

**Charakterisierung von Pathogenese und  
Prävention des zerebralen Vasospasmus  
mittels Durchmesseranalyse  
zerebraler Arteriolen im akuten  
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 Marvin Ritter

geboren am 12.11.1996 in Ilmenau

**Gutachter:**

- 1.) Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff, Jena
- 2.) Prof. Dr. rer. nat. Matthias Westerhausen, Jena
- 3.) Prof. Dr. med. Jens P. Dreier, Berlin

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.11.2022**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>Zusammenfassung</b> .....	9
<b>1 Einleitung</b> .....	11
1.1 Subarachnoidalblutung .....	11
1.1.1 Definition und Epidemiologie .....	11
1.1.2 Risikofaktoren .....	12
1.1.3 Symptomatik .....	13
1.1.4 Therapeutische Ansätze .....	13
1.1.5 Komplikationen .....	14
1.2 Zerebraler Vasospasmus .....	15
1.2.1 Definition und Epidemiologie .....	15
1.2.2 Risikofaktoren .....	15
1.2.3 Pathogenese .....	16
1.2.4 Einfluss der Hämabbauprodukte .....	18
1.2.5 Therapeutische Ansätze .....	20
1.3 BK-Kanal .....	21
1.3.1 Eigenschaften und Struktur .....	21
1.3.2 Funktionsmechanismus und Regulation .....	23
1.3.3 Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen .....	24
1.4 Proteinkinase C .....	26
1.4.1 Eigenschaften, Struktur und Signaltransduktion .....	26
1.4.2 Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen .....	27
1.4.3 Proteinkinase C und Subarachnoidalblutung .....	29
1.5 Einfluss der Subarachnoidalblutung auf die neurovaskuläre Kopplung ..	29
<b>2 Ziele der Arbeit</b> .....	32
<b>3 Material und Methoden</b> .....	33
3.1 Versuchstiere .....	33
3.2 Genotypisierung .....	34

3.3	Lösungen.....	36
3.3.1	aCSF-Liquorersatzlösungen.....	36
3.3.2	Noradrenalin-Lösung.....	39
3.4	Substanzen.....	39
3.4.1	L-NAME.....	39
3.4.2	PDPs.....	40
3.4.3	BOXes.....	41
3.4.4	MVM.....	42
3.4.5	BK-Kanal-Aktivatoren.....	43
3.4.6	BK-Kanal-Inhibitoren.....	43
3.4.7	Proteinkinase C-Inhibitor.....	44
3.5	Hirnschnittpräparation.....	44
3.6	Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie.....	46
3.7	Versuchsdesign und Versuchsübersicht.....	47
3.8	Auswertung des Gefäßdurchmessers.....	49
3.9	Statistik.....	49
3.10	Elektrische Stimulation.....	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1	Gefäßantwort unter aCSF.....	53
4.2	Gefäßantwort unter L-NAME.....	54
4.3	Gefäßantwort unter aCSF in adulten Mäusen.....	55
4.4	Hämabbauprodukte in adulten Mäusen.....	56
4.4.1	Applikation von PDP A.....	56
4.4.2	Applikation von BOX A.....	57
4.5	Applikation von Dihydro-BOX A.....	58
4.6	Applikation von MVM.....	59
4.7	Applikation spezifischer BK-Kanal-Aktivatoren.....	60
4.7.1	Applikation von BMS 191011.....	60
4.7.2	Applikation von BMS 204352.....	61
4.8	Applikation spezifischer BK-Kanal-Inhibitoren.....	62

4.9	Applikation eines Proteinkinase C-Inhibitors.....	64
4.10	Einfluss der Hämabbauprodukte auf die neurovaskuläre Kopplung .....	65
4.10.1	Elektrische Stimulation in Kortexschicht II/III .....	65
4.10.2	Elektrische Stimulation in Kortexschicht VI.....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
5.1	Diskussion der Methodik.....	71
5.1.1	Versuchstiere.....	71
5.1.2	L-NAME .....	71
5.1.3	Analyse des Gefäßdurchmessers.....	74
5.1.4	Elektrische Stimulation .....	75
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	76
5.2.1	Hämabbauprodukte in adulten Mäusen .....	76
5.2.2	Dihydro-BOX A .....	77
5.2.3	MVM .....	78
5.2.4	Effekt spezifischer BK-Kanal-Aktivatoren .....	79
5.2.5	Effekt spezifischer BK-Kanal-Inhibitoren .....	80
5.2.6	Effekt eines Proteinkinase C-Inhibitors .....	81
5.2.7	Einfluss der Hämabbauprodukte auf die neurovaskuläre Kopplung .....	83
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>91</b>
	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>108</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>108</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
aCSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit ( <i>artificial cerebrospinal fluid</i> )
BK-Kanal	spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanal mit hoher Kalium-Leitfähigkeit
BMS	<i>Bristol-Myers Squibb</i> (Pharmaunternehmen)
BOX	Bilirubin-Oxidations-Endprodukt
C57BL/6J	verbreiteter Mausstamm
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast ( <i>differential interference contrast</i> )
DIND	verzögertes ischämisches neurologisches Defizit ( <i>delayed ischemic neurologic deficit</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
EET	Epoxyeicosatriensäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GDP	Guanosindiphosphat
Gö 6983	Göml 6983 (unspezifischer Proteinkinase C-Inhibitor)
G <sub>q</sub> -Protein	Phospholipase C-gekoppeltes Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HDP	Hämabbauprodukt ( <i>heme degradation product</i> )
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie ( <i>high pressure liquid chromatography</i> )
IAAC	Institut für Anorganische und Analytische Chemie
IbTX	Iberiotoxin

IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
K <sub>ir</sub> -Kanal	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
KO	Knock-out
K <sub>v</sub> -Kanal	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
L-NA	L-Nitro-Arginin
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester
MVM	4-Methyl-3-Vinylmaleimid
n	Stückzahl
NA	Noradrenalin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ns	nicht signifikant
PAX	Paxillin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDP	Propentdyopent (Intermediat der Bilirubin-Oxidation)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
SAB	Subarachnoidalblutung
Slo1	<i>slowpoke 1</i> (Gensequenz des BK-Kanals)
Slo1 <sup>-/-</sup>	deaktiviertes Slo1-Gen
Slo1 <sup>+/+</sup>	homozygotes Vorhandensein des Slo1-Gens
Slo1 <sup>+/-</sup>	heterozygotes Vorhandensein des Slo1-Gens
RCK	Kaliumstrom-regulierende Domäne ( <i>regulator of conductance</i> )
Tab.	Tabelle
WT	Wildtyp

## SI-Einheiten

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Einheit</b>
l	Länge	m (Meter)
m	Masse	kg (Kilogramm)
n	Stoffmenge	mol (Mol)
t	Zeit	s (Sekunde)

## Abgeleitete SI-Einheiten

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Einheit</b>
c	Stoffmengenkonzentration (Molarität)	mol * m <sup>-3</sup> (Molar)
G	Elektrischer Leitwert	S (Siemens) = kg <sup>-1</sup> * m <sup>-2</sup> * s <sup>3</sup> * A <sup>2</sup>
g	Erdbeschleunigung	9,81 m * s <sup>-2</sup>
M	Molare Masse	Kg * mol <sup>-1</sup>
P	Druck	mmHg (Millimeter-Quecksilbersäule) = kg * m <sup>-1</sup> * s <sup>-2</sup>
Θ	Celsius-Temperatur	° C (Grad Celsius)
U	Elektrische Spannung	V (Volt) = kg * m <sup>2</sup> * s <sup>-3</sup> * A <sup>-1</sup>
V	Volumen	l (Liter) = 0,001 * m <sup>3</sup>



## Zusammenfassung

Hämorrhagische Schlaganfälle, wie die aneurysmatische Subarachnoidalblutung (SAB), weisen eine Altersassoziation mit einem Inzidenzgipfel in der sechsten Lebensdekade auf. Die Einblutung in den äußeren Liquorraum begünstigt die Entstehung des zerebralen Vasospasmus, einer zeitlich verzögert auftretenden, krampfhaften Verengung arterieller Gefäße, die mit morphologischen sowie funktionellen Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation einhergeht und eine prognostisch ungünstige Sekundärkomplikation der SAB mit möglichen neurologischen Ausfallerscheinungen darstellt. Die Behandlungs- und Präventionsmöglichkeiten des Vasospasmus sind unzureichend und die Pathogenese ist nur lückenhaft aufgeklärt. In den letzten Jahren rückten vermehrt die Abbauprodukte des Hämoglobins (HDPs) als Ursache des Vasospasmus in den Blickpunkt der Forschung. Hierzu zählen Propentdyopents (PDPs) und Bilirubin-Oxidations-Endprodukte (BOXes), die im Liquor von SAB-Patienten nachweisbar sind und vermutlich inhibitorisch auf Kalzium-aktivierbare Kaliumkanäle (BK-Kanäle) wirken. Die dadurch fehlende Repolarisation lässt glatte Gefäßmuskelzellen kontrahieren und führt zur Vasokonstriktion zerebraler Arterien. Ziel dieses Promotionsprojekts war die Identifikation weiterer für den Pathomechanismus der HDPs wichtiger Kofaktoren. So sollte der Stellenwert des Alters, die Struktur der HDP-Moleküle, die Funktion der Proteinkinase C (PKC) sowie der Einfluss von BK-Kanal-Aktivatoren und -Inhibitoren untersucht werden. Die Ergebnisse sollen Grundlage für die Neuentwicklung präventiver Therapieansätze sein, um neurologische Defizite nach einer SAB zu vermeiden und das neurorehabilitative Potenzial langfristig zu stärken.

Unter *in vitro*-Bedingungen wurden akute Hirnschnitte der Maus mittels Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie visualisiert und zeitliche Änderungen des Gefäßdurchmessers intrakortikaler Arteriolen während der Applikation von HDPs und vasoregulatorischen Kofaktoren analysiert.

Die Testung von PDPs in Hirnschnitten adulter Mäuse resultierte in einer signifikant abgeschwächten Vasokonstriktion im Vergleich zu juvenilen Mäusen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem altersabhängigen Auftreten des Vasospasmus nach der SAB und kann auf morphologische sowie funktionelle Gefäßveränderungen mit zunehmendem Alter zurückgeführt werden.

Die noch ungetesteten HDPs Dihydro-BOX A und MVM zeigten keine Vasoaktivität. Da sich Dihydro-BOX A nur durch eine Hydrierung an der Vinylgruppe vom vasokonstriktorisches BOX A-Molekül unterscheidet, kann aus dem Ergebnis abgeleitet werden, dass die Vinylgruppe für das vasokonstriktorisches Potenzial bedeutend ist.

In diversen Studien wurde eine Interaktion der HDPs mit dem BK-Kanal vermutet. Der BK-Kanal-Aktivator BMS 204352 konnte, im Gegensatz zu BMS 191011, die PDP-induzierte Vasokonstriktion signifikant verhindern. Da BMS 204352 in vorangegangenen Studien ein geringes Nebenwirkungsprofil aufwies, stellt die Weiterentwicklung dieser Substanz einen vielversprechenden Ansatz zur Prävention des Vasospasmus dar. Zudem wurde die PDP-induzierte Vasokonstriktion auch durch den PKC-Inhibitor Gö 6983 signifikant verhindert. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien scheint die PKC in den Pathomechanismus der PDPs involviert zu sein und kann demzufolge ebenso als potenzieller Präventionsansatz betrachtet werden.

BK-Kanäle werden sowohl in glatten Gefäßmuskelzellen als auch in Astrozyten exprimiert. Um zu untersuchen, ob HDPs mit zelltypspezifischen BK-Kanälen interagieren, wurden die BK-Kanal-Inhibitoren Paxillin und Iberiotoxin ausgewählt und in Kombination mit PDPs getestet. Die Ergebnisse deuten auf einen inhibitorischen Effekt der PDPs auf hauptsächlich astrozytäre BK-Kanäle hin.

Da astrozytäre BK-Kanäle einen großen Stellenwert bei der neurovaskulären Kopplung einnehmen, wurde der Einfluss von HDPs auf die neurovaskuläre Kopplung mithilfe von elektrischen Stimulationsversuchen des Hirnschnittgewebes untersucht. Die Arteriolen zeigten eine abgeschwächte Gefäßreaktion unter der Wirkung von PDPs sowie BOXes. Die Ergebnisse lassen somit einen inhibitorischen Effekt der HDPs auf die neurovaskuläre Kopplung vermuten.

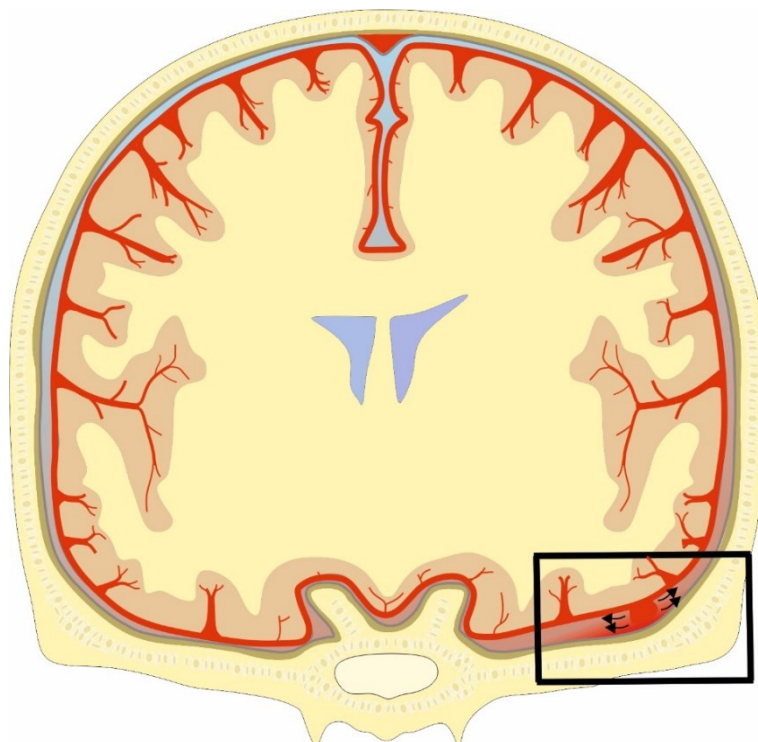
Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, dass die HDP-Wirkung auf den Gefäßdurchmesser mit zunehmendem Alter abnimmt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Vinylgruppe des BOX A-Moleküls dessen vasokonstriktorisches Potenzial maßgeblich mitbestimmt. Weiterhin stellte sich heraus, dass der BK-Kanal-Aktivator BMS 204352 sowie der PKC-Inhibitor Gö 6983 als Ansatz zur Prävention der PDP-induzierten Gefäßverengung geeignet sind. Die Datenlage spricht außerdem dafür, dass HDPs vorzugsweise astrozytäre BK-Kanäle inhibieren, was durch die abgeschwächte neurovaskuläre Reaktion unter PDPs und BOXes zusätzlich untermauert werden konnte.

# 1 Einleitung

## 1.1 Subarachnoidalblutung

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Subarachnoidalblutung (SAB) wird den hämorrhagischen Schlaganfällen zugeordnet und definiert sich als akute, meist arterielle Einblutung in den Subarachnoidalraum (Bederson et al. 2009), welcher zwischen Pia mater und Arachnoidea mater lokalisiert ist und die hirnersorgenden Gefäße beinhaltet (Abb. 1). Ätiologisch kann die SAB in eine traumatische und eine nicht traumatische Form unterteilt werden. Nachfolgendes bezieht sich auf die nicht traumatische (spontane) Aneurysmaruptur. Ein Aneurysma stellt eine begrenzte, pathologische Aufweitung des Blutgefäßquerschnitts dar, welche aus einer erworbenen oder angeborenen Gefäßwandveränderung hervorgeht. Eine Ruptur einer solchen Gefäßwandpathologie durch unausgeglichene Druckverhältnisse, beispielsweise aufgrund von Blutdruckspitzen, umfasst etwa 85 % der SABs spontaner Genese und tangiert insbesondere die basalen Hirnarterien (van Gijn et al. 2007).



**Abb. 1:** Schema eines koronalen Schnittbilds durch das menschliche Gehirn mit Illustration einer arteriellen Einblutung in den Subarachnoidalraum infolge eines rupturierten Aneurysmas (dargestellt innerhalb des schwarzen Vierecks).

Obwohl nur etwa jeder 20. Schlaganfall eine SAB ist (van Gijn und Rinkel 2001), können 22 - 25 % aller zerebrovaskulären Todesursachen auf diese zurückgeführt werden (Hop et al. 1998). Viele Studien, welche die 30-Tages-Letalität nach einer SAB untersuchten, identifizierten, dass 36 - 42 % der Menschen nach initialem Ereignis innerhalb von 30 Tagen versterben (Ingall et al. 2000, Fischer et al. 2005, Sandvei et al. 2011). Die Inzidenz schwankt regional (2 - 22 auf 100.000 Einwohner) (de Rooij et al. 2007), zwischen den Altersgruppen (Inzidenzgipfel zwischen 40 und 60 Jahren) (van Gijn und Rinkel 2001) sowie auch geringfügig zwischen den Geschlechtern (häufigeres Auftreten beim weiblichen Geschlecht) (Raaymakers 1999). In Europa liegt das mittlere Auftreten einer SAB bei 7 - 10 Personen auf 100.000 Einwohner (Ingall et al. 2000).

### **1.1.2 Risikofaktoren**

Mehrere Faktoren tragen sowohl zur Entstehung als auch zur Ruptur eines Aneurysmas bei. Genetisch bedingte Erkrankungen, wie beispielsweise die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (Ditlefsen und Tonjum 1960), das Marfan-Syndrom (Finney et al. 1976) oder die fibromuskuläre Dysplasie (Sato et al. 1983), begünstigen die Entstehung eines Aneurysmas durch die Beeinflussung der physiologischen Gefäßstruktur und werden familiär gehäuft beobachtet. Ein weiterer nicht beeinflussbarer Risikofaktor ist das Geschlecht. Mit dem weiblichen Geschlecht geht sowohl ein erhöhtes Risiko der Entstehung als auch der Ruptur eines Aneurysmas einher (de Rooij et al. 2007). Im Kontrast dazu stehen Risikofaktoren, die zu degenerativen Veränderungen der Arterienwand und somit zu Gefäßläsionen führen. Sowohl Rauchen und Alkoholabusus als auch arterielle Hypertonie erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Entstehens sowie der Ruptur des Aneurysmas (International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms 1998, Ellamushi et al. 2001). Faktoren, die nur das Risiko der Ruptur erhöhen, sind zum einen regelmäßiger Kokainabusus (Nanda et al. 2000) und zum anderen Aneurysma-spezifische Eigenschaften, wie die Lokalisation, die Aneurysmaarchitektur sowie die Größe und Anzahl der vorhandenen Aneurysmen (Drake und Peerless 1997, Wiebers 2006).

### **1.1.3 Symptomatik**

Das Kardinalsymptom der SAB ist der akut einsetzende Vernichtungskopfschmerz, welcher mit seiner charakteristischen Intensität von der Mehrheit der Patienten beschrieben wird und sich in der akuten Reizung der Meningen begründet (van Gijn et al. 2007). Der Hirndruck steigt je nach Intensität und Lokalisation der Blutung an, was zu Erbrechen, Nackensteifigkeit, Photophobie sowie Somnolenz führen kann (Suarez et al. 2006). Durch das entstehende intrazerebrale Hämatom können zudem fokale neurologische Defizite sowie Hirnnervenläsionen, wie etwa eine Läsion des Nervus oculomotorius, auftreten (van Gijn et al. 2007, Kundra et al. 2014). Aufgrund der zahlreichen Verbindungen des Gehirns zu anderen Organen können auch andere Organsysteme beeinträchtigt werden. Zu nennen sind beispielsweise subhyaloidale Glaskörperblutungen im Rahmen des Terson-Syndroms (Fonseca und Rosa Junior 2017), kardiopulmonale Dysfunktionen sowie Hyponatriämien aufgrund hypothalamischer Irritationen (van Gijn und van Dongen 1982, Rose 2011). Einige Wochen vor der Aneurysmaruptur schildern viele Patienten überdies ein gehäuftes Auftreten von Kopfschmerzen (Bassi et al. 1991). Dieses Warnsymptom einer bevorstehenden SAB wird oft fehlinterpretiert und fälschlicherweise als Migräne, hypertensive Krise, akutes Zervikalsyndrom oder Meningitis behandelt.

### **1.1.4 Therapeutische Ansätze**

Um die SAB optimal therapieren zu können, ist das frühe Erkennen und der rasche Transport in ein neurovaskuläres Spezialzentrum mit Verlegung auf eine Intensiv- oder Intermediate Care-Station essenziell (Sarker et al. 2008). Das Ziel der Therapie ist die Komplikationsvermeidung und somit die Minimierung der Folgeschäden. Grundsätzlich sollte der neurologische Status frequent kontrolliert werden, da schon kleine Verschlechterungen des neurologischen Zustandes mit dem Auftreten von Komplikationen assoziiert sein können. Basismaßnahmen, wie das medikamentöse Behandeln von Hyperglykämie oder Hyperthermie, die Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes und die Überwachung der kardiopulmonalen Parameter, müssen regelrecht erfolgen (Lanzino et al. 1993, Wartenberg und Mayer 2006). Weitere wichtige Aspekte sind die medikamentöse Einstellung des Blutdruckes sowie das Vermeiden von Blutdruckspitzen (Bederson et al. 1998). Des Weiteren sollten Angst- und Schmerzzustände adäquat behandelt werden, um das Körperstresslevel

gering zu halten. Ein frühes Ausschalten der Blutungsquelle durch Aneurysma-Clipping oder -Coiling reduziert überdies die Mortalität (Kassell et al. 1990) und sollte innerhalb der ersten 72 Stunden nach einer SAB erfolgen (Whitfield und Kirkpatrick 2001). Mit dem Krankheitsverlauf einhergehende Komplikationen erfordern gesonderte und komplikationsspezifische therapeutische Maßnahmen.

### **1.1.5 Komplikationen**

Die Komplikationsschwere und -rate beeinflusst maßgeblich die Letalität sowie Morbidität der SAB. Anhand des zeitlichen Auftretens kann man die Komplikationen in primäre und sekundäre unterteilen. Primäre Komplikationen treten kurz nach dem Initialereignis innerhalb der ersten 72 Stunden auf. Durch die Entstehung eines Hämatoms und/oder eines Hirnödems steigt der intrakranielle Druck und die Minderperfusion von Hirnarealen wird begünstigt. Durch das resultierende Sauerstoffdefizit entwickeln sich oftmals ischämische Hirnläsionen, die tödlich enden können (Westermaier et al. 2012, Fu et al. 2013, Frontera et al. 2015). Mit dem Anstieg des intrakraniellen Druckes wird zudem der Liquorabfluss gestört, wodurch die Ventrikel dilatieren und ein akuter Hydrozephalus, welcher ein externes Liquorabflusssystem erfordert (Lu et al. 2012), entstehen kann (Suarez-Rivera 1998). Das Risiko einer Rezidivblutung ist mit 9 - 17 % innerhalb der ersten 72 Stunden am größten (Proust et al. 1995, Starke et al. 2011). Um dieses Risiko zu senken, ist eine frühe Ausschaltung des Aneurysmas indiziert (Consoli et al. 2013). Kardiopulmonale Komplikationen, Elektrolytentgleisungen sowie epileptische Anfälle können sowohl unmittelbar nach der SAB als auch erst einige Tage nach dem Initialereignis sekundär auftreten (Solenski et al. 1995). Eine adäquate antikonvulsive Therapie kann das Risiko weiterer epileptischer Anfälle signifikant reduzieren (Claassen et al. 2003). 20 - 30 % der Patienten entwickeln durch die gestörte Liquorresorption nach einer SAB einen chronischen Hydrozephalus, welcher ein häufiger Grund für persistierende Morbidität darstellt (Sheehan et al. 1999, Corsten et al. 2001). Eine permanente Liquorableitung kann die Prognose jedoch verbessern (Mayberg et al. 1994). Der zerebrale Vasospasmus kann einige Tage nach der initialen Blutung sekundär auftreten und den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussen. Da sich diese Arbeit hauptsächlich dem zerebralen Vasospasmus nach der SAB widmet, wird diese Komplikation im folgenden Kapitel genauer betrachtet.

## **1.2 Zerebraler Vasospasmus**

### **1.2.1 Definition und Epidemiologie**

Der zerebrale Vasospasmus beschreibt die segmentale krampfartige Verengung zerebraler Arteriolen, welche die Prognose des Patienten nach einer SAB substantiell beeinflusst (Kassell et al. 1990) und einen wesentlichen Teil zur Entstehung von verzögerten ischämischen neurologischen Defiziten (DINDs) beiträgt (Dankbaar et al. 2009). Als sekundäre Komplikation beginnt die Gefäßverengung zwischen Tag 3 und 5, prägt sich zwischen Tag 5 und 14 meist voll aus und normalisiert sich innerhalb von 2 bis 4 Wochen wieder (Spendel 2008). Definitionsgemäß kann zwischen einem angiographischen (Gefäßverengung, die mittels bildgebender Verfahren dargestellt werden kann) und einem symptomatischen Vasospasmus (Gefäßverengung, die durch ischämische Hirnläsionen sowohl kortexspezifische als auch unspezifische Symptome hervorruft) unterschieden werden. Des Weiteren kann eine Unterteilung nach der Lokalisation in fokal oder diffus sowie anhand des Schweregrades in mild, moderat oder schwer erfolgen (prozentuale Gefäßverengung < 25 %, 25 - 50 % oder > 50 %) (Baldwin et al. 2004). Ein angiographischer Vasospasmus kann bei 50 - 90 % der Patienten nach einer SAB beobachtet werden; bei 2 von 3 Patienten ist eine moderate bis schwere Form der Konstriktion feststellbar (Dorsch 1994). Bei der Hälfte der Patienten mit nachgewiesenem angiographischen Vasospasmus entwickeln sich zerebrale Ischämien, die sich in Form einer kortexspezifischen Symptomatik äußern. Dieser symptomatische Vasospasmus resultiert bei 50 % der betroffenen Patienten wiederum in einem ischämischen Schlaganfall (Findlay et al. 2016). Ein gegenwärtiger Bestandteil der Forschung ist die Untersuchung der pathophysiologischen Hintergründe des zerebralen Vasospasmus zur Entwicklung medikamentöser Präventionsstrategien (Macdonald 2014), da trotz guter intensivmedizinischer Versorgung eine große Mortalität sowie Morbidität mit dem Vasospasmus einhergeht und die präventiven Ressourcen begrenzt sind (Baggott und Aagaard-Kienitz 2014).

### **1.2.2 Risikofaktoren**

Das Risiko für die Entstehung des Vasospasmus korreliert insbesondere mit der Größe des Blutgerinnsels, welches sich durch den Ausstrom des Blutes in den Subarachnoidalraum nach einer SAB bildet (Friedman et al. 2002). Zudem wird ein

langsamer körpereigener Abbau dieses Gerinnsels mit der Entstehung des Vasospasmus assoziiert (Reilly et al. 2004). Des Weiteren begünstigen die bereits erwähnten Risikofaktoren der SAB (Kapitel 1.1.2) die Entstehung sowie das Ausmaß der Gefäßkonstriktion (Harrod et al. 2005, Mocco et al. 2006, de Rooij et al. 2013, Abla et al. 2014).

### 1.2.3 Pathogenese

Die Entstehung des zerebralen Vasospasmus ist sehr komplex und multifaktoriell bedingt. Demzufolge werden einige Ansätze diskutiert, welche zur Pathogenese des zerebralen Vasospasmus beitragen könnten.

Der frühe Hirnschaden (*early brain injury*) beschreibt pathologische Prozesse innerhalb der ersten 72 Stunden nach einer Aneurysmaruptur, welche das Auftreten beziehungsweise den Schweregrad des Vasospasmus entscheidend determinieren (Kusaka et al. 2004). Ausschlaggebend dafür sind die global-ischämischen Verhältnisse, die durch den raschen intrakraniellen Druckanstieg aufgrund des austretenden Blutes entstehen. Folglich sinkt der zerebrale Perfusionsdruck (Nornes und Magnaes 1972). Damit einhergehende pathophysiologische Vorgänge, wie beispielsweise die Entstehung eines Hirnödems, Exzitotoxizität, Inflammation, Blut-Hirn-Schranken-Dysfunktion, neuronale Apoptose und Mikrothrombosen, werden initiiert und beeinflussen die zerebrale Physiologie unmittelbar nach der Initialblutung (Caner et al. 2012, Rowland et al. 2012, Chen et al. 2014).

Zudem kann das Oxyhämoglobin des Blutes im Subarachnoidalraum Änderungen des elektrischen Potentials glatter Gefäßmuskelzellen kleiner zerebraler Gefäße verursachen, was den verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle begünstigt. Die resultierende Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen bewirkt eine Vasokonstriktion und somit die Verringerung des zerebralen Blutflusses (Wellman et al. 2002). Des Weiteren wird die Kalziumkanaldichte durch Expression zusätzlicher R-Typ-Kalziumkanäle erhöht. Folglich steigt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die Vasokonstriktion wird verstärkt (Ishiguro et al. 2005). Eine verminderte Aktivierung spannungs- sowie kalziumabhängiger Kaliumkanäle (BK-Kanäle) begünstigt die Depolarisation glatter Gefäßmuskelzellen überdies (Jewell et al. 2004).



Das Oxyhämoglobin im Subarachnoidalraum fördert nicht nur die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen, sondern auch diverse proinflammatorische sowie proliferative Prozesse. Die Hochregulation von proinflammatorisch und proliferativ wirkenden Genen sowie Genen mit Einfluss auf die Strukturen der extrazellulären Matrix konnte identifiziert werden (Macdonald et al. 2002, Vikman et al. 2006, Vikman et al. 2007). Proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interleukin-6, konnten nach einer SAB in größeren Konzentrationen im Blut nachgewiesen werden (Sasaki et al. 1981, Bowman et al. 2004) und waren mit strukturellen Gefäßveränderungen sowie auch der Verengung von Gefäßen assoziiert (Dumont et al. 2003).

Die durch den oxidativen Abbau des Hämoglobins entstehenden Sauerstoffradikale können intrazerebrale Gefäßwände permeieren und Endothel- sowie glatte Gefäßmuskelzellen über Lipidperoxidation schädigen (Sasaki et al. 1981, Kamezaki et al. 2002). Durch den Endothelschaden wird das physiologische Gleichgewicht vasodilatatorischer und vasokonstriktorischer Transmitter gestört. Die endotheliale Synthese des stark vasokonstriktorisches wirkenden Peptids Endothelin-1 wird durch den Endothelschaden begünstigt (Iuliano et al. 2004). Das Maximum der Überproduktion des Peptids wird an Tag 3 - 4 nach einer SAB erreicht (Thampatty et al. 2011). Eine Hochregulation der Endothelin-A-Rezeptoren begünstigt die Wirkung des Endothelin-1 und erhöht den Gefäßtonus zusätzlich (Alabadi et al. 1993). Ein wichtiges Molekül der Vasodilatation hingegen ist Stickstoffmonoxid (NO). NO ist als physiologischer Vasodilatator durch Inhibition des  $Ca^{2+}$ -Ausstroms aus dem sarkoplasmatischen Retikulum maßgeblich an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass durch das Vorhandensein von Hämoglobin im Subarachnoidalraum die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gesenkt und die Funktionalität der neuronalen NO-Synthase (nNOS) beeinträchtigt wird (Pluta et al. 1996, Iuliano et al. 2004). Zudem bindet Hämoglobin mit hoher Affinität NO, was die Bioverfügbarkeit zusätzlich reduziert (Gibson und Roughton 1957). Aufgrund des Endothelin-1-Überschusses bei einer reduzierten NO-Synthese verschiebt sich das endotheliale Gleichgewicht zugunsten der vasokonstriktorisches Faktoren, was das Entstehen eines Vasospasmus begünstigt (Pluta 2008).

Des Weiteren können mikrozirkulatorische Dysfunktionen durch die Bildung von Mikrothromben mit dem Auftreten des Vasospasmus korrelieren. Diese

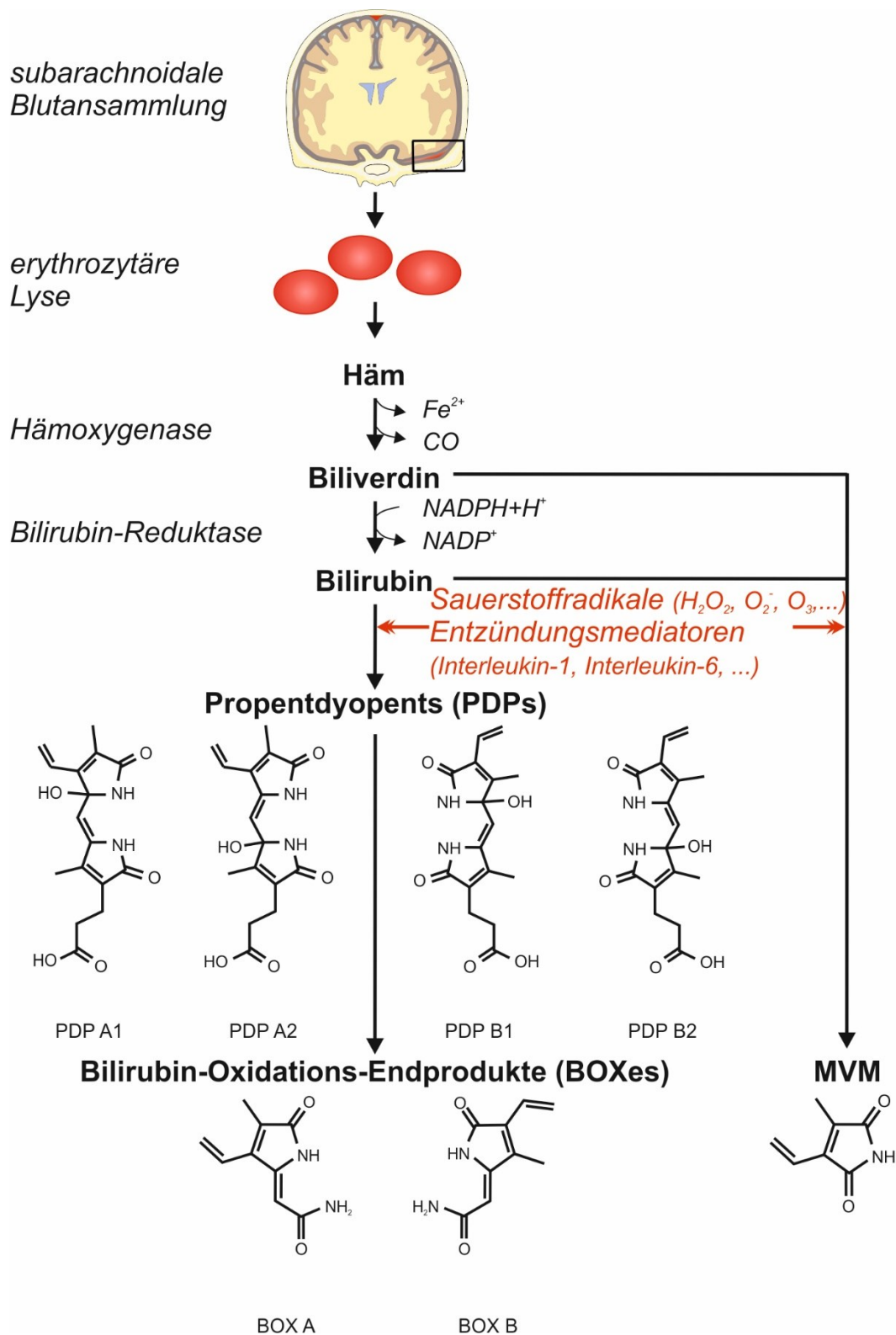
Mikrothromben sind auf die erhöhte Konzentration von koagulatorischen Faktoren zurückzuführen (Hirashima et al. 1997, Frijns et al. 2006, Dorsch 2011).

Zuletzt sei erwähnt, dass auch kortikale *spreading depolarizations* mit der Pathogenese der DINDs assoziiert werden, welche aber im Verlauf dieser Einleitung explizit betrachtet werden (Kapitel 1.5).

#### **1.2.4 Einfluss der Hämabbauprodukte**

Der dieser Arbeit zugrunde liegende pathophysiologische Ansatz der Entstehung des zerebralen Vasospasmus ist der Einfluss der oxidativen Hämabbauprodukte (HDPs). Hämoglobin wird durch die Lyse von Erythrozyten des subarachnoidalen Blutes vermehrt freigesetzt und in vier globuläre Untereinheiten zerlegt. Nachdem Häm vom Globinanteil getrennt wurde, katalysiert die Häm-Oxygenase den Abbau des Häms zu Biliverdin. Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert, anschließend in die Leber aufgenommen und durch die UDP-Glucuronosyltransferase in das wasserlöslichere Bilirubindiglucuronid umgewandelt. Über die Galle wird das hydrophile Molekül in das Darmlumen sezerniert, weiter enzymatisch umgewandelt und letztendlich über die Niere oder den Darm ausgeschieden (Schmid und McDonagh 1975). Aufgrund beschriebener inflammatorischer Prozesse wird Bilirubin nach einer SAB weniger enzymatisch abgebaut, sondern unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren und Sauerstoffradikalen vorwiegend oxidativ umgewandelt (Clark et al. 2002, Clark und Sharp 2006). Der Weg dieser oxidativen Umwandlung (Abb. 2) führt über Intermediate, die Propentdyopents (PDPs) (Bonnett und Stewart 1972, Lightner und Quistad 1972), zu den Bilirubin-Oxidations-Endprodukten (BOXes) (Kranc et al. 2000). Ergänzend zu den BOXes kann durch die oxidative Umwandlung des Biliverdins beziehungsweise des Bilirubins 4-Methyl-3-Vinylmaleimid (MVM) als weiteres Endprodukt entstehen (Abb. 2).

Bereits im Jahr 2000 wurden die HDPs mit der Entstehung des Vasospasmus in Verbindung gebracht. Es konnte *in vitro* wie auch *in vivo* gezeigt werden, dass sowohl BOXes (Kranc et al. 2000, Clark und Sharp 2006) als auch PDPs (Joerk et al. 2019) den Gefäßdurchmesser zerebraler Arteriolen verringern und den Gefäßtonus erhöhen. Zudem wurden Liquorproben von SAB-Patienten analysiert und sowohl signifikant erhöhte BOX- als auch PDP-Konzentrationen identifiziert (Pyne-Geithman et al. 2005, Joerk et al. 2019).



**Abb. 2:** Schema des Hämabbaus: Die Lyse der Erythrozyten nach einer SAB initiiert den enzymatischen Abbau des Häms zu Biliverdin sowie Bilirubin. Infolgedessen begünstigt das gehäufte Vorkommen von Sauerstoffradikalen und Entzündungsmediatoren zum einen den oxidativen Abbau des Bilirubins zu den BOXes (über die Zwischenstufe der PDPs) und zum anderen den oxidativen Abbau des Biliverdins beziehungsweise des Bilirubins zu MVM.

Es ist anzunehmen, dass HDPs inhibierend auf BK-Kanäle wirken. Hou et al. beschrieben, dass BOXes die geschlossene BK-Kanal-Konformation stabilisieren und somit den Ionenfluss durch die Kanalpore reduzieren (Hou et al. 2011). Diese in glatten Gefäßmuskelzellen sowie Astrozyten exprimierte Kanäle leisten einen substantiellen Beitrag zur Gefäßtonusregulation, da sie einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration mit einem Ausstrom von  $K^+$  kompensieren und somit die Zellhyperpolarisation begünstigen können. Bei der HDP-induzierten BK-Kanal-Inhibition entfällt dieses zelluläre Entgegensteuern und resultiert demzufolge in vasokonstriktorisches Verhältnissen (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019).

### **1.2.5 Therapeutische Ansätze**

Als Grundstein der Therapie sowie der Prävention des zerebralen Vasospasmus diente jahrelang die Triple-H-Therapie. Basierend auf den hämodynamischen Beeinträchtigungen nach einer SAB sollte durch diesen therapeutischen Ansatz der zerebrale Blutfluss gesteigert werden. Eine Zunahme des zerebralen Blutflusses ist durch den Anstieg des systemischen Blutdruckes (Hypertension) sowie des Blutvolumens (Hypervolämie) und durch eine Senkung des Hämatokritwertes (Hämodilution) erreichbar (Rowland et al. 2012). Dankbaar et al. zeigten jedoch, dass das Triple-H-Schema nicht der bestmögliche therapeutische Ansatz ist (Dankbaar et al. 2010). Insbesondere die induzierte Hypervolämie wird nicht mit einem Benefit, sondern eher mit zusätzlichen Komplikationen, wie dem gehäuften Auftreten extraduraler Hämatome, erhöhter Blutungsneigung und kongestivem Herzversagen, assoziiert (Egge et al. 2001, Rinkel et al. 2004, Dankbaar et al. 2010). Es stellte sich heraus, dass anstelle einer aggressiven hypertensiven oder hypervolämischen Therapie die normovolämische Aufrechterhaltung eines zerebralen Perfusionsdruckes von 80 - 120 mmHg indiziert ist und die Komplikationsrate senken kann (Raabe et al. 2005, Athar und Levine 2012).

Ein bedeutender Eckpfeiler der Prävention des Vasospasmus ist der L-Typ-Kalziumkanal-Antagonist Nimodipin, welcher ab Diagnosesicherung einer SAB mit einer täglichen Dosis von 60 mg alle 4 Stunden über 21 Tage oral oder intravenös verabreicht wird. Nimodipin wurde entwickelt, um die Vasokonstriktion durch Inhibition des L-Typ-Kalziumkanaleinstroms zu verhindern (Bederson et al. 2009). Klinische Studien verdeutlichten, dass Nimodipin die Prognose der Patienten verbessert, jedoch

nicht den Vasospasmus verhindert (Feigin et al. 1998). Es ist eher anzunehmen, dass Nimodipin einer neuronalen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung entgegenwirkt und dementsprechend neuroprotektive Effekte im Vordergrund stehen (Petruk et al. 1988, Pisani et al. 1998, Findlay et al. 2016).

Wenn sowohl die Triple-H-Therapie als auch die Gabe von Nimodipin keinen Erfolg erzielen oder der Patient einen kritischen kardiopulmonalen Status aufweist, kann außerdem endovaskulär therapiert werden (Bederson et al. 2009, Diringier et al. 2011). Mittels perkutaner transluminaler Ballonangioplastie können proximale vasospastische Gefäße dilatiert werden und der zerebrale Blutfluss ansteigen (Firlik et al. 1997). Aufgrund der Angioplastie-assoziierten Komplikationsrate von etwa 5 % ist ein solcher Eingriff jedoch nicht prophylaktisch indiziert (Zwienenberg-Lee et al. 2008). Um distale Gefäße zu erreichen, können Vasodilatoren, wie beispielsweise Papaverin, proximal der Gefäßverengung intraarteriell injiziert werden. Die Wirkung der Vasodilatoren auf die Langzeitprognose ist allerdings umstritten und wurde in einigen Studien sogar als kontraproduktiv eingestuft (McAuliffe et al. 1995, Cross et al. 1998, Vajkoczy et al. 2001).

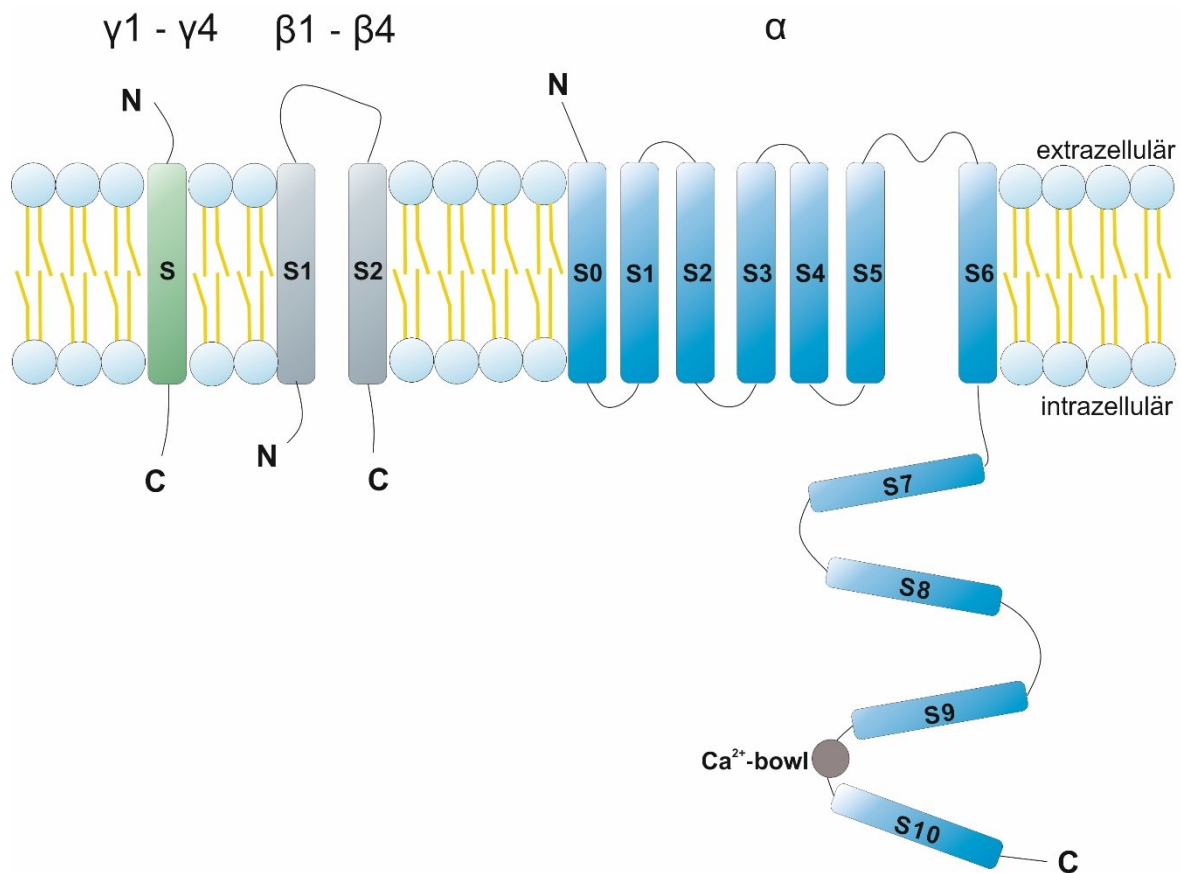
Aufgrund der umfassenden pathophysiologischen Vorgänge, die zur Entstehung des Vasospasmus beitragen, sind medikamentöse Präventionsansätze breit gefächert. Jedoch konnten weder Magnesium (Golan et al. 2013), Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (Macdonald et al. 2011, Macdonald et al. 2012), Statine (Su et al. 2014) noch die intraventrikuläre Applikation von NO-Donatoren (Thomas und McGinnis 2002) die Prognose der Patienten deutlich verbessern. Es ist aktuell Gegenstand der Forschung, eine effektive medikamentöse Therapie gegen die Entstehung sowie Auswirkungen des zerebralen Vasospasmus zu entwickeln.

### **1.3 BK-Kanal**

#### **1.3.1 Eigenschaften und Struktur**

Der BK-Kanal (Synonyme: Slo1-Kanal, Maxi-K, KCNM-Kanal) ist ein ubiquitär im Körper exprimierter Kaliumkanal, der einen großen  $\text{K}^+$ -Ausstrom von 250 pS aufweist (Butler et al. 1993). Obwohl der BK-Kanal der Superfamilie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (TM6V) untergeordnet ist, kann eine Kanalaktivierung auch durch intrazelluläre Ionen oder Moleküle erfolgen (Magleby 2003). Die  $\alpha$ -Untereinheit des Kanals wird durch das Slo1-Gen kodiert und zeichnet sich durch sechs

Transmembrandomänen aus, welche die Zellmembran durchspannen (Atkinson et al. 1991). Ergänzend zu den Slo1-kodierten Transmembransegmenten wird stets ein weiteres S0-Segment, das in Verbindung zum extrazellulären Milieu steht, mit der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals assoziiert (Meera et al. 1997) (Abb. 3). Vier Slo1-Proteine formieren zusammen ein Slo1-Tetramer, welches die Grundlage jedes BK-Kanals darstellt. Jede der vier  $\alpha$ -Untereinheiten besteht funktionell aus einer porenbildenden, spannungssensorischen und ionensensitiven Domäne (Wang und Sigworth 2009, Yuan et al. 2010, Giraldez und Rothberg 2017). Die Segmente S0 - S4 bilden die spannungssensorische Komponente des Kanals, welche über einen Aminosäure-Linker mit der porenbildenden Domäne verbunden ist. Im Unterschied zu anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen ist die Sensorsensitivität des BK-Kanals gering. Demnach muss eine größere Membranpotenzialänderung erfolgen, damit ein Ionenstrom erzielt werden kann. Diese Sensoreigenschaft verleiht dem Kanal jedoch die Fähigkeit, über einen großen Spannungsänderungsbereich arbeiten zu können (Stefani et al. 1997, Koval et al. 2007). Am C-terminalen Ende jeder  $\alpha$ -Untereinheit bildet die zytosolisch-terminale Domäne den chemischen Sensor. Zwei Kaliumstrom-regulierende Domänen (RCK 1 innerhalb der Segmente S7 und S8 sowie RCK 2 innerhalb S9 und S10) bestimmen den  $K^+$ -Efflux über die Zellmembran in Abhängigkeit der intrazellulären Liganden (Meera et al. 1997, Jiang et al. 2001, Jiang et al. 2002) (Abb. 3). Aufgrund der tetrameren Struktur des Kanals formen insgesamt acht RCK-Domänen einen intrazellulären Ring, der über einen Aminosäure-Linker mit der Kanalpore in Verbindung steht (Tao et al. 2017). Die Kanalpore wird durch die Segmente S5 und S6 gebildet. Eine GYG-Sequenz jeder  $\alpha$ -Untereinheit trennt das intrazelluläre vom extrazellulären Milieu und formt einen für  $K^+$  selektiven Porenfilter, der den  $K^+$ -Fluss durch die Zellmembran ermöglicht (Doyle et al. 1998). Es sei erwähnt, dass mit dem BK-Kanal sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Untereinheiten assoziiert sein können (Abb. 3). Da diese Untereinheiten bei der Regulation des Kanals von großer Bedeutung sind, werden diese im folgenden Kapitel genauer betrachtet.



**Abb. 3:** Darstellung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - sowie  $\gamma$ -Untereinheit des BK-Kanals. Die Segmente der  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden sich in ihrer funktionellen Zugehörigkeit. Die Transmembransegmente S0 - S4 bilden den Spannungssensor, S5 und S6 formen die Kanalpore. Die Ionensensitivität des Kanals wird durch die intrazellulären Segmente S7 - S10 ermöglicht. Eine oder mehrere  $\beta$ - und/oder  $\gamma$ -Untereinheiten können mit dem Kanal assoziiert sein.

### 1.3.2 Funktionsmechanismus und Regulation

Das wichtigste Signal für die Aktivitätssteigerung des BK-Kanals ist eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Ligandenbindungsplätze der zytosolischen Kanaldomäne sind für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  unterschiedlich affin. Die „ $\text{Ca}^{2+}$ -bowl“ der RCK 2-Domäne bindet mit hoher Affinität  $\text{Ca}^{2+}$  und kann die Energie der Konformationsänderung über einen Aminosäure-Linker an die Porendomäne übertragen, welche schließlich  $\text{K}^+$  permeieren lässt (Schreiber und Salkoff 1997, Yuan et al. 2010). Je höher die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist, desto größer ist auch der hyperpolarisierende Effekt des Kanals, wobei bei einer intrazellulären Konzentration unter 100 - 300 nM keine Kanalaktivität mehr zu verzeichnen ist (Jaggar

et al. 2000). Zudem können auch andere Ionen sowie Moleküle, wie etwa Magnesiumionen (Golowasch et al. 1986), Häm (Tang et al. 2003) und Ethanol (Dopico et al. 1998), die Aktivität des Kanals über die Bindung an die zytosolische Domäne modulieren. Ein weiterer Stimulus ist die durch den Spannungssensor detektierte Membranpotenzialänderung. Depolarisiert eine Zelle, nimmt dies der Spannungssensor wahr und übermittelt die Information auf bisher unvollständig aufgeklärten Weg an die Porendomäne, die den  $K^+$ -Ausstrom spannungsabhängig anpasst (Yang et al. 2015).

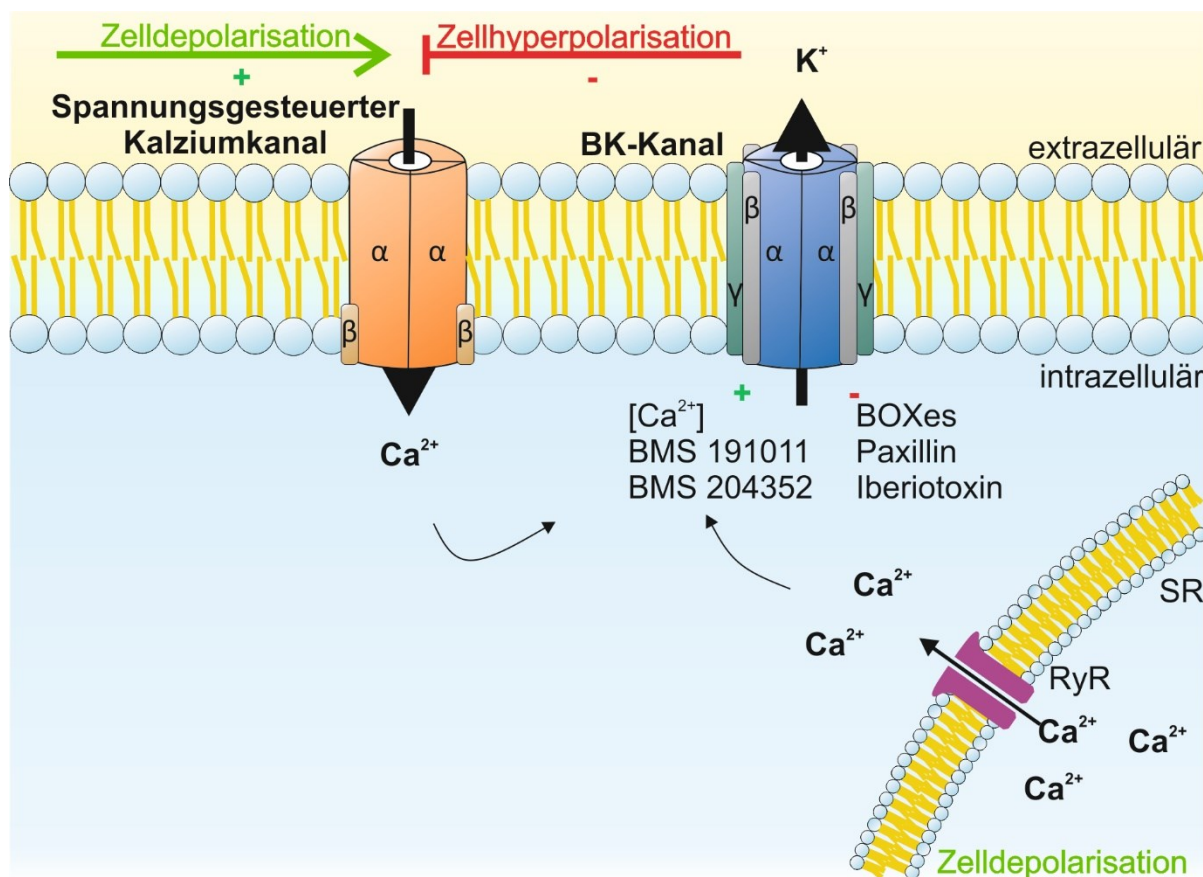
Die Regulationsmöglichkeiten des Kanals sind vielfältig und begründen sich teilweise in der Verbindung der Domänen untereinander. Beispielsweise kann durch die zytosolische Bindung von Magnesiumionen die Aktivität des Spannungssensors erhöht und somit wiederum die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals beeinflusst werden (Yang et al. 2007). Des Weiteren erhöhen akzessorische  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten sowohl die regulatorische als auch die phänotypische Vielfalt. Vier von unterschiedlichen Genen kodierte  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$  -  $\beta_4$ ) modulieren die Kinetik des BK-Kanals und beeinflussen die Kalzium- und Spannungssensitivität. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Spannung auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals mit der Anzahl der  $\beta$ -Untereinheiten steigt (Wang et al. 2002, Karlin 2015). Die genetische Ablation der vorwiegend in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten  $\beta_1$ -Untereinheit wird mit einem gesteigerten Gefäßtonus assoziiert (Brenner et al. 2000). Durch das mögliche Vorhandensein einer  $\gamma$ -Untereinheit ( $\gamma_1$  -  $\gamma_4$ ) kann die Aktivität in diversen Geweben zusätzlich beeinflusst werden. Die  $\gamma_1$ -Untereinheit scheint beispielsweise die Sensitivität der zerebralen glatten Gefäßmuskelzellen für  $Ca^{2+}$  zu erhöhen (Yan und Aldrich 2010, Li und Yan 2016). Des Weiteren kann die zytosolische Domäne posttranslational modifiziert und somit die Aktivität des Kanals angepasst werden (Shipston und Tian 2016).

### **1.3.3 Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen**

BK-Kanäle sind ubiquitär im Körper exprimiert und kommen in nahezu jedem Zelltyp vor (Salkoff et al. 2006). Aufgrund der vielfältigen Regulationsmechanismen kann der BK-Kanal zelltypspezifisch unterschiedliche Funktionen erfüllen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nachfolgend nur der Effekt auf das vaskuläre Gefäßmuskelsystem erläutert. Die in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten



BK-Kanäle leisten einen großen Beitrag zur Gefäßtonuskontrolle, da auf eine durch  $\text{Ca}^{2+}$  initiierte Zelldepolarisation ein  $\text{K}^+$ -Ausstrom durch den BK-Kanal aus der Zelle erfolgt (Jaggar et al. 2000). Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass BK-Kanäle in der Nähe des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, was einen schnellen Rückkopplungs-Mechanismus auf eine ansteigende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermöglicht (Ghatta et al. 2006). Durch den  $\text{K}^+$ -Ausstrom hyperpolarisiert die Membran glatter Gefäßmuskelzellen, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle schließen sich und das Gefäß dilatiert (Abb. 4).



**Abb. 4:** Einfluss des BK-Kanals auf das Membranpotenzial einer glatten Gefäßmuskelzelle. Der BK-Kanal steuert der Zelldepolarisation entgegen. Die durch die Zelldepolarisation resultierende erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom durch Ryanodinrezeptoren [RyR] aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [SR] in das Zytosol der glatten Gefäßmuskelzelle) bedingt die Aktivitätssteigerung des Kanals und ermöglicht einen verstärkten  $\text{K}^+$ -Ausstrom. Folglich hyperpolarisiert die Zelle und spannungsgesteuerte Kalziumkanäle werden vermehrt inhibiert. BK-Kanal-aktivierend wirken BMS 191011 sowie BMS 204352; BK-Kanal-inhibierend hingegen BOXes, Paxillin und Iberitoxin.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des BK-Kanals, beispielsweise durch Paxillin (PAX) oder Iberiotoxin (IbTX), gefäßverengend (Joerk et al. 2014), eine BK-Kanal-Aktivierung durch Substanzen wie BMS 191011 (Mori et al. 2011) oder BMS 204352 (Gribkoff et al. 2001) hingegen gefäßerweiternd beziehungsweise neuroprotektiv auf retinale Arteriolen wirkt. Der BK-Kanal kann somit vasokonstriktorisches Verhalten entgegenwirken und das Ruhemembranpotenzial glatter Gefäßmuskelzellen stabilisieren (Hu und Zhang 2012).

## 1.4 Proteinkinase C

### 1.4.1 Eigenschaften, Struktur und Signaltransduktion

Die Proteinkinase C (PKC) ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym der Serin/Threonin-Kinasen (Mellor und Parker 1998) und wurde Ende der siebziger Jahre durch Takai et al. entdeckt (Takai et al. 1977). Als Kinase phosphoryliert die PKC Serin- und Threoninreste nachgeschalteter Proteine, um deren Aktivität zu regulieren. Viele biologische Prozesse unterliegen der Regulation der PKC, so zum Beispiel das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Apoptose oder auch die Tumorinduktion (Nishizuka 1984).

Insgesamt kodieren neun Gene für zehn Isoformen der PKC (Hoque et al. 2014). Jedes Enzym besteht aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Die regulatorische Domäne beinhaltet eine autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz sowie eine Bindestelle für den aktivierenden *second messenger*. Die katalytische Domäne besteht aus einer ATP-Bindestelle, einer Substratbindestelle sowie einer Phosphattransferregion (Newton 1995, Mochly-Rosen et al. 2012). Die Unterteilung der Isoformen in die Gruppen konventionelle, neue oder atypische PKC erfolgt in Abhängigkeit der N-terminalen Struktur und des dementsprechenden Aktivierungsmechanismus (Nishizuka 1995, Mellor und Parker 1998). Der Expressionsgrad der jeweiligen Isoformen ist hierbei gewebeabhängig (Damron et al. 1998, Ward et al. 2004).

Die Aktivierung der PKC erfolgt über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der durch Hormone, wie beispielsweise Adrenalin, Wachstumsfaktoren und Dopamin, stimuliert wird und ein nachgeschaltetes G<sub>q</sub>-Protein aktiviert (Somlyo und Somlyo 2003). Das aktivierte G<sub>q</sub>-Protein stimuliert die Phospholipase C (PLC), welche wiederum ein membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die *second*

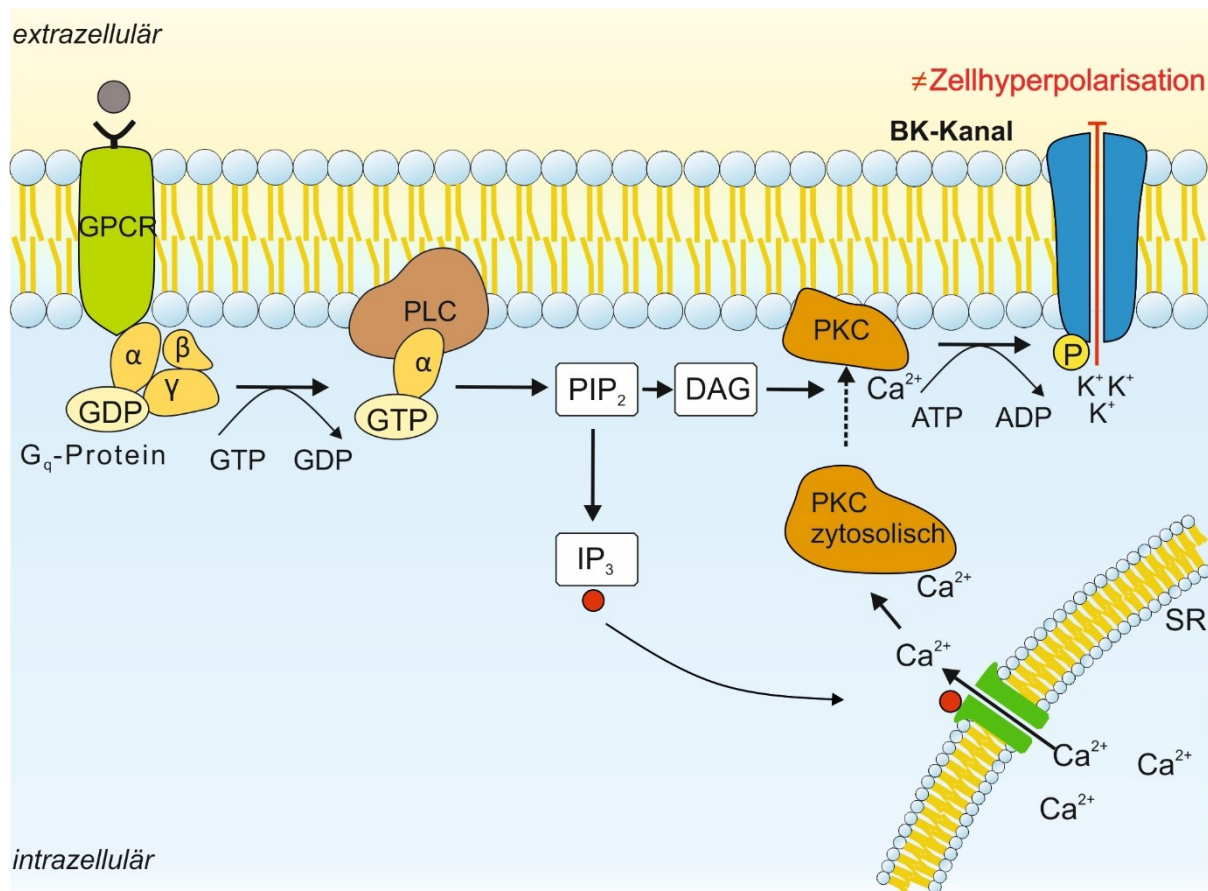
*messenger* Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet. Die entstehenden Transmitter aktivieren die PKC. Das IP<sub>3</sub> induziert den Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum, was in erster Linie für die konventionellen PKCs ein essenzieller Bestandteil der Aktivierung ist; das membranständige DAG stellt für die meisten Isoformen hingegen ein direktes Signal der Aktivierung dar (Mochly-Rosen et al. 2012). Nach der Aktivierung wandert die zytosolische PKC durch das Signal des DAGs an die Zellmembraninnenseite der Zelle (Saito 2003, Khalil 2013). Es scheint möglich, dass durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup> und/oder DAG eine Konformationsänderung im Enzym entsteht, weswegen vermehrt hydrophobe Aminosäuren an der Proteinoberfläche zum Vorschein kommen, welche dann dazu neigen, an Membranlipide zu binden. Ein weiterer Effekt der Konformationsänderung ist die Dissoziation der Pseudosubstratsequenz aus dem katalytischen Zentrum des Enzyms, welche die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine letztendlich ermöglicht (Newton 1995) (Abb. 5).

#### **1.4.2 Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen**

Der Gefäßtonus wird maßgeblich durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration geprägt. Die PKC ist in viele regulatorische Prozesse involviert, welche den Kalziumhaushalt beeinflussen. Beispielsweise kann die PKC die Aktivität von Ionenkanälen und Ionenpumpen oder die Sensitivität kontraktile Proteine für Ca<sup>2+</sup> modulieren. Zudem werden auch kalziumunabhängige Prozesse reguliert (Gerald und King 2010, Ringvold und Khalil 2017). Insgesamt überwiegen die vasokonstriktorisches die vasodilatatorischen Effekte, sodass eine PKC-Aktivierung aufgrund einer erhöhten intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eher mit vasokonstriktorisches Verhältnissen assoziiert wird (Wang et al. 2015).

Ein relevantes Beispiel ist die Phosphorylierung des BK-Kanals am C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit (Abb. 5). Durch die Phosphorylierung wird der offene Kanalzustand inhibiert, was zur Reduktion des K<sup>+</sup>-Ausstroms führt (Zhou et al. 2010). Studien zeigten, dass PKC-Aktivatoren, wie etwa Phorbol-12,13-Dibutyrat oder Thymeleatoxin, dem hyperpolarisierenden Effekt des BK-Kanals entgegenwirken. Demzufolge depolarisieren glatte Gefäßmuskelzellen, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle öffnen, die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt und das Gefäß verengt sich (Nelson und Alkon 1995, Ghatta et al. 2006). Diese Inaktivierung kann jedoch durch PKC-

Inhibitoren, wie beispielsweise Gouml (Gö) 6983, wieder aufgehoben werden (Barman et al. 2003).



**Abb. 5:** BK-Kanal-Inhibition durch die Proteinkinase C(PKC)-Phosphorylierung. Die PKC-Aktivierungskaskade wird durch die extrazelluläre Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) eingeleitet. Ein mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor assoziiertes intrazelluläres G<sub>q</sub>-Protein wird dabei durch den Austausch von GDP durch GTP aktiviert. Die α-Untereinheit des Proteins dissoziiert und stimuliert die Phospholipase C (PLC), welche ein membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die second messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet. IP<sub>3</sub> initiiert den Ca<sup>2+</sup>-Efflux aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und aktiviert die PKC indirekt über die gesteigerte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration; DAG aktiviert die PKC direkt. Die aktivierte PKC wandert an die Innenseite der Zellmembran, bindet ATP sowie die Zielstruktur des BK-Kanal-Proteins und phosphoryliert mithilfe der Phosphattransferregion die α-Untereinheit des BK-Kanals. Aufgrund der Inhibition des K<sup>+</sup>-Ausstroms entfällt der zellhyperpolarisierende Effekt des BK-Kanals.

### **1.4.3 Proteinkinase C und Subarachnoidalblutung**

Es ist bekannt, dass die PKC nach einer SAB vermehrt exprimiert wird. Die Ansätze zur Erklärung dieses Anstiegs sind vielfältig. Beispielsweise ist das DAG-Konzentrationslevel durch Sauerstoffradikale des subarachnoidalen Blutes erhöht, was zur direkten Aktivierung der PKC führen kann (Ohta et al. 1995). Des Weiteren wird beschrieben, dass HDPs die Aktivität der PKC steigern können. So konnte 2008 identifiziert werden, dass BOXes die PKC-Translokation zur Zellmembraninnenseite induzieren, was als Zeichen der gesteigerten PKC-Aktivität gilt (Pyne-Geithman et al. 2008). Es ist somit wahrscheinlich, dass HDPs Einfluss auf das Aktivitätslevel der PKC nehmen.

### **1.5 Einfluss der Subarachnoidalblutung auf die neurovaskuläre Kopplung**

Die neurovaskuläre Kopplung beschreibt die Regulation des zerebralen Blutflusses in Abhängigkeit von der regionalen Gehirnfunktion. Die Glieder der neurovaskulären Kopplung werden als neurovaskuläre Einheit zusammengefasst und bestehen aus Neuronen, Astrozyten und intrazerebralen Arteriolen (Iadecola und Nedergaard 2007, Attwell et al. 2010). Neuronen detektieren einen erhöhten Stoffwechsel über lokale Änderungen des pH-Wertes sowie eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blut. Auf diese chemischen Faktoren reagieren sie mit einer erhöhten Glutamatausschüttung. Das Glutamat aktiviert astrozytäre metabotrope Rezeptoren, welche IP<sub>3</sub>-induziert eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration initiieren. Folglich werden BK-Kanäle am astrozytären Endfuß vermehrt aktiviert (Price et al. 2002). Der resultierende K<sup>+</sup>-Ausstrom aktiviert K<sub>ir</sub>-Kanäle der nahe am Endfuß lokalisierten Arteriole. Der K<sup>+</sup>-Efflux durch K<sub>ir</sub>-Kanäle hyperpolarisiert wiederum glatte Gefäßmuskelzellen und dilatiert die Arteriole der neurovaskulären Einheit, sodass das Sauerstoff- sowie Glukoseangebot steigt (Filosa et al. 2006, Dunn und Nelson 2010).

Dieser Regulationsmechanismus wird durch die SAB beeinträchtigt und scheint sowohl mit der Minderversorgung des Hirngewebes als auch mit dem Entstehen des Vasospasmus assoziiert zu sein (Koide et al. 2013b). Das Zusammenspiel der Ionen ist pathophysiologisch entscheidend. Unter SAB-ähnlichen Bedingungen konnte in astrozytären Endfüßen eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration detektiert werden. Ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration über 700 nM aktiviert vermehrt BK-Kanäle, sodass der astrozytäre K<sup>+</sup>-Ausstrom größer wird. Steigt die

extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration zwischen Endfuß und Arteriole auf einen Wert von über 20 mM, kann das Phänomen der inversen neurovaskulären Kopplung beobachtet werden (Koide et al. 2012). Aufgrund der erhöhten extrazellulären  $K^+$ -Konzentration ändert sich die Stromrichtung der  $K_{ir}$ -Kanäle, glatte Gefäßmuskelzellen neigen zur Depolarisation, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle öffnen und die Arteriole verengt sich (Attwell et al. 2010, Girouard et al. 2010, Pappas et al. 2015).

Eine inverse Gefäßreaktion kann auch im Zuge von kortikalen *spreading depolarizations* nach einer SAB beobachtet werden (Dreier et al. 2009). Der Begriff *spreading depolarization* beschreibt eine Depolarisationswelle neuronaler und glialer Zellen, welche sich mit einer Geschwindigkeit von 2 - 5 mm/min ausbreitet (Lauritzen 1994). Durch diese etwa zweiminütige kortikale Dauererregung entsteht ein großer Anstieg der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration. Folglich wird die neuronale Kommunikation durch den Verlust des physiologischen Ionengradienten gestört (Kraig und Nicholson 1978). Die extrazellulären  $K^+$  werden durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase unter ATP-Verbrauch zurück in den intrazellulären Raum gepumpt. Im vitalen Hirngewebe entsteht so eine starke Vasodilatation, die auch als kortikale *spreading hyperemia* bezeichnet wird und etwa zwei Minuten anhält (Lauritzen 1994, Windmuller et al. 2005, Dreier 2011). Die *spreading hyperemia* dient der Anpassung des zerebralen Blutflusses an die erhöhten metabolischen Anforderungen kortikaler Strukturen sowie an den Abtransport anfallender toxischer Moleküle und Ionen (Hansen und Lauritzen 1984). Der entscheidende Mediator dieser Gefäßerweiterung ist NO, welches durch die gesteigerte Aktivität der nNOS in erregten Neuronen synthetisiert wird (Duckrow 1993, Dreier et al. 1998). Nach der Repolarisation der erregten Zellen sinkt der regionale zerebrale Blutfluss für etwa zwei Stunden um 20 – 30 % unter das Ausgangsniveau. Dieses Zeitintervall, welches durch eingeschränkte Vasoreaktivität gekennzeichnet ist, wird auch als kortikale *spreading oligemia* bezeichnet (Lauritzen 1994). Unter den pathologischen Bedingungen einer SAB wird anstelle der *spreading hyperemia* häufig eine inverse Gefäßreaktion beobachtet. Bei der Lyse von Erythrozyten des subarachnoidalen Blutes werden sowohl Hämoglobin als auch  $K^+$  freigesetzt. Die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration kann dementsprechend Werte von bis zu 50 mM annehmen (Ohta et al. 1983) und das freie Hämoglobin zudem die Bioverfügbarkeit des vasodilatatorischen NOs senken (Gibson und Roughton 1957, Dreier et al. 1998). Sinkt die NO-Bioverfügbarkeit bei einer erhöhten extrazellulären  $K^+$ -Konzentration, folgt auf eine *spreading depolarization* eine Gefäßverengung, die

zur kortikalen *spreading ischemia* führen kann (Dreier et al. 1998, Dreier et al. 2000). Durch die Vasokonstriktion wird die Energiezufuhr zum depolarisierten Areal limitiert, wodurch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen nicht ausreichend K<sup>+</sup> in die Zellen zurücktransportieren können (Mayevsky et al. 1982). Durch die langsame Normalisierung des Kaliumhaushaltes bleiben Neuronen länger im depolarisierten Zustand. Zusätzlich bleibt bis zum Erreichen des Schwellenwertes für K<sup>+</sup> der K<sub>ir</sub>-Kanäle die Gefäßkonstriktion bestehen. Die ischämischen Verhältnisse können Gewebeschäden sowie kortikale Nekrosen verursachen, die sich über den Kortex ausbreiten (Dreier et al. 1998, Dreier et al. 2000, Dreier 2011) und mit der Entstehung von DINDs nach einer SAB assoziiert werden (Dreier et al. 2006).

Es ist offensichtlich, dass der BK-Kanal einen großen Stellenwert im Ablauf der neurovaskulären Kopplung einnimmt. Sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Voraussetzungen stellt der Einfluss der HDPs auf den astrozytären BK-Kanal ein wichtiges Untersuchungsobjekt dar.

## 2 Ziele der Arbeit

Hämorrhagische Schlaganfälle, wie die aneurysmatische SAB, weisen eine Altersassoziation mit einem Inzidenzgipfel in der sechsten Lebensdekade auf. Einblutungen in den äußeren Liquorraum begünstigen die Entstehung des zerebralen Vasospasmus, welcher mit morphologischen sowie funktionellen Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation einhergeht und eine prognostisch ungünstige Sekundärkomplikation darstellt. Die Behandlungs- und Präventionsmöglichkeiten des Vasospasmus sind derzeit unzureichend, die Pathogenese ist nur lückenhaft aufgeklärt. Einen Ansatzpunkt der Pathogenese stellen oxidative Hämabbauprodukte (HDPs) dar, welche im Liquor von SAB-Patienten identifiziert werden konnten und einen inhibitorischen Effekt auf BK-Kanäle entfalten. BK-Kanäle werden ubiquitär exprimiert und leisten sowohl in der Membran glatter Gefäßmuskelzellen als auch astrozytärer Endfüße einen wichtigen Beitrag zur Gefäßtonusregulation. Die Inhibition der BK-Kanäle depolarisiert glatte Gefäßmuskelzellen und resultiert damit in der Konstriktion von Arteriolen.

Unter *in vitro*-Bedingungen sollten akute Hirnschnitte der Maus mittels Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie visualisiert und zeitliche Änderungen des Gefäßdurchmessers intrakortikaler Arteriolen während der Applikation von HDPs in Mischapplikation mit vasoregulatorischen Kofaktoren analysiert werden. Folgende zentrale Fragestellungen sollten hierbei beantwortet werden:

- Besteht eine Altersabhängigkeit der HDP-induzierten Gefäßkonstriktion?
- Zeigen noch nicht untersuchte HDPs Vasoaktivität auf?
- Eignen sich spezifische BK-Kanal-Aktivatoren zur Prävention der HDP-induzierten Vasokonstriktion?
- Kann die Testung zweier BK-Kanal-Inhibitoren einen zelltypspezifischen Effekt der HDPs aufzeigen?
- Ist die Proteinkinase C in die Pathogenese der HDPs involviert?
- Beeinflussen HDPs die neurovaskuläre Kopplung?

Die erhobenen Daten sollen zum besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie des zerebralen Vasospasmus beitragen und Ansätze für neue präventive Therapieoptionen zur Vermeidung neurologischer Defizite und zur Stärkung des neurorehabilitativen Potenzials nach einer SAB bieten.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Mäuse des Stammes C57BL6/J sowie homozygote Slo1-Knock-out-Mäuse (Slo1-KO, Slo1<sup>-/-</sup>) und Slo1-Wildtyp-Mäuse (Slo1-WT, Slo1<sup>+/+</sup>). In allen Experimenten wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Mäuse im Alter von 20 bis 30 Lebenstagen wurden als juvenil; Mäuse im Alter von 477 bis 645 Lebenstagen als adult bezeichnet.

Die C57BL/6J- und Slo1<sup>+/+</sup>-Mäuse wurden als unbelastete, die Slo1<sup>-/-</sup>-Mäuse als geringgradig belastete Tierlinie eingestuft. Die Beeinträchtigungen der KO-Tiere zeichneten sich durch Ataxie (Meredith et al. 2004), Xerophthalmie mit Blepharitis (= Augentlidenzündung), erhöhten Blutdruck (Sausbier et al. 2004) sowie Hochtonschwerhörigkeit aus (Ruttiger et al. 2004). Des Weiteren fiel ein geringeres Geburtsgewicht sowie eine verzögerte körperliche Entwicklung bis zur 12. Lebenswoche im Vergleich zu den Slo1<sup>+/+</sup>- und den Slo1<sup>+/-</sup>-Mäusen auf (Sausbier et al. 2004).

Die Haltung und Pflege der Tiere erfolgte in offener Käfighaltung bei einem Hell- / Dunkelrhythmus von 14 / 10 Stunden in der Zentralen Experimentellen Tierhaltung (ZET) in Jena-Lobeda (Forschungszentrum Lobeda, Haus F4, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena). Zur Vorbeugung einer Retinaatrophie wurden die albinotischen Slo1-Mäuse in abgedunkelten Räumen bei einer Lichtintensität von maximal 60 Lux gehalten. Wasser und Trockenfutter wurden ad libitum bereitgestellt.

Die Züchtung der Mäuse des Slo1-Stammes erfolgte auf Grundlage eines beim Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV) genehmigten Zuchtrahmenantrags mit der Registriernummer ZRA UKJ-17-013. Zur Generierung von Slo1<sup>+/+</sup>- und Slo1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden heterozygote Individuen (Slo1<sup>+/-</sup>) miteinander verpaart. Jede gezüchtete Maus wurde durch eine Tier-ID gekennzeichnet und in einer elektronischen Datenbank (PyRAT) erfasst. Die Organentnahmen waren gemäß der §1 und §4 Absatz 3 des TierSchG, Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken, legitimiert und durch die Tötungsanzeige TWZ-030-2017 beim TLV gemeldet. Die geforderte Sachkunde (FELASA B, EU-Tätigkeitsgebiet A) für die Durchführung der Anästhesie und Tötung von Versuchstieren war erfüllt.

### 3.2 Genotypisierung

Am Ende der zweiten Lebenswoche erfolgte über eine Schwanzspitzenbiopsie eine Genotypisierung jeder Maus. Die Genotypisierung lieferte die nötige Information über die Expression des Slo1-Gens und ermöglichte die Unterscheidung der Tiere in heterozygot, WT sowie KO. Nach jedem abgeschlossenen Experiment folgte eine Nachgenotypisierung durch die postmortale Gewinnung einer weiteren Schwanzspitzenbiopsie. Bei einem Widerspruch zur ersten Genotypisierung und der fälschlich erwiesenen Verwendung heterozygoter Mäuse wurden diese Experimente aus der Versuchsreihe ausgeschlossen.

Der Ablauf beider Genotypisierungen gestaltete sich wie folgt:

Zuerst wurde die DNA aus der entnommenen Schwanzspitze isoliert. Das Biopsat wurde mit 180 µl Gewebe-Lyse-Puffer und 20 µl Proteinkinase K versetzt und anschließend bei 56 °C und 300 Umdrehungen pro Minute für eine bis drei Stunden in einer Zentrifuge inkubiert. Die Lysereaktion der Proteinkinase K wurde nach der Inkubationszeit durch Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer und 200 µl absolutem Ethanol gestoppt.

Anschließend wurde das Lysat auf eine Trennsäule (DNA Isolation Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) pipettiert und einminütig bei 8000 \* g zentrifugiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Zur Gewährleistung der DNA-Reinheit erfolgte die Durchspülung in der Zentrifuge zweimalig mit 500 µl Wasch-Puffer. Der entstandene Durchfluss wurde wieder verworfen.

Mittels 20 µl Elutions-Puffer wurde die DNA aus der Säule in der Zentrifuge für eine Minute bei 8000 \* g eluiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt durchgeführt und das gewonnene Eluat bei 4 °C gelagert.

Anschließend wurden die aufgereinigten Proben in zwei Ansätze unterteilt. Dieser Schritt erwies sich als notwendig, da sich die Primer der WT- und der KO-Genomvariante bei der nachfolgenden PCR gegenseitig behindern würden.

Die Bestandteile des PCR-Reaktionsansatzes waren die in Tab. 1 aufgeführten:

Stoff	WT	KO
Gibco Wasser (Qiagen)	2,7	2,7
5 * Q-Buffer (Qiagen)	2	2
10 * 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 Exon 1 5'	0,5	-
Primer WT 3'	0,1	-
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,1	0,1

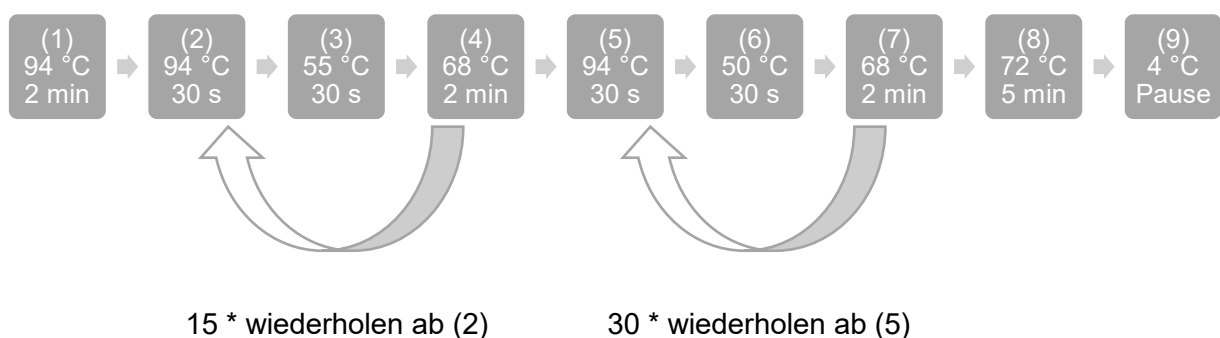
**Tab. 1:** Zusammensetzung der PCR-Ansätze für WT und KO in  $\mu$ l.

Die Sequenz der verwendeten Primer (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) lautete:

- Neo: 5'-ATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'
- RA 14025: 3'-CCTCAAGAAGGGGACTCTAAAC-5'
- Exon1: 5'-TTCATCATCTTGCTCTGGCGGACG-3'
- WT: 3'-CCATAGTCACCAATAGCCC-5'

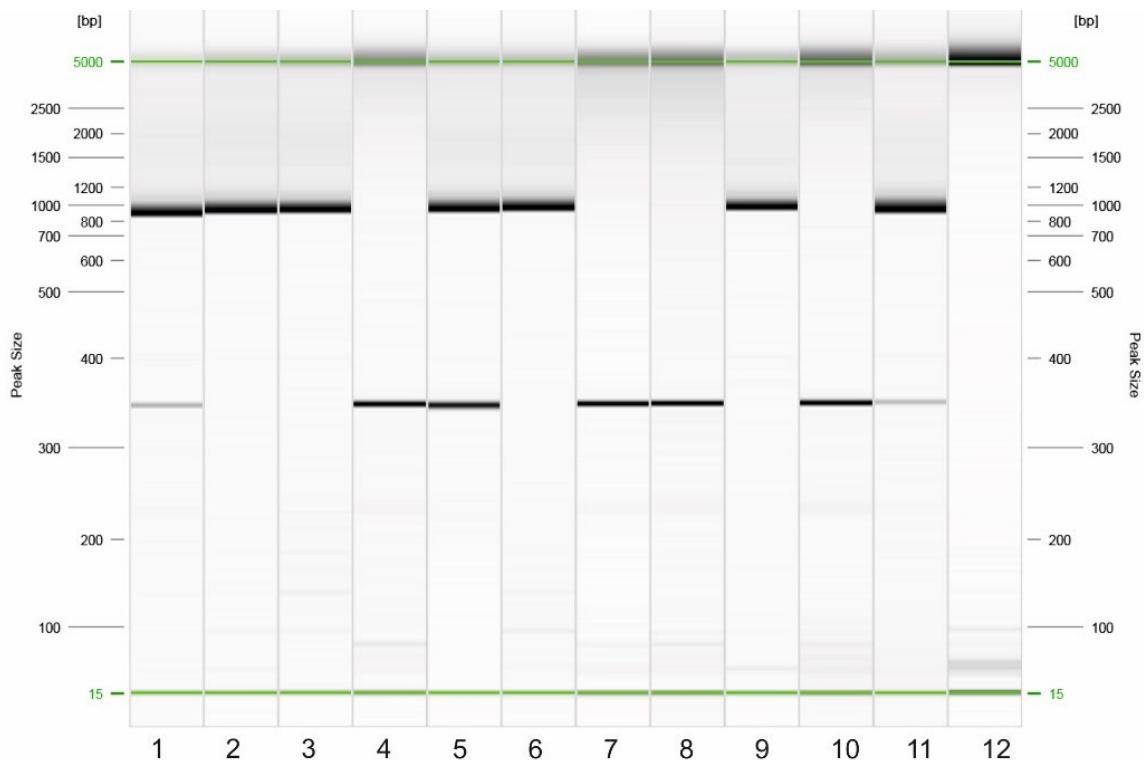
3  $\mu$ l der eluierten DNA wurden zu jedem Ansatz hinzugegeben.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Thermozykler (Biometra TRIO 48, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) mit dem in Abb. 6 dargestellten Ablauf.



**Abb. 6:** Thermischer Ablauf der PCR im Biometra TRIO 48.

Die Ergebnisse der PCR wurden anschließend durch eine Gelelektrophorese mit QIAxcel Advanced (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) visualisiert. Als Kartusche diente das QIAxcel DNA-Screening-Kit 2400 (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Hierbei wurde die Trennung der Reaktionsansätze eines Biopsats wieder aufgehoben und für die Gelelektrophorese wiedervereint. Der Unterschied zwischen den heterozygoten (1, 5), den WT- (4, 7, 8) und den KO-Mäusen (2, 3, 6) wird in Abb. 7 ersichtlich.



**Abb. 7:** Ergebnis einer Gelelektrophorese von acht Biopsien (1 - 8) verglichen mit den vier Kontrollen: KO (9), WT (10), heterozygot (11) sowie Wasser (12). KO-Bande: 1000 Basenpaare; WT-Bande: 332 Basenpaare. KO: Biopsie 2, 3, 6; WT: Biopsie 4, 7, 8; heterozygot: Biopsie 1, 5.

### 3.3 Lösungen

#### 3.3.1 aCSF-Liquorersatzlösungen

Ein grundlegendes Element der Hirnschnittversorgung sowohl während der Hirnpräparation als auch während der Mikroskopie ist die kontinuierliche Umspülung mit oxygenierter artifizierlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF), deren Zusammensetzung an die des natürlichen Liquor cerebrospinalis angepasst ist.

Zur Herstellung der aCSF-Lösungen wurden vier Stammlösungen angefertigt und bei 4 - 6 °C gekühlt aufbewahrt. Die aCSF-Stammlösung beinhaltete die in Tab. 2 aufgeführten Substanzen, welche bis zum Erreichen des Endvolumens von 1000 ml in doppelt destilliertem Wasser (dd H<sub>2</sub>O) gelöst wurden.

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

**Tab. 2:** Zusammensetzung der aCSF-Stammlösung. Die Substanzen wurden bis zum Erreichen des Endvolumens (1000 ml) gemeinsam in dd H<sub>2</sub>O gelöst.

Zusätzlich zur aCSF-Stammlösung wurden jeweils 100 ml einer CaCl<sub>2</sub>-, MgCl<sub>2</sub>- und Glukose-Stammlösung hergestellt (Tab. 3) und gekühlt in einem jeweiligen Vorratsgefäß gelagert. Zum Erreichen der Zielvolumina wurde dd H<sub>2</sub>O verwendet.

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

**Tab. 3:** Zusammensetzung der CaCl<sub>2</sub>-, MgCl<sub>2</sub>- und Glukose-Stammlösung. Die jeweilige Substanz wurde bis zum Erreichen des Endvolumens (100 ml) in dd H<sub>2</sub>O gelöst.

Unter Verwendung der vier Stammlösungen wurden an jedem Versuchstag zwei verschiedene aCSF-Lösungen unterschiedlicher Temperierung hergestellt (Tab. 4) und für mindestens eine halbe Stunde mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid) vor pH-Adjustierung oxygeniert.

<b>Substanz</b>	<b>Präparationslösung (500 ml)</b>		<b>Messlösung (1000 ml)</b>	
	<b>Konzentration</b> [mM]	<b>Volumen</b> [ml]	<b>Konzentration</b> [mM]	<b>Volumen</b> [ml]
<b>NaCl</b>	125	50	125	100
<b>KCl</b>	4		4	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25		25	
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Monohydrat</b>	1,25		1,25	
<b>CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat</b>	0,5	0,25	2	2
<b>MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat</b>	6	3	1	1
<b>Glukose-Monohydrat</b>	10	2,5	10	5
<b>dd H<sub>2</sub>O</b>		444,25		892
Soll-pH von 7,4 bei Oxygenierung mit Carbogen				

**Tab. 4:** Zusammensetzung der unterschiedlich temperierten aCSF-Präparations- sowie Messlösung.

Die Präparationslösung wurde durch ein Eisbad auf 3 - 4 °C abgekühlt. 800 ml der Messlösung wurden in ein Vorratsgefäß gefüllt, welches für die Umspülung der Hirnschnitte unter dem Mikroskop kontinuierlich auf 35 °C in einem Wasserbad erwärmt wurde; die restlichen 200 ml wurden zur Lagerung der Hirnschnitte bei Raumtemperatur verwendet. Anschließend wurde der pH-Wert beider Lösungen gemessen und an den Zielwert von pH = 7,4 angepasst. Als Säure diente hierbei HCl [2 M] (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), als Base NaOH [1 M] (Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland).

### **3.3.2 Noradrenalin-Lösung**

Noradrenalin (NA) wurde tiefgekühlt gelagert (pulverförmig; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Zur Herstellung einer NA-Lösung für die Positivkontrolle am Ende eines Experimentes wurde 1 mg NA abgewogen und in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) gelöst. Die NA-Lösung wurde anschließend aliquotiert und bei 4 - 6 °C gekühlt aufbewahrt. Am Ende eines Experimentes wurden 10 µl NA-Lösung für die Positivkontrolle in die lichtdurchlässige Kammer des Mikroskops appliziert.

## **3.4 Substanzen**

### **3.4.1 L-NAME**

Als *L*-Arginin-Analogon beeinträchtigt *L*-NAME die NO-Synthese über unspezifische NOS-Inhibition (Dwyer et al. 1991, Moore und Handy 1997). Die dementsprechende Reduktion der Bioverfügbarkeit des vasodilatatorischen NOs erzeugt eine Gefäßvorspannung, die den fehlenden Gefäßtonus im Hirnschnittmodell simulieren kann. *L*-NAME (M = 269,69 g/mol; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde als Feststoff tiefgekühlt bei -20 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden 5,4 mg *L*-NAME abgewogen und in 200 ml aCSF-Messlösung zu einer *L*-NAME-Lösung [100 µM] vermischt und anschließend oxygeniert. Die *L*-NAME-Lösung diente während der Experimente als Lösungsmittel für die zu testenden Substanzen. Da *L*-NAME über den ganzen Versuchszeitraum leicht vasokonstriktorisch wirkte, wurde bei Messreihen mit zusätzlicher Substanzapplikation die Gefäßreaktion mit einer *L*-NAME-Kontrollgruppe (Langguth 2019) verglichen (nachfolgend als Kontrolle bezeichnet), um einen additiven Effekt auszuschließen.

### 3.4.2 PDPs

PDPs ( $M = 319,13 \text{ g/mol}$ ) sind Intermediate des oxidativen Bilirubin-Abbaus und somit eine direkte Vorstufe der BOXes. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Isomerenpaar Z-PDP A1/A2 (nachfolgend als PDP A bezeichnet) verwendet.

Die Aufreinigung und Bereitstellung der Substanzen erfolgte durch Marcel Ritter vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie Jena (IAAC).

Mithilfe der Degradierung des Bilirubins wurden die Intermediate gewonnen. 5 g Bilirubin (8,6 mmol) wurden für 24 Stunden 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 %igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung im Zeitrahmen von vier Stunden erreicht werden. Anschließend wurde das entstandene Gemisch für weitere 20 Stunden gerührt. Zur Isolierung der bei diesem Prozess entstandenen Abbauprodukte wurden die BOXes durch Zugabe von Chloroform vom Hämoglobin extrahiert. PDP A konnte 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 Acetonitril und Wasser (im Verhältnis 1:4) die Intermediate eluiert. Die Trocknung der Einzelisomere erfolgte in einer Vakuumzentrifuge, die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (LC-8A, Shimadzu, Kyoto, Japan) fand mit einer HTEC C18-Säule (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 16 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und SPD-10AV UV/Vis-Detektion bei 280 nm statt. Die Notwendigkeit des direkten Gefrierens der HPLC-Fractionen mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) im Anschluss der HPLC 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 stabilisierten Einzelisomere konnten für die Verwendung im Experiment in der gewünschten Menge gemischt und konzentriert werden.

Die Lagerung von PDP A erfolgte bei 4 - 6 °C in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen. Ein solches Gefäß beinhaltete die bereits abgewogene Masse von PDP A für die Lösung in 30 ml L-NAME-Lösung. Die Endkonzentration des verwendeten PDP A-Isomerenpaares im Perfusat betrug 0,5  $\mu\text{M}$ . Bei Mischapplikationen wurde stets zuerst PDP A und anschließend die zusätzliche Substanz in Lösung gebracht.



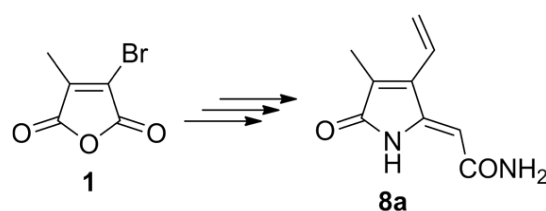
Eine publizierte Messreihe unter gleichen Versuchsbedingungen zur Wirkung von PDP A in Hirnschnitten juveniler Mäuse diente bei der Testung von PDP A in Hirnschnitten adulter Mäuse, bei den Versuchen mit BK-Kanal-Aktivatoren und -Inhibitoren sowie beim Einfluss der PKC als Kontrollgruppe (nachfolgend als PDP A-Kontrolle bezeichnet) (Joerk et al. 2019).

### 3.4.3 BOXes

Die Gewinnung von Z-BOX A ( $M = 179,2 \text{ g/mol}$ ) (nachfolgend als BOX A bezeichnet) erfolgte im Kontrast zu PDP A über einen chemischen Syntheseprozess, der zum einen von der Firma Laborchemie Apolda GmbH und zum anderen von Daniel Schulze (IAAC) unter der Leitung von Professor Matthias Westerhausen erfüllt wurde (IAAC).

Das Ausgangsprodukt war 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion, das durch vier bis sechs Stufen, wie beispielsweise Vinylierungen und Ringtransformationen, zu dem Endprodukt BOX A reagierte (Abb. 8). Die Wahl des synthetischen Weges begründete sich im Gewinn eines höheren Ertrages verglichen mit einem etwaigen Degradationsprozess zur Gewinnung der Substanz.

Die Substanz wurde anschließend durch Marcel Ritter portioniert, in lichtgeschützte Reaktionsgefäße abgefüllt und gekühlt bei  $4 - 6 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die abgewogene Substanz wurde durch Zugabe von 30 ml L-NAME-Lösung lichtgeschützt in Lösung gebracht, sodass die Endkonzentration der Substanz in der Lösung  $5 \text{ } \mu\text{M}$  betrug.



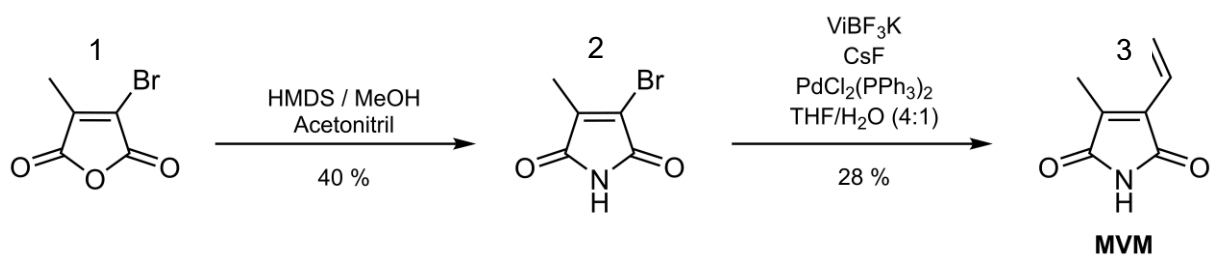
**Abb. 8:** Schema des chemischen BOX A-Syntheseweges von der Ausgangssubstanz 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion (1) zum Endprodukt Z-BOX A (8a) (Klopfleisch et al. 2013).

Eine publizierte Messreihe unter gleichen Versuchsbedingungen zur Wirkung von BOX A in Hirnschnitten juveniler Mäuse diente bei der Testung von BOX A in Hirnschnitten adulter Mäuse sowie bei der Versuchsreihe des Dihydro-BOX A als Kontrollgruppe (nachfolgend als BOX A-Kontrolle bezeichnet) (Joerk et al. 2019).

Zudem wurde Dihydro-Z-BOX A (nachfolgend als Dihydro-BOX A bezeichnet), ein an der Vinylgruppe hydriertes BOX A-Molekül, durch Daniel Schulze synthetisiert. Die Substanz wurde durch Marcel Ritter portioniert, in lichtgeschützte Reaktionsgefäße abgefüllt und gekühlt bei 4 - 6 °C gelagert. Durch Zugabe von 30 ml *L*-NAME-Lösung konnte der Feststoff in Lösung gebracht und unter lichtgeschützten Bedingungen auf Vasoaktivität geprüft werden. Die Dihydro-BOX A-Endkonzentration in der Lösung betrug 5 µM.

### 3.4.4 MVM

Das aus dem oxidativen Hämabbau entstehende Endprodukt MVM (M = 135,9 g/mol) wurde durch Daniel Schulze aus 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion synthetisiert (Abb. 9). Als Feststoff neigt MVM bei Raumtemperatur schnell zu polymerisieren und somit langkettige Moleküle zu bilden. Um diesen Prozess zu unterdrücken, wurde MVM [5 µM] in 50 ml aCSF-Messlösung durch Marcel Ritter portioniert und lichtgeschützt in Falcon-Tubes<sup>®</sup> aufbewahrt. Ein mit MVM gefülltes Falcon-Tube<sup>®</sup> wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn aus dem Kühlschrank entnommen, in einen Standzylinder umgefüllt, oxygeniert und nach anschließender pH-Wert-Adjustierung (auf 7,4) für die Hirnschnittumspülung erneut oxygeniert. Sowohl vor Beginn als auch im Anschluss der Experimente wurde die Reinheit des MVMs durch Kernspinresonanzspektroskopie sowie Elementaranalysen von Daniel Schulze kontrolliert.



**Abb. 9:** Schema des MVM-Syntheseweges von der Ausgangssubstanz 3-Bromo-4-methylfuran-2,5-dion (1) über 3-Bromo-4-methylpyrrol-2,5-dion (2) zu MVM (3) (Schulze 2020).

### **3.4.5 BK-Kanal-Aktivatoren**

#### ***BMS 191011***

5 mg BMS 191011 (M = 370,71 g/mol; pulverförmig; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden zusammen mit 1,35 ml DMSO (nachfolgend stets von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland erworben) eine Minute lang gevortext (maximale Löslichkeit in DMSO laut Hersteller: 20 mg/ml). Anschließend wurden jeweils 50 µl der resultierenden BMS 191011-Stammlösung [10 mM] aliquotiert und gekühlt bei 4 - 6 °C gelagert. Zur Testung der Substanz im Experiment wurden 30 µl der Stammlösung aus einem Aliquot entnommen und zu 30 ml oxygenierter L-NAME-Lösung für die gewünschte Endkonzentration von 10 µM hinzugegeben.

#### ***BMS 204352***

5 mg BMS 204352 (M = 359,70 g/mol; pulverförmig; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden zusammen mit 1,39 ml DMSO eine Minute lang gevortext (maximale Löslichkeit in DMSO laut Hersteller: 20 mg/ml). Infolgedessen wurden jeweils 50 µl der resultierenden BMS 204352-Stammlösung [10 mM] aliquotiert und bei -20 °C tiefgekühlt aufbewahrt. 30 Minuten vor Testung der Substanz wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut, 30 µl der Stammlösung entnommen und für die Endkonzentration von 10 µM in 30 ml oxygenierte L-NAME-Lösung hinzugegeben.

### **3.4.6 BK-Kanal-Inhibitoren**

#### ***Paxillin (PAX)***

5 mg PAX (M = 435,56 g/mol; pulverförmig; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden zusammen mit 1,15 ml DMSO eine Minute lang gevortext. Anschließend wurden jeweils 50 µl der resultierenden PAX-Stammlösung [10 mM] aliquotiert und gekühlt bei 4 - 6 °C gelagert. Zur Testung der Substanz im Experiment wurden 3 µl eines Aliquots entnommen und zu 30 ml oxygenierter L-NAME-Lösung für die gewünschte Endkonzentration von 1 µM hinzugegeben.

#### ***Iberitoxin (IbTX)***

100 µg IbTX (M = 4248,86 g/mol; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; rekombinant hergestellt von *Mesobuthus tamulus*) wurden in 1,15 ml aCSF-Lösung gelöst und eine Minute lang gevortext. Anschließend wurden jeweils 10 µl der resultierenden IbTX-

Stammlösung [20 µM] aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren aufbewahrt. 30 Minuten vor Testung der Substanz wurden zehn Aliquote (100 µl) bei Raumtemperatur aufgetaut und für die Endkonzentration von 50 nM in 40 ml oxygenierte *L*-NAME-Lösung hinzugegeben.

### **3.4.7 Proteinkinase C-Inhibitor**

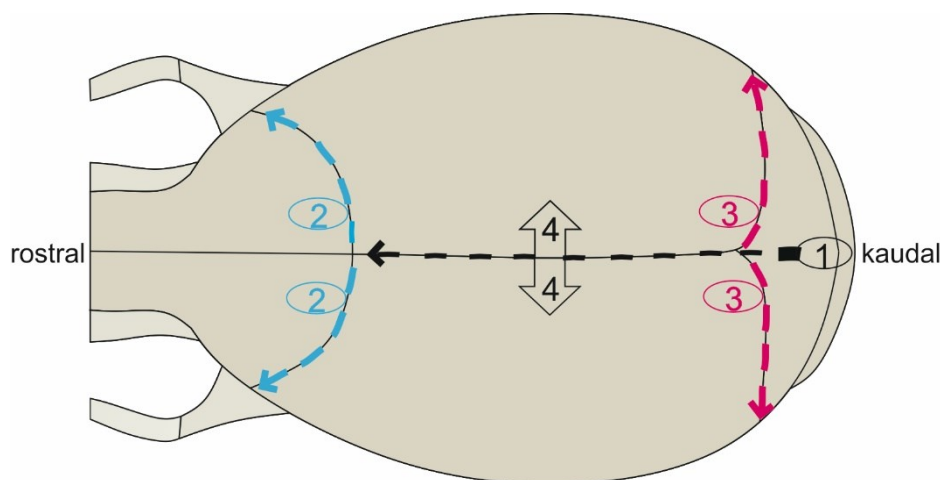
5 mg des Breit-Spektrum-PKC-Inhibitors Gö 6983 (M = 442,50; pulverförmig; abcam, Cambridge, UK) wurden in 1,13 ml DMSO gelöst. Die entstandene Gö 6983-Stammlösung [10 mM] (Löslichkeitsgrenze laut Hersteller: 50 mM) wurde nach Aliquotierung (je 50 µl) bei -20 °C tiefgekühlt aufbewahrt. Eine Stunde vor Beginn der Testung von Gö 6983 wurde eine tiefgefrorene Probe der Stammlösung bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 3 µl in ein Endvolumen von 30 ml *L*-NAME-Lösung pipettiert und die resultierende Gö 6983-Lösung [1 µM] für eine Minute gevortext.

### **3.5 Hirnschnittpräparation**

Zur Präparation akuter Hirnschnitte wurde die Maus in einer Glasglocke mit flüssigem Isofluran (1 ml/ml, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland), welches auf ausgelegtes Papier geträufelt wurde, anästhesiert. Nach Einsetzen der Schnappatmung sowie Überprüfung des negativen Zehenzwischenreflexes wurde das Tier zur Hirnentnahme getötet. Während juvenile Mäuse dekapitiert wurden, ging bei den adulten Mäusen der Dekapitation zusätzlich die zervikale Dislokation voraus. Die Narkotisierung und Tötung der Mäuse erfolgte durch fachkundiges Personal mit anerkannter Berufsausbildung (Biologe, Arzt, Biologisch-technischer Assistent) und gültigem Sachkundenachweis (FELASA B, EU-Tätigkeitsgebiet A).

Der Dekapitation folgte die Entfernung der Kopfhaut mithilfe einer kleinen Schere sowie einer Pinzette. Als obligat für eine sichere Scherenführung erwies sich die Fixierung des Mausschädels mithilfe einer Pinzette in den Orbitae. Anschließend wurde die Schädelkalotte unter Zuhilfenahme eines OP-Stereomikroskops (Karl Kaps GmbH & Co. KG, Aßlar, Deutschland) in einer Petrischale, die zuvor mit eiskalter oxygenierter aCSF-Präparationslösung befüllt wurde, präpariert (Abb. 10). Okzipital des Schnittpunkts von Sagittal- und Lambdanaht wurde der Schädelknochen mit einer Federschere eröffnet, ohne das darunter liegende Gehirn zu verletzen. Der

Interhemisphärenspalt bildete die Schnittlinie der Federschere bis zum Schnittpunkt von Sagittal- und Frontalnaht. An den Enden des Schnittes entlang der Sagittalnaht folgte nun sowohl nach links als auch nach rechts, entlang der Lambda- sowie der Koronarnaht, ein Schnitt bis an die Schädelbasis, um ein laterales Aufklappen der Parietalplatten zu erleichtern. Anschließend wurden die Parietalplatten sowie die Hinterhauptschuppe entfernt, sodass das Gehirn vollständig frei lag. Infolgedessen wurde mithilfe eines Skalpells das nicht benötigte Kleinhirn, der Riechkolben und das präfrontale Hirn geradlinig vom Rest des Gehirns getrennt und verworfen. Das nun separierte Gehirn konnte unter Zuhilfenahme eines gebogenen Spatels von der Schädelbasis abgehoben und auf den gekühlten Probenhalter des Vibrotoms (Leica VT1200 S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) mit Sekundenkleber (UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland) frontalseitig fixiert werden.



**Abb. 10:** Vorgehensweise der Schädelöffnung. (1) stellt den Schnitt entlang der Sagittalnaht dar. Von den Enden des ersten Mikroscherenschnittes wurde entlang der Koronar- (2) sowie der Lambdanaht (3) nach lateral geschnitten. Anschließend konnten die Parietalplatten weggeklappt (4) und das Großhirn nach Trennung vom Kleinhirn, Riechkolben sowie vom präfrontalen Hirn entnommen werden.

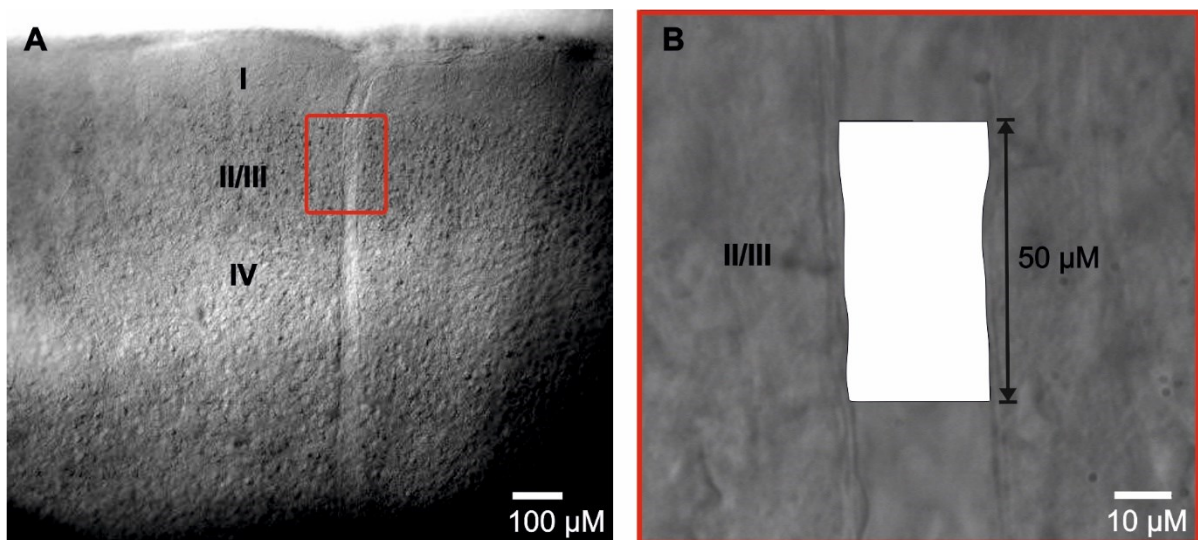
Der Probenhalter wurde unverzüglich in die Wanne des Vibrotoms eingesetzt, welche ebenfalls mit eiskalter oxygenierter aCSF-Präparationslösung gefüllt wurde. Mittels einer zuvor kalibrierten Klinge wurden bis zu neun 350 µm dünne Hirnschnitte in koronaler Ebene geschnitten. Die Vorschubgeschwindigkeit der Klinge betrug 0,12 mm/s, die Schwingungsamplitude 1,0 mm. Abschließend wurden die Hirnschnitte in ein Becherglas mit raumtemperierter aCSF-Messlösung transferiert. Zur Adaptation

an die veränderte Temperatur- und Ionenzusammensetzung der aCSF-Messlösung wurde eine Verweildauer von mindestens 30 Minuten bis zum Beginn der mikroskopischen Messung eingehalten.

### **3.6 Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie**

Die im Becherglas aufbewahrten Hirnschnitte wurden nach Ablauf der Adaptationszeit in die lichtdurchlässige Kammer des Differentialinterferenzkontrast-Mikroskops (DIC-Mikroskops) transferiert und auf ihre Eignung zur Gefäßmessung analysiert. Das durch einen Temperaturregler (Badcontroller V, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) auf 32,5 °C erwärmte zulaufende sowie ablaufende Polyethylenschlauchsystem stand mit der Kammer des Durchlichtmikroskops (Eclipse FN 1, Nikon Instruments, Tokio, Japan) in Verbindung zu einem mit aCSF-Messlösung gefüllten Vorratsgefäß, das kontinuierlich mit Carbogen begast wurde. Die durch ein Wasserbad auf 35 °C erwärmte aCSF-Messlösung wurde durch eine Peristaltikpumpe (Behr Labor-Technik PPH5064, Düsseldorf, Deutschland) mit einer Pumpgeschwindigkeit von 5 ml/min durch das Schlauchsystem transportiert. Durch diesen Versuchsaufbau konnte ein Erhalt der Vitalität des Hirnschnittgewebes über durchschnittlich 6 Stunden gewährleistet werden. Die DIC-Mikroskopie bietet die Möglichkeit, transparente Phasenobjekte durch Differenzen in den optischen Wellenlängen sichtbar zu machen und somit hohe Kontrastverhältnisse zu schaffen. Der DIC entsteht durch den Einbau eines Polarisationsfilters sowie eines Nomarski-Prismas sowohl vor dem Kondensator als auch hinter dem Objektiv des Durchlichtmikroskops (Murphy 2012). Die hohen Kontrastverhältnisse sind notwendig, um das Endothel deutlich vom Lumen des Gefäßes abgrenzen zu können. Die Schicht II/III des visuellen sowie parietalen Kortex wurde nach senkrecht zur Hirnoberfläche verlaufenden Arteriolen durch ein Wasserimmersionsobjektiv (Nikon LWD 16x/0.80W DIC N2, Nikon Instruments, Tokio, Japan) abgesucht und das Bild über einen Analog-Digital-Konverter (Hamamatsu Kamera Kontroller C2400, Hamamatsu Photonics, Japan) digitalisiert. Mithilfe des Kamera-Kontrollers konnten bei Bedarf zusätzlich die Helligkeits- und Kontrastverhältnisse moduliert werden. Die digitalisierten Bilder wurden über das Programm View Creator Pro (Version 1.7.3.0401, AdLink, Neu-Taipeh, Taiwan) auf einem Standrechner geöffnet. Im Abstand von fünf Minuten entstanden die zu analysierenden Bilder einer Arteriole, welche im Windows Bitmap-Dateiformat gespeichert wurden. Um die Qualität des Hirnschnitts langfristig zu gewährleisten und

den möglichen Einfluss der Lichtquelle des Mikroskops auf die pharmakologisch zu testenden Substanzen zu reduzieren, wurde die Beleuchtungszeit durch Ausschalten der Lichtquelle zwischen den Bildaufnahmen so gering wie möglich gehalten. Eine Arteriole wurde nur zur Messung ausgewählt, wenn der Gefäßdurchmesser zwischen 15 und 50  $\mu\text{m}$  betrug und das Gefäßlumen über eine Länge von mindestens 50  $\mu\text{m}$  deutlich vom Gefäßendothel abgegrenzt werden konnte (Abb. 11). Wenn sich die Gefäßsuche sowohl auf der Vorder- als auch auf der Rückseite des Präparats als nicht erfolgreich erwies, wurde der Hirnschnitt verworfen.



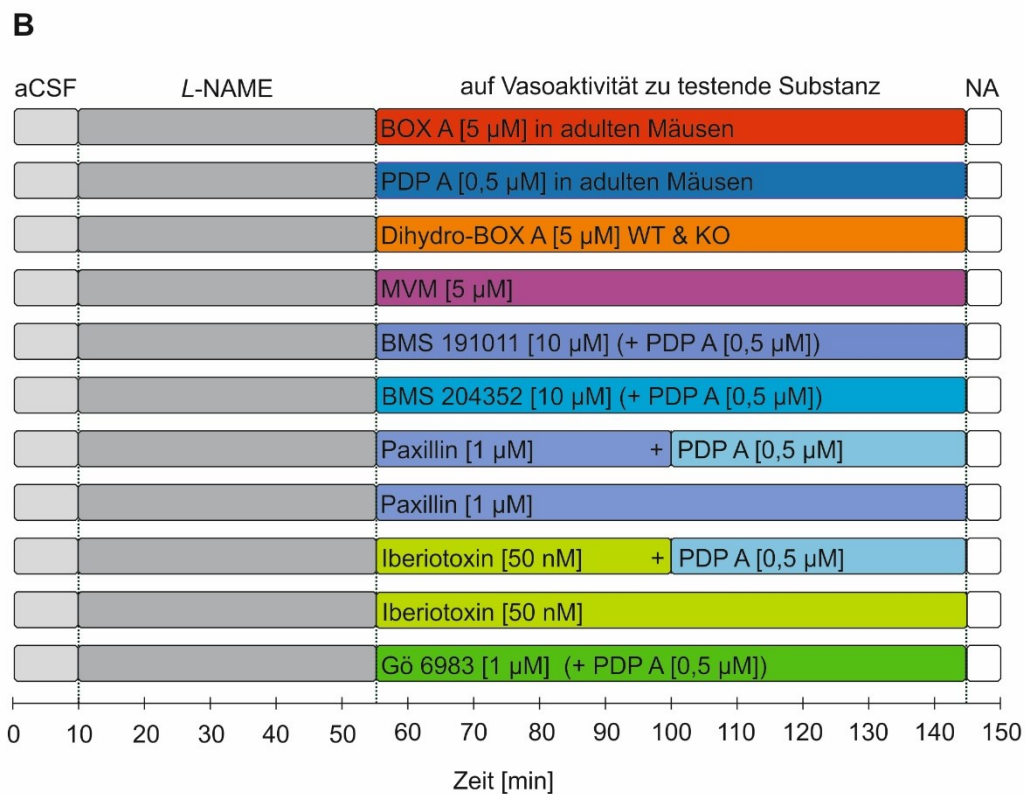
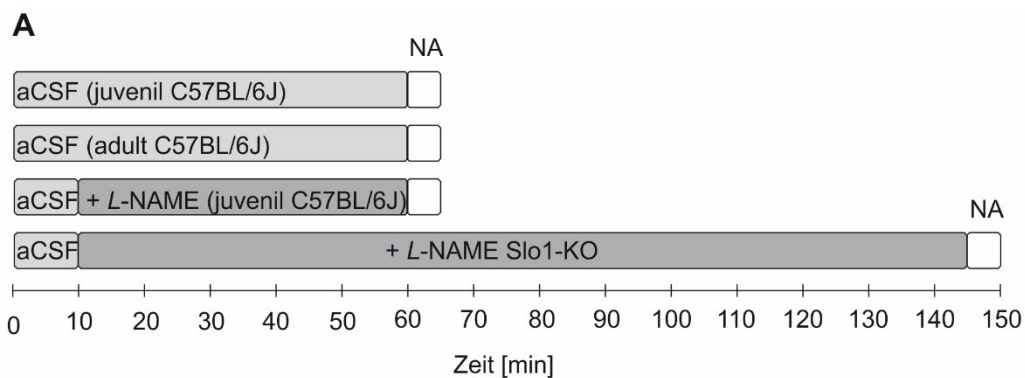
**Abb. 11:** Visualisierung einer intrakortikalen Arteriole im akuten Hirnschnittmodell der Maus. Grobe Kennzeichnung der Kortexschichten I - IV sowie Markierung des Zielbereichs der Arteriolen-Erfassung in Schicht II/III (rotes Kästchen) (A). DIC-Aufnahme einer penetrierenden Arteriole in Schicht II/III. Ermittlung der zeitlichen Änderung des Gefäßdurchmessers über die Flächenbestimmung eines 50  $\mu\text{m}$  langen Arteriolenabschnittes (weiße Fläche) (B).

### 3.7 Versuchsdesign und Versuchsübersicht

Am Anfang eines Experimentes wurde der Hirnschnitt mit gewärmter und oxygenierter aCSF-Messlösung zehnmütig umspült, um die Stabilität des Gefäßdurchmessers zu überprüfen. Zur Simulation des Gefäßtonus erfolgte anschließend die Zugabe von L-NAME zur aCSF-Messlösung. Nach der 45-minütigen Badapplikation von aCSF und L-NAME wurde die zu untersuchende Substanz in gewünschter Konzentration für weitere 90 Minuten in die bestehende oxygenierte Lösung eingewaschen. Am Ende eines Experimentes (Minute 145) wurde die Peristaltikpumpe gestoppt und augenblicklich 10  $\mu\text{l}$  NA zur Positivkontrolle in die Kammer des Mikroskops

hirnschnittnah appliziert (Abb. 12 B). Über fünf weitere Minuten wurde das Gefäß beobachtet und anhand der NA-induzierten Gefäßreaktion beurteilt, ob dieses noch vital war.

Der beschriebene Versuchsablauf ist auf alle Experimente dieser Arbeit anwendbar (Abb. 12 B). Lediglich die Versuchsreihen ohne zusätzliche Substanzapplikation (Gefäßantwort juveniler sowie adulter Mäuse unter aCSF und Gefäßantwort unter L-NAME; Abb. 12 A) sowie die Versuche der elektrischen Stimulation (Kapitel 3.10) divergieren von diesem Ablauf.



**Abb. 12:** Schema des Versuchsdesigns und Versuchsübersicht der Experimente ohne zusätzliche Substanzapplikation (A) sowie mit zusätzlicher Substanzapplikation (B).



### 3.8 Auswertung des Gefäßdurchmessers

Nach Beendigung einer Messung wurden die im Abstand von fünf Minuten aufgenommenen Bilder unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ (Version 1.4.3.67) analysiert und hinsichtlich der Auswertbarkeit eines 50 µm langen Arteriolenabschnittes beurteilt (Abb. 11 B). Alle Bilder wurden mit 6,03 Pixel/µm kalibriert. Die abgespeicherten Bilddateien wurden nacheinander in das Programm eingefügt und die Fläche zwischen den inneren Gefäßwänden (Grenze Lumen und Endothel) mithilfe der „Polygon-Funktion“ ausgemessen. Das über dem Lumen des Gefäßes abgemessene Polygon wurde anschließend als TIF-Datei abgespeichert. Die so resultierende Quadratmikrometer-Angabe der Fläche über dem Gefäß diente der Erfassung der Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit eines Versuches.

### 3.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm OriginPro 9 verwendet (OriginLab Corp., Massachusetts, USA). Der Zweistichproben-t-Test wurde als Hypothesentest für alle Auswertungen festgelegt. Innerhalb dieses Testverfahrens lautete die Nullhypothese  $H_0$ : „Es gibt keine Unterschiede in der Gefäßdurchmesseränderung aller Versuche.“ Im Vorhinein wurde das Signifikanzniveau zur Ablehnung der Nullhypothese  $H_0$  auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt und angenommen, dass die Stichproben normalverteilt sind. In Abhängigkeit des p-Wertes wurden weiterhin folgende Signifikanzniveaus festgelegt:

- \* =  $p < 0,05$
- \*\* =  $p < 0,01$
- \*\*\* =  $p < 0,001$

Innerhalb des Testverfahrens wurde der Mittelwert der Minuten 80 bis 90 (Endwerte) nach Substanzapplikation mit dem Mittelwert der Endwerte der jeweiligen Kontrolle verglichen. Die Darstellung des Mittelwertes einer Messreihe erfolgte mithilfe eines Liniendiagrammes. Der Kurvenverlauf entspricht hierbei der relativen Flächenänderung des Gefäßlumens bezogen auf den Mittelwert des zehnminütigen L-NAME-Ausgangsintervalls (Minute 45 bis 55). Der Mittelwert des Ausgangsintervalls wurde auf 100 % normalisiert. Die Standardabweichung einer Versuchsreihe wurde als schattierte Fläche um den Mittelwertgraph dargestellt. Eine Punktauftragung diente der Darstellung des Mittelwertes der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers

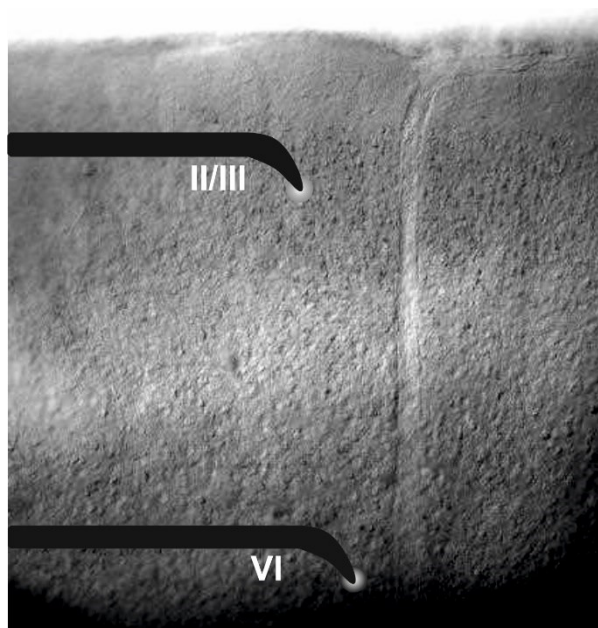
sowie der Abbildung des gemittelten Endwertes jedes Einzelversuchs einer zu testenden Substanz im Vergleich zur Kontrolle. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken um den Mittelwert dargestellt. Als Stichprobe wurde die Anzahl der verwendeten Hirnschnitte mit „n = x“ gekennzeichnet. Die Erstellung aller Graphen erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware CorelDRAW (Graphics Suite X5, Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

### 3.10 Elektrische Stimulation

Aufgrund des abweichenden Versuchsdesigns und Auswertungsverfahrens sollen die Versuche der elektrischen Stimulation separat betrachtet werden. Nach der Suche einer geeigneten Arteriole wurde entweder in Schicht II/III oder in Schicht VI des Mausekortex eine auf einem Manipulator befestigte konzentrische Elektrode auf dem Hirngewebe platziert (Abb. 13). Die Parameter der elektrischen Stimulation wurden vor Versuchsbeginn durch einen Pulsstimulator (*isolated pulse stimulator* [Modell 2100], A-M Systems, Sequim, USA) festgelegt (Tab. 5).

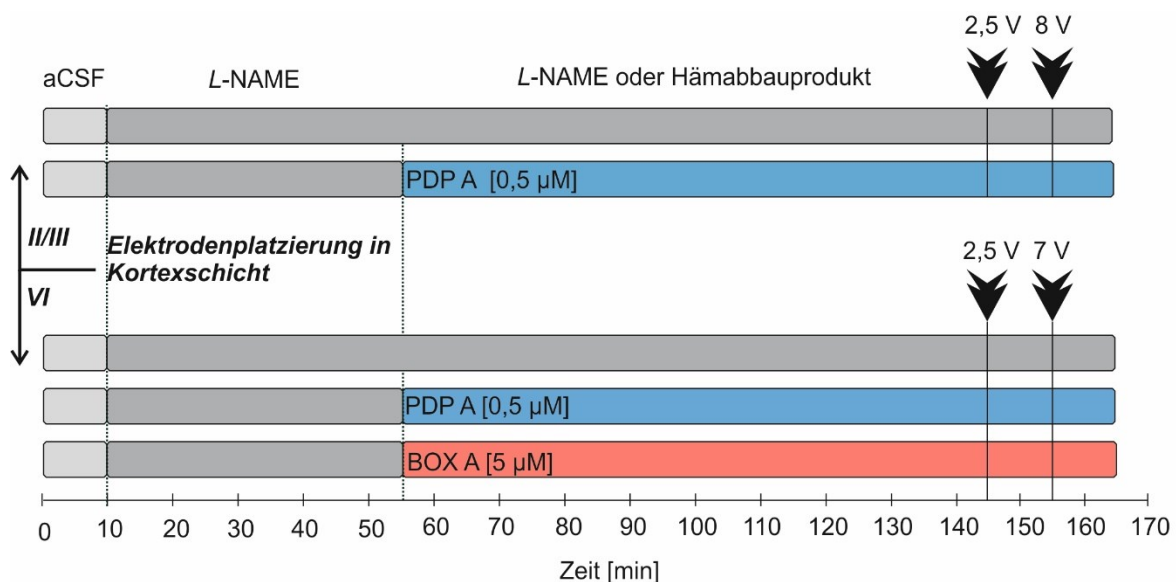
Burstlänge	2 s
Pulsdauer	$2 \cdot 10^{-4}$ s
Inter-Puls-Periode	$2 \cdot 10^{-2}$ s

**Tab. 5:** Parameter des Pulsstimulators.

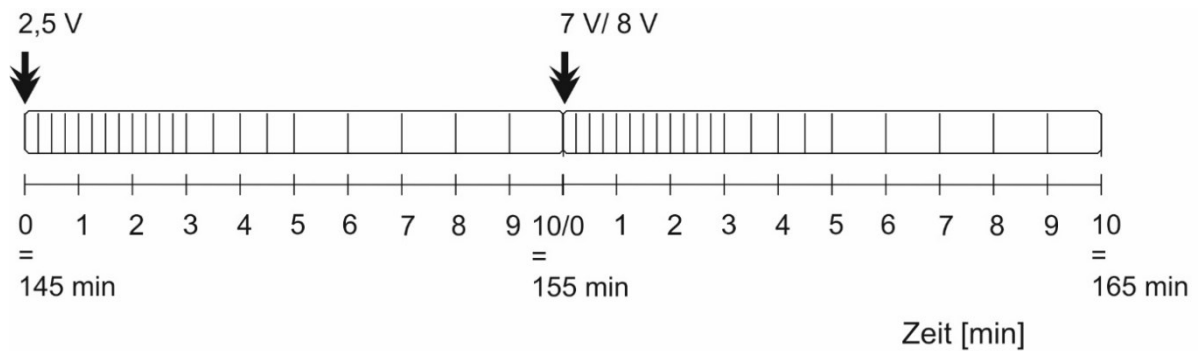


**Abb. 13:** Schematische Darstellung der Platzierung der Elektrode in Schicht II/III oder VI des visuellen Mausekortex.

Nach der Elektrodenplatzierung folgte der experimentelle Ablauf bis zum Erreichen der Minute 145 dem beschriebenen Versuchsdesign (Vergleich Kapitel 3.7). Bei Minute 145 wurde anstelle der NA-Applikation der Versuch fortgesetzt und unverzüglich ein erster Stimulus mit einer angelegten Spannung von 2,5 V über die Elektrode an das Hirngewebe abgegeben. Bei Minute 155 erfolgte eine weitere Stimulation mit entweder 7 V (Kortexschicht VI) oder 8 V (Kortexschicht II/III) (Abb. 14). Die Aufnahme der auszuwertenden Bilder erfolgte unterschiedlich frequent. Nach Impulsabgabe wurde zunächst über 3 Minuten alle 15 s ein Bild des Gefäßes erfasst, bis zum Erreichen der Minute 5 alle 30 s und anschließend bis zum Erreichen des Endzeitpunktes (Minute 10) jede Minute eine Aufnahme des Gefäßes abgespeichert (Abb. 15).



**Abb. 14:** Schematische Übersicht über den Ablauf und die Untergliederung der Versuche der elektrischen Stimulation.



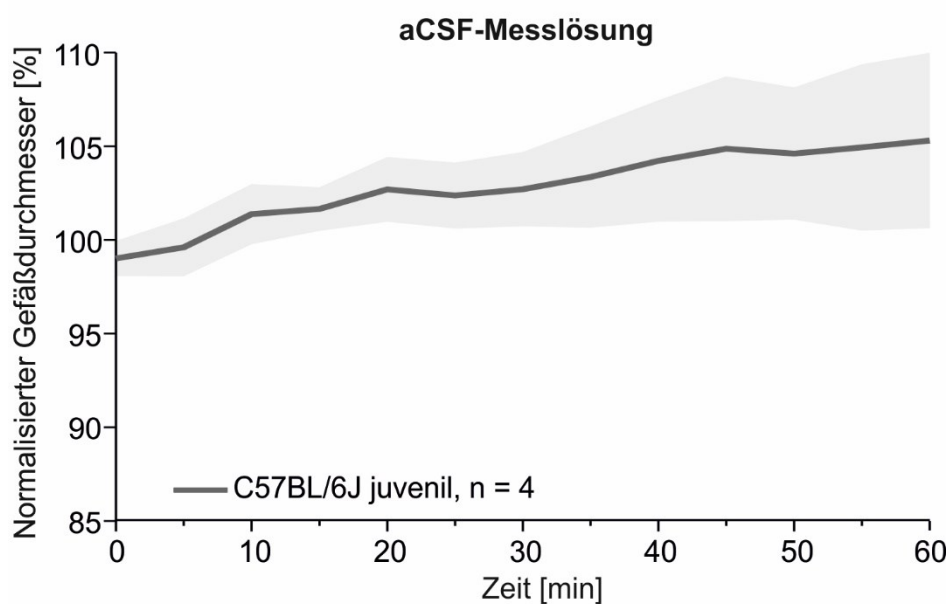
**Abb. 15:** Stimulations- und Bildaufnahmeprotokoll des zu erfassenden Gefäßes während der elektrischen Stimulation. Schematische Illustration der Aufnahme eines Einzelbildes durch die orthogonalen Linien innerhalb des Rechtecks. Die gezackten Pfeile stellen die Stimuli bei Minute 145 beziehungsweise 155 dar.

Als Bezugspunkt zur Ermittlung der zeitlichen Änderung des Durchmessers wurde anstelle der gemittelten Endwerte die letzte Aufnahme vor dem jeweiligen Stimulus verwendet. Vor der 2,5 V-Stimulation entspricht das Minute 145; vor der 7 V-beziehungsweise 8 V-Stimulation Minute 155. Der Zweistichproben-t-Test sowie die zuvor definierten Signifikanzniveaus (Kapitel 3.9) wurden auch bei der Analyse der Versuche der elektrischen Stimulation angewandt. Als Kontrollgruppe diente eine L-NAME-Versuchsreihe (nachfolgend als Kontrolle bezeichnet). Zudem wurde zur Minimierung des stochastischen Rauschens ein arithmetisch gleitender Durchschnitt, bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, gebildet. Die durch den Filter entstandenen Mittelwerte bildeten die Grundlage der Ermittlung des maximalen Amplitudenunterschieds (Differenz zwischen dem Ausgangsdurchmesser und dem minimalen Gefäßdurchmesser nach Stimulation) der Versuche mit 7 V und 8 V sowie des Vergleichs der Gefäßreaktion zu definierten Zeitpunkten (alle Versuche). Durch die Anwendung des Filters verschiebt sich der graphisch dargestellte Beginn einer Versuchsreihe (15 s nach Minute 145 beziehungsweise 155). Zudem endet die Darstellung einen Zeitpunkt früher (= 9 Minuten nach dem jeweiligen Stimulus).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gefäßantwort unter aCSF

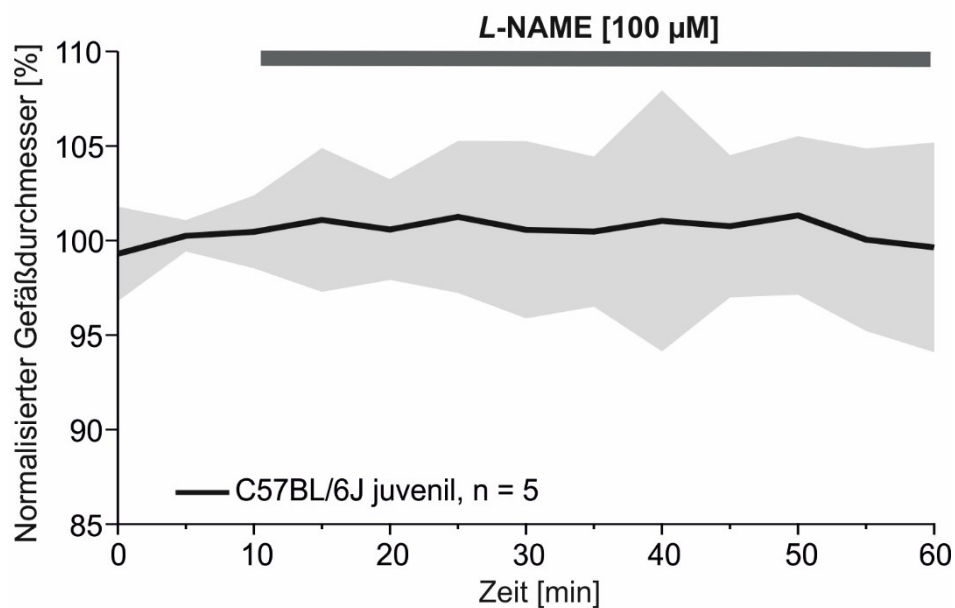
Zur Etablierung der Methodik wurden Hirnschnitte juveniler C57BL/6J-Mäuse präpariert und mit aCSF-Messlösung umspült. Die in Abb. 16 dargestellte leichte Arterioldilatation ( $105 \pm 4,8 \%$ ;  $n = 4$ ) stellt die physiologische Antwort, der zuvor bei Raumtemperatur aufbewahrten Hirnschnitte, auf die durch den Heizblock induzierte Erwärmung auf  $32,5 \text{ }^\circ\text{C}$  unter dem DIC-Mikroskop dar.



**Abb. 16:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler C57BL/6J-Mäuse unter aCSF-Messlösung. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich).

## 4.2 Gefäßantwort unter L-NAME

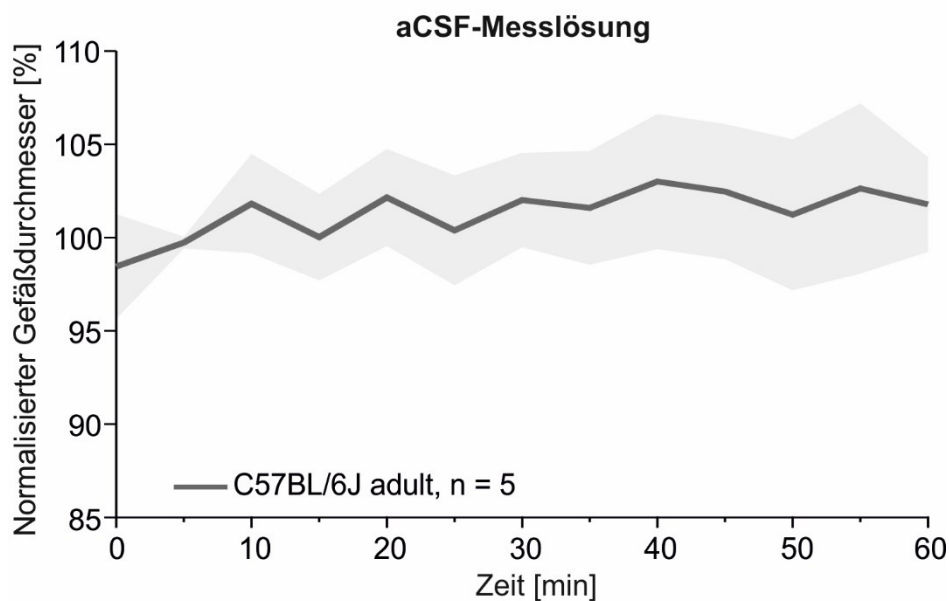
Zur Vermeidung der unter aCSF-Messlösung beobachteten Arterioldilatation wurde L-NAME nach zehnmütiger aCSF-Eingewöhnung in die Lösung appliziert. Infolge der 50-minütigen L-NAME-Wirkung ( $100 \pm 5,5 \%$ ;  $n = 5$ ; Abb. 17) unterschied sich der Gefäßdurchmesser nicht signifikant ( $p = 0,15$ ) von den Hirnschnitten juveniler C57BL/6J-Mäuse, die nur mit aCSF-Messlösung umspült wurden ( $105 \pm 4,8 \%$ ;  $n = 4$ ).



**Abb. 17:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler C57BL/6J-Mäuse nach Applikation von L-NAME [100 µM]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich).

### 4.3 Gefäßantwort unter aCSF in adulten Mäusen

Der zerebrale Vasospasmus ist eine Komplikation, die insbesondere bei Patienten jungen und mittleren Alters nach einer SAB gehäuft auftritt. Um die Methodik für die nachfolgenden Experimente in Hirnschnitten adulter Mäuse zu etablieren, wurde die Gefäßantwort unter dem Einfluss der aCSF-Messlösung in adulten C57BL/6J-Mäusen untersucht. Es resultierte eine leichte Vasodilatation ( $102 \pm 2,5 \%$ ;  $n = 5$ ; Abb. 18), die sich nicht von der Gefäßreaktion juveniler C57BL/6J-Hirnschnitte unterschied ( $105 \pm 4,8 \%$ ;  $n = 4$ ;  $p = 0,2$ ).

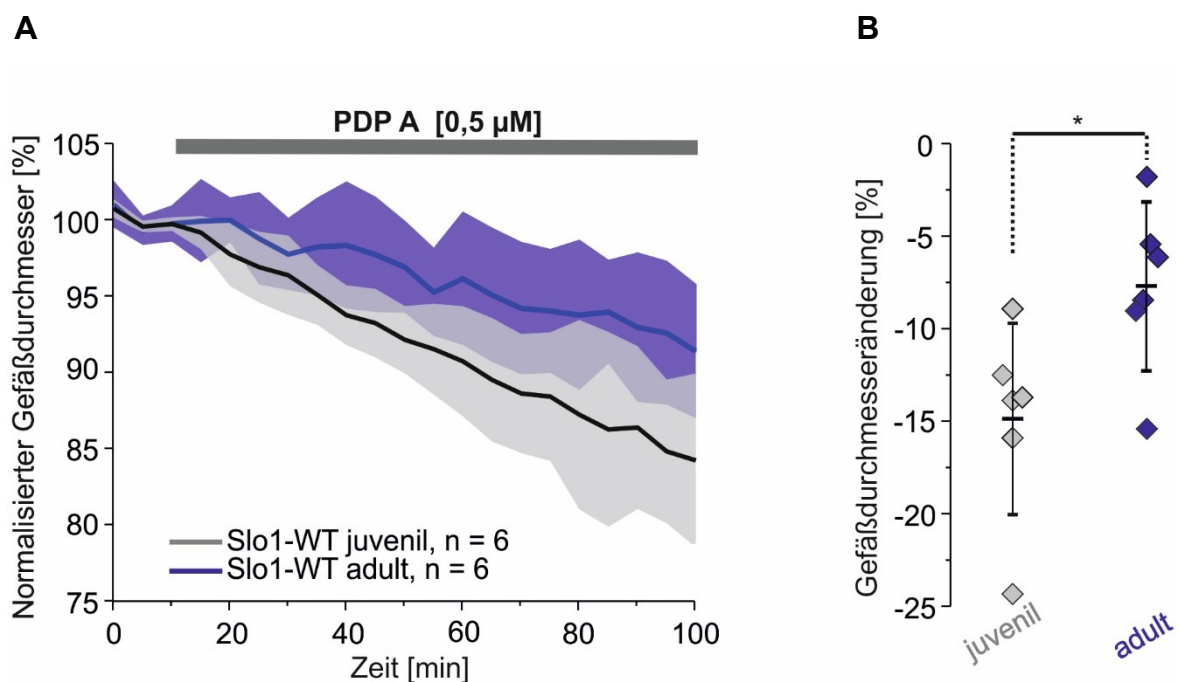


**Abb. 18:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten adulter C57BL/6J-Mäuse unter aCSF-Messlösung. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich).

## 4.4 Hämabbauprodukte in adulten Mäusen

### 4.4.1 Applikation von PDP A

Mittels der Testung von PDP A in Hirnschnitten adulter Slo1-WT-Mäuse sollte der Einfluss des Alters auf die PDP A-induzierte Gefäßkonstriktion untersucht und mit der bereits erhobenen Gefäßantwort in juvenilen Hirnschnitten verglichen werden (Joerk et al. 2019). Es konnte eine abgeschwächte Gefäßverengung beobachtet werden ( $92 \pm 4,6 \%$ ;  $n = 6$ ; Abb. 19 A), die sich signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 19 B) von der juvenilen PDP A-Kontrolle unterschied ( $85 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ).

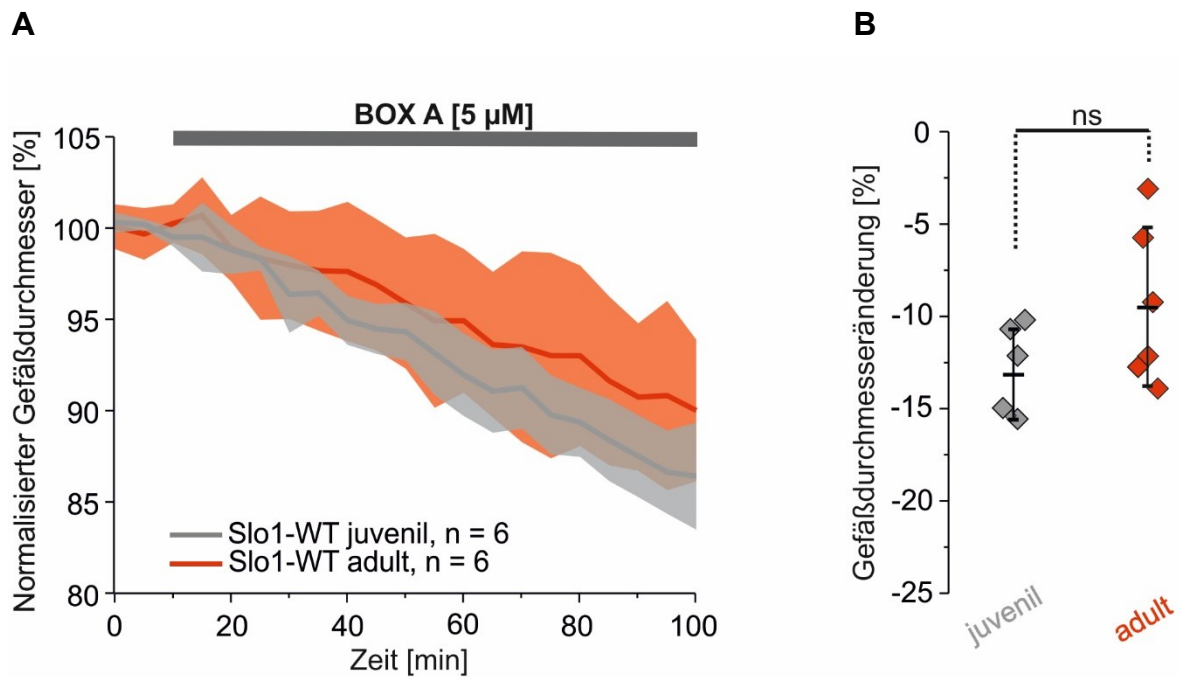


**Abb. 19:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler sowie adulter Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von PDP A [0,5 µM]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von PDP A in Hirnschnitten adulter Mäuse verglichen mit der juvenilen PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).



#### 4.4.2 Applikation von BOX A

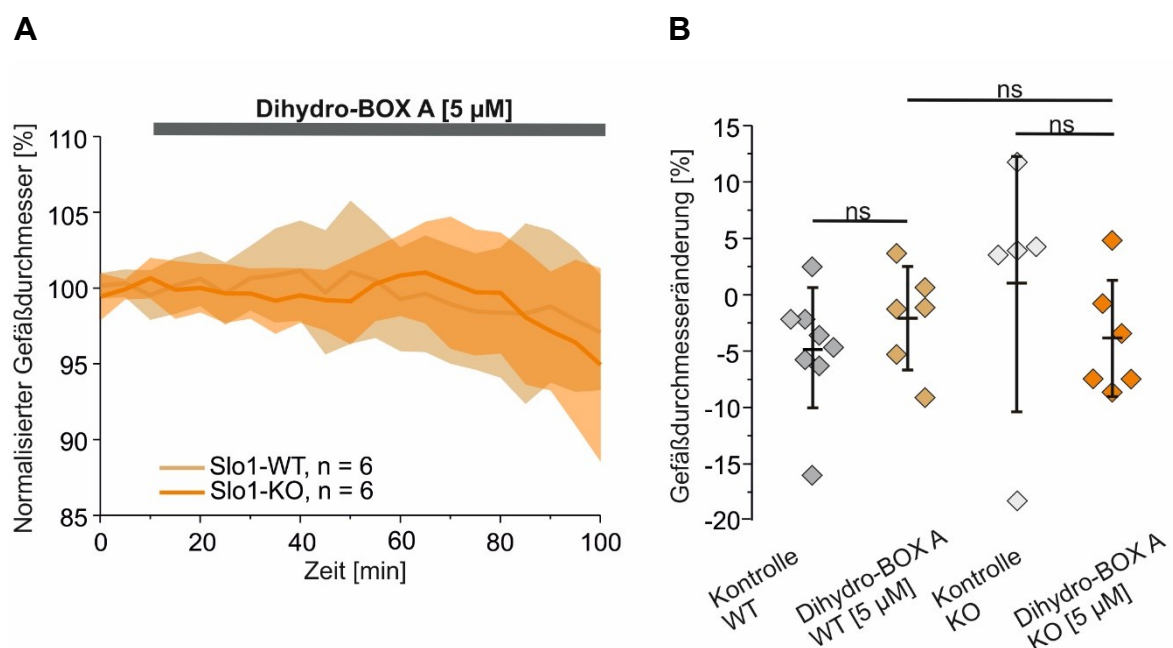
Als Pendant zur vorherig beschriebenen Versuchsreihe wurde der Effekt von BOX A in adulten Slo1-WT-Mäusen analysiert und mit der bereits erhobenen Gefäßantwort in juvenilen Hirnschnitten verglichen (Joerk et al. 2019). Die BOX A-induzierte Gefäßkonstriktion ( $91 \pm 4,3 \%$ ;  $n = 6$ ; Abb. 20 A) unterschied sich nicht signifikant ( $p = 0,1$ ; Abb. 20 B) von der juvenilen BOX A-Kontrolle ( $87 \pm 2,4 \%$ ;  $n = 6$ ).



**Abb. 20:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler sowie adulter Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von BOX A [5 µM]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von BOX A in Hirnschnitten adulter Mäuse verglichen mit der juvenilen BOX A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

#### 4.5 Applikation von Dihydro-BOX A

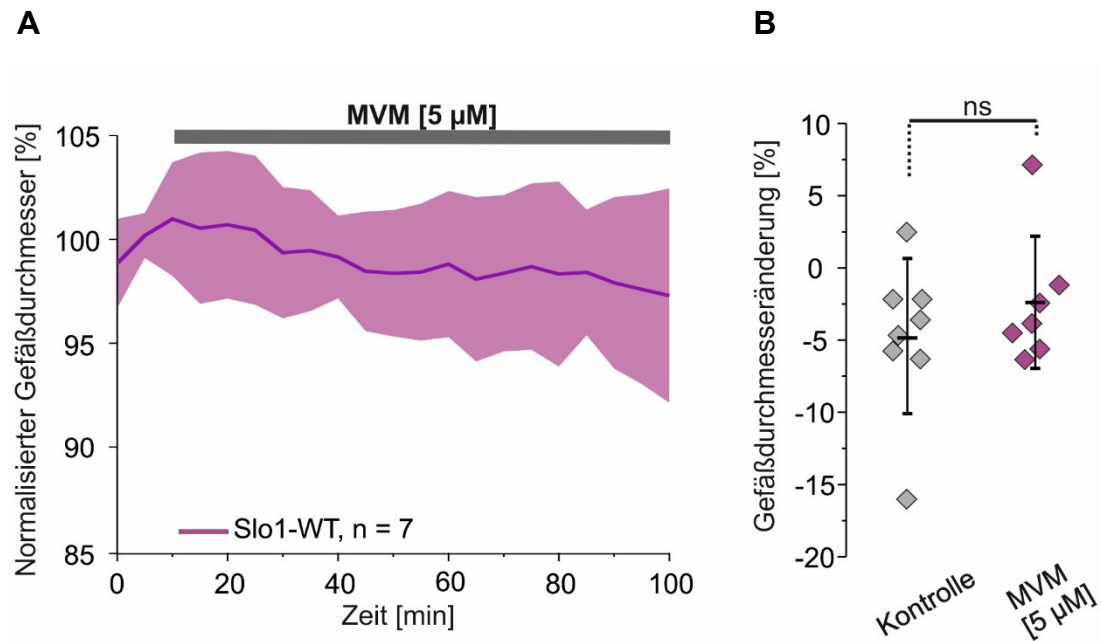
Die Testung von Dihydro-BOX A resultierte sowohl bei den Slo1-WT- ( $98 \pm 4,5 \%$ ;  $n = 6$ ) als auch bei den Slo1-KO-Mäusen ( $96 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ) in einer schwachen Gefäßverengung (Abb. 21 A). Beide Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0,55$ ). Des Weiteren wurde weder bei der WT- ( $p = 0,34$ ) noch bei der KO-Versuchsgruppe ( $p = 0,37$ ) ein Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (WT:  $n = 8$ ; KO:  $n = 5$ ) festgestellt (Abb. 21 B). Die Vasokonstriktion der Dihydro-BOX A WT-Versuchsgruppe war signifikant geringer ( $p < 0,001$ ) verglichen zur BOX A-Kontrolle ( $87 \pm 2,4 \%$ ;  $n = 6$ ).



**Abb. 21:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT- und Slo1-KO-Mäuse nach Applikation von Dihydro-BOX A [5 μM]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von Dihydro-BOX A verglichen mit der jeweiligen Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

## 4.6 Applikation von MVM

Um eine Aussage über die Vasoaktivität von MVM treffen zu können, wurde das Spaltprodukt der Bilirubin-Oxidation in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse getestet. Über den Beobachtungszeitraum wurde eine schwache Gefäßreaktion festgestellt ( $98 \pm 4,6 \%$ ;  $n = 7$ ; Abb. 22 A), die sich nicht signifikant von der Kontrolle ( $95 \pm 5,4 \%$ ;  $n = 8$ ) unterschied ( $p = 0,37$ ; Abb. 22 B).

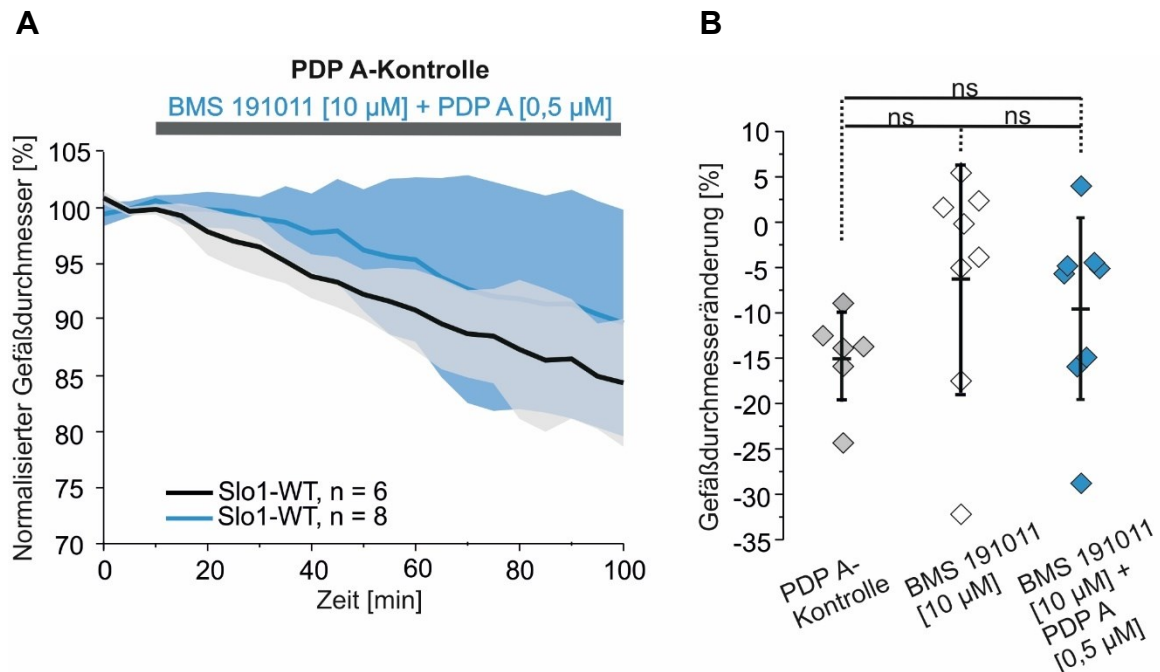


**Abb. 22:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von MVM [5  $\mu$ M]. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von MVM verglichen mit der Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

## 4.7 Applikation spezifischer BK-Kanal-Aktivatoren

### 4.7.1 Applikation von BMS 191011

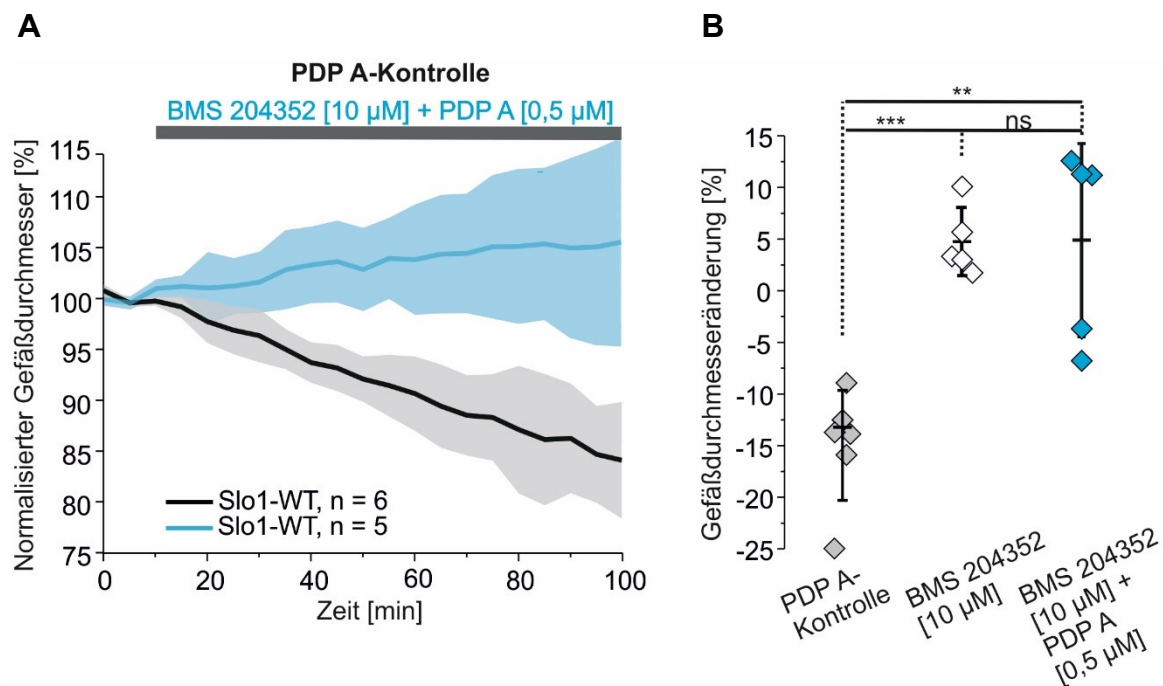
Um den präventiven Effekt von BK-Kanal-Aktivatoren auf die vasokonstriktorische Wirkung von PDP A zu prüfen, wurde eine Substanz der Substanzklasse BMS getestet. Es resultierte eine leichte Vasokonstriktion sowohl nach Applikation von BMS 191011 + PDP A ( $91 \pm 10,4 \%$ ;  $n = 8$ ; Abb. 23 A) als auch nach Applikation von BMS 191011 allein ( $93 \pm 12,6 \%$ ;  $n = 8$ ). Beide Versuchsgruppen unterschieden sich nicht voneinander ( $p = 0,57$ ; Abb. 23 B). Es wurde weder nach Applikation von BMS 191011 + PDP A ( $p = 0,25$ ) noch nach Applikation von BMS 191011 allein ( $p = 0,14$ ) ein signifikanter Unterschied zur PDP A-Kontrolle ( $85 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ; Abb. 23 A) festgestellt.



**Abb. 23:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von BMS 191011 [5  $\mu$ M] + PDP A [0,5  $\mu$ M] verglichen mit einer PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von BMS 191011 sowie BMS 191011 + PDP A verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

#### 4.7.2 Applikation von BMS 204352

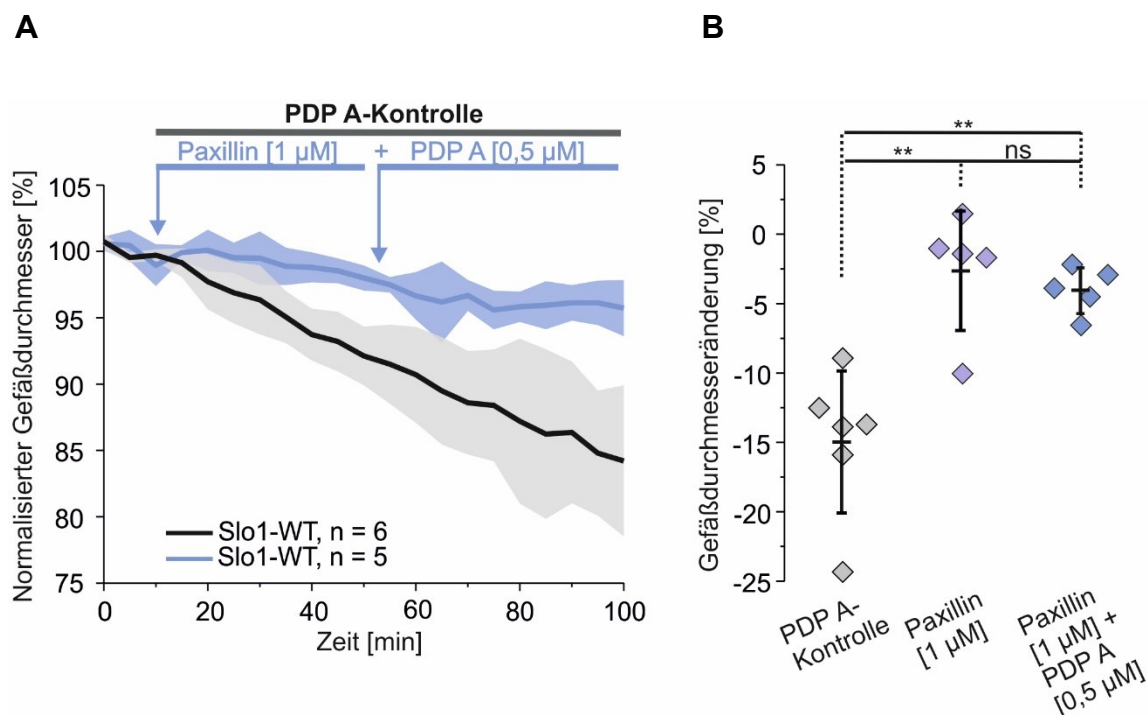
Der BK-Kanal-Aktivator BMS 204352 sollte als weitere Substanz der BMS-Gruppe auf das Präventionspotenzial zur PDP A-induzierten Gefäßverengung untersucht werden. Verglichen mit der PDP A-Kontrolle ( $85 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ) unterschieden sich die Arteriolen sowohl nach Applikation von BMS 204352 + PDP A ( $105 \pm 9,3 \%$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,01$ ; Abb. 24 A) als auch nach Applikation von BMS 204352 allein ( $105 \pm 3,3 \%$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ) signifikant voneinander (Abb. 24 B). Zwischen der Kombination aus BMS 204352 + PDP A und BMS 204352 allein ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,98$ ; Abb. 24 B).



**Abb. 24:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von BMS 204352 [5 µM] + PDP A [0,5 µM] verglichen mit einer PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von BMS 204352 sowie BMS 204352 + PDP A verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

#### 4.8 Applikation spezifischer BK-Kanal-Inhibitoren

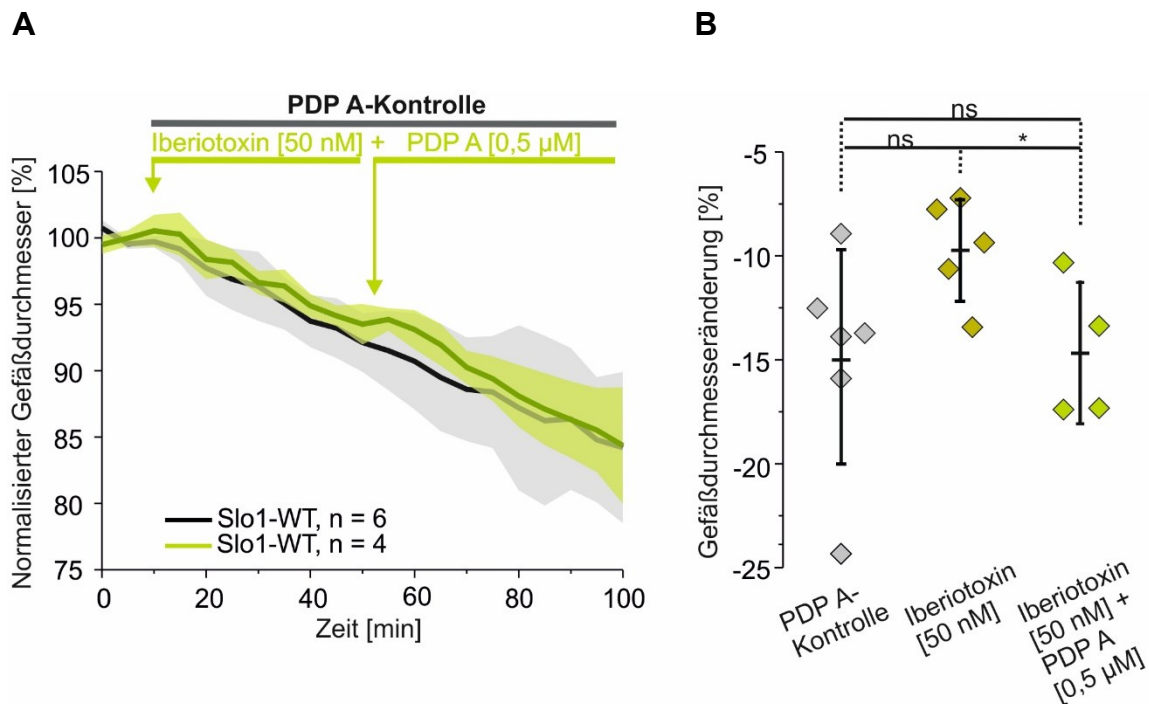
Zur Identifizierung von Unterschieden des PDP A-Einflusses auf BK-Kanäle spezifischer Zellen wurden zwei unterschiedliche BK-Kanal-Inhibitoren ausgewählt: PAX, ein BK-Kanal-Pan-Inhibitor, welcher sowohl Einfluss auf vaskulär als auch auf astrozytär exprimierte BK-Kanäle nimmt sowie IbTX, das nur BK-Kanäle in glatten Gefäßmuskelzellen inhibiert. Beide Substanzen wurden sowohl allein als auch nach 45-minütiger PAX- oder IbTX-Präinkubation mit PDP A gemeinsam geprüft. Es resultierte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,5$ ) zwischen der PAX- ( $97 \pm 4,4 \%$ ;  $n = 5$ ) und der PAX + PDP A-Versuchsgruppe ( $96 \pm 1,7 \%$ ;  $n = 5$ ; Abb. 25 A). Beide Versuchsgruppen unterschieden sich signifikant ( $p < 0,01$ ; Abb. 25 B) von der PDP A-Kontrolle ( $85 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ). Weder nach Applikation von PAX ( $p = 0,45$ ) noch nach Applikation von PAX + PDP A ( $p = 0,76$ ) wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt ( $95 \pm 5,4 \%$ ;  $n = 8$ ).



**Abb. 25:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von PAX [1  $\mu$ M] + PDP A [0,5  $\mu$ M] verglichen mit einer PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach Applikation von PAX sowie PAX + PDP A verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).



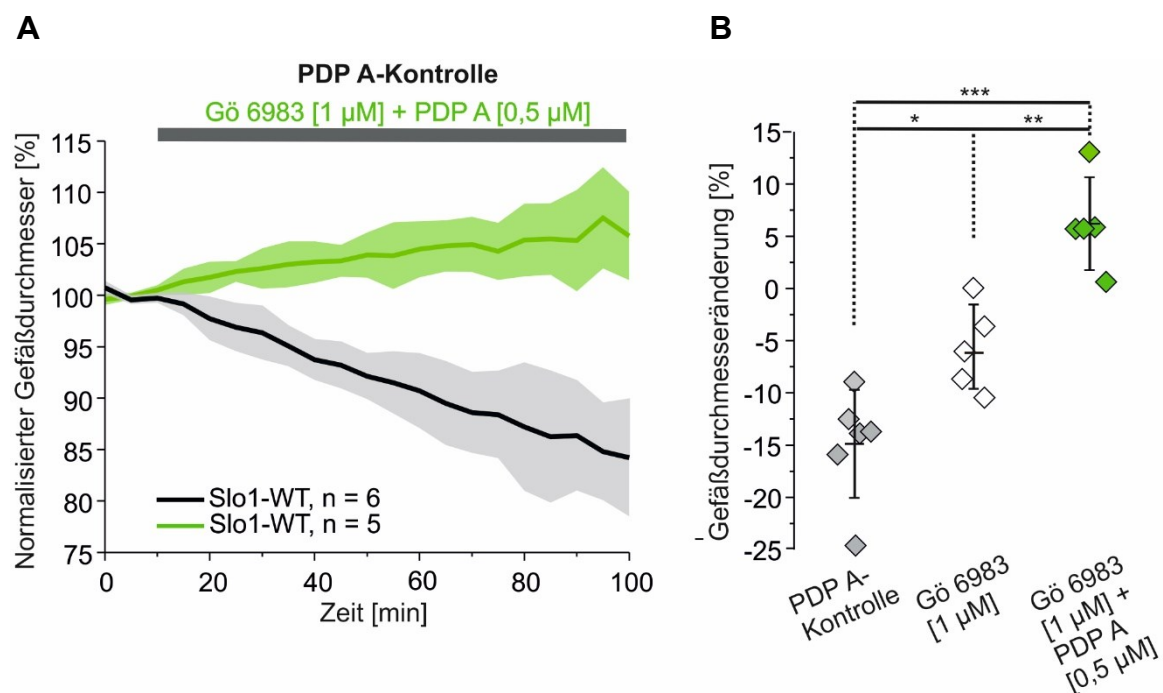
Zwischen der IbTX- ( $90 \pm 2,5 \%$ ;  $n = 5$ ) und der IbTX + PDP A-Versuchsgruppe ( $85 \pm 3,4 \%$ ;  $n = 4$ ; Abb. 26 A) wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p < 0,05$ ). Sowohl die IbTX- ( $p = 0,07$ ) als auch die IbTX + PDP A-Versuchsgruppe ( $p = 0,93$ ) unterschied sich nicht signifikant von der PDP A-Kontrolle ( $85 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ; Abb. 26 B). Ein signifikanter Unterschied ergab sich beim Vergleich der IbTX + PDP A-Versuchsgruppe mit der Kontrolle ( $95 \pm 5,4 \%$ ;  $n = 8$ ;  $p < 0,01$ ); IbTX allein unterschied sich nicht von dieser ( $p = 0,08$ ).



**Abb. 26:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von IbTX [50 nM] + PDP A [0,5 µM] verglichen mit einer PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach Applikation von IbTX sowie IbTX + PDP A verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).

#### 4.9 Applikation eines Proteinkinase C-Inhibitors

Neben dem BK-Kanal spielt auch die PKC eine zentrale Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. Um den Beitrag der PKC zur Pathogenese der PDP A-induzierten Vasokonstriktion zu beleuchten, wurde der unspezifische PKC-Inhibitor Gö 6983 ausgewählt, welcher auch die zerebral exprimierten und in den glatten Gefäßmuskelzellen vorkommenden Untereinheiten der PKC inhibiert. Die untersuchten Arteriolen unterschieden sich sowohl nach Applikation von Gö 6983 + PDP A ( $106 \pm 4,4 \%$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 27 A) als auch nach Applikation von Gö 6983 allein ( $94 \pm 4,2 \%$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) signifikant von der PDP A-Kontrolle ( $85 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 6$ ; Abb. 27 B). Ein signifikanter Unterschied resultierte zudem zwischen der Gö 6983 + PDP A- und der Gö 6983-Versuchsgruppe ( $p < 0,01$ ; Abb. 27 B).



**Abb. 27:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers in Hirnschnitten juveniler Slo1-WT-Mäuse nach Applikation von Gö 6983 [1 µM] + PDP A [0,5 µM] verglichen mit einer PDP A-Kontrolle. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) (A). Punktauftragung der gemittelten Endwerte der Einzelversuche nach 80- bis 90-minütiger Wirkung von Gö 6983 sowie Gö 6983 + PDP A verglichen mit der PDP A-Kontrolle. Die Fehlerbalken um den Mittelwert stellen die Standardabweichung dar (B).



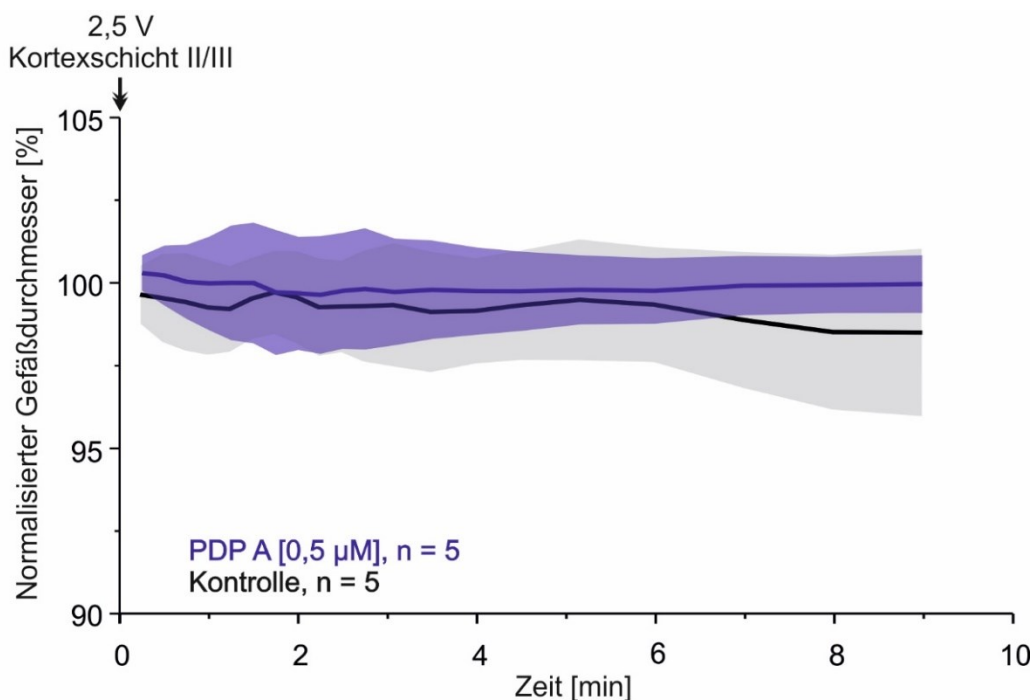
#### 4.10 Einfluss der Hämabbauprodukte auf die neurovaskuläre Kopplung

Da BK-Kanäle nicht nur in glatten Gefäßmuskelzellen, sondern auch in Astrozyten exprimiert sind (Price et al. 2002), sollte abschließend untersucht werden, inwiefern HDPs die neurovaskuläre Kopplung durch BK-Kanal-Inhibition beeinflussen. Hierzu wurden die Hirnschnitte in zwei kortikalen Schichten stimuliert: Schicht II/III mit 2,5 V und 8 V und Schicht VI mit 2,5 V und 7 V (siehe Kapitel 3.10).

##### 4.10.1 Elektrische Stimulation in Kortexschicht II/III

###### *Stimulation mit 2,5 V*

Es resultierte keine signifikante Änderung des Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation (2,5 V) in Kortexschicht II/III zu den in Tab. 6 aufgeführten Zeitpunkten zwischen der PDP A-Versuchsgruppe und der Kontrolle (Abb. 28).



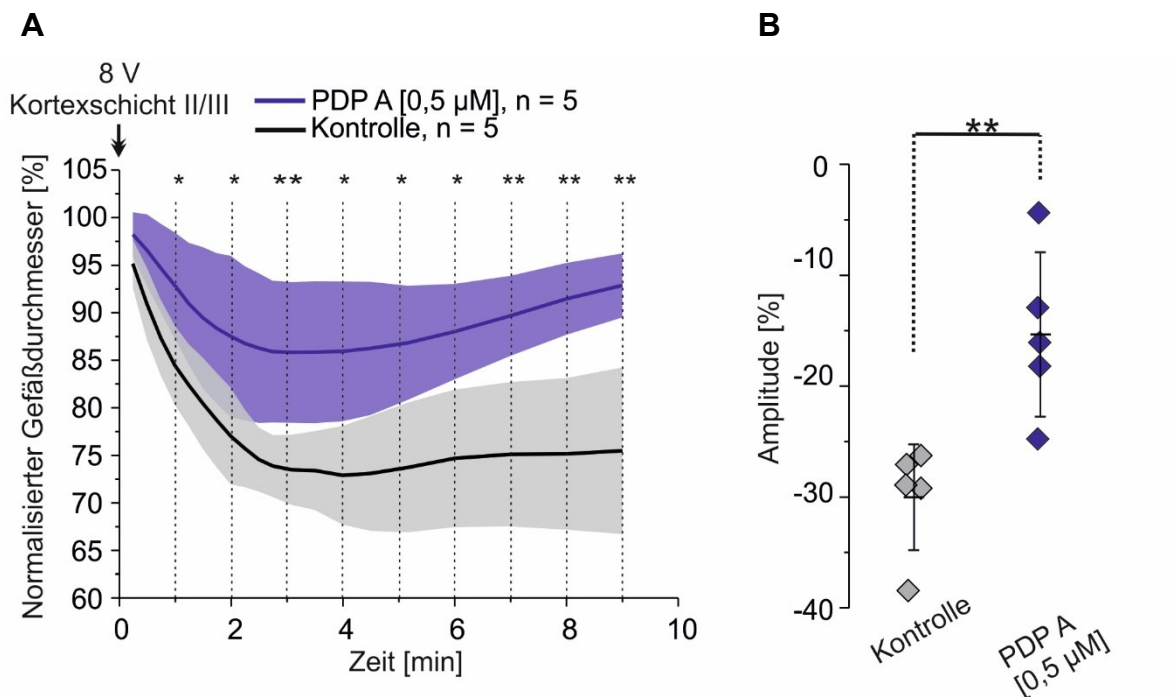
**Abb. 28:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation (2,5 V) in Kortexschicht II/III in Slo1-WT-Hirnschnitten. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) einer Versuchsgruppe nach Applikation von PDP A [0,5 µM] und einer Kontrolle.

	Mittelwert Gefäßdurchmesser PDP A	Mittelwert Gefäßdurchmesser Kontrolle
150 s	100 ± 1,8 % (n = 5)	99 ± 1,5 % (n = 5)
p-Wert	0,55	
300 s	100 ± 0,9 % (n = 5)	100 ± 1,9 % (n = 5)
p-Wert	0,84	
600 s	100 ± 1,0 % (n = 5)	99 ± 2,3 % (n = 5)
p-Wert	0,38	

**Tab. 6:** Mittelwert des Gefäßdurchmessers nach Applikation von PDP A [0,5 µM] sowie einer Kontrolle in Slo1-WT-Hirnschnitten 150 s, 300 s sowie 600 s nach elektrischer Stimulation (2,5 V) in Kortexschicht II/III. Ermittlung des p-Wertes zwischen der PDP A-Versuchsgruppe und der Kontrolle (dargestellt unterhalb der mittleren Gefäßdurchmesser).

### Stimulation mit 8 V

Ein signifikanter maximaler Amplitudenunterschied ( $p < 0,01$ ; Abb. 29 B) resultierte zwischen der PDP A-Versuchsgruppe ( $85 \pm 7,4 \%$ ;  $n = 5$ ) und der Kontrolle ( $71 \pm 5,2 \%$ ;  $n = 5$ ) nach Stimulation (8 V) in Kortexschicht II/III (Abb. 29). Zudem wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied des Gefäßdurchmessers zwischen der PDP A-Versuchsgruppe und der Kontrolle beobachtet (gestrichelte Linien Abb. 29 A).

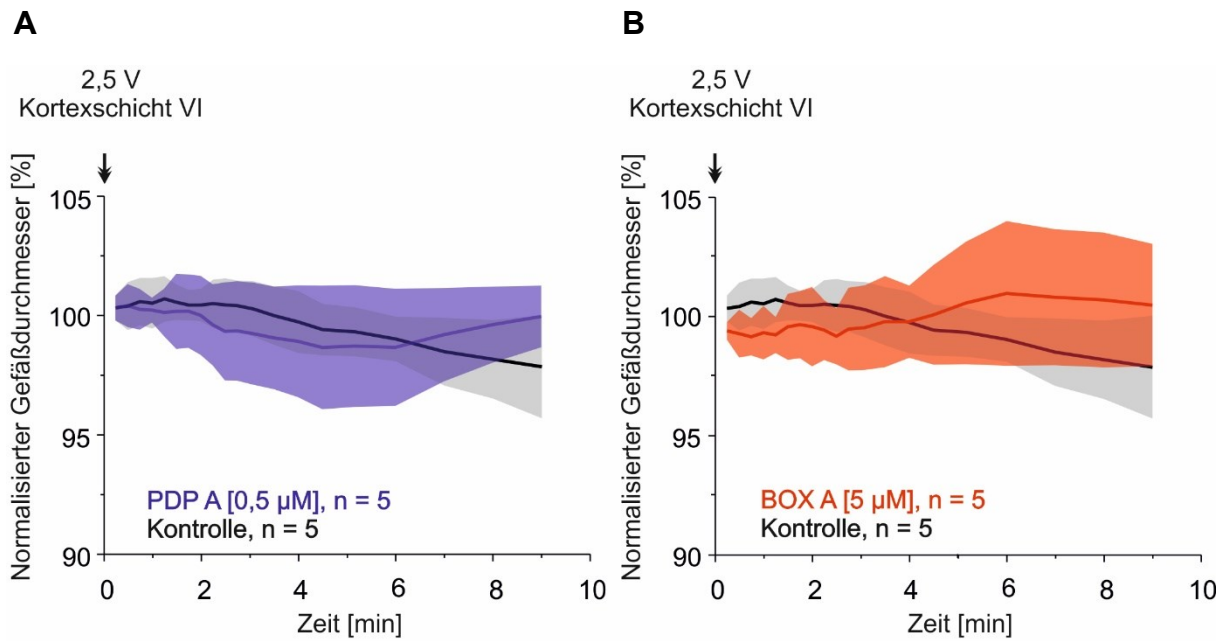


**Abb. 29:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation (8 V) in Kortexschicht II/III in Slo1-WT-Hirnschnitten. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) einer Versuchsgruppe nach Applikation von PDP A [0,5 μM] sowie einer Kontrolle. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Gefäßdurchmesserunterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrolle zu den graphisch markierten (gestrichelte Linien) Zeitpunkten (A). Punktauftragung der maximalen Amplitude der Einzelversuche mit Darstellung der Standardabweichung als Fehlerbalken um den Mittelwert (B).

#### 4.10.2 Elektrische Stimulation in Kortexschicht VI

##### Stimulation mit 2,5 V

Es wurde kein signifikanter Gefäßdurchmesserunterschied nach 2,5 V-Stimulation in Kortexschicht VI zu den in Tab. 7 aufgeführten Zeitpunkten zwischen der PDP A- (Abb. 30 A) beziehungsweise der BOX A-Versuchsgruppe (Abb. 30 B) und der Kontrolle festgestellt.



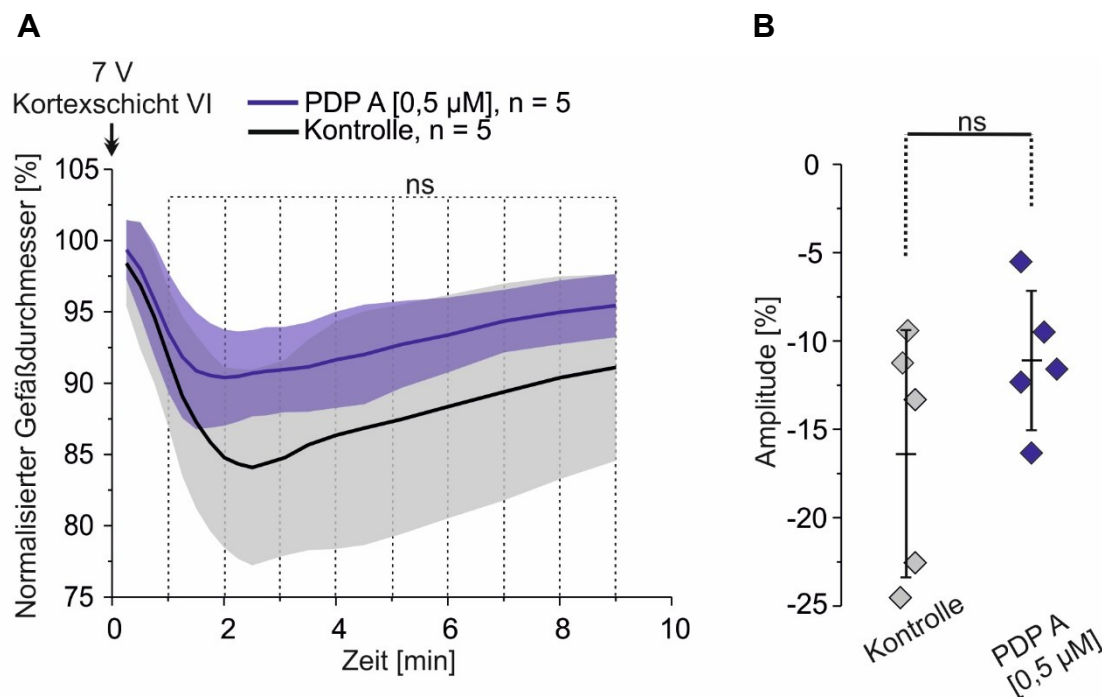
**Abb. 30:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation (2,5 V) in Kortexschicht VI in *Slo1-WT*-Hirnschnitten. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) einer Versuchsgruppe nach Applikation von PDP A [0,5 μM] (A) oder BOX A [5 μM] (B) sowie einer Kontrolle.

	Mittelwert Gefäßdurchmesser PDP A	Mittelwert Gefäßdurchmesser Kontrolle	Mittelwert Gefäßdurchmesser BOX A
150 s	100 ± 1,9 % (n = 5)	101 ± 1,3 % (n = 5)	100 ± 1,5 % (n = 5)
<b>p-Wert</b>	<b>0,31</b>		<b>0,39</b>
300 s	98 ± 3,0 % (n = 5)	99 ± 0,7 % (n = 5)	101 ± 3,4 % (n = 5)
<b>p-Wert</b>	<b>0,54</b>		<b>0,33</b>
600 s	100 ± 1,5 % (n = 5)	98 ± 2,6 % (n = 5)	101 ± 2,5 % (n = 5)
<b>p-Wert</b>	<b>0,18</b>		<b>0,16</b>

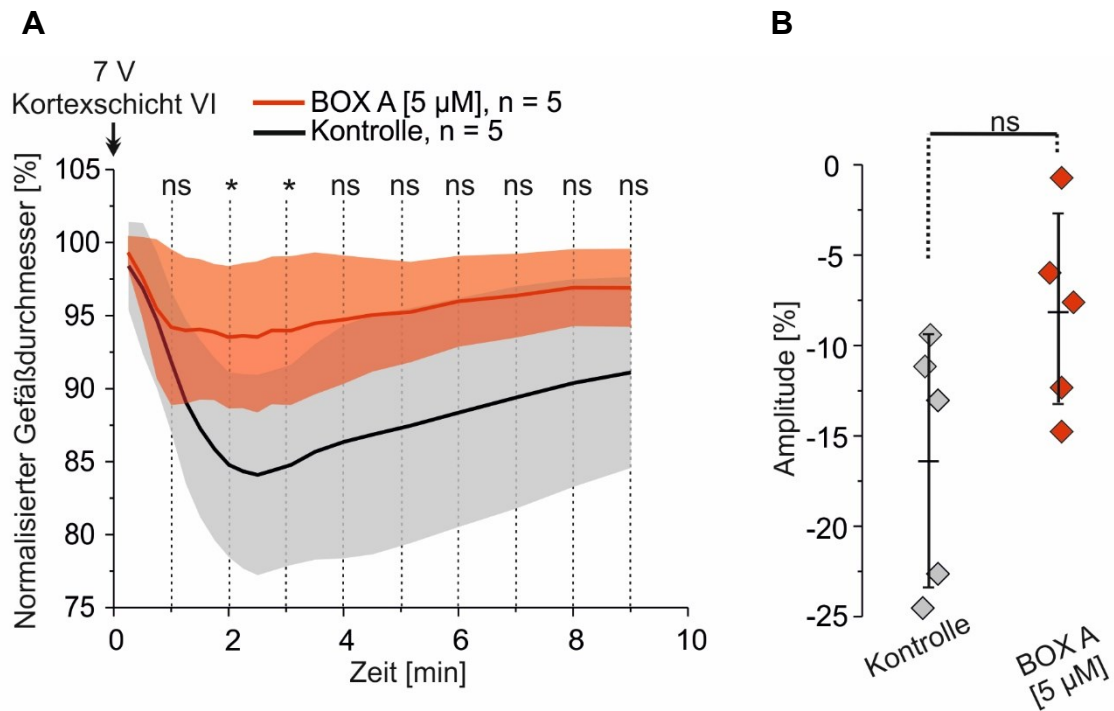
**Tab. 7.** Mittelwert des Gefäßdurchmessers nach Applikation von PDP A [0,5 μM] oder BOX A [5 μM] sowie einer Kontrolle 150 s, 300 s sowie 600 s nach elektrischer Stimulation (2,5 V) in Kortexschicht VI. Ermittlung des p-Wertes zwischen der PDP A-Versuchsgruppe und der Kontrolle sowie zwischen der BOX A-Versuchsgruppe und der Kontrolle (dargestellt unterhalb der mittleren Gefäßdurchmesser).

### Stimulation mit 7 V

Verglichen mit der Kontrolle ( $84 \pm 6,9 \%$ ;  $n = 5$ ) konnte weder unter dem Einfluss von PDP A ( $89 \pm 3,9 \%$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,18$ , Abb. 31) noch unter dem Einfluss von BOX A ( $92 \pm 5,4 \%$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,08$ ; Abb. 32) ein signifikanter Amplitudenunterschied nach Stimulation (7 V) in Kortexschicht VI festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied der Gefäßkonstriktion wurde zwischen der BOX A-Versuchsgruppe und der Kontrolle zwei beziehungsweise drei Minuten nach der Stimulation identifiziert ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ; gestrichelte Linien bei Minute 2 und 3 in Abb. 32 A).



**Abb. 31:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation (7 V) in Kortexschicht VI in *Slo1-WT*-Hirnschnitten. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) einer Versuchsgruppe nach Applikation von PDP A [0,5  $\mu$ M] sowie einer Kontrolle. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Gefäßdurchmesserunterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrolle zum graphisch markierten (gestrichelte Linie) Zeitpunkt (A). Punktauftragung der maximalen Amplitude der Einzelversuche mit Darstellung der Standardabweichung als Fehlerbalken um den Mittelwert (B).



**Abb. 32:** Zeitverlauf der prozentualen Änderung des Gefäßdurchmessers nach elektrischer Stimulation (7 V) in Kortexschicht VI in Slo1-WT-Hirnschnitten. Dargestellt ist der mittlere Zeitverlauf (Linie) mit Standardabweichung (schattierter Bereich) einer Versuchsgruppe nach Applikation von BOX A [5 μM] sowie einer Kontrolle. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Gefäßdurchmesserunterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrolle zum graphisch markierten (gestrichelte Linie) Zeitpunkt (**A**). Punktauftragung der maximalen Amplitude der Einzelversuche mit Darstellung der Standardabweichung als Fehlerbalken um den Mittelwert (**B**).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1 Versuchstiere**

Die Wahl der Maus als Modellorganismus hatte mehrere Gründe. Die große Ähnlichkeit zwischen Maus- und Humangenom stellt grundsätzlich eine gute Voraussetzung für die präklinische Forschung dar. Für die Maus stehen viele Formen der genetischen Modifikation zur Verfügung, so auch konkret für das Slo1-Gen. Die Paarung heterozygoter Slo1-Mäuse ermöglichte die Reproduktion homozygoter KO- und WT-Tiere, welche zur Untersuchung der Pathophysiologie des BK-Kanals sowie des Vasospasmus unentbehrlich waren. Des Weiteren sei erwähnt, dass zur SAB-Grundlagenforschung viele Studien an Mäusen und Ratten durchgeführt und somit vergleichbare Bedingungen geschaffen wurden. Finanziell erwies sich die Zucht und Haltung der Mäuse aufgrund kurzer Generationszeiten und kleiner Käfiggrößen als verhältnismäßig kostengünstig. Die kurze Tragzeit von 18 - 21 Tagen ermöglichte, bei zeitlich versetzt beginnenden Verpaarungen, eine weitestgehend lückenlose Bereitstellung von Versuchstieren innerhalb eines kurzen Zeitraumes.

Aufgrund verschiedener Fragestellungen wurden Hirnschnitte zwei unterschiedlich alter Mauskohorten untersucht. Die Wahl der juvenilen Maus als Standarduntersuchungsobjekt begründete sich in der Vitalität des jungen Gewebes und der damit einhergehenden erhöhten Toleranz gegenüber ischämischen Hirnschnittschäden. Hirnschnitte adulter Mäuse wurden verwendet, um den Einfluss des Alters auf die HDP-induzierte Gefäßantwort zu ermitteln. Hintergrund dieser Fragestellung ist die Beobachtung, dass der angiographische Vasospasmus signifikant häufiger bei jungen als bei alten Patienten auftritt (de Rooij et al. 2013, Kale et al. 2013, Malinova et al. 2016, Nassar et al. 2019). Es zeigte sich, dass die Übertragung des zeitlichen Versuchsdesigns von Hirnschnitten juveniler auf Hirnschnitte adulter Mäuse möglich war und die zu erwartende verminderte Ischämietoleranz keinen limitierenden Faktor darstellte.

#### **5.1.2 L-NAME**

Die zerebrale Blutperfusion des Menschen kann über Schwankungen des systemischen Blutdruckes im Bereich von 60 - 180 mmHg weitestgehend konstant

gehalten werden. Arteriolen mit einem Durchmesser von 20 - 30  $\mu\text{m}$  unterliegen hierbei besonders der myogenen Autoregulation (Busse und Fleming 1998). Mechanosensible nicht-selektive Kationenkanäle in der Zellmembran zerebraler Widerstandsgefäße reagieren auf eine Blutdruckerhöhung mit einem Ioneneinstrom, was eine Depolarisation der Zelle induziert und spannungsgesteuerte Kalziumkanäle öffnet. Der resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in glatte Gefäßmuskelzellen aktiviert den Querbrückenzyklus und initiiert die Konstriktion des Widerstandsgefäßes (Bayliss 1902). Als ubiquitär vorhandenes Molekül kann NO den vasokonstriktorischen Verhältnissen entgegenwirken, zur Stabilisierung des Gefäßtonus beitragen und somit die ausreichende Versorgung des Hirngewebes sichern (Rubanyi et al. 1990). NO ist in viele physiologische, aber auch pathologische Prozesse involviert und entsteht durch die eNOS, nNOS oder induzierbare NO-Synthase bei der Umwandlung von L-Arginin in Citrullin (Faraci und Heistad 1998). Druckabhängige Scherkräfte innerhalb eines Gefäßes gelten als Initiator der vermehrten Expressierung der NO-Synthasen (Holtz et al. 1984). Entsteht NO im Endothel zerebraler Arteriolen (eNOS) oder in Neuronen, perivaskulären Nerven und Astrozyten (nNOS), diffundiert das lipophile Molekül in glatte Gefäßmuskelzellen, wo es die lösliche Guanylatcyclyase aktiviert. Das durch die Guanylatcyclyase entstehende cGMP aktiviert die Proteinkinase G, welche die NO-vermittelten Prozesse einleitet (Faraci und Heistad 1998). Über die Hemmung des Querbrückenzyklus und die Aktivierung kalzium- sowie spannungsgesteuerter Kaliumkanäle entfaltet NO seine hyperpolarisierende und somit vasodilatorische Wirkung (Schlossmann et al. 2000, Nakamura et al. 2007).

Angesichts des fehlenden zerebralen Perfusionsdruckes verschiebt sich das Gleichgewicht von Vasokonstriktion und Vasodilatation im Hirnschnittmodell zugunsten der Vasodilatation. Um diesem Ungleichgewicht entgegenzuwirken, wurde L-NAME vor jeder Substanztestung präinkubiert. Als L-Arginin-Analogon inhibiert dieses die eNOS und nNOS kompetitiv, wodurch die NO-Bioverfügbarkeit sinkt (Dwyer et al. 1991, Moore und Handy 1997). L-NAME empfiehlt sich zur Erzeugung eines Gefäßtonus, da es dem endogenen eNOS-Inhibitor ADMA ähnelt. ADMA wird nach einer SAB vermehrt im Liquor nachgewiesen und scheint in die Pathogenese des Vasospasmus involviert zu sein, da es, wie auch L-NAME, ein zerebrales NO-Defizit begünstigt (Jung et al. 2004). Das 45-minütige Präinkubationsintervall war für die ausreichende Wirkungsentfaltung auf die NO-Synthasen notwendig (Fergus et al. 1995, Zonta et al. 2003). Da L-NAME auch über das Präinkubationsintervall hinaus



leicht vasokonstriktorisch wirkte, wurde bei den Messreihen mit Substanzapplikation die Gefäßreaktion mit einer *L*-NAME-Kontrolle (Langguth 2019) verglichen, um einen additiven Effekt auszuschließen.

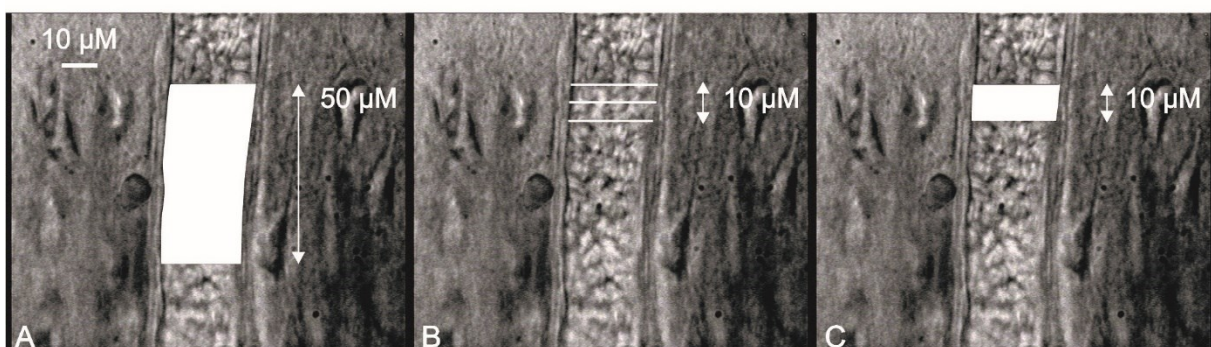
Es existieren Alternativen zur Simulierung des Gefäßtonus *in vitro*. Wie bereits in Kapitel 1.2.3 erwähnt, verschiebt sich das physiologische Gleichgewicht vasokonstriktorischer und vasodilatatorischer Transmitter durch den Endothelschaden nach einer SAB zugunsten der Gefäßverengung. Als vasokonstriktorisches Arachidonsäurederivat ist auch Thromboxan A<sub>2</sub> in dieses Ungleichgewicht involviert. Studien von Ansar et al. zeigten, dass unter SAB-Bedingungen Thromboxan-Rezeptoren vermehrt exprimiert werden. Durch das gehäufte Rezeptorvorkommen entfaltet Thromboxan A<sub>2</sub> einen verstärkten kontraktilen Effekt und bewirkt somit eine Reduktion des regionalen zerebralen Blutflusses (Ansar et al. 2010). Die Beeinflussung der Physiologie von Thromboxan A<sub>2</sub> kann genutzt werden, um eine gesteigerte Kontraktilität im Hirnschnittmodell zu simulieren. So eignet sich beispielsweise der Thromboxan-Rezeptor-Agonist U-46619 zur Simulierung des Gefäßtonus (Sorop et al. 2002). Eine weitere Alternative ist die Vorspannung von Hirngefäßen mittels eines Myographen (Grande et al. 2013). Das setzt jedoch die Freipräparation des Gefäßes voraus und ist bei kleinen Arteriolen nicht umsetzbar und somit keine Option.

Paradoxerweise resultierte die Präinkubation von *L*-NAME nicht immer in einer Konstriktion, sondern mitunter in einer Dilatation der zu untersuchenden Arteriole. Diese Gefäßreaktion lässt sich auf die Beobachtung zurückführen, dass NO eine entscheidende Rolle bei der neurovaskulären Kopplung einnimmt (Zonta et al. 2003). NO inhibiert zum einen die  $\omega$ -Hydroxylase und zum anderen die Epoxygenase in Astrozyten. Folglich wird weniger Arachidonsäure zu vasokonstriktorischer 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) beziehungsweise vasodilatatorischer Epoxyeicosatriensäure (EET) oxidiert. Die Enzyme  $\omega$ -Hydroxylase und Epoxygenase unterscheiden sich in ihrer NO-Sensitivität. Es ist anzunehmen, dass bei einem hohen astrozytären NO-Level insbesondere die Epoxygenase inhibiert wird, folglich weniger gefäßerweiternde EET vorhanden ist und deswegen der vasokonstriktorisches 20-HETE-Effekt überwiegt. Bei einem niedrigen astrozytären NO-Level ist hingegen die  $\omega$ -Hydroxylase zunehmend inhibiert, die 20-HETE-Konzentration sinkt und EET kann einen vasodilatatorischen Effekt vermitteln (Metaea und Newman 2006). Da die

Ausgangskonzentration von NO zwischen den Hirnschnitten variiert, kann vermutet werden, dass die neurovaskuläre Kopplung und somit die Regulation des Gefäßdurchmessers unter L-NAME unterschiedlich ausfällt.

### 5.1.3 Analyse des Gefäßdurchmessers

Die polygonale Flächenbestimmung zwischen den Gefäßwänden eines 50  $\mu\text{m}$  langen Arteriolenabschnittes ist seit Jahren das etablierte Auswerteverfahren zur Identifizierung von Vasoaktivität in der Arbeitsgruppe Bioimaging. Ein alternativer Ansatz zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers ist die Ermittlung dreier Innendurchmesser entlang eines definierten Arteriolenabschnittes. Aus den gemessenen Werten wird der Mittelwert gebildet, welcher zum Ausgangsmittelwert in Bezug gesetzt werden kann (Koide et al. 2013a, Balbi et al. 2017). Anna Schaeffgen zeigte in ihrer medizinischen Dissertation stichprobenartig, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Auswertemethoden über einen 50  $\mu\text{m}$  langen Arteriolenabschnitt resultiert (Schaeffgen 2020). Zur Bekräftigung dieses Ergebnisses wurde die PDP A-Messreihe in adulten Mäusen erneut aufgegriffen und, in Anlehnung an Balbi et al., über einen 10  $\mu\text{m}$  langen Arteriolenabschnitt über die Mittelung dreier Innendurchmesser ausgewertet. Zusätzlich wurde der gleiche 10  $\mu\text{m}$  lange Abschnitt mit der Flächenmethode analysiert (Abb. 33). Das Ergebnis der statistischen Auswertung ist in Tab. 8 dargestellt.



**Abb. 33:** Darstellung der Auswerteverfahren im Vergleich: Flächenmethode über 50  $\mu\text{m}$  (A), Erfassung dreier Gefäßinnendurchmesser über 10  $\mu\text{m}$  zur Bildung des Mittelwertes (B) und Flächenmethode über 10  $\mu\text{m}$  (C).

	Flächenmethode (50 µm)	Mittelung dreier Innendurchmesser (10 µm)	Flächenmethode (10 µm)
Gefäßkonstriktion [%] n = 6	7,7	7,2 (p = 0,9)	6,9 (p = 0,8)

**Tab. 8:** Vergleich unterschiedlicher Auswerteverfahren zur Ermittlung des Innendurchmessers anhand der Messreihe „PDP A in adulten Mäusen“. Der p-Wert nimmt Bezug auf die bisher angewendete Flächenmethode über 50 µm. Verwendung des Zweistichproben-t-Tests bei angenommener Normalverteilung.

Es wird ersichtlich, dass die Auswahl des Auswerteverfahrens keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis nimmt und somit die Flächenmethode über 50 µm legitimiert. Die prozentuale Gefäßkonstriktion wird durch die beiden alternativen Auswertemethoden jedoch unterschätzt, was als kritisch zu betrachten ist.

#### 5.1.4 Elektrische Stimulation

Der Untersuchungsgegenstand der elektrischen Hirnschnitt-Stimulation ist die neurovaskuläre Kopplung, welche die Regulation des Gefäßdurchmessers in Abhängigkeit von der lokalen Kortexaktivität beschreibt (Filosa et al. 2006, Iadecola und Nedergaard 2007). Neuronen, Astrozyten und intrazerebrale Arteriolen stellen die Glieder des auch als funktionelle Hyperämie bekannten Prozesses dar (Attwell et al. 2010). In dieser Arbeit diente ein elektrischer Stimulus der Erzeugung einer neuronalen Erregung, welche über das astrozytäre Bindeglied eine Gefäßreaktion bis Kortexschicht II/III des visuellen Mausekortex bewirken sollte. Durch die Wahl einer bipolaren, konzentrischen Elektrode wurde die Ausbreitung des Stimulus begrenzt und zudem das Ausmaß des Schadens im Hirngewebe reduziert (Ranck 1975, Neagu et al. 2005). Die Platzierung der Elektrode erfolgte zum einen in Kortexschicht VI, angrenzend an die weiße Hirnsubstanz in der kortikalen Kolumne der zu analysierenden Arteriole und zum anderen in der benachbarten Kolumne in Kortexschicht II/III. Holthoff et al. zeigten, dass ein elektrischer Stimulus in Kortexschicht VI ein intrinsisches optisches Signal in den Kortexschichten II bis VI hervorruft (Holthoff et al. 1994). Dieses Signal, welches *in vitro* durch die aktivitätsabhängige Zunahme des intrazellulären Volumens hervorgerufen wird

(MacVicar und Hochman 1991), kann im akuten Hirnschnitt als Reporter für gesteigerte neuronale Aktivität benutzt werden (Holthoff et al. 1994). Die kolumnäre Erregungsausbreitung sollte durch die Stimulation in Kortexschicht VI ausgelöst werden. In Kortexschicht II/III wird der Gefäßdurchmesser intralaminär sowohl durch GABAerge Interneurone als auch durch Cyclooxygenase-2 exprimierende Pyramidenzellen, welche das vasodilatatorische Prostaglandin E<sub>2</sub> synthetisieren, moduliert (Petersen 2007, Lecrux und Hamel 2016). Die Wahl der angelegten Spannungen fußt auf laborinternen Stimulationsprotokollen (durchgeführt von Dr. Alexander Joerk). Stimuli von 1 - 2 V in Kortexschicht VI erzeugten neuronale Erregbarkeit und resultierten in einer physiologischen Vasodilatation; Stimuli von 6 - 8 V aufgrund einer überschwelligeren Erregung in einer Vasokonstriktion. Übertragen auf die Experimente dieser Arbeit sollte sowohl die arterioläre Reaktion bei Stimulation mit 2,5 V als auch mit 7 V und 8 V untersucht werden. Der Vergleich zwischen den Experimenten der Stimulation mit 7 V in Kortexschicht VI und 8 V in Kortexschicht II/III erscheint aufgrund der Änderung zweier Parameter (Spannung und Lage der Elektrode) nicht sinnvoll.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Hämabbauprodukte in adulten Mäusen**

Eine signifikant geringere Vasokonstriktion konnte bei der Testung von PDP A in adulten Maushirnschnitten im Vergleich zur juvenilen Kontrolle detektiert werden (Abb. 19). Die Beobachtung der abgeschwächten Gefäßverengung in adulten Mäusen entspricht den Ergebnissen klinischer Studien, die das altersabhängige Auftreten der angiographischen Vasokonstriktion untersuchten. Malinova et al. sowie Nassar et al. identifizierten ein signifikant erhöhtes Risiko des Entstehens eines angiographischen Vasospasmus bei Patienten, die jünger als 39 beziehungsweise 38 Jahre alt waren (Malinova et al. 2016, Nassar et al. 2019). Ergänzend konnten auch Studien von Kale et al. sowie De Rooij et al. zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines angiographischen Vasospasmus bei einem Lebensalter von unter 50 beziehungsweise 55 Jahren signifikant größer ist (de Rooij et al. 2013, Kale et al. 2013). Die Beobachtung der abgeschwächten Gefäßreaktion kann auf vielfältige altersabhängige biologische Gefäßveränderungen zurückgeführt werden, welche die Vitalität und Anpassungsmöglichkeiten der Gefäße betreffen. Die Gefäßphysiologie

wird maßgeblich durch die Vitalität des Endothels und die Funktionalität glatter Gefäßmuskelzellen bestimmt. Durch Einschränkungen Endothel-abhängiger sowie -unabhängiger Relaxationsprozesse nimmt die Anpassungsfähigkeit von Gefäßen im Alter ab (Marin 1995, Gerhard et al. 1996). Des Weiteren wird die kontraktile Antwort durch strukturelle Gefäßveränderungen, welche teilweise durch das gehäufte Auftreten von Sauerstoffradikalen aufgrund geringerer antioxidativer Kapazitäten bedingt sind, erschwert (Lang et al. 1995, Samiec et al. 1998). Veränderungen im Kalziumhaushalt (Cassie et al. 1990) sowie die Beeinträchtigung der Funktionalität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen (Ponte et al. 1996) beeinflussen die Gefäßreaktion zusätzlich.

Shi et al. untersuchten den BK-Kanal in der Mesenterialarterie alter Ratten. Es stellte sich heraus, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit, die mittlere Öffnungszeit sowie die Sensitivität des BK-Kanals für Ca<sup>2+</sup> bei alten Ratten niedriger als bei der jungen Vergleichsgruppe war und mit der Herunterregulation der α- und β1-Untereinheit des Kanals assoziiert sein könnte (Shi et al. 2013).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, zusätzlich zu den strukturellen Gefäßveränderungen, die Beeinträchtigung der Funktionalität des BK-Kanals im Alter eine wichtige Ursache der beobachteten abgeschwächten HDP-induzierten Gefäßreaktion darstellen könnte und die Ergebnisse mit dem klinischen Bild des altersabhängigen Auftretens eines angiographischen Vasospasmus vereinbar sind.

### **5.2.2 Dihydro-BOX A**

Das Z-konfigurierte BOX A-Molekül zeigte in vergangenen und vergleichbaren Hirnschnittexperimenten eine signifikante Verengung des Gefäßdurchmessers (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019). Dagegen führte die E-Konfiguration des Isomers zu einem Verlust der Vasoaktivität (Langguth 2019). Um auf Grundlage dieser Vordaten die Struktur-Wirkungs-Beziehung von BOX A detaillierter aufzuklären, wurde die Vinylgruppe des Moleküls hydriert und analysiert, ob die Veränderung der Substanz den vasogenen Effekt beeinflusst. Das modifizierte BOX A-Molekül entfaltete sowohl bei den WT- als auch bei den KO-Maushirnschnitten keinen vasokonstriktorisches Effekt (Abb. 21). Die Gefäßreaktion der WT-Versuchsgruppe war jedoch signifikant schwächer als die der BOX A WT-Kontrolle. Die Interaktion von BOX A mit dem BK-Kanal ist nicht vollständig aufgeklärt. Es ist möglich, dass sich das hydrophobe

BOX A-Molekül zwischen die Transmembrandomänen sowie die zytoplasmatische RCK1-Domäne schiebt und somit den geschlossenen Kanalzustand stabilisiert. Die Amid-Gruppe des BOX A-Moleküls scheint hierbei mit der <sup>329</sup>RKK<sup>331</sup>-Domäne des S6-Transmembransegments zu interagieren und den inhibitorischen Effekt zu bestimmen (Hou et al. 2011, Seidel et al. 2017). Bei der Synthese von Dihydro-BOX A wurde jedoch nicht die Amid-, sondern die Vinyl-Gruppe des BOX A-Moleküls hydriert. Folglich scheinen sowohl die Amid- als auch die Vinyl-Gruppe bei der Interaktion des BOX A-Moleküls mit dem BK-Kanal von Bedeutung zu sein.

Es bleibt jedoch offen, wie die Vinyl-Gruppe mit dem BK-Kanal interagiert und welche Rolle die Amid-Gruppe diesbezüglich einnimmt.

### 5.2.3 MVM

In einem Reaktionsansatz einer Studie von Kranc et al. zerfiel das Bilirubinmolekül unter dem Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu den in der HPLC identifizierten Oxidations-Endprodukten BOX A, BOX B und MVM. Die HPLC-Liquoranalyse von Patienten nach einer SAB bekräftigte das Vorhandensein dieser Oxidations-Endprodukte (Kranc et al. 2000). Es ist bekannt, dass BOXes einen inhibitorischen Effekt auf den BK-Kanal entfalten und somit zur Pathogenese des Vasospasmus beitragen (Kranc et al. 2000, Hou et al. 2011). Für BOX A konnte dieser vasokonstriktorische Effekt sowohl in akuten Hirnschnittexperimenten als auch *in vivo* bewiesen werden. Die Testung von BOX B zeigte eine verzögerte signifikante Vasokonstriktion *in vivo* (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019). Aufgrund der Möglichkeit der Synthese sowie der Stabilisierung von MVM konnte das oxidative Endprodukt, ergänzend zu BOX A und BOX B, auf Vasoaktivität untersucht werden. Konträr zur Testung von BOX A vermittelte MVM keinen signifikanten gefäßverengenden Effekt im Hirnschnittmodell (Abb. 22). Das Ergebnis der MVM-Testung steht im Einklang mit der von Hou et al. formulierten Hypothese. BOXes verfügen über eine Amid-Gruppe, welche für den inhibitorischen Effekt auf den BK-Kanal essenziell zu sein scheint. Da im MVM-Molekül keine Amid-Gruppe vorhanden ist, kann MVM auch nicht inhibitorisch wirken (Hou et al. 2011).

Um die Aussage der fehlenden Vasoaktivität des MVM-Moleküls zu fundieren und andere Effekte auf den BK-Kanal auszuschließen, sollten ergänzend *in vivo*-Versuche, angelehnt an die Vorversuche mit BOXes, über eine größere Zeitspanne erfolgen. Dies würde jedoch eine stabile Formulierung des MVM-Moleküls voraussetzen.

#### 5.2.4 Effekt spezifischer BK-Kanal-Aktivatoren

Während die PDP A-induzierte Gefäßverengung durch BMS 204352 verhindert werden konnte (Abb. 24), ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der Testung von BMS 191011 (Abb. 23). BMS 204352 wurde ursprünglich zur Neuroprotektion nach ischämischen Schlaganfällen entwickelt, konnte jedoch in einer Phase-III-Studie keine bessere Prognose der Patienten nachweisen (Jensen 2002). Die selektive BK-Kanal-Aktivierung in ischämischen Zellen sollte einer übermäßig gesteigerten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration entgegenwirken und somit die zelluläre Depolarisationsrate senken (Gribkoff et al. 2001). Es zeigte sich, dass BMS 204352 zusätzlich aktivierend auf  $K_v7$ -Kanäle wirkt. Durch die Aktivierung dieser Kaliumkanäle wird das Ruhemembranpotenzial neuronaler Zellen stabilisiert und Übererregungen entgegengesteuert (Schroder et al. 2001). Überdies wurde sowohl der  $K_v7.1$ - als auch der  $K_v7.4$ -Kanal in der Membran glatter Gefäßmuskelzellen intrazerebraler Arteriolen entdeckt (Zhong et al. 2010). Eine mögliche Aktivierung arteriolärer  $K_v7$ -Kanäle könnte glatte Gefäßmuskelzellen zusätzlich zur BK-Kanal-Aktivierung hyperpolarisieren und so die vasodilatatorische Wirkung unterstützen. Entgegen der Hypothese konnte bei der Testung von BMS 191011 (sowohl mit als auch ohne PDP A-Zugabe) eine Tendenz zur Vasokonstriktion festgestellt werden, welche von Streuungen geprägt war. Die Beobachtungen zu den Versuchen mit BMS 191011 widersprechen dem Ergebnis eines gefäßerweiternden Effektes auf retinale Arteriolen (Mori et al. 2011). Da die Streuung der Mittelwerte nach BMS 204352-Applikation gering ausfiel und sich beide BMS-Substanzen nur in ihrer Wirkung auf die  $K_v7$ -Kanäle unterscheiden, kann vermutet werden, dass der fehlende aktivierende Effekt auf  $K_v7$ -Kanäle eine Übererregung neuronaler Zellen nach BMS 191011-Applikation begünstigte.

Die Bewertung der BMS-Substanzen zur Prävention der PDP-induzierten Vasokonstriktion fällt somit unterschiedlich aus. BMS 204352 konnte den gefäßverengenden Effekt von PDP A verhindern und wurde bisher nur unter dem Aspekt der Neuroprotektion nach ischämischen Schlaganfällen in klinischen Studien getestet (Jensen 2002). Da das Risikoprofil in vergangenen Studien gering ausfiel, könnte eine weiterführende Testung von BMS 204352 gezielt zur Vasospasmusprävention einen vielversprechenden Ansatz darstellen. BMS 191011 konnte die PDP A-induzierte Gefäßverengung nicht verhindern. Die begrenzte Datenlage zu BMS 191011 lässt keine abschließende Beurteilung über die klinische

Anwendbarkeit der Substanz zu. Weitere Studien mit Einschluss der Untersuchung möglicher Nebeneffekte unter Interaktionen sind daher unerlässlich.

### **5.2.5 Effekt spezifischer BK-Kanal-Inhibitoren**

Die PAX-Versuchsgruppe unterschied sich nicht von der PAX-Versuchsgruppe, bei der zeitverzögert PDP A appliziert wurde (Abb. 25). Die Gefäßkonstriktion nach zeitverzögerter PDP A-Applikation auf dem Hintergrund von IbTX war hingegen signifikant stärker als nach alleiniger IbTX-Applikation (Abb. 26). Zudem konnte nur bei den beiden IbTX-Versuchsgruppen eine signifikante Vasokonstriktion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die Ergebnisse der Testung zelltypspezifischer BK-Kanal-Inhibitoren deuten darauf hin, dass PDP A vorwiegend auf astrozytär-exprimierte BK-Kanäle inhibitorisch wirkt. Die Aussage begründet sich in der Beobachtung des zusätzlichen vasokonstriktorischen Effektes von PDP A nach 45-minütiger Präinkubation mit IbTX (BK-Kanal-Inhibitor in glatten Gefäßmuskelzellen). Unter Annahme einer Inhibition der glattmuskulär exprimierten BK-Kanäle durch IbTX kann PDP A weiterhin Einfluss auf astrozytär-exprimierte BK-Kanäle nehmen und den vasokonstriktorischen Effekt verstärken. PAX wirkt paninhibitorisch auf BK-Kanäle der gesamten neurovaskulären Einheit einschließlich der Expression in Astrozyten und Endothelzellen (Gebremedhin et al. 2003, Yamaura et al. 2006). Durch die pharmakologische Inhibition aller BK-Kanäle konnte folgerichtig keine zusätzliche Konstriktion bei PDP A-Zugabe beobachtet werden. Die Wirkung von PDP A auf den astrozytären BK-Kanal ist jedoch nicht die einzige mögliche Erklärung für das beobachtete Ergebnis. Es könnte auch sein, dass PDP A einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration im astrozytären Endfuß initiiert. Folglich werden BK-Kanäle vermehrt aktiviert und der  $K^{+}$ -Ausstrom aus dem astrozytären Endfuß nimmt zu. Steigt die extrazelluläre  $K^{+}$ -Konzentration auf über 20 mM an, entfalten  $K_{ir}$ -Kanäle in der Membran glatter Gefäßmuskelzellen einen depolarisierenden Effekt, der die Konstriktion des zerebralen Gefäßes initiiert (Koide et al. 2012). Die Tatsache, dass sowohl die Testung von PAX allein als auch in Kombination mit PDP A in keiner signifikanten Vasokonstriktion resultierte, lässt sich mit der Beobachtung einer anderen Studie erklären. PAX inhibiert vorzugsweise BK-Kanäle im geschlossenen Zustand (Zhou und Lingle 2014). Durch die Vorspannung mit L-NAME befinden sich BK-Kanäle hauptsächlich im geöffneten Kanalzustand, um dem NO-Defizit



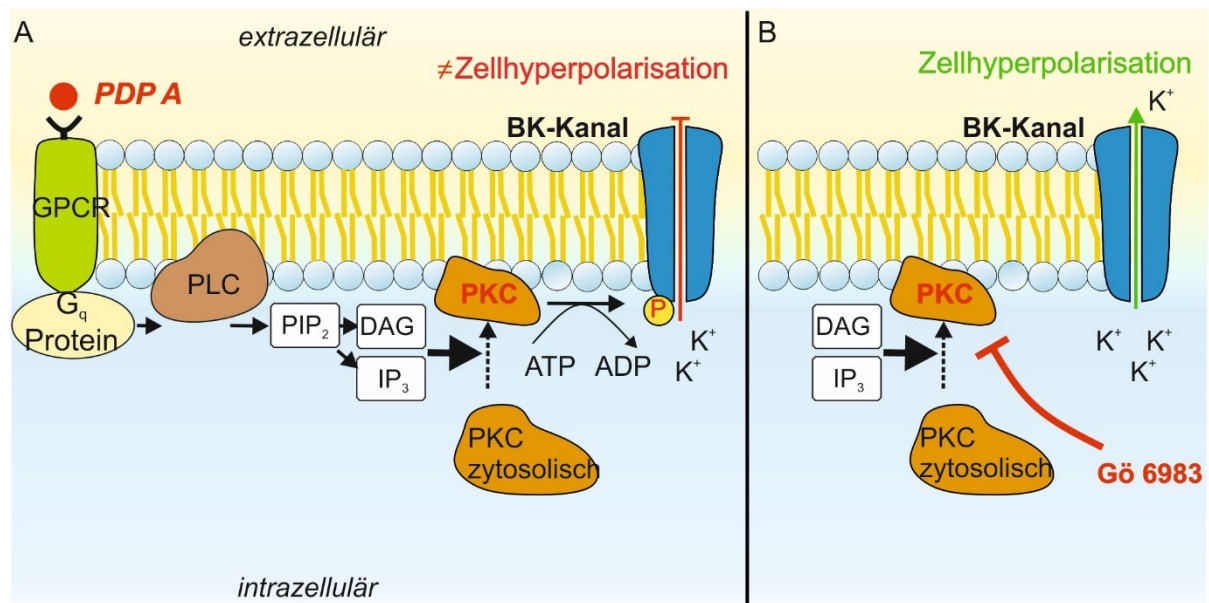
entgegenzuwirken. PAX wirkt demzufolge weniger inhibitorisch auf BK-Kanäle und die Vasokonstriktion ist schwächer ausgeprägt.

Ergänzend zu den Experimenten mit den zelltypspezifischen Inhibitoren IbTX und PAX wäre die Testung von PDP A in einem Knock-out-Modell des astrozytären BK-Kanals aufschlussreich. Zeigt PDP A keinen vasokonstriktorischen Effekt auf, könnte die Vermutung, dass astrozytäre BK-Kanäle vermehrt durch PDP A inhibiert werden, untermauert werden.

### **5.2.6 Effekt eines Proteinkinase C-Inhibitors**

Es ist bekannt, dass das PKC-Aktivitätslevel nach einer SAB erhöht ist (Ohta et al. 1995, Laher und Zhang 2001) und mit vasokonstriktorischen Verhältnissen in glatten Gefäßmuskelzellen assoziiert wird (Wang et al. 2015). Die Effekte der PKC auf glatte Gefäßmuskelzellen sind umfassend und wurden in Kapitel 1.4.2 explizit erläutert. Als besonderer Aspekt soll die Wirkung auf den BK-Kanal geschildert werden. Die inhibierende Wirkung der PKC auf den BK-Kanal wurde von Minami et al. 1993 beschrieben (Minami et al. 1993). Zhou et al. zeigten, dass die PKC über Phosphorylierungen an zwei Serinresten der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals aktivitätsmodulierend wirkt (Zhou et al. 2010). Im Laufe der Jahre wurde der PKC sowohl eine inhibierende (Zhou et al. 2008, Zhou et al. 2010) als auch eine aktivierende Wirkung (Barman et al. 2004, Zhu et al. 2006) auf den BK-Kanal zugesprochen, welcher vom Gefäßbett und der Expression der Isoformen abhängig ist. Pyne-Geithman et al. konnten unter dem Einfluss von BOXes eine signifikante Translokationssteigerung der PKC Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  nachweisen und postulierten, dass die PKC eine verstärkende Funktion für den kontraktile Effekt der BOXes einnimmt (Pyne-Geithman et al. 2008). In Anlehnung an diese Beobachtung wurde Gö 6983, welches die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\zeta$  der PKC inhibiert, ausgewählt, um eine mögliche Interaktion der PDPs mit der PKC zu identifizieren. Die Testung der Kombination aus Gö 6983 und PDP A resultierte in einer leichten Vasodilatation, die sich signifikant von der PDP A-Kontrolle unterschied (Abb. 27). Aus dem Ergebnis könnte abgeleitet werden, dass die Inhibition der PKC, in Anlehnung an Zhou et. al, in einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals resultiert. Da vergangene Studien darauf hindeuten, dass PDPs ihren gefäßverengenden Effekt über die Inhibition des BK-Kanals entfalten (Joerk et al. 2014, Joerk et al. 2019), kann vermutet

werden, dass die PKC über die Phosphorylierung des Kanalproteins in die Pathogenese der PDP A-induzierten Gefäßkonstriktion involviert ist (Abb. 34).



**Abb. 34:** Schema des Stellenwerts der Proteinkinase C (PKC) in der PDP A-vermittelten BK-Kanal-Inhibition. PDP A könnte durch die Aktivierung der extrazellulären Domäne des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors (GPCR) die PKC-Aktivierungskaskade einleiten. Die entstehenden Moleküle Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) ermöglichen kalziumabhängig und/oder kalziumunabhängig die Translokation der PKC zur Zellmembraninnenseite. Die aktivierte PKC kann unter Verbrauch eines ATPs die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals phosphorylieren und somit inaktivieren. Folglich entfällt der hyperpolarisierende Effekt des BK-Kanals und die glatte Gefäßmuskelzelle neigt zur Depolarisation (A). Gö 6983 inhibiert die PKC durch Blockade der ATP-Bindungsstelle. Dementsprechend kann die PKC das BK-Kanal-Protein nicht mehr phosphorylieren. Der BK-Kanal entfaltet so, trotz des Vorhandenseins der PDPs, einen hyperpolarisierenden Effekt auf die glatte Gefäßmuskelzelle (B).

Weitere Studien könnten gezielt die Translokation der PKC-Isoformen unter dem Einfluss von PDP A untersuchen. Zum einen würde so eine genauere Aussage zur PKC-Aktivierung durch PDPs möglich, zum anderen könnte man die involvierten Isoformen, ähnlich wie Pyne-Geithman et al. 2008, ausfindig machen und anschließend selektivere PKC-Inhibitoren in Hirnschnittexperimenten testen. Eine selektivere PKC-Inhibition würde Nebeneffekte auf kalziumabhängige

und -unabhängige Prozesse (Geraldes und King 2010, Ringvold und Khalil 2017) minimieren und somit das Nebenwirkungsprofil senken.

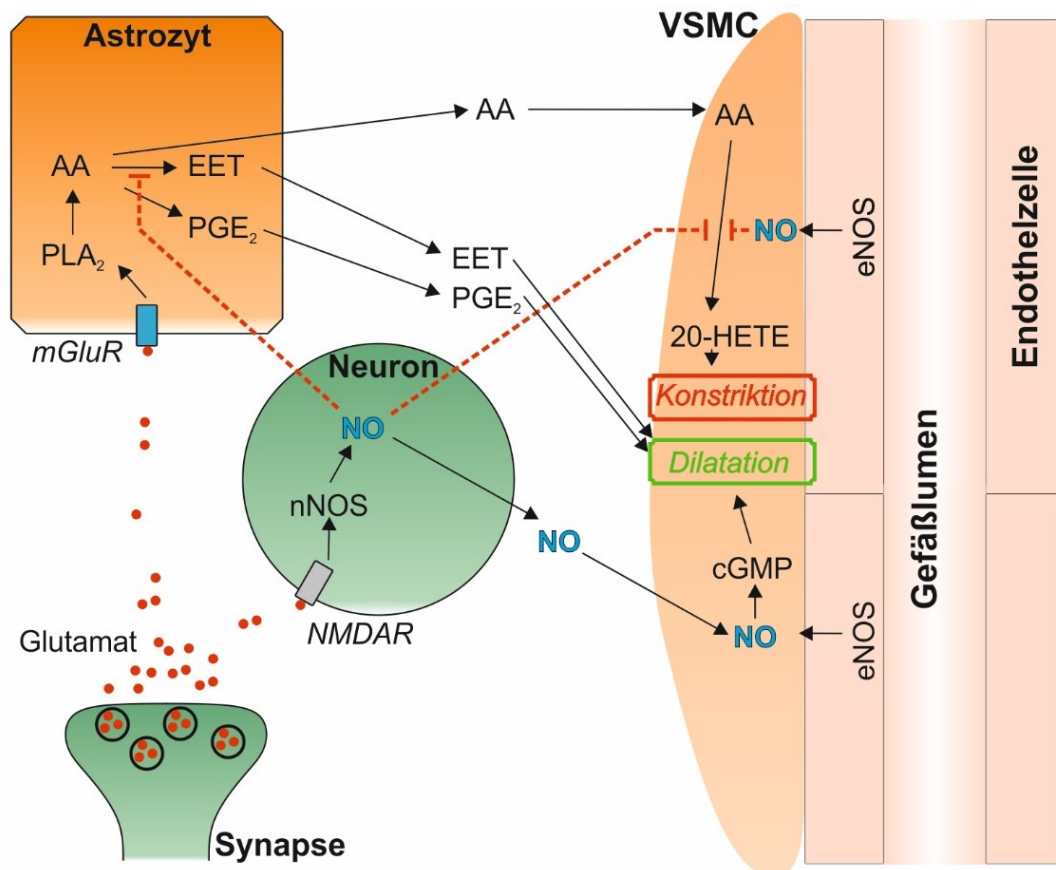
### **5.2.7 Einfluss der Hämabbauprodukte auf die neurovaskuläre Kopplung**

Als Grundlage für die Experimente der elektrischen Stimulation diente eine von Dr. Alexander Joerk erfasste, laborinterne Stimulationsreihe, welche die arterioläre Durchmesseränderung in Abhängigkeit der angelegten Spannung zum Gegenstand hatte. Innerhalb dieser Versuchsreihe dilatierte die untersuchte Arteriole nach Stimulation mit einer angelegten Spannung von kleiner gleich 2 V. Die Stimulationsexperimente mit 2,5 V basierten somit auf der Hypothese, dass die elektrische Stimulation eine kortikale Erregung initiiert, welche über Astrozyten als Bindeglied zu glatten Gefäßmuskelzellen zur Dilatation der blutzuführenden Arteriole führt. Da bei dieser physiologisch auftretenden funktionellen Hyperämie astrozytäre BK-Kanäle von großer Bedeutung sind, sollte der Einfluss der HDPs auf die neurovaskuläre Kopplung untersucht werden. Weder nach Stimulation mit 2,5 V in Kortexschicht II/III noch in Kortexschicht VI wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen HDP-Versuchsgruppe und der Kontrolle festgestellt (Abb. 28 und 30).

Während die Vorarbeiten am nativen Hirnschnittpräparat bei niedrigen Spannungen eine Gefäßdilataion zeigten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nach pharmakologischer Gefäßvorspannung mittels L-NAME (Kontrolle) kein vasodilatatorischer Effekt identifiziert werden. Um diese Beobachtung erklären zu können, muss die Physiologie der neurovaskulären Kopplung genauer betrachtet werden. Die in Kapitel 1.5 beschriebene Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen als Folge gesteigerter astrozytärer BK-Kanal-Aktivität (Filosa et al. 2006, Price et al. 2002) ist nicht der einzige Signalweg, der zur Zunahme des regionalen zerebralen Blutflusses führt. Im Rahmen der neurovaskulären Kopplung können zudem Prostaglandin E<sub>2</sub> sowie NO einen Großteil der aktivitätsabhängigen Vasodilatation bewirken (Buerk et al. 2003). Erhöhte neuronale Aktivität führt zur verstärkten Freisetzung von Glutamat, was wiederum die Aktivierung postsynaptischer NMDA- und AMPA-Rezeptoren ermöglicht. Infolgedessen steigt die neuronale intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und kalziumabhängige Enzyme, wie beispielsweise die nNOS, werden aktiviert. Das entstehende NO kann direkt in glatte Gefäßmuskelzellen

diffundieren, die lösliche Guanylatcyclase aktivieren und eine Vasodilatation bewirken (Attwell et al. 2010, Lecrux und Hamel 2016). Alternativ können auch nNOS-positive Interneurone aktiviert werden und den Gefäßdurchmesser entscheidend erweitern (Wakatsuki et al. 1998).

Das durch die neuronale Erregung freigesetzte Glutamat kann überdies metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Astrozyten stimulieren. Folglich steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wodurch die Phospholipase  $\text{A}_2$  vermehrt Arachidonsäure aus Membranlipiden spalten kann. Die Arachidonsäure wird anschließend entweder direkt in den Astrozyten über die Epoxygenase zu EET oder erst in der glatten Gefäßmuskelzelle über die  $\omega$ -Hydroxylase zu 20-HETE umgewandelt. Sowohl die vasodilatatorische EET als auch die vasokonstriktorische 20-HETE beeinflussen den Gefäßdurchmesser im Rahmen der neurovaskulären Übertragung (Peng et al. 2004, Metea und Newman 2006). NO, synthetisiert durch die nNOS und durch die eNOS, kann zudem Einfluss auf die Wirkung der Arachidonsäurederivate nehmen, indem es die jeweiligen Enzyme konzentrationsabhängig inhibiert (Roman 2002). Da sich die Epoxygenase und die  $\omega$ -Hydroxylase in ihrer NO-Sensitivität unterscheiden, resultiert ein von NO abhängiges Inhibitionsmuster mit dementsprechenden 20-HETE- und EET-Konzentrationen, welche den Gefäßtonus modulieren (Kapitel 5.1.2). NO-Signalwege sind demzufolge, zusätzlich zur Beeinflussung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration durch gesteigerte BK-Kanal-Aktivität, ein wichtiger Bestandteil der neurovaskulären Kopplung (Abb. 35).



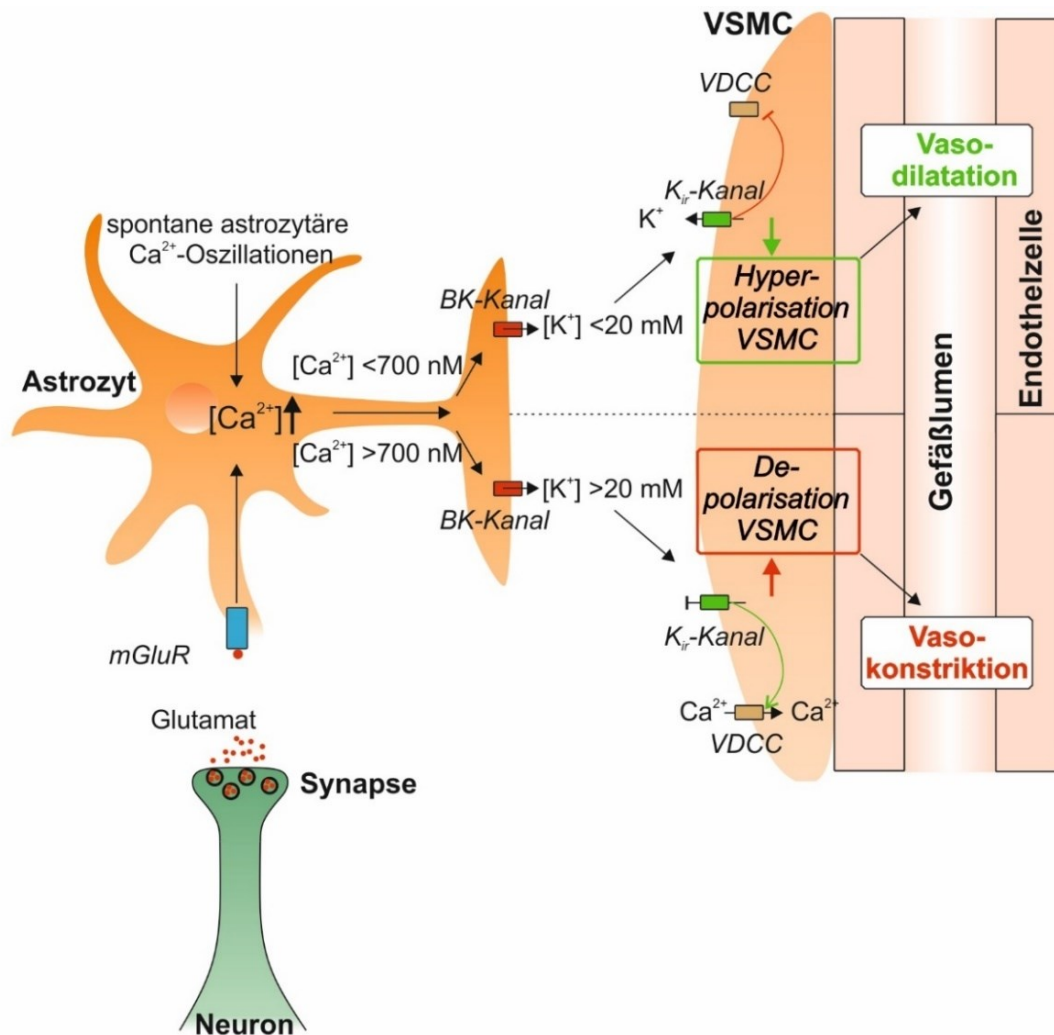
**Abb. 35:** Einfluss von NO auf die neurovaskuläre Kopplung (abgewandelt von Attwell 2010). Die gesteigerte neuronale Aktivität führt zur glutamatergen Aktivierung neuronaler NMDA-Rezeptoren (NMDAR), was wiederum die neuronale NO-Synthese ankurbelt. NO kann in die glatte Gefäßmuskelzelle (VSMC) diffundieren und gemeinsam mit dem endothelial synthetisierten NO (eNOS) die cGMP-vermittelte Vasodilatation einleiten. Zudem werden metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR) der Astrozyten aktiviert und somit die Phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)-katalysierte Entstehung der Arachidonsäure (AA) ermöglicht. Die Arachidonsäure wird entweder in den Astrozyten zu den vasodilatatorischen Molekülen EET und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) umgewandelt oder in den glatten Gefäßmuskelzellen zur vasokonstriktorischen 20-HETE. Das neuronal synthetisierte NO inhibiert die enzymatische Umwandlung von Arachidonsäure in EET beziehungsweise in 20-HETE. Zudem inhibiert das NO der eNOS die Katalyse von Arachidonsäure in 20-HETE.

Es wird ersichtlich, dass NO unentbehrlich für einen physiologischen Ablauf der neurovaskulären Kopplung ist. L-NAME inhibiert sowohl die nNOS als auch die eNOS im Hirnschnitt (Dwyer et al. 1991, Moore und Handy 1997) und greift somit unweigerlich in die neurovaskuläre Kopplung ein. Kitaura et al. applizierten den NOS-Inhibitor L-NA (vergleichbar mit L-NAME) auf die Kortexoberfläche von Mäusen des

C57BL/6-Stammes mit dem Ergebnis einer zu 50 % reduzierten aktivitätsabhängigen Vasodilatation im somatosensorischen Kortex (Kitaura et al. 2007). In einem ähnlichen Versuchsaufbau konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass NO nach einem kurzen sensorischen Stimulus über 50 % der neurovaskulären Gefäßerweiterung ermöglicht und somit als früh einsetzender Botenstoff ein essenzieller Bestandteil der neurovaskulären Kopplung ist (Shibuki et al. 2003). Eine langanhaltende Stimulation initiiert hingegen in erster Linie die verstärkte astrozytäre Synthese der vasodilatatorischen EET (Liu et al. 2008). Da L-NAME jedoch in die EET- und 20-HETE-Physiologie über die Beeinflussung des NO-Haushaltes eingreift, könnte zudem die EET-vermittelte Vasodilatation im Hirnschnittmodell beeinträchtigt worden sein.

Letztendlich muss in Erwägung gezogen werden, dass durch die Gefäßvorspannung der NO-Haushalt so beeinträchtigt wurde, dass kein vasodilatatorischer Effekt auf den 2,5 V-Stimulus, unabhängig von der HDP-Applikation, identifiziert werden konnte. Bei der Gefäßerweiterung infolge der 2 V-Stimulation im Rahmen der laborinternen Stimulationsreihe wurde kein L-NAME zur Gefäßvorspannung eingesetzt, was diesen Rückschluss bekräftigt.

Zudem identifizierte Dr. Alexander Joerk eine inverse Gefäßreaktion nach elektrischer Stimulation mit einer angelegten Spannung von 6 V beziehungsweise 8 V. Eine solche Gefäßantwort konnte auch bei den Stimulationsexperimenten dieser Arbeit in Kortexschicht II/III (8 V) sowie VI (7 V) beobachtet werden. Ein wichtiger Faktor dieser inversen Gefäßreaktion ist die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration zwischen astrozytärem Endfuß und Arteriole (Abb. 36). Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise nach einer SAB mit spontanen hochamplitudigen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen im Astrozyten, wird der astrozytäre BK-Kanal verstärkt aktiviert. Infolgedessen steigt die perivaskuläre  $K^+$ -Konzentration (Koide et al. 2012). Die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration bestimmt maßgeblich die Leitfähigkeit von  $K_{ir}$ -Kanälen in der Membran glatter Gefäßmuskelzellen. Wird ein perivaskulärer Schwellenwert für  $K^+$  von 20 mM überschritten, entfällt die hyperpolarisierende Wirkung der  $K_{ir}$ -Kanäle. Folglich öffnen sich spannungsgesteuerte Kalziumkanäle, glatte Gefäßmuskelzellen depolarisieren und das Gefäß verengt sich (Attwell et al. 2010, Girouard et al. 2010, Pappas et al. 2015).



**Abb. 36:** Einfluss von  $K^+$  auf die neurovaskuläre Kopplung. Im Astrozyten kann die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch spontane  $Ca^{2+}$ -Oszillationen (Koide et al. 2012) sowie durch gesteigerte Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren (mGluR) aufgrund neuronaler Erregung ansteigen (Attwell et al. 2010). Die Aktivität von am astrozytären Endfuß lokalisierten BK-Kanälen wird durch die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration reguliert. Die BK-Kanal-Aktivität beeinflusst die  $K^+$ -Konzentration zwischen astrozytären Endfuß und glatter Gefäßmuskelzelle (VSMC), welche die Polarität von  $K_{ir}$ -Kanälen in der Membran der glatten Gefäßmuskelzelle bestimmt und über die Gefäßreaktion entscheidet. Bei einer astrozytären  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $< 700$  nM wird die BK-Kanal-Aktivität so gesteigert, dass eine perivaskuläre  $K^+$ -Konzentration von 20 mM nicht überschritten wird. Resultierend stabilisieren  $K_{ir}$ -Kanäle das Ruhemembranpotenzial glatter Gefäßmuskelzellen, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VDCC) werden inhibiert und das Gefäß dilatiert sich. Bei einer höheren astrozytären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (unterer Bildteil) ist die BK-Kanal-Aktivität so groß, dass die perivaskuläre  $K^+$ -Konzentration Werte über 20 mM erreicht.  $K_{ir}$ -Kanäle verlieren die hyperpolarisierende Wirkung, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle werden aktiviert, glatte Gefäßmuskelzellen depolarisieren und das Gefäß verengt sich.

Im Versuchsdesign dieser Arbeit sollte die Stimulation mit einer angelegten Spannung von 7 V beziehungsweise 8 V eine erhöhte Erregung, ähnlich der von Koide et al. beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, darstellen. Bei den Versuchen in Kortexschicht II/III (8 V) wurde eine signifikant geringere maximale Amplitude nach Applikation von PDP A im Vergleich zur Kontrolle identifiziert (Abb. 29). Die maximale Amplitude der Stimulationsversuche in Kortexschicht VI (7 V) der HDP-Versuchsgruppen unterschied sich nicht von der Kontrolle (Abb. 31 und 32). Eine signifikant geringere inverse Gefäßreaktion wurde jedoch zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten deutlich (Vergleich Abb. 32 A).

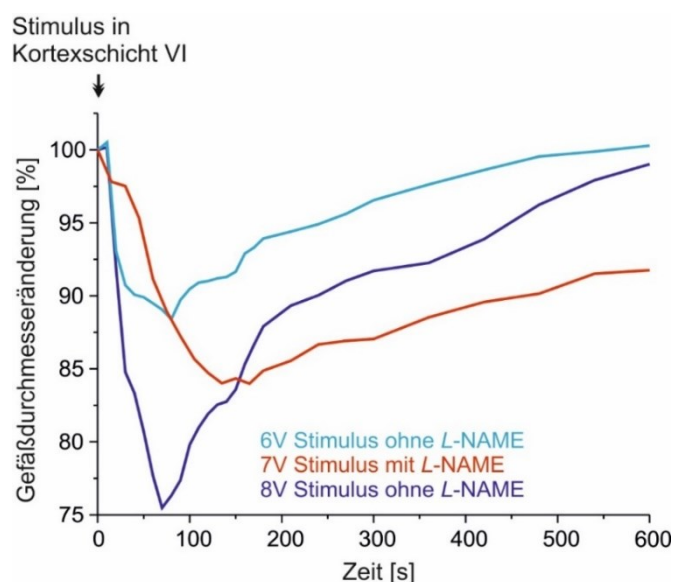
Der BK-Kanal steht im Zentrum der inversen Gefäßreaktion, da er mit der Beeinflussung der perivaskulären  $\text{K}^+$ -Konzentration die Polarität der  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle und somit auch die Gefäßantwort bestimmt. Betrachtet man das Ergebnis der abgeschwächten Vasokonstriktion nach HDP-Präinkubation unter dem Aspekt der Stellung des BK-Kanals in der inversen neurovaskulären Gefäßantwort, so kann vermutet werden, dass HDPs inhibitorisch auf den astrozytären BK-Kanal wirken. Werden BK-Kanäle vermehrt durch PDP A oder BOX A inhibiert, steigt die perivaskuläre  $\text{K}^+$ -Konzentration weniger stark an und die Arteriole verengt sich in einem geringeren Ausmaß. In einem Hirnschnittmodell untersuchten Koide et al. die Wirkung des BK-Kanal-Inhibitors PAX auf die durch eine elektrische Stimulation ausgelöste inverse neurovaskuläre Kopplung. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Stimulationsversuche dieser Arbeit wurde in dieser Studie eine signifikant abgeschwächte inverse Gefäßreaktion unter der Wirkung von PAX deutlich (Koide et al. 2012).

Wie in Kapitel 1.5 ausführlich erläutert, kann eine inverse Gefäßreaktion auch häufig als Folge von *spreading depolarizations* unter den pathologischen Bedingungen einer SAB beobachtet werden. Durch die Lyse der Erythrozyten des subarachnoidalen Blutes steigt die extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration, welche die Polarität der  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle und somit auch die Gefäßantwort direkt beeinflussen kann. Unter physiologischen Bedingungen kann NO, das durch die gesteigerte Aktivität der nNOS im Rahmen einer *spreading depolarization* zunehmend freigesetzt wird, diesem Konzentrationsanstieg entgegenwirken und eine inverse Gefäßreaktion verhindern. Da durch die Lyse der Erythrozyten jedoch auch freies Hämoglobin entsteht, welches die Bioverfügbarkeit des NOs reduziert, entfällt diese vasodilatatorische Wirkung des NOs auf das



vasokonstriktorisches Potenzial einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration (Macdonald und Weir 1991, Dreier et al. 1998, Dreier et al. 2000). Das Vorhandensein von NO beeinflusst demzufolge maßgeblich, ob auf eine *spreading depolarization* eine *spreading hyperemia* oder eine *spreading ischemia* folgt (Windmuller et al. 2005). Eine *spreading hyperemia* kann eine Depolarisationswelle durch die energieliefernde Vasodilatation schnell eliminieren. Eine *spreading ischemia* birgt hingegen ein Perfusionsdefizit, das im Rahmen einer SAB bleibende Hirnschäden verursachen und zur Entstehung von DINDs beitragen kann (Dreier et al. 2006, Dreier 2011, Woitzik et al. 2012).

Zudem vermuteten Dreier et al., dass eine extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration über 20 mM die Hypoperfusion einer NO-reduzierenden Substanz potenziert (Dreier et al. 1998). Demzufolge könnte eine inverse Gefäßantwort verstärkt und die Repolarisation neuronaler Strukturen verzögert werden. In den Messungen von Dr. Alexander Joerk ohne L-NAME-Vorspannung erholte sich der Gefäßdurchmesser nach Stimulation mit 6 V beziehungsweise 8 V in Kortexschicht VI nahezu logarithmisch. Dieser typische Verlauf konnte nach Stimulation mit 7 V in Kortexschicht VI im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Wie man Abb. 37 entnehmen kann, erholen sich die Arteriolen im Mittel verzögert und unter einem nahezu linearen Zusammenhang zwischen Zeit und Gefäßdurchmesserzunahme.



**Abb. 37:** Darstellung der Gefäßdurchmesseränderung nach Stimulation mit 6 V, 7 V oder 8 V in Kortexschicht VI über eine zehnminütige Zeitspanne. Die Experimente mit 6 V und 8 V von Dr. Alexander Joerk erfolgten ohne L-NAME-Präinkubation und waren Einzelversuche.

Daraus kann abgeleitet werden, dass durch die Anwendung von *L*-NAME die inverse Gefäßreaktion verstärkt und die Rückbildung zum Ausgangsdurchmesser beeinträchtigt worden sein könnte.

Der Einfluss der HDPs auf die neurovaskuläre Kopplung konnte durch die Versuche der elektrischen Stimulation somit nur ansatzweise identifiziert werden, was auch auf die Grenzen des zugrundeliegenden Hirnschnittmodells zurückzuführen ist. Die Simulierung eines Gefäßtonus mit *L*-NAME ist ein substanzieller Bestandteil des experimentellen Designs dieser Arbeit (Kapitel 5.1.2). Durch die Verwendung von *L*-NAME wird die Bioverfügbarkeit von NO reduziert. NO ist jedoch sowohl beim physiologischen als auch beim pathophysiologischen Ablauf der neurovaskulären Kopplung von großer Bedeutung. Dementsprechend wird durch die NO-defizitären Verhältnisse stark in die neurovaskuläre Interaktion eingegriffen und zusätzlich die Dynamik der Gefäßreaktion beeinträchtigt. Da die Mechanismen der neurovaskulären Kopplung enorm vielseitig sind, würde eine alternative Simulierung des Gefäßtonus, beispielsweise durch den Thromboxan-Rezeptor-Agonist U-46619, die Ergebnisse ebenso beeinflussen. So entfalten etwa Prostaglandin E<sub>2</sub> sowie auch EET ihre vasodilatatorische Wirkung über Thromboxan-Rezeptor-Antagonisierung (Buerk et al. 2003, Liu et al. 2008).

Es erscheint sinnvoll, ein anderes Versuchsdesign zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung zu verwenden. Eine Gefäßvorspannung wäre etwa in einem *in vivo*-Versuchsaufbau nicht nötig. Man könnte bei der anästhesierten und analgesiierten Maus eine Kraniotomie durchführen und, in Anlehnung an das *in vivo*-Versuchsdesign von Joerk et al., HDPs sowie ein Fluoreszenzfarbstoff in eine subarachnoidale Kaverne wie die Cisterna Magna injizieren (Joerk et al. 2019). Anschließend könnte durch die topische Gabe von KCl auf die Kortexoberfläche eine *spreading depolarization* ausgelöst werden (Dreier et al. 1998). Die Gefäßreaktion könnte unter Zuhilfenahme der Zwei-Photonen-Mikroskopie oder durch ein Doppler-Verfahren erfasst und mit der Kontrolle verglichen werden.

## 6 Schlussfolgerungen

Das Ziel der Promotionsarbeit war zum einen die Identifizierung weiterer spasmogener Faktoren, die zur HDP-induzierten Vasokonstriktion beitragen und zum anderen das Prüfen vielversprechender Präventionsansätze.

Die Testung von HDPs in Hirnschnitten adulter Mäuse resultierte in einer abgeschwächten Vasokonstriktion, was auf eine abnehmende Gefäßreaktion sowie Gefäßvitalität im Alter zurückzuführen ist und im Einklang mit der Beobachtung der niedrigeren Inzidenz des Vasospasmus bei Patienten hohen Alters steht. Die erstmalig getesteten HDPs Dihydro-BOX A und MVM zeigten keine Vasoaktivität. Die Versuchsreihe des Dihydro-BOX A legt dar, dass eine Hydrierung der Vinylgruppe den bekannten vasokonstriktorisches Effekt des BOX A-Moleküls aufheben kann. Dieses Erkenntnis ist insbesondere für die Struktur-Aktivitäts-Beziehung und somit für einen möglichen Präventionsansatz von hoher Relevanz. Der BK-Kanal-Aktivator BMS 204352 konnte, im Gegensatz zu BMS 191011, den gefäßverengenden Effekt von PDP A erfolgreich verhindern. BMS 204352 stellte in einer klinischen Phase-III-Studie zur Neuroprotektion seine große Spezifität unter Beweis und zeigte ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Demzufolge empfiehlt sich die Substanz für die Testung zur gezielten Prävention des Vasospasmus *in vivo* oder in klinischen Studien. Der unspezifische PKC-Inhibitor Gö 6983 konnte den vasokonstriktorisches PDP A-Effekt aufheben. Das Ergebnis deutet auf eine Involvierung der PKC in die Pathogenese der PDP A-induzierten Gefäßkonstriktion hin und ist ein möglicher Ansatz für zukünftige Präventionsstrategien. Die Ergebnisse der getesteten BK-Kanal-Inhibitoren erlauben den Rückschluss, dass PDPs vorwiegend auf astrozytäre BK-Kanäle inhibitorisch wirken. Der inhibierende HDP-Effekt auf astrozytäre BK-Kanäle konnte im Rahmen der elektrischen Stimulationsversuche zur Untersuchung der Beeinflussung der neurovaskulären Kopplung nur bedingt gezeigt, jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es stellte sich heraus, dass das Versuchsdesign zur Untersuchung der komplexen neurovaskulären Interaktion an seine Grenzen stößt und ohne Zuhilfenahme einer gefäßvorspannenden Substanz in einem *in vivo*-Versuchsdesign untersucht werden sollte.

Diese Promotionsarbeit steuert wichtige Erkenntnisse zur Pathophysiologie der HDP-induzierten Gefäßkonstriktion bei und dient demzufolge als Grundlage für die

Entwicklung neuer Präventionsansätze zur Vermeidung des Vasospasmus nach einer SAB.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abla AA, Wilson DA, Williamson RW, Nakaji P, McDougall CG, Zabramski JM, Albuquerque FC, Spetzler RF. 2014. The relationship between ruptured aneurysm location, subarachnoid hemorrhage clot thickness, and incidence of radiographic or symptomatic vasospasm in patients enrolled in a prospective randomized controlled trial. *J Neurosurg*, 120 (2):391-397.
- Alabadi JA, Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Jover T, Alborch E. 1993. Changes in the cerebrovascular effects of endothelin-1 and nicardipine after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 33 (4):707-714; discussion 714-705.
- Ansar S, Larsen C, Maddahi A, Edvinsson L. 2010. Subarachnoid hemorrhage induces enhanced expression of thromboxane A2 receptors in rat cerebral arteries. *Brain Res*, 1316:163-172.
- Athar MK, Levine JM. 2012. Treatment options for cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurotherapeutics*, 9 (1):37-43.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. 1991. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science*, 253 (5019):551-555.
- 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.
- Baggott CD, Aagaard-Kienitz B. 2014. Cerebral vasospasm. *Neurosurg Clin N Am*, 25 (3):497-528.
- Balbi M, Koide M, Wellman GC, Plesnila N. 2017. Inversion of neurovascular coupling after subarachnoid hemorrhage in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37 (11):3625-3634.
- Baldwin ME, Macdonald RL, Huo D, Novakovic RL, Goldenberg FD, Frank JI, Rosengart AJ. 2004. Early vasospasm on admission angiography in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is a predictor for in-hospital complications and poor outcome. *Stroke*, 35 (11):2506-2511.
- Barman SA, Zhu S, White RE. 2004. PKC activates BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286 (6):L1275-1281.
- Barman SA, Zhu S, Han G, White RE. 2003. cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284 (6):L1004-1011.
- Bassi P, Bandera R, Loiero M, Tognoni G, Mangoni A. 1991. Warning signs in subarachnoid hemorrhage: a cooperative study. *Acta Neurol Scand*, 84 (4):277-281.
- Bayliss WM. 1902. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol*, 28 (3):220-231.
- Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna CA, Jenkins AL, 3rd, Vallabhajosyula P. 1998. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 42 (2):352-360; discussion 360-352.
- Bederson JB, Connolly ES, Jr., Batjer HH, Dacey RG, Dion JE, Diringer MN, Duldner JE, Jr., Harbaugh RE, Patel AB, Rosenwasser RH, American Heart A. 2009. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 40 (3):994-1025.

- Bonnett R, Stewart JC. 1972. Singlet oxygen in the photo-oxidation of bilirubin in hydroxylic solvents. *Biochem J*, 130 (3):895-897.
- Bowman G, Dixit S, Bonneau RH, Chinchilli VM, Cockroft KM. 2004. Neutralizing antibody against interleukin-6 attenuates posthemorrhagic vasospasm in the rat femoral artery model. *Neurosurgery*, 54 (3):719-725; discussion 725-716.
- Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. 2000. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, 407 (6806):870-876.
- Buerk DG, Atochin DN, Riva CE. 2003. Investigating the role of nitric oxide in regulating blood flow and oxygen delivery from in vivo electrochemical measurements in eye and brain. *Adv Exp Med Biol*, 530:359-370.
- Busse R, Fleming I. 1998. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*, 35 (2):73-84.
- Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L. 1993. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science*, 261 (5118):221-224.
- Caner B, Hou J, Altay O, Fujii M, Zhang JH. 2012. Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Neurochem*, 123 Suppl 2:12-21.
- Cassie NJ, Cross MA, Phelan EL, Millar JA. 1990. Sensitivity to Ca<sup>2+</sup> and the effects of a calcium channel antagonist in resistance vessels from two strains of genetically hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 16 Suppl 7:S12-13.
- Chen S, Feng H, Sherchan P, Klebe D, Zhao G, Sun X, Zhang J, Tang J, Zhang JH. 2014. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol*, 115:64-91.
- Claassen J, Peery S, Kreiter KT, Hirsch LJ, Du EY, Connolly ES, Mayer SA. 2003. Predictors and clinical impact of epilepsy after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*, 60 (2):208-214.
- Clark JF, Sharp FR. 2006. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (10):1223-1233.
- Clark JF, Reilly M, Sharp FR. 2002. Oxidation of bilirubin produces compounds that cause prolonged vasospasm of rat cerebral vessels: a contributor to subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (4):472-478.
- Consoli A, Grazzini G, Renieri L, Rosi A, De Renzis A, Vignoli C, Nappini S, Ammannati F, Capaccioli L, Mangiafico S. 2013. Effects of hyper-early (<12 hours) endovascular treatment of ruptured intracranial aneurysms on clinical outcome. *Interv Neuroradiol*, 19 (2):195-202.
- Corsten L, Raja A, Guppy K, Roitberg B, Misra M, Alp MS, Charbel F, Debrun G, Ausman J. 2001. Contemporary management of subarachnoid hemorrhage and vasospasm: the UIC experience. *Surg Neurol*, 56 (3):140-148; discussion 148-150.
- Cross DT, 3rd, Moran CJ, Angtuaco EE, Milburn JM, Diringer MN, Dacey RG, Jr. 1998. Intracranial pressure monitoring during intraarterial papaverine infusion for cerebral vasospasm. *AJNR Am J Neuroradiol*, 19 (7):1319-1323.
- Damron DS, Nadim HS, Hong SJ, Darvish A, Murray PA. 1998. Intracellular translocation of PKC isoforms in canine pulmonary artery smooth muscle cells by ANG II. *Am J Physiol*, 274 (2):L278-288.

- 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.
- Dankbaar JW, Rijdsdijk M, van der Schaaf IC, Velthuis BK, Wermer MJ, Rinkel GJ. 2009. Relationship between vasospasm, cerebral perfusion, and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neuroradiology*, 51 (12):813-819.
- de Rooij NK, Greving JP, Rinkel GJ, Frijns CJ. 2013. Early prediction of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: development and validation of a practical risk chart. *Stroke*, 44 (5):1288-1294.
- 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.
- Diringer MN, Bleck TP, Claude Hemphill J, 3rd, Menon D, Shutter L, Vespa P, Bruder N, Connolly ES, Jr., Citerio G, Gress D, Hanggi D, Hoh BL, Lanzino G, Le Roux P, Rabinstein A, Schmutzhard E, Stocchetti N, Suarez JI, Treggiari M, Tseng MY, Vergouwen MD, Wolf S, Zipfel G, Neurocritical Care S. 2011. Critical care management of patients following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recommendations from the Neurocritical Care Society's Multidisciplinary Consensus Conference. *Neurocrit Care*, 15 (2):211-240.
- Ditlefsen EM, Tonjum AM. 1960. Intracranial aneurysms and polycystic kidneys. *Acta Med Scand*, 168:51-54.
- Dopico AM, Anantharam V, Treisman SN. 1998. Ethanol increases the activity of Ca(++)-dependent K<sup>+</sup> (mslo) channels: functional interaction with cytosolic Ca<sup>++</sup>. *J Pharmacol Exp Ther*, 284 (1):258-268.
- Dorsch N. 2011. A clinical review of cerebral vasospasm and delayed ischaemia following aneurysm rupture. *Acta Neurochir Suppl*, 110 (Pt 1):5-6.
- Dorsch NW. 1994. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part III: Mechanisms of action of calcium antagonists. *J Clin Neurosci*, 1 (3):151-160.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280 (5360):69-77.
- Drake CG, Peerless SJ. 1997. Giant fusiform intracranial aneurysms: review of 120 patients treated surgically from 1965 to 1992. *J Neurosurg*, 87 (2):141-162.
- Dreier JP. 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*, 17 (4):439-447.
- Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhaupl KM, Victorov I, Dirnagl U. 2000. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg*, 93 (4):658-666.
- Dreier JP, Korner K, Ebert N, Gorner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhaupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U. 1998. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K<sup>+</sup> is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18 (9):978-990.
- Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ. 2006. Delayed ischaemic neurological

- deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain*, 129 (Pt 12):3224-3237.
- Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolias C, Oliveira-Ferreira AI, Fabricius M, Hartings JA, Vajkoczy P, Lauritzen M, Dirnagl U, Bohner G, Strong AJ, group Cs. 2009. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain*, 132 (Pt 7):1866-1881.
- Duckrow RB. 1993. A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res*, 618 (2):190-195.
- Dumont AS, Dumont RJ, Chow MM, Lin CL, Calisaneller T, Ley KF, Kassell NF, Lee KS. 2003. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. *Neurosurgery*, 53 (1):123-133; discussion 133-125.
- Dunn KM, Nelson MT. 2010. Potassium channels and neurovascular coupling. *Circ J*, 74 (4):608-616.
- Dwyer MA, Bredt DS, Snyder SH. 1991. Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-nitroarginine in brain in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 176 (3):1136-1141.
- Egge A, Waterloo K, Sjöholm H, Solberg T, Ingebrigtsen T, Romner B. 2001. Prophylactic hyperdynamic postoperative fluid therapy after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a clinical, prospective, randomized, controlled study. *Neurosurgery*, 49 (3):593-605; discussion 605-596.
- Ellamushi HE, Grieve JP, Jager HR, Kitchen ND. 2001. Risk factors for the formation of multiple intracranial aneurysms. *J Neurosurg*, 94 (5):728-732.
- Faraci FM, Heistad DD. 1998. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78 (1):53-97.
- Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J. 1998. Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Neurology*, 50 (4):876-883.
- Fergus A, Jin Y, Thai QA, Kassell NF, Lee KS. 1995. Vasodilatory actions of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in parenchymal microvessels of the rat hippocampus. *Brain Res*, 694 (1-2):78-84.
- 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.
- Finney LH, Roberts TS, Anderson RE. 1976. Giant intracranial aneurysm associated with Marfan's syndrome. Case report. *J Neurosurg*, 45 (3):342-347.
- Firlik AD, Kaufmann AM, Jungreis CA, Yonas H. 1997. Effect of transluminal angioplasty on cerebral blood flow in the management of symptomatic vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 86 (5):830-839.
- Fischer T, Johnsen SP, Pedersen L, Gaist D, Sorensen HT, Rothman KJ. 2005. Seasonal variation in hospitalization and case fatality of subarachnoid hemorrhage - a nationwide danish study on 9,367 patients. *Neuroepidemiology*, 24 (1-2):32-37.
- Fonseca APA, Rosa Junior M. 2017. Terson's syndrome: an important differential diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *Radiol Bras*, 50 (5):346-347.
- Friedman JA, Goerss SJ, Meyer FB, Piepgras DG, Pichelmann MA, McIver JI, Toussaint LG, 3rd, McClelland RL, Nichols DA, Atkinson JL, Wijdicks EF. 2002. Volumetric quantification of Fisher Grade 3 aneurysmal subarachnoid



- hemorrhage: a novel method to predict symptomatic vasospasm on admission computerized tomography scans. *J Neurosurg*, 97 (2):401-407.
- Frijns CJ, Fijnheer R, Algra A, van Mourik JA, van Gijn J, Rinkel GJ. 2006. Early circulating levels of endothelial cell activation markers in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: associations with cerebral ischaemic events and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77 (1):77-83.
- Frontera JA, Ahmed W, Zach V, Jovine M, Tanenbaum L, Sehba F, Patel A, Bederson JB, Gordon E. 2015. Acute ischaemia after subarachnoid haemorrhage, relationship with early brain injury and impact on outcome: a prospective quantitative MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86 (1):71-78.
- Fu C, Yu W, Sun L, Li D, Zhao C. 2013. Early cerebral infarction following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: frequency, risk factors, patterns, and prognosis. *Curr Neurovasc Res*, 10 (4):316-324.
- Gebremedhin D, Yamaura K, Zhang C, Bylund J, Koehler RC, Harder DR. 2003. Metabotropic glutamate receptor activation enhances the activities of two types of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 23 (5):1678-1687.
- Geraldes P, King GL. 2010. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*, 106 (8):1319-1331.
- Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ, Creager MA. 1996. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*, 27 (4):849-853.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. 2006. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther*, 110 (1):103-116.
- Gibson QH, Roughton FJ. 1957. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J Physiol*, 136 (3):507-524.
- Giraldez T, Rothberg BS. 2017. Understanding the conformational motions of RCK gating rings. *J Gen Physiol*, 149 (4):431-441.
- Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. 2010. Astrocytic endfoot Ca<sup>2+</sup> and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (8):3811-3816.
- Golan E, Vasquez DN, Ferguson ND, Adhikari NK, Scales DC. 2013. Prophylactic magnesium for improving neurologic outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: systematic review and meta-analysis. *J Crit Care*, 28 (2):173-181.
- Golowasch J, Kirkwood A, Miller C. 1986. Allosteric effects of Mg<sup>2+</sup> on the gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. *J Exp Biol*, 124:5-13.
- Grande G, Nilsson E, Edvinsson L. 2013. Comparison of responses to vasoactive drugs in human and rat cerebral arteries using myography and pressurized cerebral artery method. *Cephalalgia*, 33 (3):152-159.
- Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI. 2001. Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist*, 7 (2):166-177.
- Hansen AJ, Lauritzen M. 1984. The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Bras Cienc*, 56 (4):457-479.
- Harrod CG, Bendok BR, Batjer HH. 2005. Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review. *Neurosurgery*, 56 (4):633-654; discussion 633-654.

- Hirashima Y, Nakamura S, Suzuki M, Kurimoto M, Endo S, Ogawa A, Takaku A. 1997. Cerebrospinal fluid tissue factor and thrombin-antithrombin III complex as indicators of tissue injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 28 (9):1666-1670.
- 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.
- Holtz J, Forstermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge E. 1984. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, 6 (6):1161-1169.
- Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. 1998. Quality of life in patients and partners after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 29 (4):798-804.
- Hoque M, Rentero C, Cairns R, Tebar F, Enrich C, Grewal T. 2014. Annexins - scaffolds modulating PKC localization and signaling. *Cell Signal*, 26 (6):1213-1225.
- Hou S, Xu R, Clark JF, Wurster WL, Heinemann SH, Hoshi T. 2011. Bilirubin oxidation end products directly alter K<sup>+</sup> channels important in the regulation of vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):102-112.
- Hu XQ, Zhang L. 2012. Function and regulation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today*, 17 (17-18):974-987.
- Iadecola C, Nedergaard M. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, 10 (11):1369-1376.
- Ingall T, Asplund K, Mahonen M, Bonita R. 2000. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke*, 31 (5):1054-1061.
- International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms I. 1998. Unruptured intracranial aneurysms--risk of rupture and risks of surgical intervention. *N Engl J Med*, 339 (24):1725-1733.
- Ishiguro M, Wellman TL, Honda A, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. 2005. Emergence of a R-type Ca<sup>2+</sup> channel (Ca<sub>v</sub> 2.3) contributes to cerebral artery constriction after subarachnoid hemorrhage. *Circ Res*, 96 (4):419-426.
- Iuliano BA, Pluta RM, Jung C, Oldfield EH. 2004. Endothelial dysfunction in a primate model of cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 100 (2):287-294.
- Jaggard JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT. 2000. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 (2):C235-256.
- Jensen BS. 2002. BMS-204352: a potassium channel opener developed for the treatment of stroke. *CNS Drug Rev*, 8 (4):353-360.
- Jewell RP, Saundry CM, Bonev AD, Tranmer BI, Wellman GC. 2004. Inhibition of Ca<sup>++</sup> sparks by oxyhemoglobin in rabbit cerebral arteries. *J Neurosurg*, 100 (2):295-302.
- Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2001. Structure of the RCK domain from the E. coli K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron*, 29 (3):593-601.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417 (6888):515-522.
- 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.
- Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM. 2004. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 101 (5):836-842.
- Kale SP, Edgell RC, Alsheklee A, Borhani Haghighi A, Sweeny J, Felton J, Kitchener J, Vora N, Bieneman BK, Cruz-Flores S, Abdulrauf S. 2013. Age-associated vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 22 (1):22-27.
- Kamezaki T, Yanaka K, Nagase S, Fujita K, Kato N, Nose T. 2002. Increased levels of lipid peroxides as predictive of symptomatic vasospasm and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 97 (6):1302-1305.
- Karlin A. 2015. Membrane potential and Ca<sup>2+</sup> concentration dependence on pressure and vasoactive agents in arterial smooth muscle: A model. *J Gen Physiol*, 146 (1):79-96.
- Kassell NF, Torner JC, Jane JA, Haley EC, Jr., Adams HP. 1990. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 2: Surgical results. *J Neurosurg*, 73 (1):37-47.
- Khalil RA. 2013. Protein Kinase C Inhibitors as Modulators of Vascular Function and their Application in Vascular Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6 (3):407-439.
- Kitaura H, Uozumi N, Tohmi M, Yamazaki M, Sakimura K, Kudoh M, Shimizu T, Shibuki K. 2007. Roles of nitric oxide as a vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory cortex. *Neurosci Res*, 59 (2):160-171.
- Klopfleisch M, Seidel RA, Gorls H, Richter H, Beckert R, Imhof W, Reiher M, Pohnert G, Westerhausen M. 2013. Total synthesis and detection of the bilirubin oxidation product (Z)-2-(3-ethenyl-4-methyl-5-oxo-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-ylidene)ethanamide (Z-BOX A). *Org Lett*, 15 (17):4608-4611.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. 2012. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (21):E1387-1395.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. 2013a. Subarachnoid blood converts neurally evoked vasodilation to vasoconstriction in rat brain cortex. *Acta Neurochir Suppl*, 115:167-171.
- Koide M, Sukhotinsky I, Ayata C, Wellman GC. 2013b. Subarachnoid hemorrhage, spreading depolarizations and impaired neurovascular coupling. *Stroke Res Treat*, 2013:819340.
- Koval OM, Fan Y, Rothberg BS. 2007. A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels. *J Gen Physiol*, 129 (3):209-220.
- Kraig RP, Nicholson C. 1978. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience*, 3 (11):1045-1059.
- Kranc KR, Pyne GJ, Tao L, Claridge TD, Harris DA, Cadoux-Hudson TA, Turnbull JJ, Schofield CJ, Clark JF. 2000. Oxidative degradation of bilirubin produces vasoactive compounds. *Eur J Biochem*, 267 (24):7094-7101.

- Kundra S, Mahendru V, Gupta V, Choudhary AK. 2014. Principles of neuroanesthesia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 30 (3):328-337.
- Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. 2004. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (8):916-925.
- Laher I, Zhang JH. 2001. Protein kinase C and cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21 (8):887-906.
- Lang MG, Noll G, Luscher TF. 1995. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: modulation by endothelial factors. *Am J Physiol*, 269 (3 Pt 2):H837-844.
- Langguth N. 2019. Einfluss von Hämabbauprodukten auf die Vasoreaktivität zerebraler Arteriolen im akuten Hirnschnitt der Maus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität
- Lanzino G, Kassell NF, Germanson T, Truskowski L, Alves W. 1993. Plasma glucose levels and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 79 (6):885-891.
- Lauritzen M. 1994. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*, 117 ( Pt 1):199-210.
- 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).
- Li Q, Yan J. 2016. Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits. *Int Rev Neurobiol*, 128:51-90.
- Lightner DA, Quistad GB. 1972. Hematinic acid and propentdyopents from bilirubin photo-oxidation in vitro. *FEBS Lett*, 25 (1):94-96.
- Liu X, Li C, Falck JR, Roman RJ, Harder DR, Koehler RC. 2008. Interaction of nitric oxide, 20-HETE, and EETs during functional hyperemia in whisker barrel cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295 (2):H619-631.
- Lu J, Ji N, Yang Z, Zhao X. 2012. Prognosis and treatment of acute hydrocephalus following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Clin Neurosci*, 19 (5):669-672.
- Macdonald RL. 2014. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol*, 10 (1):44-58.
- Macdonald RL, Weir BK. 1991. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke*, 22 (8):971-982.
- Macdonald RL, Zhang ZD, Ono S, Komuro T. 2002. Up-regulation of parathyroid hormone receptor in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage in monkeys. *Neurosurgery*, 50 (5):1083-1091; discussion 1091-1083.
- Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, Marr A, Roux S, Kassell N. 2011. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol*, 10 (7):618-625.
- Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, Nowbakht P, Roux S, Kassell N. 2012. Randomized trial of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing endovascular coiling. *Stroke*, 43 (6):1463-1469.
- MacVicar BA, Hochman D. 1991. Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J Neurosci*, 11 (5):1458-1469.

- Magleby KL. 2003. Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol*, 121 (2):81-96.
- Malinova V, Schatlo B, Voit M, Suntheim P, Rohde V, Mielke D. 2016. Identification of specific age groups with a high risk for developing cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Rev*, 39 (3):429-436.
- Marin J. 1995. Age-related changes in vascular responses: a review. *Mech Ageing Dev*, 79 (2-3):71-114.
- Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, Diringer M, Haley EC, Heros RC, Sternau LL, Torner J, Adams HP, Jr., Feinberg W, et al. 1994. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*, 25 (11):2315-2328.
- Mayevsky A, Zarchin N, Friedli CM. 1982. Factors affecting the oxygen balance in the awake cerebral cortex exposed to spreading depression. *Brain Res*, 236 (1):93-105.
- McAuliffe W, Townsend M, Eskridge JM, Newell DW, Grady MS, Winn HR. 1995. Intracranial pressure changes induced during papaverine infusion for treatment of vasospasm. *J Neurosurg*, 83 (3):430-434.
- Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (25):14066-14071.
- Mellor H, Parker PJ. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 332 ( Pt 2):281-292.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW. 2004. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*, 279 (35):36746-36752.
- Metea MR, Newman EA. 2006. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci*, 26 (11):2862-2870.
- Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y. 1993. Protein kinase C inhibits the Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 190 (1):263-269.
- Mocco J, Ransom ER, Komotar RJ, Mack WJ, Sergot PB, Albert SM, Connolly ES, Jr. 2006. Racial differences in cerebral vasospasm: a systematic review of the literature. *Neurosurgery*, 58 (2):305-314.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov*, 11 (12):937-957.
- Moore PK, Handy RL. 1997. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase--is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci*, 18 (6):204-211.
- Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. 2011. BMS-191011, an opener of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels, dilates rat retinal arterioles in vivo. *Biol Pharm Bull*, 34 (1):150-152.
- Murphy DBD, M.W. 2012. Differential Interference Contrast Microscopy and Modulation Contrast Microscopy. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. 173-197.
- 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. *Circ Res*, 101 (7):712-722.

- Nanda A, Vannemreddy PS, Polin RS, Willis BK. 2000. Intracranial aneurysms and cocaine abuse: analysis of prognostic indicators. *Neurosurgery*, 46 (5):1063-1067; discussion 1067-1069.
- Nassar HGE, Ghali AA, Bahnasy WS, Elawady MM. 2019. Vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: prediction, detection, and intervention. *Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg*, 55 (1):3.
- Neagu B, Strominger NL, Carpenter DO. 2005. Use of bipolar parallel electrodes for well-controlled microstimulation in a mouse hippocampal brain slice. *J Neurosci Methods*, 144 (2):153-163.
- Nelson TJ, Alkon DL. 1995. Phosphorylation of the conditioning-associated GTP-binding protein cp20 by protein kinase C. *J Neurochem*, 65 (5):2350-2357.
- Newton AC. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 270 (48):28495-28498.
- Nishizuka Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308 (5961):693-698.
- Nishizuka Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, 9 (7):484-496.
- Nornes H, Magnaes B. 1972. Intracranial pressure in patients with ruptured saccular aneurysm. *J Neurosurg*, 36 (5):537-547.
- Ohta O, Osaka K, Siguma M, Yamamoto M, Shimizu K, Toda N. 1983. Cerebral vasospasm following ruptured intracranial aneurysms, especially some contributions of potassium ion released from subarachnoid hematoma to delayed cerebral vasospasm. *Vascular Neuroeffector Mechanisms* (Bevan JA, ed):353-358.
- Ohta S, Nishihara J, Oka Y, Todo H, Kumon Y, Sakaki S. 1995. Possible mechanism to induce protein kinase C-dependent arterial smooth muscle contraction after subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 137 (3-4):217-225.
- Pappas AC, Koide M, Wellman GC. 2015. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Signaling Drives Inversion of Neurovascular Coupling after Subarachnoid Hemorrhage. *J Neurosci*, 35 (39):13375-13384.
- Peng X, Zhang C, Alkayed NJ, Harder DR, Koehler RC. 2004. Dependency of cortical functional hyperemia to forepaw stimulation on epoxygenase and nitric oxide synthase activities in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (5):509-517.
- Petersen CC. 2007. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*, 56 (2):339-355.
- Petruk KC, West M, Mohr G, Weir BK, Benoit BG, Gentili F, Disney LB, Khan MI, Grace M, Holness RO, et al. 1988. Nimodipine treatment in poor-grade aneurysm patients. Results of a multicenter double-blind placebo-controlled trial. *J Neurosurg*, 68 (4):505-517.
- Pisani A, Calabresi P, Tozzi A, D'Angelo V, Bernardi G. 1998. L-type Ca<sup>2+</sup> channel blockers attenuate electrical changes and Ca<sup>2+</sup> rise induced by oxygen/glucose deprivation in cortical neurons. *Stroke*, 29 (1):196-201; discussion 202.
- Pluta RM. 2008. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH. *Acta Neurochir Suppl*, 104:139-147.
- Pluta RM, Thompson BG, Dawson TM, Snyder SH, Boock RJ, Oldfield EH. 1996. Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 84 (4):648-654.
- Ponte A, Sanchez-Ferrer CF, Hernandez C, Alonso MJ, Marin J. 1996. Effect of ageing and hypertension on endothelial modulation of ouabain-induced

- contraction and sodium pump activity in the rat aorta. *J Hypertens*, 14 (6):705-712.
- Price DL, Ludwig JW, Mi H, Schwarz TL, Ellisman MH. 2002. Distribution of rSlo Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat astrocyte perivascular endfeet. *Brain Res*, 956 (2):183-193.
- Proust F, Hannequin D, Langlois O, Freger P, Creissard P. 1995. Causes of morbidity and mortality after ruptured aneurysm surgery in a series of 230 patients. The importance of control angiography. *Stroke*, 26 (9):1553-1557.
- Pyne-Geithman GJ, Nair SG, Caudell DN, Clark JF. 2008. PKC and Rho in vascular smooth muscle: activation by BOXes and SAH CSF. *Front Biosci*, 13:1526-1534.
- 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.
- Raabe A, Beck J, Keller M, Vatter H, Zimmermann M, Seifert V. 2005. Relative importance of hypertension compared with hypervolemia for increasing cerebral oxygenation in patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 103 (6):974-981.
- Raaymakers TW. 1999. Aneurysms in relatives of patients with subarachnoid hemorrhage: frequency and risk factors. MARS Study Group. Magnetic Resonance Angiography in Relatives of patients with Subarachnoid hemorrhage. *Neurology*, 53 (5):982-988.
- Ranck JB, Jr. 1975. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res*, 98 (3):417-440.
- Reilly C, Amidei C, Tolentino J, Jahromi BS, Macdonald RL. 2004. Clot volume and clearance rate as independent predictors of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 101 (2):255-261.
- Ringvold HC, Khalil RA. 2017. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. *Adv Pharmacol*, 78:203-301.
- Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van Gijn J. 2004. Circulatory volume expansion therapy for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*, (4):CD000483.
- Roman RJ. 2002. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*, 82 (1):131-185.
- Rose MJ. 2011. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an update on the medical complications and treatments strategies seen in these patients. *Curr Opin Anaesthesiol*, 24 (5):500-507.
- Rowland MJ, Hadjipavlou G, Kelly M, Westbrook J, Pattinson KT. 2012. Delayed cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: looking beyond vasospasm. *Br J Anaesth*, 109 (3):315-329.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR. 1990. Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels*, 27 (2-5):246-257.
- Ruttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Muller M, Kopschall I, Pfister M, Munkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rusch A, Ruth P, Knipper M. 2004. Deletion of the Ca<sup>2+</sup>-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BK beta 1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (35):12922-12927.

- Saito N. 2003. Fluorescence imaging of protein kinase C translocation in living cells. *Methods Mol Biol*, 233:93-103.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*, 7 (12):921-931.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr., Reed RL, Jones DP. 1998. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 24 (5):699-704.
- Sandvei MS, Mathiesen EB, Vatten LJ, Muller TB, Lindekleiv H, Ingebrigtsen T, Njolstad I, Wilsgaard T, Lochen ML, Vik A, Romundstad PR. 2011. Incidence and mortality of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in two Norwegian cohorts, 1984-2007. *Neurology*, 77 (20):1833-1839.
- Sarker SJ, Heuschmann PU, Burger I, Wolfe CD, Rudd AG, Smeeton NC, Toschke AM. 2008. Predictors of survival after haemorrhagic stroke in a multi-ethnic population: the South London Stroke Register (SLSR). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79 (3):260-265.
- Sasaki T, Wakai S, Asano T, Watanabe T, Kirino T, Sano K. 1981. The effect of a lipid hydroperoxide of arachidonic acid on the canine basilar artery. An experimental study on cerebral vasospasm. *J Neurosurg*, 54 (3):357-365.
- Satoh T, Yamamoto Y, Asari S, Sakurai M, Suzuki K. 1983. Disappearance and development of cerebral aneurysms in moyamoya disease. Case report. *J Neurosurg*, 58 (6):949-953.
- Sausbier M, Hu H, 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 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (25):9474-9478.
- Schaeffgen 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.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature*, 404 (6774):197-201.
- Schmid R, McDonagh AF. 1975. The enzymatic formation of bilirubin. *Ann N Y Acad Sci*, 244:533-552.
- Schreiber M, Salkoff L. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, 73 (3):1355-1363.
- Schroder RL, Jespersen T, Christophersen P, Strobaek D, Jensen BS, Olesen SP. 2001. KCNQ4 channel activation by BMS-204352 and retigabine. *Neuropharmacology*, 40 (7):888-898.
- Schulze D. 2020. Synthese und Charakterisierung ausgewählter Produkte und Derivate des oxidativen Hämabbaus [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Seidel RA, Claudel T, Schleser FA, Ojha NK, Westerhausen M, Nietzsche S, Sponholz C, Cuperus F, Coldewey SM, Heinemann SH, Pohnert G, Trauner M, Bauer M. 2017. Impact of higher-order heme degradation products on hepatic function and hemodynamics. *J Hepatol*, 67 (2):272-281.
- Sheehan JP, Polin RS, Sheehan JM, Baskaya MK, Kassell NF. 1999. Factors associated with hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 45 (5):1120-1127; discussion 1127-1128.



- Shi L, Liu X, Li N, Liu B, Liu Y. 2013. Aging decreases the contribution of MaxiK channel in regulating vascular tone in mesenteric artery by unparallel downregulation of alpha- and beta1-subunit expression. *Mech Ageing Dev*, 134 (9):416-425.
- Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T, Tanaka R. 2003. Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol*, 549 (Pt 3):919-927.
- Shipston MJ, Tian L. 2016. Posttranscriptional and Posttranslational Regulation of BK Channels. *Int Rev Neurobiol*, 128:91-126.
- Solenski NJ, Haley EC, Jr., Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, Torner JC. 1995. Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med*, 23 (6):1007-1017.
- Somlyo AP, Somlyo AV. 2003. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83 (4):1325-1358.
- Sorop O, Spaan JA, VanBavel E. 2002. Pulsation-induced dilation of subendocardial and subepicardial arterioles: effect on vasodilator sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282 (1):H311-319.
- Spendel MC. 2008. Die aneurysmatische Subarachnoidalblutung: Epidemiologie, Ätiologie, Klinik und Komplikationen. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie*, 9 (2):20-30.
- Starke RM, Connolly ES, Jr., Participants in the International Multi-Disciplinary Consensus Conference on the Critical Care Management of Subarachnoid H. 2011. Rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 15 (2):241-246.
- Stefani E, Ottolia M, Noceti F, Olcese R, Wallner M, Latorre R, Toro L. 1997. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>channel (hsl<sub>o</sub>). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (10):5427-5431.
- Su SH, Xu W, Hai J, Wu YF, Yu F. 2014. Effects of statins-use for patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*, 4:4573.
- Suarez-Rivera O. 1998. Acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*, 49 (5):563-565.
- Suarez JI, Tarr RW, Selman WR. 2006. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*, 354 (4):387-396.
- Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem*, 252 (21):7603-7609.
- Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. 2003. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature*, 425 (6957):531-535.
- Tao X, Hite RK, MacKinnon R. 2017. Cryo-EM structure of the open high-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel. *Nature*, 541 (7635):46-51.
- Thampatty BP, Sherwood PR, Gallek MJ, Crago EA, Ren D, Hricik AJ, Kuo CW, Klamerus MM, Alexander SA, Bender CM, Hoffman LA, Horowitz MB, Kassam AB, Poloyac SM. 2011. Role of endothelin-1 in human aneurysmal

- subarachnoid hemorrhage: associations with vasospasm and delayed cerebral ischemia. *Neurocrit Care*, 15 (1):19-27.
- Thomas JE, McGinnis G. 2002. Safety of intraventricular sodium nitroprusside and thiosulfate for the treatment of cerebral vasospasm in the intensive care unit setting. *Stroke*, 33 (2):486-492.
- Vajkoczy P, Horn P, Bauhuf C, Munch E, Hubner U, Ing D, Thome C, Poeckler-Schoeninger C, Roth H, Schmiedek P. 2001. Effect of intra-arterial papaverine on regional cerebral blood flow in hemodynamically relevant cerebral vasospasm. *Stroke*, 32 (2):498-505.
- van Gijn J, van Dongen KJ. 1982. The time course of aneurysmal haemorrhage on computed tomograms. *Neuroradiology*, 23 (3):153-156.
- van Gijn J, Rinkel GJ. 2001. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain*, 124 (Pt 2):249-278.
- van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. 2007. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*, 369 (9558):306-318.
- Vikman P, Ansar S, Edvinsson L. 2007. Transcriptional regulation of inflammatory and extracellular matrix-regulating genes in cerebral arteries following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation. *J Neurosurg*, 107 (5):1015-1022.
- Vikman P, Beg S, Khurana TS, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. 2006. Gene expression and molecular changes in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Neurosurg*, 105 (3):438-444.
- Wakatsuki H, Gomi H, Kudoh M, Kimura S, Takahashi K, Takeda M, Shibuki K. 1998. Layer-specific NO dependence of long-term potentiation and biased NO release in layer V in the rat auditory cortex. *J Physiol*, 513 ( Pt 1):71-81.
- Wang L, Sigworth FJ. 2009. Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature*, 461 (7261):292-295.
- Wang Y, Zhou H, Wu B, Zhou Q, Cui D, Wang L. 2015. Protein Kinase C Isoforms Distinctly Regulate Propofol-induced Endothelium-dependent and Endothelium-independent Vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 66 (3):276-284.
- 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 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J Neurosci*, 22 (5):1550-1561.
- Ward JP, Knock GA, Snetkov VA, Aaronson PI. 2004. Protein kinases in vascular smooth muscle tone--role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacol Ther*, 104 (3):207-231.
- Wartenberg KE, Mayer SA. 2006. Medical complications after subarachnoid hemorrhage: new strategies for prevention and management. *Curr Opin Crit Care*, 12 (2):78-84.
- Wellman GC, Nathan DJ, Saundry CM, Perez G, Bonev AD, Penar PL, Tranmer BI, Nelson MT. 2002. Ca<sup>2+</sup> sparks and their function in human cerebral arteries. *Stroke*, 33 (3):802-808.
- Westermaier T, Stetter C, Raslan F, Vince GH, Ernestus RI. 2012. Brain edema formation correlates with perfusion deficit during the first six hours after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Transl Stroke Med*, 4 (1):8.
- Whitfield PC, Kirkpatrick PJ. 2001. Timing of surgery for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD001697.

- Wiebers DO. 2006. Unruptured intracranial aneurysms: natural history and clinical management. Update on the international study of unruptured intracranial aneurysms. *Neuroimaging Clin N Am*, 16 (3):383-390, vii.
- Windmuller O, Lindauer U, Foddiss M, Einhaupl KM, Dirnagl U, Heinemann U, Dreier JP. 2005. Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain*, 128 (Pt 9):2042-2051.
- Woitzik J, Dreier JP, Hecht N, Fiss I, Sandow N, Major S, Winkler M, Dahlem YA, Manville J, Diepers M, Muench E, Kasuya H, Schmiedek P, Vajkoczy P, group Cs. 2012. Delayed cerebral ischemia and spreading depolarization in absence of angiographic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32 (2):203-212.
- Yamaura K, Gebremedhin D, Zhang C, Narayanan J, Hoefert K, Jacobs ER, Koehler RC, Harder DR. 2006. Contribution of epoxyeicosatrienoic acids to the hypoxia-induced activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel current in cultured rat hippocampal astrocytes. *Neuroscience*, 143 (3):703-716.
- Yan J, Aldrich RW. 2010. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature*, 466 (7305):513-516.
- Yang H, Zhang G, Cui J. 2015. BK channels: multiple sensors, one activation gate. *Front Physiol*, 6:29.
- Yang H, Hu L, Shi J, Delaloye K, Horrigan FT, Cui J. 2007. Mg<sup>2+</sup> mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (46):18270-18275.
- Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. 2010. Structure of the human BK channel Ca<sup>2+</sup>-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*, 329 (5988):182-186.
- Zhong XZ, Harhun MI, Olesen SP, Ohya S, Moffatt JD, Cole WC, Greenwood IA. 2010. Participation of KCNQ (Kv7) potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter. *J Physiol*, 588 (Pt 17):3277-3293.
- Zhou XB, Wulfsen I, Lutz S, Utku E, Sausbier U, Ruth P, Wieland T, Korth M. 2008. M2 muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual, Gbetagamma-mediated inhibition of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity. *J Biol Chem*, 283 (30):21036-21044.
- Zhou XB, Wulfsen I, Utku E, Sausbier U, Sausbier M, Wieland T, Ruth P, Korth M. 2010. Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (17):8005-8010.
- Zhou Y, Lingle CJ. 2014. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol*, 144 (5):415-440.
- Zhu S, White RE, Barman SA. 2006. Effect of PKC isozyme inhibition on forskolin-induced activation of BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Lung*, 184 (2):89-97.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6 (1):43-50.
- Zwienerberg-Lee M, Hartman J, Rudisill N, Madden LK, Smith K, Eskridge J, Newell D, Verweij B, Bullock MR, Baker A, Coplin W, Mericle R, Dai J, Rocke D, Muizelaar JP, Balloon Prophylaxis for Aneurysmal Vasospasm Study G. 2008. Effect of prophylactic transluminal balloon angioplasty on cerebral vasospasm and outcome in patients with Fisher grade III subarachnoid hemorrhage: results of a phase II multicenter, randomized, clinical trial. *Stroke*, 39 (6):1759-1765.

## **Anhang**

### **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Otto W. Witte für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Experimentellen Neurologie am Forschungszentrum Lobeda bedanken. Zudem gilt mein Dank Herrn Professor Knut Holthoff, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in der Arbeitsgruppe Bioimaging durchzuführen, stets eine große Unterstützung war und für jedes Problem eine passende Lösung fand.

Besonderer Dank gilt zudem meinem Mentor Herrn Dr. Alexander Joerk, der mich mit der Arbeit im Labor und mit der Welt der Hämoglobinabbauprodukte vertraut machte. Seine umfassende Unterstützung, Motivation sowie sein großes Engagement haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Marcel Ritter und Daniel Schulze (IAAC Jena) danke ich für die Bereitstellung der HDPs (PDPs, BOXes und MVM), ohne die der Großteil der Experimente nicht realisierbar gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei der „Jena School for Ageing Medicine (JSAM)“ für die strukturierte Promotionsbetreuung, finanzielle Unterstützung und die Teilnahme an interessanten und lehrreichen Seminaren, Vorträgen sowie Symposien bedanken.

Außerdem danke ich meiner Mitdotorandin Charlotte Schröder für die angenehme Zusammenarbeit und unterhaltsame Tage im Labor sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungszentrums Lobeda für den guten Umgang miteinander.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern und meiner Familie, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert haben sowie meine akademischen Ziele ermöglichen und meiner Freundin, die während der Promotionsarbeit eine immer zuverlässige Stütze für mich war.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

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

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

Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff

Dr. med. Alexander Joerk

Dr. rer. nat. Marcel Ritter

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, 07.12.2022

Marvin Ritter