCA sichere Aussagen zu treffen, wären weitere Untersuchungen zur Aufstockung der BA-Datenpunkte von Nöten.

Aus den an der PCA erhobenen Daten wird in Anlehnung an die Ergebnisse der *in vivo*-Studie geschlossen, dass HDPs an extraparenchymalen Gefäßen eine Gefäßwandverengung auslösen. Dabei ist der Effekt der PDPs innerhalb der ersten Woche stärker als nach 14 d und wird nicht durch einen KO von BK-Kanälen modifiziert. BOXes bewirken morphologische Veränderungen an den glatten Gefäßmuskelzellen, die eine mindestens 14 d anhaltende Verdickung der Wände von extraparenchymalen Gefäßen zur Folge haben.

Die Untersuchung der APA ergab keine signifikanten Unterschiede in den Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die APA scheint demnach als Kontrollgefäß für HDP-induzierte Veränderungen von Durchmesser und Wanddicke extraparenchymaler Gefäßen geeignet zu sein.

Da *in vitro* eine kombinierte Applikation beider HDP-Klassen keinen additiven vasokonstriktiven Effekt zeigte (Schaeffgen 2020), sondern vielmehr PDPs akut stärker vasokonstriktiv wirken als BOXes (Joerk et al. 2019), ist es durchaus vorstellbar, dass die beiden Substanzklassen auch langfristig unterschiedliche Effekte auf zerebrale Gefäße haben. Interessant wäre eine Expansion der *in vivo*-Studie mit Aufnahme weiterer Untersuchungszeitpunkte, an den Tagen drei und 28 nach Injektion. Eine Untersuchung dieser Zeitpunkte *in vivo* und *post mortem* mittels CLSM könnte von Nutzen sein, um die Umbau- und Konstriktionsprozesse noch besser nachzuvollziehen.

Die Übertragung dieser Versuche auf das Rattenmodell wäre ein nächster Schritt, um einen besseren Vergleich zum Menschen ziehen zu können. Das wiederum könnte eine Beurteilung erlauben, ob das Zusammenspiel von akutem vasokonstriktivem und langfristig gefäßwandverdickendem und vasokonstriktivem Effekt die Vasospasmusentstehung bei SAB-Patienten begünstigt. Anschließend sollte man die Frage stellen, welcher dieser Effekte wichtiger für die Entstehung der DCI und des daraus folgenden DIND ist und daher den besten potentiellen Angriffspunkt für prophylaktische Maßnahmen bietet.

6 Schlussfolgerungen

Ziel der Promotionsarbeit war es, über die Untersuchung der Wirkweise von HDPs am BK-Kanal therapeutischen Ansätzen zur Prävention des zerebralen Vasospasmus näher zu kommen. Dazu wurden verschiedene Abschnitte des zerebralen Gefäßbaumes einbezogen, neben dem BK-Kanal auch weitere wichtige Akteure der neurovaskulären Einheit studiert und nicht nur der akute Effekt, sondern auch die längerfristige Wirkung von HDPs untersucht.

Die Testung von Fasudil, BaCl₂ und ML133 zeigte, dass der Rho-Kinase-Inhibitor die PDP A-induzierte Vasokonstriktion attenuierte, K_{ir}-Kanäle in den Versuchen allerdings nicht aktiviert wurden und ihre Hemmung daher mit der hier angewandten Methodik nicht untersucht werden konnte.

In den Experimenten mit SM-BK-Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KO- und Kontrollgruppe. Allerdings löste PDP A auch an Arteriolen der WT-Mäuse dieses Stammes keine Vasokonstriktion aus. Diese Daten lassen keine Schlussfolgerung darüber zu, wie entscheidend der BK-Kanal glatter Gefäßmuskelzellen an der PDP A-induzierten Vasokonstriktion beteiligt ist. Sie weisen aber darauf hin, dass bisher außer Acht gelassene genetische bzw. epigenetische Faktoren bei der Untersuchung verschiedener Mausstämme eine wichtige Rolle spielen könnten.

Durch die elektrische Stimulation an Hirnschnitten junger und alter Mäuse wurde das Alter als Einflussgröße der vaskulär vermittelten Gefäßantwort identifiziert. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der weiterführenden Altersforschung in Bezug auf die SAB, insbesondere in Zeiten des demographischen Wandels. Die Expression des BK-Kanals hatte hingegen keine Auswirkungen auf die Reaktivität der Arteriolen, weswegen vorerst davon ausgegangen werden muss, dass in diesem Zusammenhang andere Signalwege von größerer Bedeutung sind. Eine Versuchsreihe mit konditionalem BK-Kanal-KO wäre jedoch unabdingbar, um diesen Sachverhalt abschließend zu klären. Die Anwendung des neu entworfenen Stimulationsprotokolls offenbarte in der Auswertung der Parameter zur Charakterisierung der Funktion der neurovaskulären Einheit einige Schwächen, die neue Überlegungen zur Verbesserung des Versuchsprotokolls anstießen.

Die Untersuchung fixierter Hirnschnitte und der Vergleich von extraparenchymalen mit intraparenchymalen Arterien zeigte, dass Blut und seine Abbauprodukte bei direktem

Kontakt zum Gefäß einen langfristig gefäßwandverdickenden bzw. vasokonstriktiven Effekt haben. BOXes scheinen dabei verzögert und über längere Zeit anhaltend sowohl die Wanddicke als auch den Durchmesser der Gefäße zu beeinflussen, während PDPs keine Gefäßwandverdickung, sondern eine kontinuierliche Konstriktion auslösen, die eine Woche nach Injektion rückläufig wird. In Bezug auf diese morphologischen Veränderungen an extraparenchymalen Gefäßen sind intraparenchymale Arterien wie die APA als Kontrolle geeignet.

Auch wenn viele der zu Beginn gestellten Fragen im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht ausreichend beantwortet werden konnten, haben doch die daraus neu entstandenen Fragen hoffentlich das Potential, die Vasospasmusforschung weiter voranzutreiben. Diese Arbeit deutet an, wie wichtig interdisziplinäre Forschung im Bereich der Vasospasmuspathogenese ist: Insbesondere mit der Molekulargenetik und der Geriatrie bestehen hier Kooperationsansätze. Die HDPs sind in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung für akute und längerfristige Veränderungen des zerebrovaskulären Systems.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- 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.
- Aydin F, Rosenblum WI, Povlishock JT. 1991. Myoendothelial junctions in human brain arterioles. *Stroke*, 22 (12):1592-1597.
- Balbi M, Vega MJ, Loubopoulos A, Terpolilli NA, Plesnila N. 2019. Long-term impairment of neurovascular coupling following experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*:271678X19863021.
- Boulouis G, Labeyrie MA, Raymond J, Rodriguez-Regent C, Lukaszewicz AC, Bresson D, Ben Hassen W, Trystram D, Meder JF, Oppenheim C, Naggara O. 2017. Treatment of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol*, 27 (8):3333-3342.
- Brown RJ, Kumar A, Dhar R, Sampson TR, Diringner MN. 2013. The relationship between delayed infarcts and angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 72 (5):702-707; discussion 707-708.
- Butler A TS, McCobb DP, Wei A, Salkoff L. 1993. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science*, 261(5118):221-4.
- Cai W, Zhang K, Li P, Zhu L, Xu J, Yang B, Hu X, Lu Z, Chen J. 2017. Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res Rev*, 34:77-87.
- Chaichana KL, Pradilla G, Huang J, Tamargo RJ. 2010. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg*, 73 (1):22-41.
- 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.
- Chauveau D, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Macnicol A, Gonzalo A, Grunfeld JP. 1994. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 45 (4):1140-1146.
- 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 after a subarachnoid hemorrhage in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 337 (3):663-672.
- Chen Y, Zhu Y, Zhang Y, Zhang Z, Lian J, Luo F, Deng X, Wong KK. 2016. Ultrasound guided double injection of blood into cisterna magna: a rabbit model for treatment of cerebral vasospasm. *Biomed Eng Online*, 15:19.
- Chrissobolis S, Sobey CG. 2006. Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke*, 37 (8):2174-2180.
- Chrissobolis S ZJ, Chu Y, Faraci FM, Sobey CG. 2000. Role of inwardly rectifying K(+) channels in K(+)-induced cerebral vasodilatation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(6):H2704-12.
- 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.
- Collins DM, McCullough WT, Ellsworth ML. 1998. Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. *Microvasc Res*, 56 (1):43-53.
- 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.
- Dawes M, Sieniawska C, Delves T, Dwivedi R, Chowienczyk PJ, Ritter JM. 2002. Barium reduces resting blood flow and inhibits potassium-induced vasodilation in the human forearm. *Circulation*, 105 (11):1323-1328.
- 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.
- Dietrich HH, Horiuchi T, Xiang C, Hongo K, Falck JR, Dacey RG, Jr. 2009. Mechanism of ATP-induced local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral penetrating arterioles. *J Vasc Res*, 46 (3):253-264.
- Dolan J, Walshe K, Alsbury S, Hokamp K, O'Keeffe S, Okafuji T, Miller SF, Tear G, Mitchell KJ. 2007. The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. *BMC Genomics*, 8:320.
- 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.

- Eagles ME, Tso MK, Macdonald RL. 2019. Cognitive Impairment, Functional Outcome, and Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.*
- Eddleman CS, Hurley MC, Naidech AM, Batjer HH, Bendok BR. 2009. Endovascular options in the treatment of delayed ischemic neurological deficits due to cerebral vasospasm. *Neurosurg Focus*, 26 (3):E6.
- Edwards A TG. 1969. Ehlers-Danlos syndrome with vertebral artery aneurysm. *Proc R Soc Med*, 62 (7):734-735.
- Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. 2002. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation*, 105 (15):1756-1759.
- Faraci FM, Heistad DD. 1998. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78 (1):53-97.
- Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Anderson CS. 2003. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *The Lancet Neurology*, 2 (1):43-53.
- Feigin VL, Rinkel GJ, Lawes CM, Algra A, Bennett DA, van Gijn J, Anderson CS. 2005. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies. *Stroke*, 36 (12):2773-2780.
- 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.
- Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. 1980. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery*, 6 (1):1-9.
- Fix AS, Garman RH. 2000. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system. *Toxicol Pathol*, 28 (1):122-131.
- Ford NC, Baccei ML. 2016. Inward-rectifying K(+) (Kir2) leak conductance dampens the excitability of lamina I projection neurons in the neonatal rat. *Neuroscience*, 339:502-510.
- Friedrich B, Muller F, Feiler S, Scholler K, Plesnila N. 2012. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and

- microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32 (3):447-455.
- Frontera JA, Fernandez A, Schmidt JM, Claassen J, Wartenberg KE, Badjatia N, Connolly ES, Mayer SA. 2009. Defining vasospasm after subarachnoid hemorrhage: what is the most clinically relevant definition? *Stroke*, 40 (6):1963-1968.
- Fujii M, Yan J, Rolland WB, Soejima Y, Caner B, Zhang JH. 2013. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res*, 4 (4):432-446.
- Fumoto T, Naraoka M, Katagai T, Li Y, Shimamura N, Ohkuma H. 2019. The Role of Oxidative Stress in Microvascular Disturbances after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res*, 10 (6):684-694.
- Geraghty JR, Testai FD. 2017. Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: Beyond Vasospasm and Towards a Multifactorial Pathophysiology. *Curr Atheroscler Rep*, 19 (12):50.
- Geraghty JR, Davis JL, Testai FD. 2019. Neuroinflammation and Microvascular Dysfunction After Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Emerging Components of Early Brain Injury Related to Outcome. *Neurocrit Care*, 31 (2):373-389.
- Girouard H, Iadecola C. 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* (1985), 100 (1):328-335.
- 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.
- Gonzalez-Perez V, Xia XM, Lingle CJ. 2014. Functional regulation of BK potassium channels by gamma1 auxiliary subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (13):4868-4873.
- Gonzalez-Perez V, Ben Johny M, Xia XM, Lingle CJ. 2018. Regulatory gamma1 subunits defy symmetry in functional modulation of BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (40):9923-9928.
- Gonzalez-Perez V, Lingle CJ. 2019. Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits. *Annu Rev Physiol*, 81:113-137.

- 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.
- Gustafsson F, Holstein-Rathlou N. 1999. Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance. *Acta Physiol Scand*, 167 (1):11-21.
- Holthoff K, Witte OW. 1996. Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci*, 16 (8):2740-2749.
- Holthoff K, Dodt HU, Witte OW. 1994. Changes in intrinsic optical signal of rat neocortical slices following afferent stimulation. *Neurosci Lett*, 180 (2):227-230.
- Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, Tsukahara T, Ogawa H, Torner J. 1988. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke*, 19 (7):892-897.
- Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Dacey RG, Jr. 2002. Mechanism of extracellular K⁺-induced local and conducted responses in cerebral penetrating arterioles. *Stroke*, 33 (11):2692-2699.
- 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.
- Iadecola C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 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.
- Ido K, Kurogi R, Kurogi A, Nishimura K, Arimura K, Nishimura A, Ren N, Kada A, Matsuo R, Onozuka D, Hagihara A, Takagishi S, Yamagami K, Takegami M, Nohara Y, Nakashima N, Kamouchi M, Date I, Kitazono T, Iihara K, Collaborators JAS. 2020. Effect of treatment modality and cerebral vasospasm agent on patient outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage in the elderly aged 75 years and older. *PLoS One*, 15 (4):e0230953.
- Jacob M, Chappell D, Becker BF. 2016. Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation. *Crit Care*, 20 (1):319.
- Jantzi MC, Brett SE, Jackson WF, Corteling R, Vigmond EJ, Welsh DG. 2006. Inward rectifying potassium channels facilitate cell-to-cell communication in hamster

- retractor muscle feed arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291 (3):H1319-1328.
- Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH. 2013. The vascular conducted response in cerebral blood flow regulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33 (5):649-656.
- Jiang YX, Lee A, Chen JY, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417 (6888):515-522.
- Jin L, Ying Z, Webb RC. 2004. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287 (4):H1495-1500.
- 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. Propentdyopents 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.
- Johnson CH, VanTassell VJ. 1991. Acute barium poisoning with respiratory failure and rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med*, 20 (10):1138-1142.
- Kim DH, Gutierrez-Aguilar R, Kim HJ, Woods SC, Seeley RJ. 2013. Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared with diet-resistant FVB mice. *Int J Obes (Lond)*, 37 (6):853-860.
- Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M, Swanson R. 1994. Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J Biol Chem*, 269 (25):17274-17278.

- Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT. 1996. Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J Physiol*, 492 (Pt 2):419-430.
- Ko EA HJ, Jung ID, Park WS. 2008. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*, 44(2):65-81.
- 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.
- Kranc KR PG, 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.
- Langguth N. 2019. Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität
- Lecrux C, Hamel E. 2016. Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371 (1705).
- Ledoux J WM, Brayden JE, Nelson MT. 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*, 21:69-78.
- Lindauer U, Leithner C, Kaasch H, Rohrer B, Foddiss M, Fuchtemeier M, Offenhauser N, Steinbrink J, Roysl G, Kohl-Bareis M, Dirnagl U. 2010. Neurovascular coupling in rat brain operates independent of hemoglobin deoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30 (4):757-768.
- Lindgren A, Vergouwen MD, van der Schaaf I, Algra A, Wermer M, Clarke MJ, Rinkel GJ. 2018. Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for people with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*, 8:CD003085.
- Liu H, Dienel A, Scholler K, Schwarzmaier SM, Nehr Korn K, Plesnila N, Terpolilli NA. 2018. Microvasospasms After Experimental Subarachnoid Hemorrhage Do Not Depend on Endothelin A Receptors. *Stroke*, 49 (3):693-699.
- Logothetis NK. 2003. The underpinnings of the BOLD functional magnetic resonance imaging signal. *J Neurosci*, 23 (10):3963-3971.
- Longden TA, Nelson MT. 2015. Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation*, 22 (3):183-196.

- Longden TA, Dabertrand F, Koide M, Gonzales AL, Tykocki NR, Brayden JE, Hill-Eubanks D, Nelson MT. 2017. Capillary K(+)-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nat Neurosci*, 20 (5):717-726.
- Longstreth WT Jr KT, Yerby MS, van Belle G. 1985. Risk factors for subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 16 (3):377-385.
- Luo W, Liu CT, Yang QH, Yu Q, Wang T. 2014. New angle of view on the role of rho/rho kinase pathway in human diseases. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 13 (6):378-395.
- Lyons MA, Shukla R, Zhang K, Pyne GJ, Singh M, Biehle SJ, Clark JF. 2004. Increase of metabolic activity and disruption of normal contractile protein distribution by bilirubin oxidation products in vascular smooth-muscle cells. *J Neurosurg*, 100 (3):505-511.
- Ma ZH, Zhang JP, Du RP, Ji ES, Chu L. 2011. Rho Kinase Inhibition by Fasudil Has Anti-inflammatory Effects in Hypercholesterolemic Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34 (11):1684-1689.
- Macdonald RL. 2014. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol*, 10 (1):44-58.
- Macdonald RL, Schweizer TA. 2017. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *The Lancet*, 389 (10069):655-666.
- Maeda Y TE, Miyamoto T. 1981. Prostaglandin metabolism in experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 55 (5):779-785.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW. 2004. Overactive Bladder and Incontinence in the Absence of the BK Large Conductance Ca²⁺-activated K⁺Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (35):36746-36752.
- Meyer CH, Lowe D, Meyer M, Richardson PL, Neil-Dwyer G. 1982. Subarachnoid haemorrhage: older patients have low cerebral blood flow. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 285 (6349):1149-1153.
- Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. 2016. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci*, 19 (12):1619-1627.
- Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takuwa Y. 2000. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 (1):C57-65.

- Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. 2005. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*, 46 (3):454-462.
- Nakamura K, Koga Y, Sakai H, Homma K, Ikebe M. 2007. cGMP-Dependent Relaxation of Smooth Muscle Is Coupled With the Change in the Phosphorylation of Myosin Phosphatase. *Circulation Research*, 101 (7):712-722.
- Naraoka M, Munakata A, Matsuda N, Shimamura N, Ohkuma H. 2013. Suppression of the Rho/Rho-kinase pathway and prevention of cerebral vasospasm by combination treatment with statin and fasudil after subarachnoid hemorrhage in rabbit. *Transl Stroke Res*, 4 (3):368-374.
- Nelson MT QJ. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):C799-822.
- Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FHH, de Rooij NK, Rinkel GJE. 2009. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 8 (7):635-642.
- Ohkuma H, Tsurutani H, Suzuki S. 2001. Changes of beta-actin mRNA expression in canine vasospastic basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett*, 311 (1):9-12.
- Ohkuma H, Suzuki S, Ogane K. 2003. Phenotypic modulation of smooth muscle cells and vascular remodeling in intraparenchymal small cerebral arteries after canine experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience Letters*, 344 (3):193-196.
- Park J, Woo H, Kang DH, Kim Y. 2014. Critical age affecting 1-year functional outcome in elderly patients aged ≥ 70 years with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 156 (9):1655-1661.
- Peters A. 2009. The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. *Front Neuroanat*, 3:11.
- Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, Steiger HJ. 2017. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Dtsch Arztebl Int*, 114 (13):226-236.
- Plouin PF, Perdu J, La Batide-Alanore A, Boutouyrie P, Gimenez-Roqueplo AP, Jeunemaitre X. 2007. Fibromuscular dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2:28.

- Pluta RM. 2006. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH. *Neurological Research*, 28 (7):730-737.
- 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.
- Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. 1993. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol*, 265 (5 Pt 1):C1363-1370.
- Rapoport RM. 2018. Bilirubin Oxidation Products and Cerebral Vasoconstriction. *Front Pharmacol*, 9:303.
- Reed JT, Pareek T, Sriramula S, Pabbidi MR. 2020. Aging influences cerebrovascular myogenic reactivity and BK channel function in a sex-specific manner. *Cardiovasc Res*, 116 (7):1372-1385.
- Ritter M, Seidel RA, Bellstedt P, Schneider B, Bauer M, Gorls H, Pohnert G. 2016. Isolation and Identification of Intermediates of the Oxidative Bilirubin Degradation. *Org Lett*, 18 (17):4432-4435.
- Ritter M. 2020. Charakterisierung von Pathogenese und Prävention des zerebralen Vasospasmus mittels Durchmesseranalyse zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnittmodell der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Rivers RJ HT, Zhang C, Kuo L. 2001. Activation of Barium-Sensitive Inward Rectifier Potassium Channels Mediates Remote Dilation of Coronary Arterioles. *Circulation*, 104(15):1749-53.
- Rosehart AC, Johnson AC, Dabertrand F. 2019. Ex Vivo Pressurized Hippocampal Capillary-Parenchymal Arteriole Preparation for Functional Study. *J Vis Exp*, 154.
- Rüttiger L SM, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Müller M, Köpschall I, Pfister M, Münkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rüscher A, Ruth P, Knipper M. 2004. Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK)-alpha-subunit but not the BK-beta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(35):12922-7.

- Ryttlefors M, Enblad P, Kerr RS, Molyneux AJ. 2008. International subarachnoid aneurysm trial of neurosurgical clipping versus endovascular coiling: subgroup analysis of 278 elderly patients. *Stroke*, 39 (10):2720-2726.
- Sabri M, Ai J, Knight B, Tariq A, Jeon H, Shang X, Marsden PA, Loch Macdonald R. 2011. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):190-199.
- Sadow SL, Looft-Wilson R, Doran B, Grayson TH, Segal SS, Hill CE. 2003. Expression of homocellular and heterocellular gap junctions in hamster arterioles and feed arteries. *Cardiovasc Res*, 60 (3):643-653.
- Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K. 2000. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circulation Research*, 87 (3):195-200.
- Sato Y, Seo N, Kobayashi E. 2006. Genetic background differences between FVB and C57BL/6 mice affect hypnotic susceptibility to pentobarbital, ketamine and nitrous oxide, but not isoflurane. *Acta Anaesthesiol Scand*, 50 (5):553-556.
- Sato S-i, Takayasu M, Kawasaki K, Ikegaki I, Hitomi A, Yano K, Shibuya M, Asano T. 2012. Antivasospastic Effects of Hydroxyfasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, After Subarachnoid Hemorrhage. *Journal of Pharmacological Sciences*, 118 (1):92-98.
- Sausbier M HH, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P. 2004. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25):9474-8.
- Schaefgen A. 2020. *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.
- Schmidt R., Thews G. 1997. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio: Springer-Verlag
- Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. 2011. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol*, 43 (1):27-40.

- 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.
- Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H, Nakashima M. 1992. Effect of At877 on Cerebral Vasospasm after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage - Results of a Prospective Placebo-Controlled Double-Blind Trial. *Journal of Neurosurgery*, 76 (4):571-577.
- Shimamura N, Ohkuma H. 2014. Phenotypic transformation of smooth muscle in vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res*, 5 (3):357-364.
- Somlyo AP, Somlyo AV. 2000. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology-London*, 522 (2):177-185.
- Somlyo AP, Somlyo AV. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews*, 83 (4):1325-1358.
- 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.
- Squair JW, Lee AH, Sarafis ZK, Chan F, Barak OF, Dujic Z, Day T, Phillips AA. 2020. Network analysis identifies consensus physiological measures of neurovascular coupling in humans. *J Cereb Blood Flow Metab*, 40 (3):656-666.
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. 1995. Rho as a Regulator of the Cytoskeleton. *Trends in Biochemical Sciences*, 20 (6):227-231.
- Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. 2002. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106 (1):57-62.
- Tanaka K, Minami H, Kota M, Kuwamura K, Kohmura E. 2005. Treatment of cerebral vasospasm with intra-arterial fasudil hydrochloride. *Neurosurgery*, 56 (2):214-223; discussion 214-223.

- Tang XD XR, 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.
- Torbey MT, Hauser TK, Bhardwaj A, Williams MA, Ulatowski JA, Mirski MA, Razumovsky AY. 2001. Effect of age on cerebral blood flow velocity and incidence of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 32 (9):2005-2011.
- Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y. 1998. Maxi-K-Ca, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily. *News in Physiological Sciences*, 13:112-117.
- Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. 2017. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol*, 7 (2):485-581.
- 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 den Borne SW, van de Schans VA, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HT, Lijnen PM, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ, Janssen BJ, Blankesteyn WM. 2009. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 84 (2):273-282.
- van der Heyden MA. 2011. Finding inward rectifier channel inhibitors: why and how? *Front Pharmacol*, 2:95.
- van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJE. 2007. Subarachnoid haemorrhage. *The Lancet*, 369 (9558):306-318.
- Wallner M, Meera P, Toro L. 1996. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N terminus *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (25):14922-14927.
- Wang HR, Wu M, Yu H, Long S, Stevens A, Engers DW, Sackin H, Daniels JS, Dawson ES, Hopkins CR, Lindsley CW, Li M, McManus OB. 2011. Selective inhibition of the K(ir)2 family of inward rectifier potassium channels by a small molecule

- probe: the discovery, SAR, and pharmacological characterization of ML133. *ACS Chem Biol*, 6 (8):845-856.
- Wang YW, Ding JP, Xia XM, Lingle CJ. 2002. Consequences of the stoichiometry of Slo1 alpha and auxiliary beta subunits on functional properties of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Journal of Neuroscience*, 22 (5):1550-1561.
- Weyer GW, Jahromi BS, Aihara Y, Agbaje-Williams M, Nikitina E, Zhang ZD, Macdonald RL. 2006. Expression and function of inwardly rectifying potassium channels after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (3):382-391.
- Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS, Offermanns S. 2008. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med*, 14 (1):64-68.
- Wu M, Wang H, Yu H, Makhina E, Xu J, Dawson ES, Hopkins CR, Lindsley CW, McManus OB, Li M. 2010. A potent and selective small molecule Kir2.1 inhibitor. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD).
- Yamaguchi-Okada M, Nishizawa S, Koide M, Nonaka Y. 2005. Biomechanical and phenotypic changes in the vasospastic canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *J Appl Physiol* (1985), 99 (5):2045-2052.
- Yan J, Aldrich RW. 2012. BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (20):7917-7922.
- Yao L, Romero MJ, Toque HA, Yang G, Caldwell RB, Caldwell RW. 2010. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res*, 1 (4):165-170.
- Yin Y, Middleton WJ, Florez CM, Carlen PL, Hossam EB. 2014. Propofol enhances the field excitatory postsynaptic potentials in CA1 hippocampal slices of young and aged mice. *Chin Med J (Engl)*, 127 (1):137-141.
- Yusifov T, Savalli N, Gandhi CS, Ottolia M, Olcese R. 2008. The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (1):376-381.
- Zaritsky JJ ED, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. 2000. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K⁺ current in K⁺ mediated vasodilation. *Circ Res*, 87(2):160-6.

- Zhang H, Jiang L, Guo Z, Zhong J, Wu J, He J, Liu H, He Z, Wu H, Cheng C, Sun X. 2017. PPARbeta/delta, a Novel Regulator for Vascular Smooth Muscle Cells Phenotypic Modulation and Vascular Remodeling after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Sci Rep*, 7:45234.
- Zhao J, Zhou D, Guo J, Ren Z, Zhou L, Wang S, Xu B, Wang R. 2006. Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 46 (9):421-428.
- Zhou Y, Lingle CJ. 2014. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol*, 144 (5):415-440.

Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Otto W. Witte

Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff

Dr. med. Alexander Jörk

Prof. Dr. med. habil. Peter Schlattmann, M.Sc. Applied Statistics

cand. med. Franz R. Kühne

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

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

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

Jena, den 20.12.2022

Sophie Charlotte Schröder

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Knut Holthoff, der mich bereits bei unserem ersten Gespräch für dieses Projekt zu begeistern wusste und mich ermutigte, mehr Zeit als ursprünglich geplant in meine Forschungskarriere zu investieren. Bei den komplexen Fragen, die sonst niemand beantworten konnte, führten seine Erklärungen zunächst oft zu Sprachlosigkeit, später aber zu einem umfassenderen Verständnis der größeren Zusammenhänge.

Herrn Dr. Alexander Jörk danke ich für die herausragende Betreuung während der Laborarbeit. Danke für fast tägliche Gespräche und das Beantworten hunderter Fragen rund um dieses Projekt. Danke für die Unterstützung beim Organisieren, Vorbereiten und Durchführen dieser Arbeit. Danke für die Chance, an den Jahrestreffen der SfN und der DGNC aktiv teilzunehmen und für die Begleitung dorthin. Danke für coronabedingt telefonisch stattfindende Unterstützung im Schreibprozess. Danke für den zeitaufwändigen Einsatz in einem Ausmaß, das so nicht selbstverständlich ist.

Marcel Ritter und Daniel Schulze (IAAC Jena) danke ich für die Bereitstellung von PDP A, das für diese Arbeit ähnlich unabdingbar war wie die Mäuse.

Ina Ingrisch danke ich für die Ausführung der Genotypisierungen und Färbungen, für die Einführung in die Fixierung von Hirnen und für ihre Zeit beim Beantworten zahlreicher Fragen.

Vielen Dank auch den Mitarbeiter_Innen des Tierstalls für die Betreuung meiner Versuchstiere und die große Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Schlattmann (IMSID Jena) danke ich für die freundliche und gründliche Beratung bei der Auswertung des datenintensivsten Teilprojekts dieser Arbeit.

Lars Schmidl danke ich für die netten Gespräche und die tatkräftige Unterstützung bei Notfällen am DIC-Mikroskop.

Dem Else-Kröner-Promotionskolleg für Alternsforschung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Ich danke auch den überaus freundlichen und hilfsbereiten Mitarbeiterinnen der „Jena School for Ageing Medicine (JSAM)“, Jeanine Linz, Vera Voltersen, Jana Schleicher und Sigrun Nagel für ihre Unterstützung bei Organisatorischem.

Ich danke meinem Kommilitonen Niklas Langguth, der mir die AG-BioImaging empfahl und dadurch all dies anstieß.

Meinen Mitdoktoranden Marvin Ritter und Ida Knüpfer danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und das Teilen der aCSF.

Vielen Dank an meinen Kommilitonen Franz Kühne, der mit dem von ihm entwickelten ImageJ-Makro alle Daten des Teilprojektes „Elektrostimulation“ ausgewertet und mich bei der weiteren Verarbeitung beraten hat und dessen umfassendes informatisches Verständnis und beharrliche Arbeit mich nach wie vor beeindruckt.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Liebsten dafür danken, dass sie mir immer wieder Kraft gegeben haben, wenn sich diese Arbeit zu groß und mein Kopf zu leer angefühlt hat. Ohne euch wär's nicht gegangen.