

Aus dem
Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD)
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Martin Dichgans

**Endotheliales NO-sGC Signaling nach experimenteller
Subarachnoidalblutung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sabrina Maria Katzdobler

aus
Deggendorf

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Plesnila
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Trumm
PD Dr. Thomas Weig

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Nicole Terpolilli

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1 <i>Allgemeines zu hämorrhagischen Schlaganfällen</i>	4
1.2 <i>Die Subarachnoidalblutung</i>	4
1.2.1 Anatomische Grundlagen	4
1.2.2 Ätiologische Einteilung	5
1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren	5
1.2.4 Pathophysiologie der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung	5
1.2.5 Klinische Präsentation und Einteilung	6
1.2.6 Therapie der Subarachnoidalblutung	7
1.2.7 Mortalität und Outcome	7
1.3 <i>Verzögert auftretende zerebrale Ischämie (Delayed Cerebral Ischemia)</i>	8
1.4 <i>Frühe posthämorrhagische Hirnschädigung (Early Brain Injury, EBI)</i>	9
1.4.1 Pathomechanismen der EBI	9
1.4.2 Störung der Mikrozirkulation	9
1.5 <i>Stickstoffmonoxid und die lösliche Guanylatzyklase in zerebralen Gefäßen</i>	12
1.5.1 Stickstoff-Monoxid-vermittelte Regulation des Gefäßtonus	12
1.5.2 Struktur und Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS)	13
1.5.3 Struktur und Aktivität der löslichen Guanylatzyklasen (sGC)	14
1.5.4 Pathologische Veränderung des eNOS-NO-sGC-cGMP-Signalwegs nach SAB	16
1.5.5 Therapeutische Modulation der NO-Konzentration nach SAB	17
1.6 <i>Pharmakologische Stimulatoren und Aktivatoren von sGC</i>	19
1.7 <i>Zielsetzung der vorliegenden Studie</i>	21
2. Material und Methoden	22
2.1 <i>Tiermodell</i>	22
2.1.1 Versuchstiere	22
2.1.2 Endovaskuläres Perforationsmodell	22
2.1.3 Invasive Blutdruckmessung	25
2.1.4 Monitoring und Auswertung der Vitalparameter	25
2.1.5 Beurteilung der neurologischen Defizite bei Überlebensversuchen	25
2.1.6 Perfusionsfixierung	26
2.2 <i>Etablierung der Gefäß-Isolation</i>	27
2.3 <i>Gel-Elektrophorese und Westernblot</i>	29
2.3.1 Theoretische Grundlagen von Gel-Elektrophorese und Westernblot	29
2.3.2 Praktische Durchführung von SDS-Page und Westernblot	30
2.3.2.1 Proteinaufreinigung aus isolierten Gefäßen	30
2.3.2.2 Vorbereitung der Gelelektrophorese-Proteinprobe	31
2.4 <i>Intravitalmikroskopie</i>	33
2.4.1 Technischer Hintergrund	33
2.4.2 Praktische Durchführung der Zwei-Photonen-Mikroskopie	35
2.4.2.1 Vorbereitende Prozeduren: Fensterpräparation, Durchblutungsmessung, Injektionskatheter	35
2.4.2.2 Erhebung der Bilddaten	37
2.4.3 Bildanalyse	37

2.5 Testsubstanzen.....	39
2.5.1 sGC-Aktivator Bay 60-2770.....	39
2.5.2 sGC-Stimulator Bay 41-2272.....	39
2.5.3 Aufbereiten der Testsubstanzen	40
2.5.4 Dosisfindung	42
2.5.5 Applikation der Testsubstanzen	43
2.6 Versuchsreihen	43
2.6.1 Validierung des Gefäßisolation-Protokolls	43
2.6.2 Standardisierungsreihe SAB-Induktion.....	43
2.6.3 Charakterisierung von Enzymregulationen des eNOS-NO-sGC-Signalwegs nach SAB.....	44
2.6.4 Randomisierung und Verblindung der Bay 60-2770 und Bay 41-2272 Versuche.....	44
2.6.5 Akut-Versuche Bay 60-2770 3h nach SAB – In-vivo Quantifizierung der Mikrozirkulation mittels Zweiphotonen-Mikroskopie	45
2.6.6 Akut-Versuche Bay 60-2770 3h nach SAB – Quantifizierung der Hirndurchblutung.....	45
2.6.7 Akut-Versuche Bay 41-2272 3h nach SAB ohne in vivo Mikroskopie	46
2.7 Statistische Auswertung.....	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Etablierung des Gefäßisolutionsprotokolls.....	48
3.1.1 Isolation extrakortikaler und intrakortikaler Gefäße.....	48
3.1.2 Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben mittels Westernblot	49
3.2 Standardisierungsreihe endovaskuläre SAB-Induktion.....	51
3.3 Charakterisierung endothelialer Enzymveränderungen des eNOS-NO-sGC-Signalwegs nach experimenteller SAB	52
3.3.1 Induktion der Subarachnoidalblutung.....	52
3.3.2 Vergleich des eNOS-NO-sGC Signalwegs zwischen intrakortikaler Mikrozirkulation und extrakortikaler Gefäße	53
3.3.3 Untersuchung der Veränderungen des eNOS-NO-sGC Signalwegs während der Early Brain Injury Phase nach SAB	55
3.4 Effekt von Bay 60-2270 und Bay 41-2272 nach experimenteller SAB.....	57
3.4.1 Bay 60-2770.....	57
3.4.1.1 Induktion der Subarachnoidalblutung.....	57
3.4.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP).....	57
3.4.1.3 Analyse der Mikrovasospasmen.....	59
3.4.1.3.1 Anzahl der Spasmen	59
3.4.1.3.2 Analyse des Konstriktionsgrads der Spasmen	59
3.4.1.4 Effekt von Bay 60-2770 auf den nicht-spastischen Gefäßdurchmesser	61
3.4.1.5 Zerebrale Durchblutung im A. cerebri media Stromgebiet.....	62
3.4.1.6 Evaluation der zerebralen Durchblutung ohne in-vivo-Mikroskopie	64
3.4.1.6.1. Induktion der Subarachnoidalblutung.....	64
3.4.1.6.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	64
3.4.1.6.3 Durchblutung im A. cerebri media-Territorium.....	65
3.4.2 Bay 41-2272 Versuche	66
3.4.2.1 Induktion der Subarachnoidalblutung.....	66
3.4.2.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP).....	66
3.4.2.3 Durchblutung im A. cerebri media-Territorium	67
4. Diskussion	68
4.1 Diskussion der Methodik.....	68
4.1.1 Modell der experimentellen Subarachnoidalblutung.....	68
4.1.2 Verwendung organischer Lösungsmittel	69

4.1.3 Autoregulationsvorgänge als mögliche Störquelle	70
4.1.4 Mittlerer arterieller Blutdruck, Narkoseprotokoll	72
4.1.5 Messung der zerebralen Durchblutung mittels Laser-Doppler-Flowmetrie und Einfluss der Zweiphotonenmikroskopie.....	73
4.1.6 Westernblot-Verfahren	73
4.2. Diskussion der Ergebnisse	74
4.2.1 Erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur zerebralen Gefäßisolation	74
4.2.2 Charakterisierung der Veränderungen des vaskulären NO-sGC-Signalwegs nach experimenteller SAB	76
4.2.2.1 Methodisch-bedingte Unterschiede zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen	76
4.2.2.2 Spezifische Veränderungen des eNOS-NO-sGC Signalwegs nach SAB in intra- und extrakortikalen Gefäßen.....	76
4.2.3 Effekt der sGC nach experimenteller Subarachnoidalblutung.....	78
4.2.3.1 Erwarteter Wirkmechanismus der sGC-modulierenden Substanzen nach experimenteller Subarachnoidalblutung	78
4.2.3.2 Wirkung des sGC-Aktivators Bay 60-2770 auf die Mikrozirkulationsstörung nach experimenteller SAB.....	78
4.2.3.3 Wirkung des sGC-Stimulators Bay 41-2272 auf die zerebrale Durchblutung nach experimenteller SAB.....	80
4.2.3.4 Alternativer NO-vermittelte Signalwege zur Vasodilatation	81
5. Zusammenfassung und Ausblick	83
6. Englische Zusammenfassung.....	85
7. Abbildungsverzeichnis	87
8. Tabellenverzeichnis	90
9. Abkürzungsverzeichnis	91
10. Literatur.....	93
11. Posterpräsentation	117
12. Affidavit.....	118
13. Danksagung.....	119
14. Lebenslauf	120

“When persons in good health are suddenly seized with pains in the head, and straightway are laid down speechless, and breathe with stertor, they die in seven days.”

Hippocrates 460-37-BC, Aphorismi

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zu hämorrhagischen Schlaganfällen

Der Begriff Schlaganfall beschreibt allgemein den pathologischen Untergang von Nervenzellen des Gehirns, Rückenmarks oder der Retina aufgrund einer zellulären Minderversorgung mit Sauerstoff mit begleitendem neurologischem Defizit.⁴ Dabei unterscheidet man anhand der Ursache ischämische von hämorrhagischen Schlaganfällen. Innerhalb der hämorrhagischen Subgruppe wird weiter zwischen intrazerebralen Blutungen (ICB) und Subarachnoidalblutungen (SAB) unterschieden.

Jährlich erleiden in Deutschland circa 250.000 Personen einen Schlaganfall,⁵ wobei die genaue Anzahl von Studie zu Studie variiert.⁶ Von der Gesamtzahl dieser Schlaganfälle entfallen rund 80% auf die ischämische und 20% auf die hämorrhagische Unterform.⁷ Trotz geringerer Inzidenz versterben in Deutschland dabei nahezu genauso viele, weltweit sogar mehr Menschen an einem hämorrhagischen als an einem ischämischen Schlaganfall.⁵ Auch gemessen an den „Disability-adjusted life-years“, einer die Krankheitslast widerspiegelnden Einheit, gehen hämorrhagische Schlaganfälle mit einer schlechteren Prognose einher als ischämische Insulte.⁵

Diese Arbeit befasst sich mit pathophysiologischen Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation nach Subarachnoidalblutung sowie einer potenziellen pharmakologischen Manipulation zur Verbesserung der resultierenden Strukturschäden und neurologischen Defizite.

1.2 Die Subarachnoidalblutung

1.2.1 Anatomische Grundlagen

Drei Hirnhäute (Meningen) umgeben das Gehirn und Rückenmark und sorgen für dessen Schutz, Versorgung und Verankerung (Abb. 1). Die äußere harte Hirnhaut wird als Dura mater bezeichnet, sie zeichnet sich entsprechend ihrem Namen durch besonders straffes Bindegewebe aus. Ihr liegt innen die Arachnoidea mater an, die erste der beiden weichen Hirnhäute. Von dieser ziehen Bindegewebestrabekel (Trabeculae arachnoideae) durch den darunter liegenden Subarachnoidalraum zur Pia mater, der zweiten weichen Hirnhaut, und verbinden diese miteinander. Dieses spinnennetzähnliche Aussehen der Arachnoidaltrabekel verleiht der Arachnoidea mater ihren Namen („Spinnwebshaut“). Die Pia mater liegt Gehirn und Rückenmark direkt auf und beinhaltet ein Geflecht aus Gefä-

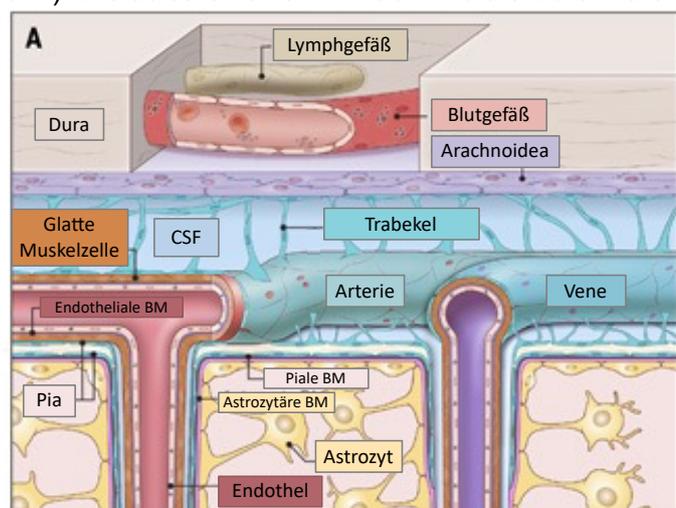


Abbildung 1: Anatomische Darstellung der drei Meningen und der sich im Subarachnoidalraum befindlichen Gefäße. BM: Basalmembran; Abgewandelt nach Mastorakos P, McGavern D. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci Immunol.* 2019;4(37):eaav0492. *nervous system. Sci Immunol.* 2019;4(37):eaav0492. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch AAAS („Reprinted with permission from AAAS“).

ßen, welche in das Parenchym eindringen und das Gehirn mit Blut versorgen („piale Gefäße“).

Im von Arachnoidea mater und Pia mater begrenzten Subarachnoidalraum zirkuliert der Liquor cerebrospinalis, der Subarachnoidalraum zählt somit zu den äußeren Liquorräumen. Er wird durchzogen von arteriellen und venösen Gefäßen, welche auch als piale Gefäße bezeichnet werden. Kommt es zu einer Blutung aus einem dieser Gefäße, spricht man von einer Subarachnoidalblutung.

1.2.2 Ätiologische Einteilung

Subarachnoidalblutungen werden zunächst unterteilt in traumatische und nicht-traumatische Formen. Traumatische SABs treten bei in bis zu 60% aller Schädelhirntraumata auf,^{8,9} sie stellen insgesamt die häufigste Form der SABs dar.⁹⁻¹¹ Ihnen gegenüber stehen nicht-traumatische bzw. spontan auftretende Subarachnoidalblutungen. Häufigste Ursache innerhalb dieser Gruppe ist die spontane Ruptur eines arteriellen Aneurysmas, seltenere Ursachen sind unter anderem die Ruptur vaskulärer Malformationen, Vaskulitiden und die zerebrale Amyloid-Angiopathie.^{12,13}

Gegenstand dieser Arbeit ist die Gruppe der aneurysmatischen Subarachnoidalblutungen, nachfolgend sind deswegen nur diese mit dem Begriff Subarachnoidalblutung bezeichnet.

1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren

Subarachnoidalblutungen stellen circa 5% aller Schlaganfälle dar.¹⁴⁻¹⁶ Die Inzidenz wird regionsabhängig auf 9-10/100.000 Einwohner geschätzt, wobei regional auch Inzidenzen von über 20/100.000 Einwohner beschrieben werden.^{17,18} Der Häufigkeitsgipfel liegt um das sechste Lebensjahrzent,¹⁹ Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer.^{15,20,21} Zu den Risikofaktoren für das Auftreten von intrakraniellen Aneurysmen zählen familiäre Vorbelastung, weibliches Geschlecht, arterielle Hypertonie, exzessiver Alkoholkonsum, Rauchen, höheres Lebensalter, sowie einige Bindegeweberkrankungen (Ehlers-Danlos-Typ IV, Marfan-Syndrom, Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung).^{14,15,17-24} Dabei sind arterielle Hypertonie, weibliches Geschlecht und höheres Lebensalter zusätzlich Risikofaktoren für die Ruptur eines bestehenden intrakraniellen Aneurysmas, ebenso wie eine vorangegangene Subarachnoidalblutung, eine irreguläre Aneurysmaform, größere Aneurysmagröße sowie die Lokalisation eines Aneurysmas in der posterioren Strombahn.²⁴⁻²⁶

1.2.4 Pathophysiologie der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung

In 85% der Fälle ist die Ruptur eines arteriellen Aneurysmas der intrakraniellen Arterien ursächlich für eine spontane SAB.^{18,27} Anatomisch werden Aneurysmen anhand ihrer Form in die Kategorien sakkulär, fusiform, dissezierend und mykotisch unterschieden, wobei einer SAB am häufigsten sakkuläre Aneurysmen zugrunde liegen.^{11,28} Aneurysmen bilden sich insbesondere an Gefäßgabelungen aus, sind meist an der Schädelbasis lokalisiert und werden anhand ihrer Lokalisation weiter in Aneurysmen der vorderen und hinteren Strombahn unterschieden.^{11,29} Dabei finden sich rund 35% der Aneurysmen im Stromgebiet der A. communicans anterior, 30% entlang der A. carotis interna, 22% an der A. cerebri media und rund 30% der Patienten mit intrakraniellen Aneurysmen weisen diese in mehr als zwei Lokalisationen auf (Abb. 2 A).²⁸ Bei Ruptur eines solchen Aneurysmas kommt es zum Austritt von Blut in den

Subarachnoidalraum, wobei es je nach Lokalisation des Aneurysmas zu einer typischen Verteilung des Bluts im Subarachnoidalraum kommt (Abb. 2 B).¹¹ Der plötzliche Blutaustritt führt

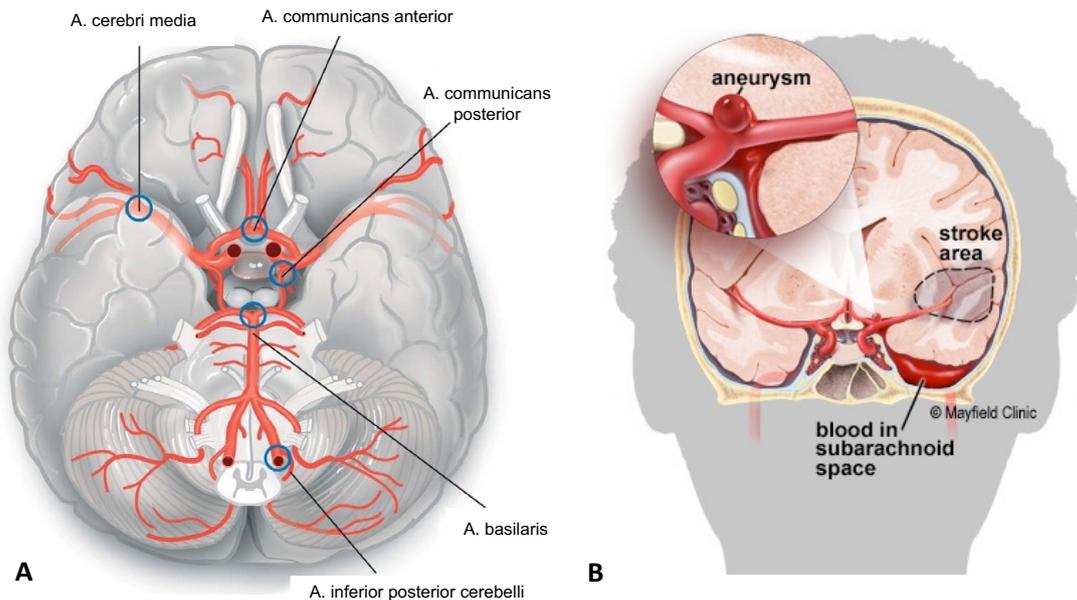


Abbildung 2: A. Graphische Darstellung des Circulus arteriosus willisi an der Schädelbasis. Markiert sind die häufigsten Lokalisationen für intrakranielle Aneurysmen. Aus Gijn, J. van, Kerr, R. S. & Rinkel, G. J. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 369, 306–318 (2007). B. Darstellung einer Subarachnoidalblutung aus einem Aneurysma an der Schädelbasis mit Blutverteilung im Subarachnoidalraum. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch Mayfield Clinic („Printed with permission from Mayfield Clinic“). Aneurysm: Aneurysma; stroke area: Infarktgebiet; blood in subarachnoid space: Blut im Subarachnoidalraum

zu einem rapiden Anstieg des intrakraniellen Drucks (Intracranial Pressure, ICP), begleitet von einem Abfall der zerebralen Durchblutung (Cerebral Blood Flow, CBF) sowie des zerebralen Perfusionsdrucks (Cerebral Perfusion Pressure, CPP) bis hin zu transienter oder permanenter globaler zerebraler Ischämie.³⁰

1.2.5 Klinische Präsentation und Einteilung

Das klinische Korrelat des massiven intrakraniellen Druckanstiegs findet sich im Hauptsymptom der SAB wieder: ein plötzlich auftretender heftigster Kopfschmerz, der entsprechend seiner akuten und ausgeprägten Präsentation als Vernichtungskopfschmerz bezeichnet wird. Typische weitere Symptome sind Übelkeit und Erbrechen, Meningismus, Bewusstseinsverlust, fokale neurologische Defizite und epileptische Anfälle.^{28,31-33} Weiterhin ist eine kardiovaskuläre Beteiligung typisch mit kardialer systolischer Dysfunktion,³⁴ Herzrhythmusstörungen und EKG-Veränderungen,³⁵⁻³⁷ aber auch im Rahmen des bereits im Jahr 1901 beschriebenen Cushing-Reflex. Letzterer beschreibt eine bei SAB beobachtete Trias aus arterieller Hypertonie, Bradykardie und erhöhtem intrakraniellen Druck.^{38,39} In bis zu 43% der Fälle finden sich in der Vorgeschichte von SAB-Patienten prodromale Kopfschmerzattacken aufgrund sogenannter „sentinel bleeds“ nur wenige Tage vor dem eigentlichen Ereignis,⁴⁰ meist interpretiert als Zeichen der Instabilität eines Aneurysmas.⁴¹

Die Einteilung des Schweregrads einer SAB kann anhand verschiedener Skalen erfolgen. Vielfach verwendet sind die Hunt und Hess-Skala, die Fisher-Skala und der World Federation of Neurological Surgeons (WFNS) Scale. Die Beurteilung nach Hunt und Hess erfolgt anhand klinischer Parameter des Patienten,⁴² die Fisher Skala beschreibt Blutverteilung und -volumen im CT,⁴³ der WFNS Score vereint den Glasgow Come Score mit dem Vorhandensein von

fokal-neurologischen Defiziten.⁴⁴ Eine ausführliche Diskussion der Vor- und Nachteile der einzelnen Graduierungssysteme steht nicht im Fokus dieser Arbeit, kann jedoch in der Literatur nachgelesen werden.⁴⁵⁻⁴⁷

1.2.6 Therapie der Subarachnoidalblutung

Die Behandlung von SAB-Patienten befasst sich einerseits mit der Stabilisierung und Versorgung der Akutsituation, andererseits mit der Prävention von Sekundärschäden. Aufgrund der Schwere dieses Krankheitsbild sollte die Versorgung dabei in speziellen Zentren mit intensivmedizinischer Ausstattung und Erfahrung erfolgen.⁴⁸⁻⁵¹ In der Akutphase stehen die Sicherstellung einer adäquaten Oxygenierung, die Aufrechterhaltung einer adäquaten systemischen und intrakraniellen Perfusion, die Kontrolle und Behandlung von erhöhten ICP-Werten sowie ein frühzeitiger Beginn einer Vasospasmusprophylaxe im Vordergrund.⁵²⁻⁵⁶ Da das Risiko für eine erneute Blutung aus derselben Blutungsquelle innerhalb der ersten 24 Stunden am höchsten ist,^{52,57} sollte frühzeitig eine Versorgung des Aneurysmas mittels endovaskulärem Coiling oder mikrochirurgischem Clipping erfolgen. Welche der beiden Methoden überlegen ist, ist aktuell Gegenstand zahlreicher Studien und wird vielfach in der Literatur diskutiert. So scheint das 1-Jahres-Outcome nach endovaskulärem Coiling verbessert zu sein, jedoch kommt es nach neurochirurgischem Clipping zu einer geringeren Zahl an Re-Blutungen.⁵⁸⁻⁶¹ Die Wahl der Methode sollte patientenindividuell und abhängig von den anatomischen Gegebenheiten der Blutungsquelle getroffen werden.

Nach Stabilisierung des Patienten sowie Sicherung der Blutungsquelle in der akuten Phase stehen die Prophylaxe sowie Therapie von Folgekomplikationen im Vordergrund. Zu den allgemeinen Maßnahmen zählen die Vermeidung von Hyperglykämie, Hyperthermie sowie ausgeprägter systolischer Hypo- oder Hypertension. Weitere Maßnahmen umfassen die nicht-medikamentöse Thromboseprophylaxe, etwa mit intermittierender pneumatischer Kompression oder Kompressionsstrümpfen, die Behandlung epileptischer Anfälle und im Falle eines Hydrocephalus die Versorgung mittels einer extraventrikulären Ventrikeldrainage, Lumbaldrainage oder Lumbalpunktion.^{52,53,62,63} Eine zusätzlich gefürchtete Komplikation stellen die pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Early Brain Injury (EBI) sowie eine verzögert auftretende zerebrale Ischämie (delayed cerebral ischemia, DCI) dar. Auf Pathophysiologie und aktuelle Behandlungsmöglichkeiten dieser beiden Phänomene soll unter den Punkten 1.3 und 1.4 genauer eingegangen werden.

1.2.7 Mortalität und Outcome

Die Subarachnoidalblutung stellt noch immer ein sehr schwerwiegendes Krankheitsbild dar. Dank zunehmender intensivmedizinischer Behandlung ist es zwar gelungen, die Mortalität der Subarachnoidalblutung über die letzten Jahrzehnte deutlich zu senken.^{15,19,23} Dennoch versterben noch immer bis zu 21% der Patienten vor Erreichen einer medizinischen Einrichtung.²⁰ Rund ein Drittel der hospitalisierten Patienten verstirbt innerhalb der ersten 48 Stunden,^{64,65} die 30-Tage-Mortalitätsrate der hospitalisierten Patienten beträgt je nach Studie zwischen 22% und 50%.^{12,64,66} Von den überlebenden Patienten tragen rund ein Drittel dauerhafte Behinderungen davon.^{17,67}

1.3 Verzögert auftretende zerebrale Ischämie (Delayed Cerebral Ischemia)

Unter dem Begriff Delayed Cerebral Ischemia (DCI) werden neu auftretende fokal-neurologische Defizite oder eine Abnahme des GCS um mindestens 2 Punkte zusammengefasst, die sich typischerweise einige Tage nach der initialen Blutung manifestieren, für mindestens eine Stunde bestehen und nicht durch eine andere Ursache, beispielsweise einen Hydrozephalus als SAB-Komplikation, erklären lassen.⁶⁸ Der Häufigkeitsgipfel für das Auftreten einer DCI liegt hierbei bei 5-14 Tagen nach der initialen Blutung.⁶⁹ Als noch immer führende Ursache für post-SAB-Mortalität und Morbidität⁷⁰ lag der allgemeine Forschungsfokus lange auf Charakterisierung der Pathophysiologie sowie Prävention und Behandlung der DCI.

Bereits 1949 wurden von Robertson sekundäre zerebrale Infarkte nach Subarachnoidalblutung beschrieben, die für die neurologische Verschlechterung im Rahmen einer DCI verantwortlich gemacht wurden.⁷¹ Sekundär auftretende Ischämien lassen sich mit modernen bildgebenden Methoden in 25-80% der SAB-Patienten nachweisen.⁷² Einige Jahre nach Robertson wurden zerebrale Spasmen der an der Schädelbasis gelegenen Arterien beschrieben, welche sich üblicherweise 3-14 Tagen nach SAB manifestieren.⁷³⁻⁷⁶ Unter anderem auch aufgrund der zeitlichen Korrelation beider Ereignisse wurden Makrovasospasmen lange als ursächlich für zerebrale Infarkte und DCI nach SAB gesehen.^{43,77,78} Mehrere neuere Studienergebnisse stellen diese Korrelation jedoch zunehmend in Frage.

So konnten auch in jüngeren Studien bei rund 70% der SAB-Patienten arterielle Gefäßspasmen 3-14 Tage nach SAB mittels Angiographie nachgewiesen werden. Dennoch entwickeln nur 20-30 % dieser Patienten ein manifestes neurologisches Defizit.^{79,80} Weitere Studien zeigten, dass nicht alle Patienten mit Makrovasospasmen einen in der Bildgebung nachweisbaren Infarkt entwickeln, gleichzeitig lagen nicht bei allen Patienten mit nachgewiesenen Infarkten Makrovasospasmen vor.⁸¹⁻⁸³ Ebenso korrelieren zerebrale Infarkte im Rahmen einer DCI hinsichtlich der Lokalisation nicht immer mit dem von Makrovasospasmen betroffenen Territorium.^{82,84} Untermauert wird diese Diskrepanz von Vorliegen von Makrovasospasmen und Manifestation einer DCI mit schlechterem Outcome durch zwei pharmakologische Beobachtungen: So verbessert der im Rahmen der SAB-Therapie standardmäßig eingesetzte L-Kalziumkanal-Antagonist Nimodipin die Prognose von Patienten, zeigt jedoch keine signifikante Reduktion von Vasospasmen.^{85,86} Der in den CONSCIOUS-Studien untersuchte Endothelin-1A-Rezeptorantagonist Clazosentan hingegen konnte trotz signifikanter Verhinderung von Vasospasmen keine Verringerung der Infarktraten oder eine Verbesserung der Prognose herbeiführen.^{87,88}

Die Kausalität von Makrovasospasmen zu DCI wird somit nach mehreren Jahrzehnten zunehmend in Frage gestellt und viel mehr eine multifaktorielle Genese der DCI angenommen.⁸⁹ Ebenso findet ein Paradigmenshift statt, hin zu der Annahme, dass bereits unmittelbar nach Ruptur des Aneurysmas pathophysiologische Vorgänge angestoßen werden, deren gemeinsame Endstrecke im Verlauf möglicherweise die DCI darstellt.^{90,91}

1.4 Frühe posthämorrhagische Hirnschädigung (Early Brain Injury, EBI)

1.4.1 Pathomechanismen der EBI

Die akut auftretenden Veränderungen innerhalb der ersten 72 Stunden nach SAB werden seit 2004 unter dem Begriff Early Brain Injury (EBI) zusammengefasst (Abb. 4).⁹² Zu Beginn dieser frühen posthämorrhagischen Hirnschädigung stehen die mechanischen/pathophysiologischen Veränderungen mit einem Anstieg des ICPs, einem Abfall des CBFs und CPPs, einer gestörten Autoregulation sowie der mechanischen Kompression durch die Formation eines Hämatoms im Subarachnoidalraum.⁹³ Diese Faktoren bedingen eine transiente oder permanente globale zerebrale Ischämie und führen zusammen mit den pathologischen Blutabbauprodukten im Subarachnoidalraum zu einem zerebralen metabolischen Versagen, einer gestörten zerebralen Autoregulation, einer gestörten Ionen-Hämostase, oxidativem Stress, Zellapoptose, mikrozirkulatorischer Dysfunktion und einer Vielzahl an inflammatorischen Vorgängen.^{64,90,94-96}

1.4.2 Störung der Mikrozirkulation

Bereits kurz nach dem Blutungsereignis sinkt in den meisten Fällen der pathologisch erhöhte intrakranielle Druck wieder ab und der zerebrale Perfusionsdruck steigt wieder an. Dennoch zeigt sich trotz normalisiertem CPP in verschiedenen Tiermodellen und in klinischen Studien ein fortdauernder Ischämiezustand mit erniedrigter zerebraler Durchblutung.⁹⁷⁻⁹⁹ Da Vasospasmen der großen Gefäße erst mit einigen Tagen Verzögerung auftreten, scheint eine Störung auf Ebene der Mikrozirkulation ursächlich für diesen früh auftretenden Ischämiezustand zu sein.^{100,101}

Bereits 1975¹⁰² wurden in Tierversuchen Vasospasmen der pialen Arteriolen unmittelbar nach Induktion einer experimentellen Subarachnoidalblutung nachgewiesen. Das Auftreten solcher mikrozirkulatorischen Vasospasmen innerhalb weniger Stunden nach SAB konnte in mehreren experimentellen Studien reproduziert werden.¹⁰³⁻¹⁰⁷ Klinisch konnten Vasospasmen der Mikrozirkulation von SAB-Patienten mittels direkter orthogonaler polarisierter spektraler Mikroskopie bereits während des Aneurysmen-Clippings und somit ebenfalls in der Phase der Early Brain Injury nachgewiesen werden (Abb. 3 A, 3B).^{1,2} Interessanterweise zeigen die Gefäße dabei keine uniforme spastische Verengung, sondern repetitive punktuelle Konstriktionen, die den Gefäßen ein Perlenketten-ähnliches Aussehen verleihen. Diese „pearl-string-like-constrictions“ wurden erstmalig systematisch nach experimentell induzierter SAB im Mausmodell beschrieben (Abb. 3 C).³ Die mittels endovaskulärem Perforationsmodell ausgelöste SAB führte bereits nach drei Stunden zu Mikrovasospasmen (MVS) in über 70% der Arteriolen, welche morphologisch den von Uhl et al.¹ in Patienten beobachteten ähneln. Mikrovaskuläre Konstriktionen waren in 30% mit Mikrothromben assoziiert und betrafen ausschließlich das arterielle Stromgebiet. Auch Pennings et al.² fanden nach Subarachnoidalblutung in Patienten Mikrovasospasmen ausschließlich in den Arteriolen, nicht den Venolen.

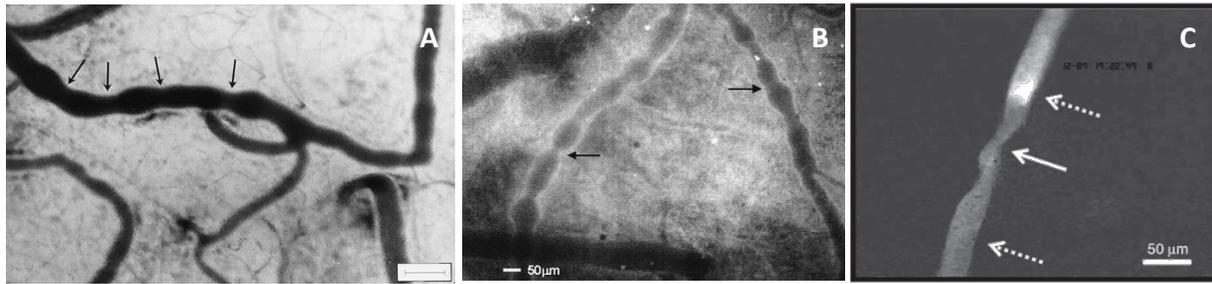


Abbildung 3: Vasospasmen der Mikrozirkulation (Arteriolen) nach Subarachnoidalblutung. Darstellung der Vasospasmen mit „pearl-string-like-constrictions“ mittels direkter orthogonaler polarisierter spektraler Mikroskopie bei je einem Patienten nach SAB durch Uhl et al.¹ (A) und Pennings et al.² (B), sowie experimentell im Maus-Modell nach SAB mittels 2-Photonen-Mikroskopie durch Friedrich et al.³ (C). Maßstab Bild links: Balken entspricht 100 µm.

Arterielle Mikrothromben scheinen zur posthämorrhagischen Mikrozirkulationsstörung beizutragen. Diese wurden sowohl in tierexperimentellen Studien^{103,108} als auch in Patienten¹⁰⁹ nachgewiesen und werden mit sekundärer zerebraler Ischämie in Verbindung gebracht.¹¹⁰ In Tiermodellen zeigt sich eine Häufung der Formierung von Mikrothromben bereits zehn Minuten nach SAB und erneut nach 24 Stunden,^{103,111} sowie ein nahezu ausschließliches Vorkommen der Thromben in von Mikrovasospasmen betroffenen Gefäßen.³ Da das Vorhandensein von Mikrothromben mit der Spasmenstärke korreliert, scheinen zum einen lokale Flussverlangsamung die Thrombenbildung pathologisch zu begünstigen,³ zum anderen werden auch eine gestörte endotheliale antithrombotische Funktion,¹¹² sowie Veränderungen der Thrombozytenaggregations-Faktoren^{113,114} als begünstigende Faktoren angenommen. Die Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO), einem physiologischen Inhibitor der Thrombozytenaggregation, ist nach SAB erniedrigt, was ebenfalls die Mikrothrombenbildung begünstigen zu scheint.¹¹⁵ Dennoch ergab sich in zwei großen Metaanalysen, die den Einsatz plättchenhemmender Medikamente nach SAB untersuchten, lediglich eine nicht-signifikante Verbesserung des neurologischen Zustands,^{116,117} sodass die Mikrothrombenbildung nur einen Teil der Pathophysiologie der Early Brain Injury darzustellen scheint.

Eine Störung der zerebralen Autoregulation tritt ebenfalls im Rahmen der frühen Mikrozirkulationsstörung nach SAB auf.¹¹⁸ Normalerweise führt eine Kombination aus neurogenen, myogenen und metabolischen Faktoren zu einer ständigen Anpassung des Gefäßwiderstands, um die kontinuierliche zerebrale Durchblutung über eine Spannweite verschiedener zerebraler Perfusionssituationen, somit indirekt auch systemischer Blutdruckschwankungen, aufrechtzuerhalten. Der Verlust dieser zerebralen Autoregulation scheint sowohl zur Entwicklung eines Hirnödems als auch der im Verlauf gefürchteten globalen zerebralen Ischämie beizutragen.¹¹⁹⁻¹²²

Cortical Spreading Depolarizations (CSD), sich langsam über den Kortex bewegende Depolarisationswellen,¹²³ treten gehäuft nach SAB auf und gehen zeitlich häufig einer DCI voraus.¹²⁴⁻¹²⁶ Bei intakten Kompensationsmechanismen löst eine CSD eine reaktive Hyperämie aus, um den erhöhten Sauerstoff- und Glukosebedarf der neuronalen Depolarisation zu decken. Dies ist gefolgt von einer Phase der neuronalen Repolarisation mit verminderter Perfusion (Depression).¹²⁷ Selbst wiederholte CSDs mit konsekutiven Phasen der neuronalen Depression führen im gesunden Gehirn zu keinem neuronalen Schaden.¹²⁸ Nach SAB kommt es jedoch vermutlich aufgrund einer beeinträchtigten neurovaskulären-Kopplung mit gestörter cerebraler Auto-

regulation anstatt zu der nötigen reaktiven Hyperämie zu einer Vasokonstriktion mit pathologischer Hypoämie.^{101,129} Der Cortical Spreading Depolarization folgt somit eine pathologische sich über den Kortex ausbreitende Ischämie (cortical spreading ischemia) mit neuronaler Zellschädigung.¹³⁰

Im Rahmen der Mikrozirkulationsstörung nach SAB ist auch die Integrität der Bluthirnschranke (Blood Brain Barrier, BBB) beeinträchtigt. Mehrere Studien im experimentellen und klinischen Setting beschreiben den zeitlichen Verlauf der BBB-Störung nach SAB, wobei bereits drei Stunden nach SAB erste Veränderungen zu sehen sind und sich das Maximum der BBB-Störung in nahezu allen Studien innerhalb der ersten 72 Stunden nach SAB zeigte.¹³¹⁻¹³⁴ Die Pathophysiologie der BBB-Schädigung beruht auf einer Vielzahl an Faktoren, darunter proinflammatorische Zytokine, Transmembranproteine, Matrix Metalloproteinasen, oxidativer Stress und viele mehr.¹³⁵⁻¹³⁹ Gemeinsame Endstrecke stellt ein zunehmendes vasogenes Ödem dar, welches über Erhöhung des ICPs und weitere Kompression der Mikrozirkulation zur globalen zerebralen Ischämie beiträgt.¹⁰¹

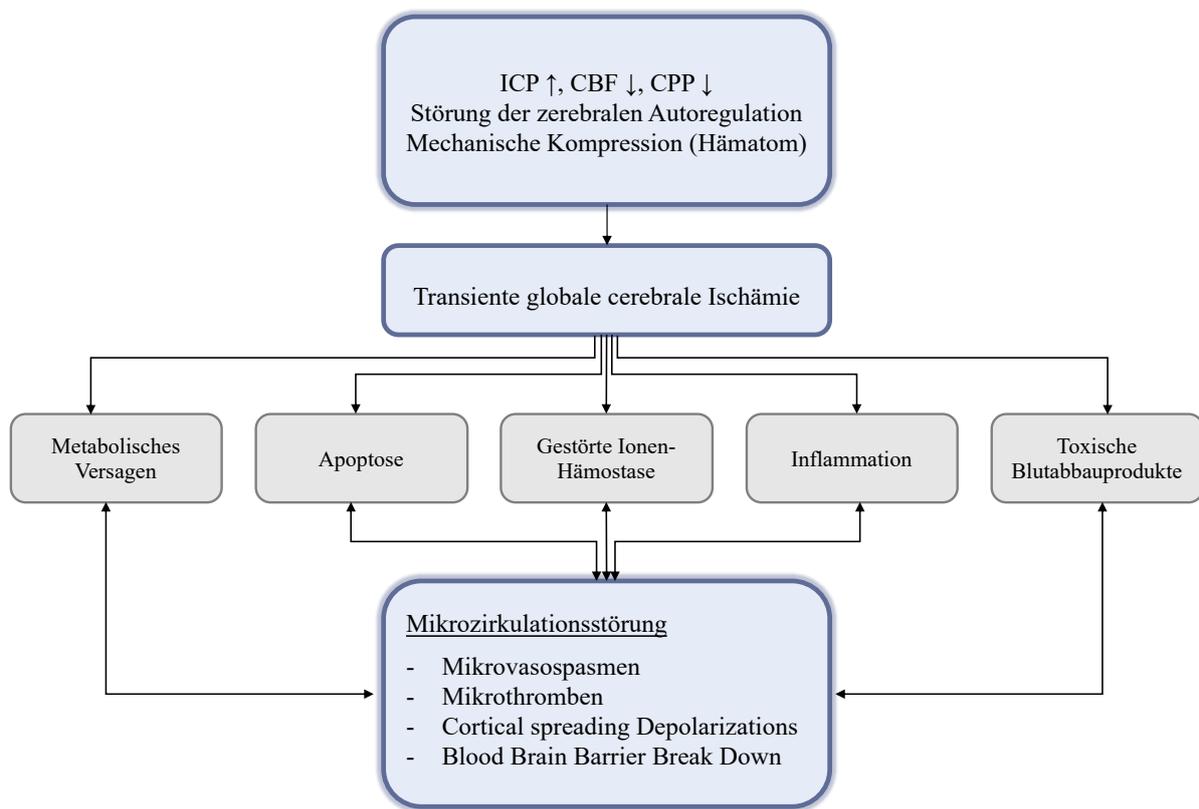


Abbildung 4: Mechanismen der Early Brain Injury nach Subarachnoidalblutung mit Störung der Mikrozirkulation.

1.5 Stickstoffmonoxid und die lösliche Guanylatzyklase in zerebralen Gefäßen

Die zerebrale Gefäßregulation wird maßgeblich vom starken endogenen Vasodilator Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) und der löslichen Guanylatzyklase (soluble Guanylate Cyclase, sGC) beeinflusst. Entsprechend wird diesem Reaktionsweg im Rahmen der Mikrozirkulationsstörung nach SAB zunehmend Aufmerksamkeit gewidmet.¹⁴⁰

1.5.1 Stickstoff-Monoxid-vermittelte Regulation des Gefäßtonus

Die vasodilatatorische Wirkung von NO wurde bereits 1980 beschrieben,¹⁴¹ jedoch erst sieben Jahre später wurde das zunächst als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnete Signalmolekül als NO identifiziert.^{142,143} NO ist ein geruchs- und farbloses gasförmiges Signalmolekül, das frei durch Zellmembranen diffundieren kann und in der Regulation einer Vielzahl von biologischen Funktionen involviert.¹⁴⁴ Endogenes NO wird von den Unterformen der Isoenzymgruppe der NO-Synthasen (NOS) gebildet: Der dauerhaft bzw. konstitutiv exprimierten endothelialen (eNOS) und der neuronalen NO-Synthase (nNOS), sowie von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).¹⁴⁵

Für die zerebrale Gefäßregulation spielt insbesondere das von eNOS synthetisierte NO eine wichtige Rolle.¹⁴⁶⁻¹⁵⁰ Nach Synthese in den vaskulären Endothelzellen diffundiert NO in die umliegenden glatten Muskelzellen (Smooth Muscle Cells, SMCs), bindet dort an den NO-Rezeptor lösliche (soluble) Guanylatzyklase, was die die Bildung von zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (Cyclic Guanosine Monophosphate, cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP)¹⁵¹ induziert (für Details siehe Kapitel 1.6.1). cGMP als intrazellulärer sekundärer Botenstoff vermittelt dann über die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG), geringer auch über die cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA), eine weitere Phosphorylierung nachgeschalteter Signalkaskaden und kann zudem direkt zyklische nukleotid-gesteuerte Kanäle (Cyclic Nucleotide-Gated ion channels, CNG-Kanäle) aktivieren.^{152,153} Die im Rahmen der Gefäßregulation stattfindende Vasodilatation mit Relaxation der SMCs wird zum einen über eine durch cGMP-induzierte und vermutlich über den Rho/Rho-Kinase-Weg vermittelte Aktivitätssteigerung der Myosin Leichtketten-Phosphatase (Myosin Light Chain Phosphatase, MLCP) hervorgerufen. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Myosin Light Chain Phosphorylierung mit reduzierter Ca^{2+} -Sensitivität von Myosin und entsprechend erhöhter Kontraktilitätsschwelle der SMCs.^{144,154} Über ein komplexes Zusammenspiel aus Phosphorylierung multipler am Ca^{2+} -Haushalt beteiligter Enzyme, Ionenkanäle und Rezeptoren senkt cGMP zudem das freie intrazelluläre Ca^{2+} und verringert so weiter die Kontraktion glatter Muskelzellen.^{155,156}

Der eNOS-NO-sGC-cGMP-Signalweg wird einerseits passiv durch Abdiffundieren von NO von sGC beendet, wodurch das auslösende Signal terminiert wird. Aktiv wird der Signalweg von Phosphodiesterasen (PDEs) beendet, die von cGMP in einer negativen Rückkopplungsschleife aktiviert werden und dieses in seine inaktive 5'-GMP-Form hydrolysieren.¹⁵⁵

Neben der Gefäßregulation wird auch die Thrombenbildung von NO beeinflusst. Die thrombozyteneigene NO-Synthase zählt ebenfalls zur Gruppe der eNOS, unterscheidet sich von der in Endothelzellen exprimierten eNOS jedoch insbesondere hinsichtlich der Aktivierung: Sie wird über Phosphorylierung reguliert und ist Ca^{2+} -unabhängig.¹⁵⁷ Nach Synthese durch die thrombozytäre eNOS induziert NO auch hier über cGMP die Proteinkinasen PKG und PKA,

welche multiple Substrate innerhalb der Thrombozyten phosphorylieren. Diese können in sog. Signaling Regulatoren und Actin-Binding-Proteins (ABPs) eingeteilt werden und umfassen unter anderem verschiedene Glykoproteine, Hitzeschockproteine, G-Proteine, Caldesmon und Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein.¹⁵⁸ Über Phosphorylierung dieser Signaling Regulatoren und ABPs werden Plättchen-Aktivierung und -Adhäsion, Sekretion der Thrombozyten-granula und Plättchen-Aggregation beeinflusst.^{157,158}

Neben der zerebralen Gefäßregulation ist NO auch an neuronaler Proliferation und Differenzierung, vaskulärem Remodelling und Angiogenese, sowie an der Modulation von Lernen und Erinnerung, Angst, Reproduktionsverhalten und Schlaf- sowie Essverhalten beteiligt.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

1.5.2 Struktur und Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

Die endotheliale NO-Synthase besteht aus einer N-terminalen Oxygenase-Domäne und einer C-terminalen Reduktase-Domäne, getrennt durch eine Calmodulin-Binding Domäne (Abb. 5).¹⁵² Nach Homodimerisation zweier NO-Synthasen zur Gewährleistung des nötigen Elektronentransfers sowie Expression relevanter Bindungsstellen werden aus L-Arginin in Gegenwart von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoff (O₂) über eine zweistufige 5-Elektronen-Redox-Reaktion L-Citrullin und NO synthetisiert.¹⁶² Aktiviert wird die dauerhaft exprimierte eNOS durch einen Anstieg des intrazellulären Calciums (Ca²⁺),¹⁶³ die NO-Synthase aus L-Arginin erfolgt unter Bindung der weiteren Co-Substrate Calmodulin, Häm, (6R)-tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavinmononukleotid und Flavin-Adenin-Dinukleotid.¹⁶⁴

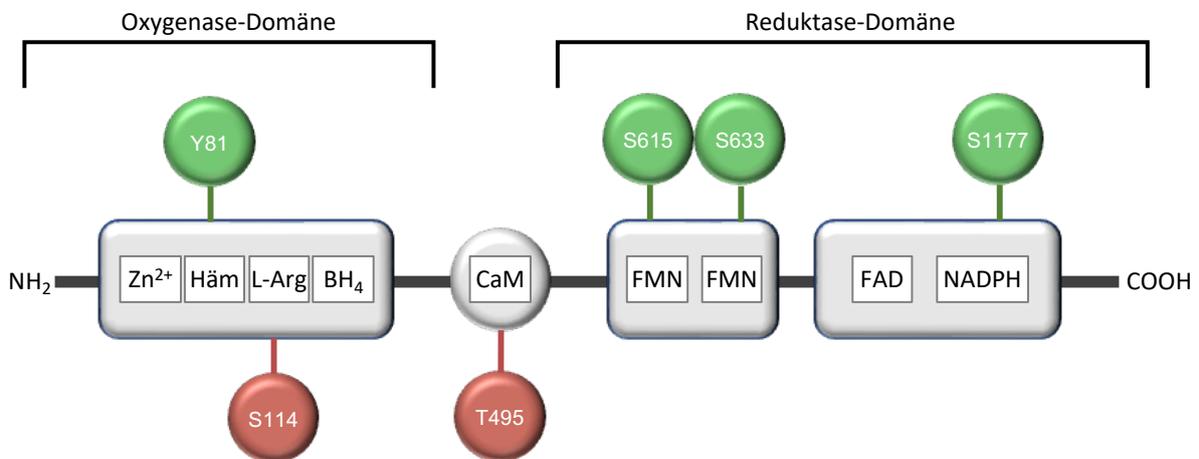


Abbildung 5: Lineare Darstellung der Domänen-Struktur der eNOS. Abwandlung nach Billaud, Marie et al. "Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall." Pharmacological reviews vol. 66,2 513-69. 26 Mar. 2014

Die enzymatische Aktivität von eNOS wird neben der Verfügbarkeit von Substrat und Co-Faktoren insbesondere durch posttranslationale Modifikationen moduliert.^{165,166} Hierbei spielt vorrangig die Phosphorylierung verschiedener Serin-, Tyrosin- und Threonin-Reste eine Rolle. So führt eine Phosphorylierung an Ser1177, Ser615 oder Tyr81 zu einer Enzymaktivierung, Phosphorylierung von Ser114 oder Thr495 zu einer Inhibition der eNOS-Enzymaktivität.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Diese regulierenden posttranslationalen Modifikation der eNOS werden selbst durch eine Vielzahl

verschiedener Signalwegen reguliert. So führt beispielsweise eine erhöhte Scherspannung der Endothelzellen zu einer Aktivierung der Kinasen PKA, Akt und Calmodulin Kinase II mit Phosphorylierung von Ser1177 und Ser633 und konsekutiver NO-vermittelter Vasodilatation.¹⁷¹⁻¹⁷³

1.5.3 Struktur und Aktivität der löslichen Guanylatzyklen (sGC)

Lösliche Guanylatzyklen sind Heterodimere, die aus einer größeren α - und einer kleineren β -Untereinheit bestehen.^{153,174} Sie sind im Zytoplasma lokalisiert und finden sich in nahezu allen Zellen von Säugetieren. Mehrere Isoformen der beiden Untereinheiten sind beschrieben, in menschlichen Zellen existieren die Isotypen α_1 , α_2 , β_1 und β_2 .¹⁵³ Jede sGC-Untereinheit besteht aus vier Domänen: Der Häm-NO-O₂-bindenden Domäne (H-NOX), der Per-ARNT-Sim (PAS)-Domäne, der coiled-coil signaling-Helix (CC) und der katalytischen Cyclase-Domäne (Abb. 6).¹⁷⁵

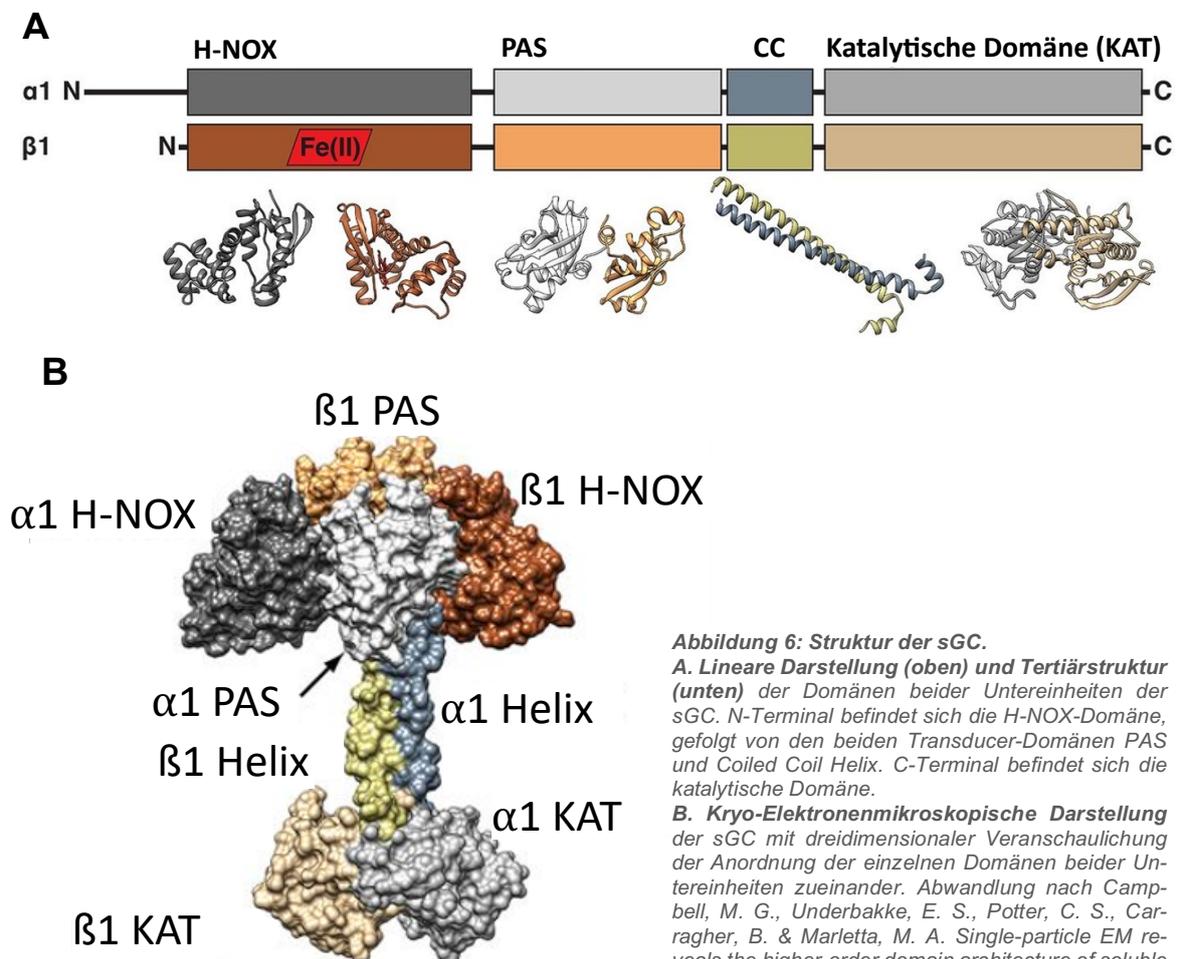


Abbildung 6: Struktur der sGC.

A. Lineare Darstellung (oben) und Tertiärstruktur (unten) der Domänen beider Untereinheiten der sGC. N-Terminal befindet sich die H-NOX-Domäne, gefolgt von den beiden Transducer-Domänen PAS und Coiled Coil Helix. C-Terminal befindet sich die katalytische Domäne.

B. Kryo-Elektronenmikroskopische Darstellung der sGC mit dreidimensionaler Veranschaulichung der Anordnung der einzelnen Domänen beider Untereinheiten zueinander. Abwandlung nach Campbell, M. G., Underbakke, E. S., Potter, C. S., Carragher, B. & Marletta, M. A. Single-particle EM reveals the higher-order domain architecture of soluble guanylate cyclase. *Proc National Acad Sci* 111, 2960–2965 (2014).

Die H-NOX-Domäne befindet sich am N-Terminus jeder Untereinheit, hier kommt es zur NO-Häm-vermittelten Aktivierung des Enzyms.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Die β -H-NOX-Domäne bindet über einen His105-Liganden Häm in seiner Fe^{2+} -reduzierten Form.¹⁷⁹ Durch Bindung von NO wird der so 5-koordinierte His- Fe^{2+} -Komplex zu einem 6-koordiniertem His- Fe^{2+} -NO-Komplex (Abb. 7).¹⁸⁰

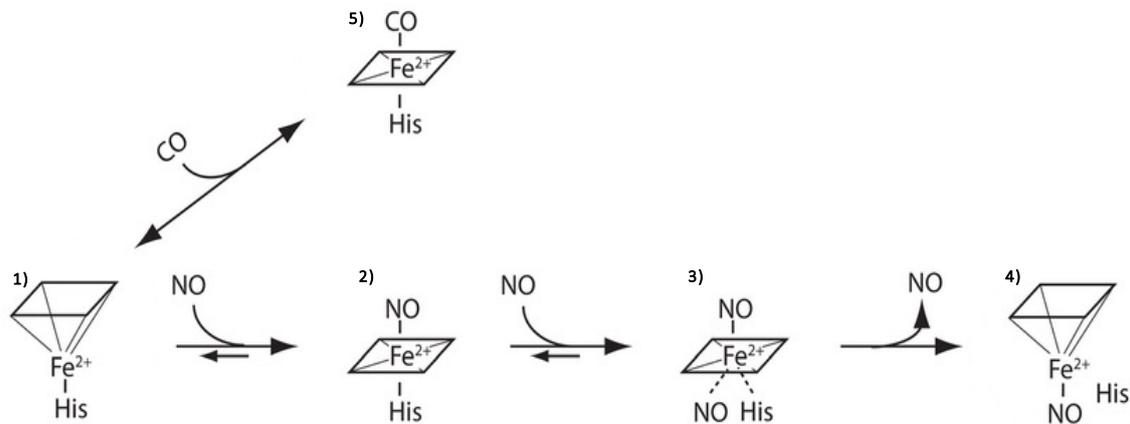


Abbildung 7: Häm-Bindungsmechanismus der sGC. 1) Im inaktiven Zustand ist die reduzierte Häm-Gruppe über Fe^{2+} an den His105-Liganden der β -Untereinheit gebunden. 2) Bindung von NO führt zunächst zu einem 6-c-His- Fe^{2+} -NO-Komplex, 3 und 4) Bindung eines weiteren NO-Moleküls führt zur Spaltung der Fe^{2+} -His105-Bindung mit Bildung eines 5-c- Fe^{2+} -NO-Komplex. 5) Alternativ kann die Häm-Gruppe auch CO als Aktivator binden. Abwandlung nach Girvan, H. M. & Munro, A. W. Heme Sensor Proteins. *J Biol Chem* 288, 13194–13203 (2013).

Durch den starken 0 -trans-Effekt von NO kommt es zur Spaltung der Fe^{2+} -His105-Bindung mit Bildung eines 5-c- Fe^{2+} -NO-Komplex und Induktion von Konformationsänderungen, welche auf die katalytische Domäne übertragen werden.^{180,181} Die genaue Beteiligung der α -H-NOX-Domäne ist noch nicht endgültig bekannt, es wird eine Regulierung der Aktivität von sGC über die Affinität für NO und Kohlenstoffmonoxid (CO) vermutet.¹⁸²

Das in der H-NOX-Domäne gebundene Häm besitzt in seiner reduzierten Form eine hohe Affinität zur Bindung von NO, kann in geringerem Maße jedoch auch CO binden.¹⁸³ Im Gegensatz zu an Myoglobin oder Hämoglobin gebundenem Häm besitzt es jedoch keine Bindungsaffinität gegenüber Sauerstoff.¹⁸¹ Da Sauerstoff in Organismen in signifikant höheren Konzentrationen als NO vorkommt, ist diese Selektivität der sGC für NO und gegen O_2 für ihre Funktion als NO-Rezeptor unerlässlich.¹⁸⁴ Die Bindung von NO führt zu einer 200-fachen Aktivierung der sGC, die Bindung von CO nur zu einer vierfachen Aktivierung.¹⁸⁵ Dabei ist nicht nur das Ausmaß der Enzymaktivierung, gemessen an Bildung des 6-c-His- Fe^{2+} -NO-Komplex, von der NO-Konzentration abhängig, sondern auch die Aktivierungsgeschwindigkeit, gemessen an der Konversion des 6-c-His- Fe^{2+} -NO-Komplex zum 5-c- Fe^{2+} -NO-Komplex.¹⁸⁶ Dass dieser zweite Reaktionsschritt ebenfalls von der NO-Konzentration abhängig zu sein scheint, führte zu der Hypothese, dass die sGC eine zweite NO-Bindungsstelle besitzt.^{180,186} Dabei wurde insbesondere eine Bindung an die proximale Seite des Häms und das Vorhandensein einer zweiten nicht-Häm-abhängigen Bindungsstelle diskutiert.¹⁸⁷⁻¹⁹³ Eine endgültige Lokalisierung der Bindungsstelle für ein zweites NO-Molekül war bislang noch nicht erfolgreich, eine zweite nicht-Häm-abhängige Bindungsstelle scheint jedoch wahrscheinlich.¹⁸⁰ Cary et al¹⁸⁹ und Russwurm et al¹⁹⁴ schlagen so jeweils ein mehrstufiges Aktivitätsmodell der sGC vor: Basale tonische sGC-Aktivität bei Vorhandensein von einfach äquivalenten NO-Konzentrationen und 100% Enzymaktivität bei Vorhandensein eines NO-Überschusses.

Die PAS und die CC-Domäne sind beide an der Dimerisierung zweier sGC-Untereinheiten beteiligt und leiten die durch NO-Bindung induzierten Konformationsänderungen an die katalytische Domäne fort.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷

Für die katalytische Aktivität der sGC ist die Dimerisierung zweier Untereinheiten nötig.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ In den meisten Formen kommt es zur Dimerisierung einer α - und einer β -Untereinheit, es sind jedoch auch selten vorkommende und enzymatisch-aktive α/α - und β/β -Homodimere beschrieben.²⁰¹ Diese Dimerisierung ist nötig, da die endgültige Substrat-Bindungsstelle und katalytische zyklische Domäne der sGC sich erst aus den Bestandteilen beider Untereinheiten zu einer funktionellen Gesamtdomäne zusammensetzt.^{181,202} Nach Aktivierung der sGC durch NO wird in der katalytischen Domäne aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) der sekundäre Botenstoff Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) synthetisiert.¹⁸⁰

1.5.4 Pathologische Veränderung des eNOS-NO-sGC-cGMP-Signalwegs nach SAB

Bereits zehn Minuten nach SAB kommt es zu einer Reduktion der zerebralen NO-Konzentration.²⁰³ Je nach Studie ist diese Reduktion der NO-Level auch 48 Stunden bis hin zu sieben Tage nach SAB nachweisbar²⁰⁴⁻²⁰⁶ und wird als maßgeblich an der Entstehung von Vasospasmen beteiligt gehalten.²⁰⁷ Mehrere Vorgänge scheinen an der NO-vermittelten Genese von Vasospasmen beteiligt zu sein (Abb. 8). So werden NO-inaktivierende Effekte von nach SAB vorhandenem extravasalem Hämoglobin sowie Hyperoxiden (O_2^-) vermutet (sog. Scavenging), die zu einer lokalen Reduktion der NO-Konzentrationen führen.^{140,203,208} Oxidativer Stress durch Hyperoxide führt zusätzlich zu einer pathologischen Oxidierung der sGC, wodurch diese ihre Funktion verliert.^{174,209} Weiterhin wird eine Störung der eNOS-Funktion mit Entkopplung der oben beschriebenen NO-Produktion beschrieben:²¹⁰ Eine zunächst durch reduzierte adventitielle nNOS-Expression hervorgerufene Vasokonstriktion²¹¹ führt über Erhöhung der Scherspannung zu einer Aktivierung der eNOS, das gleichzeitig vermehrt exprimiert wird.^{206,212} Trotz vermehrter Expression und Aktivität von eNOS finden sich reduzierte cGMP-Level in den Gefäßwänden,²¹³ reduzierte NO-Level, erhöhte Hyperoxid-Konzentrationen und fortbestehende Vasospasmen, sodass eine Dysfunktion der endothelialen NO-Synthase vorzuliegen scheint.^{206,210} Diese eNOS-Dysfunktion wird möglicherweise durch den endogenen eNOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) hervorgerufen.²¹⁴ Die ADMA-Liquorkonzentration korrelierte nach SAB in experimentellen und klinischen Studien positiv mit dem Vorhandensein von Vasospasmen und negativ mit NO-Konzentration und klinischer Prognose.²¹⁵⁻²¹⁷ Ebenfalls wird eine pathologisch gesteigerte Hydrolyse von cGMP mit resultierender vorzeitiger Beendigung des NO-sGC-cGMP-Signalwegs durch PDE diskutiert.²¹⁸

Physiologischer Gefäßzustand

Endotheliale Dysfunktion

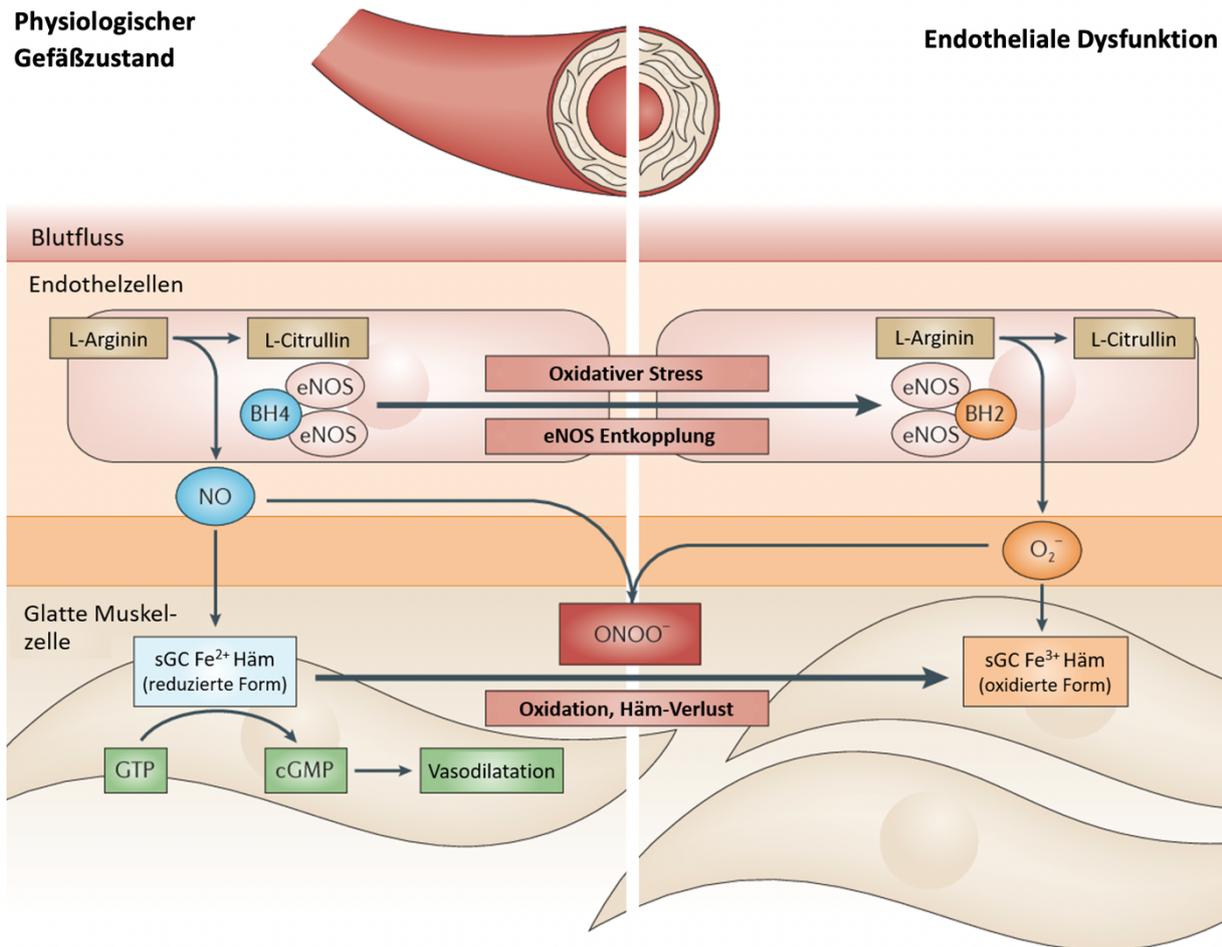


Abbildung 8: Darstellung der endothelialen Dysfunktion während Ischämie. Oxidativer Stress und Entkopplung der eNOS führen zu einer verminderten NO- und gesteigerten Superoxid-Produktion. Vermehrter oxidativer Stress führt zu Oxidation und Funktionsverlust der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Abgewandelt nach Lundberg, J. O., Gladwin, M. T. & Weitzberg, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 14, 623–641 (2015).

1.5.5 Therapeutische Modulation der NO-Konzentration nach SAB

Mehrere experimentelle und klinische Studien, die die NO-Spiegel nach SAB modifizierten, unterstützen die Hypothese, dass das NO-sGC-System eine wichtige Rolle bei der posthämorrhagischen Mikrozirkulationsstörung spielt. So führte die Applikation des NO-Donors N-nitroso-Glutathion in Ratten erfolgreich zu einer Reduktion der Vasospasmen nach SAB.^{105,219} Die intravenöse Verabreichung von Natriumnitrit sowie die intracarotidale Verabreichung von NO zeigte ebenfalls experimentell eine Reduktion der Vasospasmen nach SAB.²²⁰⁻²²² Durch transdermale Applikation von niedrig-dosiertem Nitroglycerin als NO-Donor konnte in einem SAB-Rattenmodell ebenfalls eine positive Wirkung auf Vasospasmen nachgewiesen werden.²²³ Klinisch zeigte sich nach intrathekaler Gabe von Natrium-Nitroprussid die Flussgeschwindigkeit in zerebralen Gefäßen angiographisch und im transkranialen Doppler gebessert.^{224,225} Ein häufiges Problem dieser NO-basierten Therapien stellen jedoch systemische Nebenwirkungen mit Abfall des systemischen Blutdrucks dar.¹⁶¹ Bei bereits eingeschränkter Hirndurchblutung nach SAB ist eine systemische Hypotension mit konsekutiver Verringerung des zerebralen Perfusionsdruckes eine gefürchtete Komplikation.

Diese nachteilige systemische Nebenwirkung von NO-Donoren zeigte sich interessanterweise nicht in mehreren tierexperimentellen Studien bei Verwendung von inhalativem NO (iNO).²²⁶⁻²²⁸ In einer Studie zur Untersuchung des Effekts von iNO auf die zerebrale Zirkulation nach ischämischem Schlaganfall im Schaf- und Mausmodell wurde zunächst in gesunden Tieren gezeigt, dass iNO unter physiologischen Bedingungen keinen Effekt auf die zerebrale Durchblutung und den Durchmesser zerebraler Arteriolen hat²²⁸. Es zeigte sich jedoch eine dosisabhängige Dilatation der zerebralen Venolen durch iNO. Da diese Dilatation durch eine vorhergehende Gabe des irreversiblen und hochselektiven sGC-Inhibitors ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) vollständig verhindert werden konnte, scheint eine Aktivierung des sGC-cGMP-Signalwegs die Grundlage dieser Gefäßdilatation zu sein. Mittels in vivo Fluoreszenzmikroskopie von NO-Oxidierungsprodukten in der zerebralen Mikrozirkulation sowie Quantifizierung von NO-Transportmolekülen im Blut konnten die Autoren zudem indirekt eine iNO-abhängige Mehranreicherung von NO in zerebralen Gefäßen und einen Anstieg der NO-Transportmoleküle im Blut zeigen. Inhalatives NO scheint somit in der Lunge in den Blutkreislauf überzutreten, um anschließend gebunden an NO-Transportmoleküle systemisch im Blutstrom transportiert und lokal freigesetzt zu werden. Die lokale Freisetzung von NO scheint dabei sauerstoffabhängig zu erfolgen: Unter mittels Abbindens beider Carotiden induzierten ischämischen Bedingungen, während der sich pH, Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) in Arteriolen und Venolen aneinander annähern, zeigte sich die iNO-vermittelte Dilatation nicht nur in den Venolen, sondern auch in den Arteriolen. Dieser Effekt wurde in einem ischämischen Schlaganfall-Modell reproduziert. Nach Okklusion der A. cerebri media mit anschließender Reperfusion zeigte sich unter iNO-Therapie eine selektive Vasodilatation der Arteriolen und Venolen in der hypoxischen Penumbra, nicht jedoch im gesunden Gewebe oder im Infarktkern. Diese Vasodilatation in der Penumbra resultierte in einer signifikanten Steigerung der zerebralen Durchblutung und Verbesserung der neurologischen Defizite der mit iNO-therapierten Versuchstiere.

Auch in einem murinen Tiermodell zur Subarachnoidalblutung wurde die Wirkung von iNO untersucht (Abb. 9).²²⁷ Mittels in vivo Mikroskopie konnte hier unter iNO-Therapie eine Reduktion der spastischen Gefäße der zerebralen Mikrozirkulation um 80% erzielt werden, in den verbleibenden 20% der spastischen Gefäße zeigte sich der Schweregrad der Spasmen signifikant gebessert. Diese Verbesserung der Störung der Mikrozirkulation resultierte in einer gesteigerten zerebralen Durchblutung, einer Verbesserung der neurologischen Defizite und einer deutlich verringerten Mortalität der Versuchstiere. Auch hier zeigte sich keine systemische Vasodilatation bei während NO-Inhalation stabil bleibenden Blutdruckwerten. Auf Basis dieser tierexperimentellen Daten konnte in einer klinischen Pilotstudie mit sieben SAB-Patienten mit

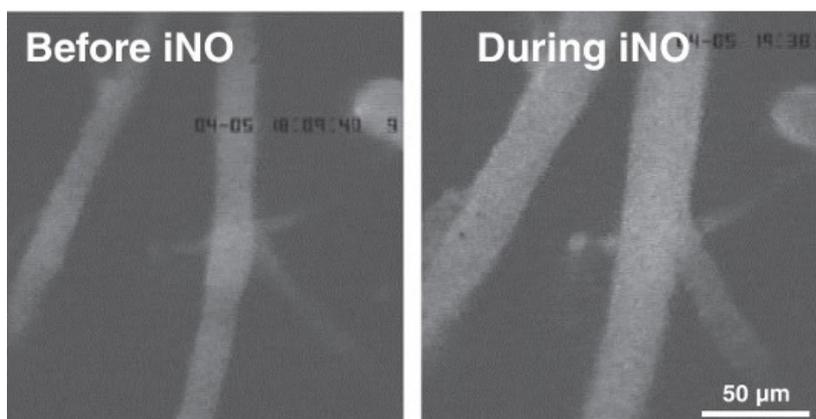


Abbildung 9: Wirkung von exogenem inhalativem NO auf die Mikrozirkulation drei Stunden nach experimenteller SAB. Während NO-Inhalation („During iNO“) kommt es zu einer Vasodilatation, Verringerung der Mikrovasospasmen und einer Steigerung des CBFs. „Before iNO“: Vor NO-Inhalation. Aus Terpolilli, N. A. et al. Nitric oxide inhalation reduces brain damage, prevents mortality, and improves neurological outcome after subarachnoid hemorrhage by resolving early pial microvasospasms. *J Cereb Blood Flow Metabolism* 36, 2096–2107 (2015).

persistierender DCI trotz ausgeschöpfter Standardtherapie gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von iNO sicher ist und eine positive Auswirkung auf die cerebrale Durchblutung hat.²²⁹ Ein erhöhter Katecholamin-Bedarf wurde bei ausbleibender kompensatorischer Hypertension nach Beendigung der iNO Gabe im Rahmen der intensivierten Narkose diskutiert.

Diese Studien legen nahe, dass inhalatives NO unter lokalen pathologischen Veränderungen eine Vasodilatation der betroffenen zerebralen Mikrozirkulation und somit eine Steigerung der zerebralen Durchblutung erzielt. Aufgrund der selektiven Freisetzung des an Transportmoleküle gebundenen NOs unter hypoxischen Bedingungen zeigt sich trotz inhalativer und damit systemischer Applikation keine generalisierte Vasodilatation. Diese therapeutisch sehr attraktiven Eigenschaften von iNO stehen jedoch der technisch aufwendigen Anwendung gegenüber. Dennoch scheint eine Aktivierung des NO-sGC-cGMP-Signalwegs ein erstrebenswertes therapeutisches Ziel zur Verbesserung der Mikrozirkulation in der frühen posthämorrhagischen Phase nach stattgehabter Subarachnoidalblutung zu sein.

1.6 Pharmakologische Stimulatoren und Aktivatoren von sGC

Bereits 1994 wurden erste sGC-stimulierende Substanzen entwickelt, die zunächst jedoch eine Lichtsensitivität in ihrer Wirkungspotenz zeigten, was sie als potenzielle Pharmaka ausscheiden ließ.¹⁷⁴ Noch im selben Jahr wurde das Indazol-Derivat YC-1 entwickelt, welches sich als NO-unabhängiger Häm-abhängiger sGC-Stimulator erwies und keine Lichtabhängigkeit zeigte.²³⁰ Zahlreiche weitere sGC-Agonisten wurden in den folgenden Jahren entwickelt und in Studien untersucht.¹⁷⁴ Im Jahr 2013 erhielt der erste sGC-Stimulator Riociguat die FDA-Zulassung zur Therapie der chronischen thromboembolischen pulmonalen Hypertension und der pulmonalen arteriellen Hypertonie, nachdem in mehreren Zulassungsstudien ein signifikanter Benefit hinsichtlich der klinischen Endpunkte nachgewiesen werden konnte.^{231,232} In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl an sGC-Stimulatoren und -Modulatoren entwickelt, die sich in verschiedenen Stadien der klinischen Studien zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Sichelzellanämie, Systemische Sklerose, Offenwinkelglaukom, aber auch neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz befinden.²³³

Innerhalb der NO-unabhängigen sGC-Agonisten werden anhand des Wirkmechanismus zwei verschiedene Gruppen unterschieden (Abb. 10):

sGC-Stimulatoren sind *Häm-abhängige* sGC-Agonisten.¹⁷⁴ Sie binden vermutlich an die α -Untereinheit der sGC^{234,235} und stimulieren diese NO-unabhängig, zeigen aber zusätzlich einen starken synergistischen Effekt mit NO, in dem sie die Sensitivität der sGC zugunsten geringer Konzentrationen an verfügbaren NO erhöhen.^{174,236} Sie sind auf das Vorliegen von reduziertem Häm in der H-NOX-Domäne angewiesen, sie zeigen keine Wirkung auf die oxidierte oder Häm-freie sGC.^{174,237} Entsprechend eignen sie sich insbesondere bei einer dem NO-sGC-Signalweg vorgeschalteten-Pathologie mit reduzierten endogenen NO-Konzentrationen bei erhaltener sGC-Funktion.^{233,238} Zu den sGC-Stimulatoren zählen unter anderem YC-1, Bay 63-2521 (Riociguat) und Bay 41-2272.^{234,238}

sGC-Aktivatoren sind *Häm-unabhängige* sGC-Agonisten.¹⁷⁴ Sie binden sowohl an die α - als auch die β -Untereinheit²³⁹ und besetzen die Häm-Bindestelle der H-NOX-Domäne.²³⁸ Gleichzeitig konkurrieren sie mit oxidiertem Häm um die H-NOX-Bindungsstelle und können dieses

aufgrund der deutlich reduzierten Bindungsaffinität der oxidierten Häm-Form verdrängen.¹⁷⁴ Sie aktivieren somit sowohl Häm-freie als auch oxidierte sGC. Im Gegensatz zum NO-synergistischen Effekt der sGC-Stimulatoren zeigen sie dabei einen additiven Effekt.²³⁹ Ihr Einsatz ist somit insbesondere im Rahmen von Pathologien mit erhöhtem oxidativem Stress und pathologischer Veränderung der sGC von Bedeutung. Der Vertreter mit der initial höchsten beschriebenen Wirkpotenz innerhalb dieser Gruppe ist Bay 58-2667, weiterhin zählen zu dieser Gruppe unter anderem HMR-1766 und Bay 60-2770.^{174,240}

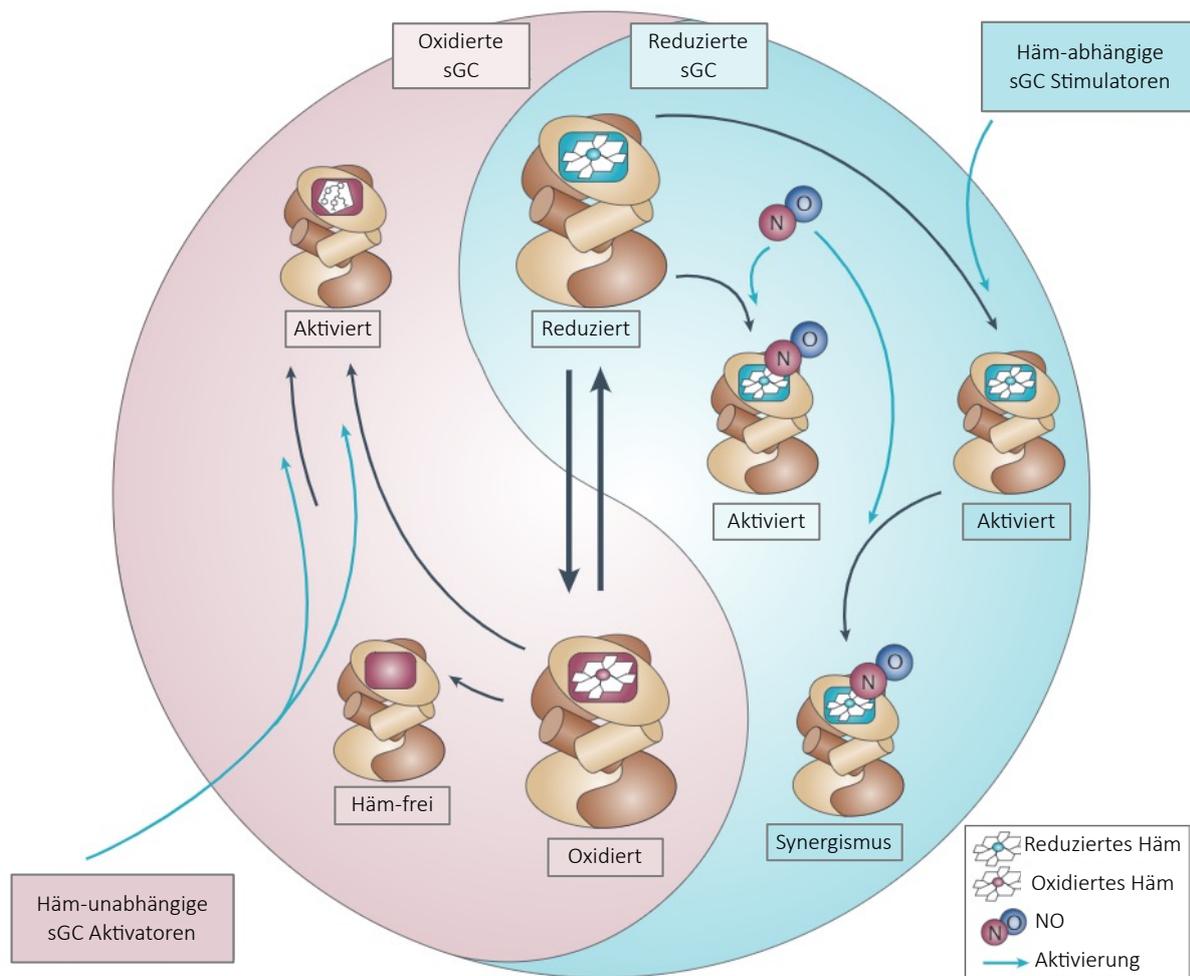


Abbildung 10: Darstellung der Wirkmechanismen von sGC-Aktivatoren und sGC-Stimulatoren. Aktivatoren sind Häm-unabhängig und können sowohl oxidiertes als auch häm-freies sGC aktivieren. Stimulatoren sind Häm-abhängig, sie sensibilisieren reduzierte sGC für niedrigere NO-Level und zeigen einen synergistischen Effekt. Abgewandelt nach Evgenov, O. V. et al. *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov* 5, 755–768 (2006).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Die Phase der Early Brain Injury mit ihren pathophysiologischen Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation rückt zunehmend in den Forschungsfokus bei SAB. Experimentelle *in-vivo*-Imaging Studien erlauben bereits die direkte Untersuchung der für die EBI charakteristischen Gefäßveränderungen sowie Effekte von Interventionsstudien auf Ebene der Mikrozirkulation. Eine gezielte Untersuchung der Mikrozirkulation hinsichtlich pathologischer Veränderungen auf Proteinebene gestaltet sich bislang jedoch technisch schwierig, meist werden stellvertretend besser zugängliche Gefäße des Circulus Willisii oder Gesamthirn-Lysate untersucht.²⁴¹⁻²⁴⁵ Im Rahmen dieser Arbeit soll durch Kombination von zwei vorbeschriebenen Methoden^{246,247} ein Protokoll zur gezielten Isolation der zerebralen Mikrozirkulation gegenüber den extrakortikalen pialen Gefäßen etabliert werden, um auch biochemische Analysen direkt auf Ebene der zerebralen Mikrozirkulation zu ermöglichen. Dieses Protokoll soll anschließend verwendet werden, um mittels Westernblot-Analysen Veränderungen des eNOS-NO-sGC-Signalwegs innerhalb der zerebralen Mikrozirkulation im zeitlichen Verlauf der Early Brain Injury nach SAB zu charakterisieren und gezielt mit Veränderungen in pialen Gefäßen zu vergleichen.

In einem zweiten Teil soll der Effekt einer pharmakologischen Modulation des sGC-cGMP-Signalwegs auf die zerebrale Durchblutung nach experimenteller Subarachnoidalblutung im Mausmodell untersucht werden; hierfür wird die Wirkung des sGC-Aktivators Bay 60-2770 und des sGC-Stimulators Bay 41-2272 auf die frühe posthämorrhagische Schädigung der Mikrozirkulation untersucht. sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren werden zunehmend in klinischen Studien im Zusammenhang mit diversen Pathologien untersucht. Diese gut charakterisierten Substanzen stimulieren mutmaßlich denselben Signalweg wie inhalatives NO und sollten somit ebenfalls zu einer zerebralen Vasodilatation mit Reduktion der Mikrovasospasmen nach SAB führen. Der Fokus des zweiten Teils der vorgelegten Studie liegt auf der direkten Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation mittels *in-vivo* Zweiphotonen-Mikroskopie nach pharmakologischer Manipulation der sGC.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung zwischen August 2015 und Dezember 2017 durchgeführt. Alle Experimente stehen in Einklang mit den aktuellen Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen und wurden vorab von der Regierung für Oberbayern genehmigt (AZ 027-15, AZ 220-14). Ergebnisse werden entsprechend der ARRIVE-Guideline²⁴⁸ berichtet. Alle Experimente wurden an männlichen, 6-8 Wochen alten C57/BL6N Mäusen der Mauslinie durchgeführt. Sämtliche Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Kisslegg, Deutschland) bezogen.

Die Mäuse wurden in einzelventilierten Standardkäfigen in der Core Facility des Centrums für Schlaganfall- und Demenzforschung gehalten. Gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU wurden abhängig vom Gewicht maximal fünf Tiere in einem Käfig gehalten. Jeder Käfig enthielt Einstreu, Nistmaterial, ein rotes Kunststoffhäuschen als Nisthöhle sowie ein Nagehölzchen. Wasser und Alleinerhaltungsfutter standen ad libitum zur Verfügung.

Im Tierstall herrschte konstant eine Umgebungstemperatur von 22 +/-2 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 45-55% relativer Feuchte. Mittels einer Zeitschaltung war nach den Empfehlungen der GV-SOLAS ein circadianer Tageslichtrhythmus vorgegeben mit 12h Licht- und 12h Nachtphase mit jeweils 30-minütiger Dämmerungsphase.

Der Gesundheitszustand jeder Maus wurde einmal täglich von einer ausgebildeten Tierpflegerin kontrolliert.

2.1.2 Endovaskuläres Perforationsmodell

Im Rahmen dieser Arbeit wird das endovaskuläre A. cerebri media- Perforationsmodell nach Vorlage von Bühler et al²⁴⁹ verwendet.

Zur adäquaten Schmerztherapie erhalten alle Mäuse 30 Minuten vor Operationsbeginn 4 mg/kg Carprofen subkutan. Anästhesie sowie Überwachung der Vitalparameter erfolgt in Anlehnung an ein bereits publiziertes Protokoll.²⁵⁰ Zur Narkoseinduktion wird das jeweilige Versuchstier in eine abgeschlossene Induktionskammer gesetzt und der Kammer 4% Isofluran (*Isofluran CP 1 ml/ml, CP-Pharma, Burgdorf*) in Raumluft zugeführt. Nach Erlöschen des Umdreh-Reflexes erhält das Tier die anhand des Gewichts berechnete Kombination aus Fentanyl (0.05 mg/kg, *Jansen-Cilag, Neuss*), Midazolam (5 mg/kg, *Braun, Melsungen*) und Medetomidin (0.5 mg/kg, *Pfizer, Karlsruhe*) intraperitoneal. Eine Stunde nach Injektion wurde ein Drittel der Induktionsdosis zur Narkoseaufrechterhaltung nachinjiziert. Bis Wirkungseintritt werden die Tiere in einem Wärmeinkubator (*MediHeat Veterinary Recovery Chamber, Peco Services Ltd, Cumbria, UK; Temperatur 28°C, Luftfeuchtigkeit 30%*) gehalten.

Nach Erlöschen der Schutzreflexe werden die Tiere unter Sicht intubiert und beatmet. Die O₂-Zufuhr wird mithilfe eines Sauerstoff-Sensors (*Oxydig®, Dräger Medical, Lübeck*) kontrolliert und bei 33% anteilig am Gesamtluftgemisch gehalten. Als Tubus wird ein peripherer Venenverweilkatheter (*Introcath® Safety-W 1,10 x 32 mm G 20 rosa, FEP, B. Braun, Melsungen*) verwendet. Eine adäquate Ventilation wird mittels eines Beatmungsgeräts für Nager (*MiniVent VentilatorModel 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hungstetten*) entsprechend der Größe der

Maus mittels Atemfrequenz und Atemvolumen eingestellt. Über ein seitlich am Tubus eingebohrtes Loch wird eine Kapnometrie-Sonde (*Capnograph for Small Rodents, Type 340 Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March-Hugstetten*) angeschlossen, der Intubationserfolg so gesichert und die Atemkurve unter Aufzeichnung des endexpiratorischen CO₂ (exCO₂) in dem Programm LabChart (*ADInstruments, New South Wales, Australien*) dargestellt. Anhand des exCO₂ erfolgt eine Feinabstimmung der Ventilation mit einem Zielwert von 20-35mmHg exCO₂.

Nach erfolgreicher Intubation und Beginn der Ventilation wird das Versuchstier in Bauchlage auf eine Heizplatte (*Heating Pad, FHC, Bowdoin, ME, USA*) gesetzt und ein damit verbundenes rektales Thermometer eingeführt. Mittels einer Rückkopplung zwischen dem Thermometer und dem Heizfeld wird die Körperkerntemperatur des Versuchstiers konstant bei 37,0 ± 0,5°C gehalten.

Um ein Austrocknen von Augen und Mundbereich zu verhindern, werden diese mit einer Augencreme (*Bepanthen®, Bayer Vital, Leverkusen*) bedeckt.

Im nächsten Schritt wird der Kopf der Maus in einer stereotaktischen Halterung (*Model 921-E Mouse Head Holder, Kopf Instruments, Tujunga, USA*) mittels einer Gaumenklemme fixiert, um bei den anschließenden Bohrarbeiten kein Vibrationstrauma durch den Bohraufschlag zu verursachen. Nach Rasur der Kopfbehaarung entlang der Schädelmittellinie erfolgt ein Hautschnitt von Stirn bis Nacken. Nach sorgfältiger Eröffnung der darunterliegenden Faszien wird links und rechts der obere Ansatz des jeweiligen Musculus temporalis mit einer kleinen Inzision vom Schädel abgetrennt und der restliche Muskel sanft mit einer Pinzette vom Schädel gelöst. Am rechten parietookzipitalen-temporalen Übergang erfolgt anschließend eine Bohrlochtrepanation zur Anlage der ICP-Sonde (*CODMAN MICROSENSOR® ICP Transducer, CODMAN ICP Express, Integra LifeSciences, New Jersey, USA; zum Zeitpunkt der Experimente vertrieben durch Johnson & Johnson Medical Limited, Berkshire, UK*), welche nach Kalibrierung mittels Zahnzement (*SPEIKO Carboxylatzement, SPEIKO-Dr. Speier GmbH, Münster*) fixiert wird. Bei einem Anstieg des ICPs über 7 mmHg muss davon ausgegangen werden, dass durch das Legen der Sonde ein Trauma verursacht wurde, dessen Schaden das nachfolgende Experiment durch reaktive Veränderungen des Gehirngewebes beeinflussen könnte. In diesem Fall wird das Experiment vorzeitig terminiert.

Nach Aushärten des Zements der ICP-Sonde wird in der zuvor geschaffenen Muskeltasche des linken M. temporalis die LDF-Sonde (*Straight Microtip, PeriFlux System 5000, PERIMED Instruments GmbH, Rommerskirchen*) angebracht. Hierbei ist darauf zu achten, die Sonde im Bereich der A. cerebri media bei einem ausreichend hohem Ausgangswert anzubringen, um später den Abfall der Durchblutung exakt zu verfolgen.

Nach Anbringen der Sonden wird die Maus aus der stereotaktischen Halterung ausgespannt und in Rückenlage gedreht. Nach Rasur des Brustbereiches erfolgt ein Hautschnitt von Kinn bis zum Oberrand des Sternums. Unter vorsichtigem Beiseiteschieben des darunterliegenden Drüsengewebes wird die in der Tiefe liegende A. carotis communis mit ihrer Gabelung in A. carotis interna und A. carotis externa und die A. thyroidea dargestellt. Als nächstes erfolgt die Abbindung der A. thyroidea superior und möglichst hoch der A. carotis externa. Zur späteren Fixierung des Perforationsfilaments wird ein Fixierungsfaden locker um den Abgang der A. carotis externa aus der A. carotis communis geschlungen. Zum blutlosen Einführen des Filaments wird im nächsten Schritt die A. carotis communis und die A. carotis interna mit Clips kurzzeitig verschlossen. Nun wird zügig mittels einer Gefäßschere eine kleine Öffnung unterhalb der Ligation der A. carotis externa geschaffen, das Perforationsfilament (*Prolene 5-0, RB-1, Ethicon, Norderstedt*) entgegen der eigentlichen Flussrichtung des Bluts eingeführt, mit dem bereits vorbereiteten Fixierungsfaden fixiert und dabei das Gefäß um das Filament herum abgebunden. Anschließend werden die zuvor gesetzten Clips wieder entfernt und die Durchblutung der A. carotis communis und interna wiederhergestellt. Das Perforationsfilament ragt nun von der A. carotis externa in die A. carotis communis. Zur Induktion der SAB wird das Filament von der A. carotis communis in die A. carotis interna umgeschwenkt und zügig weiter vorgeschoben, bis ein plötzlicher Anstieg des ICPs verzeichnet wird. Dies markiert die anatomisch bedingte Perforation des Circulus Willisii am Abgang der A. cerebri media (Abb. 11). Nach Anstieg des ICPs wird das Filament wieder bis in den Bereich der A. carotis communis zurückgezogen. Bei einem Anstieg des ICPs über einen Wert von 60 mmHg kann die SAB-Induktion als erfolgreich angesehen werden. Sollte dieser Wert nicht überschritten werden, muss das Filament erneut vorgeschoben werden, bis es zu einem weiteren ICP-Anstieg kommt. Nach Überschreiten der 60 mmHg Grenze wird das Filament aus dem Gefäßsystem entfernt und der Abgang der A. carotis externa mit dem Fixierungsfaden komplett abgebunden, um Blutungen aus dem Einführungsloch zu verhindern. Im Falle einer Sham-Operation wird das Filament ebenfalls bis in die A. carotis interna umgeschwenkt und unter Sicht eine geringe Strecke vorgeschoben, jedoch vor Perforation des Circulus willisii wieder zurückgezogen und entfernt. Das Gewebe oberhalb der Gefäße wird wieder vorsichtig an seinen alten Platz zurückgezogen, der Hautschnitt mit Einzelknopf-Nähten verschlossen und die Überwachung des Versuchstieres für 15 Minuten fortgesetzt. Nach Beendigung der Überwachungszeit werden die LDF- und ICP-Sonde entfernt und der Kopfschnitt mit Punktnähten verschlossen.

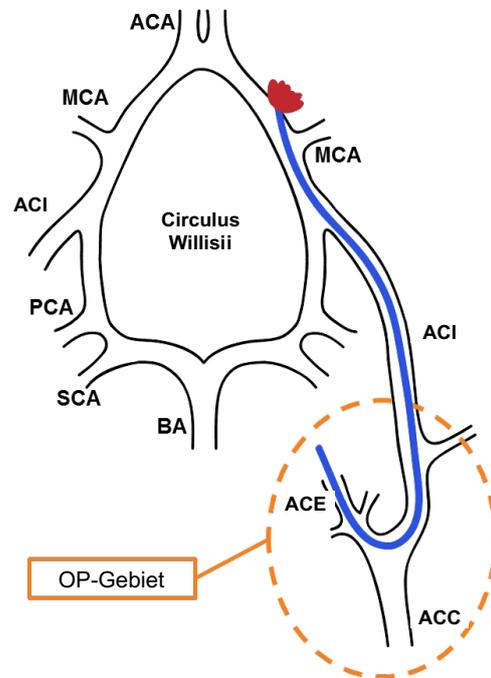


Abbildung 11: Schematische Darstellung der endovaskulären Perforation am Abgang der A. cerebri media (MCA). ACC: A. carotis communis, ACE: A. carotis externa, ACI: A. carotis. Interna, ACA: A. cerebri anterior, PCA: A. cerebri posterior, SCA: A. cerebelli superior, BA: A. basilaris. Übersetzt und abgewandelt nach Bühler, Dominik et al. "Protocol for the induction of subarachnoid hemorrhage in mice by perforation of the Circle of Willis with an endovascular filament." *Translational stroke research* vol. 5,6 (2014): 653-9

Je nach Art des Versuches wird die Maus anschließend entweder unter Aufrechterhaltung der Narkose perfundiert, um Gewebeproben zu gewinnen oder die Narkose für anschließende

Imaging- oder Überlebensversuche antagonisiert. Für Letzteres werden der Maus intraperitoneal Atipamezol (2,5 mg/kg; *Laboratorios SYVA, Leon, Spain*), Flumazenil (0,5 mg/kg; *Synthon BV, Nijmegen, Netherlands*) und Naloxon (1,2 mg/kg; *B.Braun Melsungen AG, Melsungen*) gespritzt. Sobald das Versuchstier anschließend erwacht, wird es von Tubus und Rektalthermometer befreit und in einen Wärmeinkubator (*MediHeat Veterinary Recovery Chamber, Peco Services Ltd, Cumbria, UK*; Temperatur 28°C, Luftfeuchtigkeit 30%) gesetzt.

Bei Überlebensversuchen werden die Versuchstiere während der ersten 24 Stunden nach Auslösen der SAB im Wärmeinkubator überwacht. Wasser sowie angeweichtes Trockenfutter werden ad libitum zur Verfügung gestellt. Alle 8h wird den Tieren 0,1 mg/kg Buprenorphin (*Temgesic®, Reckitt Benckiser, Berkshire, UK*) zur Analgesie intraperitoneal gespritzt. Im Anschluss werden die Tiere in Standardkäfigen gehalten.

2.1.3 Invasive Blutdruckmessung

Als Grundlage des Gefäßkatheters wird ein Feintubusschlauch verwendet (Außendurchmesser: 0,61 mm; Innendurchmesser: 0,28 mm. *Fine Bore Polythene Tubing, Smiths Medical International Ltd., Keene, USA*), der über einer Flamme erhitzt und zur Verdünnung manuell ausgezogen wird. Die A. femoralis wird kanüliert, der Katheter eingebracht und mittels einer Ligatur (*Braided Suture Non-Steril, 7/0, Pearsalls Limited, Taunton, UK*) und Gewebe-Kleber (vetbond, 3TM Animal care products, St. Paul, MN, USA) fixiert. Das andere Ende des Katheters wird an einen zuvor mit einem Manometer (*Delta-Cal™ Pressure transducer simulator/tester, ADInstruments, New South Wales, Australien*) geeichten Drucktransducer (*Deltran® Disposable Pressure Transducer, Utah Medical shield, Utah, USA*) angeschlossen. Unter kontinuierlicher Spülung mit 0,9% NaCl -Lösung über einen Perfusor (Volumenflussgeschwindigkeit 0,4ml/h; *Perfusor segura, B.Braun Melsungen AG, Melsungen*) werden die arteriellen Blutdruckwerte gemessen.

2.1.4 Monitoring und Auswertung der Vitalparameter

Die kontinuierliche Aufzeichnung der Vitalparameter erfolgt über das Programm LabChart (*ADInstruments Pty Ltd, New South Wales, Australia*). Aufgezeichnet werden Körperkerntemperatur, pCO₂, exCO₂, Atemfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck, intrakranieller Druck und zerebrale Durchblutung. Zur Auswertung der Vitalparameter wird das Programm LabChart Vierer (*ADInstruments Pty Ltd, New South Wales, Australia*) verwendet. Für die Darstellung des Verlaufs von intrakraniell Druck und zerebraler Durchblutung während und nach Induktion der Subarachnoidalblutung werden ICP- und CBF-Werte jeweils über eine Minute gemittelt. Während der Therapiephase mit Infusion von Testsubstanz oder Vehikel werden zur Darstellung von mittlerem arteriellem Blutdruck (MAP) und zerebraler Durchblutung die MAP- und CBF-Werte jeweils über einen zehn-minütigen Abschnitt gemittelt.

2.1.5 Beurteilung der neurologischen Defizite bei Überlebensversuchen

Im Rahmen von Überlebensversuchen wird alle 24h ein Neuro-Score zur Verlaufsevaluation erhoben (Abb. 12). Dieser Score setzt sich aus den Kategorien *Allgemeines Verhalten, Hirnnervenstatus, Motorik, Koordination* und dem *Bederson-Score* zusammen und beurteilt die

durch die SAB ausgelöste zentrale Beeinträchtigung der Tiere (Minimalwert = 0 Punkte, Maximalwert = 31 Punkte; ein höherer Punktwert entspricht einer stärkeren neurologischen Beeinträchtigung). Bei einem intern festgelegten Punktwert oder niedriger wurden die Tiere aus ethischen Gründen terminiert.

2.1.6 Perfusionsfixierung

Sämtliche Perfusionen erfolgen unter Narkose der Versuchstiere mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl nach oben beschriebenen Procedere.

Für einen gleichmäßigen Perfusionsdruck wird der Perfusor *Perfusion One System, Leica Biosystems, Wetzlar* verwendet. Mittels einer Handpumpe kann bei diesem Perfusor ein konstanter Druck eingestellt, sowie mit bis zu vier verschiedenen Lösungen hintereinander mit selbigem konstantem Druck perfundiert werden. Gruppeninterne Vorversuche ergaben bei dieser Maschine einen optimalen Perfusionsdruck von 125 mmHg.²⁵¹

Für die Perfusion wird das Versuchstier zunächst mittels 4,5% Isofluran (*Isofluran CP 1 ml/ml, CP-Pharma, Burgdorf*) betäubt. Anschließend erfolgt die gewichtsabhängige intraperitoneale Injektion von 0,2 - 0,4 ml der oben beschriebenen Dreifach-Narkose aus Fentanyl, Midazolam und Medetomidin. Nach Erlöschen der Schutzreflexe wird das Tier in Rückenlage fixiert. Im nächsten Schritt erfolgt ein Hautschnitt kaudal des unteren Rippenbogens mit Eröffnung des Peritoneums. Unter leichtem Anhaben des Sternums erfolgt die Eröffnung des Brustkorbs von der Bauchhöhle aus mit je einem Schnitt nach kranial durch ventrolaterale Durchtrennung der Rippen. Anschließend wird das Zwerchfell vom Brustkorb abgesetzt. Für einen optimalen Zugang zur Brusthöhle wird das Xiphoid mit einer Greifklammer leicht nach oben gezogen, wodurch das Herz optimal zur Darstellung kommt. Die Perfusionsnadel wird über die Herzspitze in die linke Herzkammer des Tieres eingebracht und mit einer Klemme fixiert. Im letzten Schritt wird die Leber mehrfach eingeschnitten, um den Perfusionskreislauf zu eröffnen. Der Perfusor wird gestartet und das Versuchstier wird mit auf 4°C temperierter 0,9% physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung, *isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B. Braun, Melsungen*) perfundiert. Bei Versuchstieren mit anschließender Gefäßisolation nach unten beschriebenem Protokoll erfolgt anschließend zur Darstellung der nun blutleeren Gefäße die Perfusion mit einprozentiger, auf 4°C gekühlter Evans Blue - Lösung (*Evans Blue, E2129, Sigma Aldrich, München*) mit unmittelbar anschließender mechanischer Gefäßisolation (siehe Kapitel 2.2). Bei Versuchstieren ohne anschließendem Gefäßisolutionsprotokoll wird das Gehirn nach Perfusion mit 0,9% NaCl-Lösung entnommen und bei -80°C eingelagert.

1. Allgemeines Verhalten		
Aufmerksamkeit	Normales Suchverhalten	= 0 Punkte
	Wach, aber passive	= 1 Punkt
	Keine Spontanbewegung (komatös)	= 2 Punkte
2. Hirnnervenzustand		
Bewegung der Barthaare	Vorhanden	= 0 Punkte
	Nicht vorhanden	= 1 Punkt
Gehör	Vorhanden	= 0 Punkte
	Ohr Bewegungen	= 1 Punkt
	Nicht vorhanden	= 2 Punkte
3. Motorik		
Vorderbeine: Linksbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
Vorderbeine: Rechtsbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
Hinterbeine: Linksbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
Hinterbeine: Rechtsbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
4. Koordination		
Balkengang 3 cm		= 0,4 Punkte
Balkengang 1,5 cm		= 0,4 Punkte
Balkengang 1 cm		= 0,4 Punkte
Kriterien: 0 Punkte: normal Bewegung/ kein Ausfall		
1 Punkt: falsche Platzierung des Fußes / un stabile Bewegungen		
2 Punkte: bleibt sitzen / bleibt auf dem Balken stehen		
3 Punkte: fällt nach einigen Schritten vom Balken		
4 Punkte: fällt direkt vom Balken ohne weitere Bewegung		
Bodengreiftest: Beide Vorderpfoten berühren den Boden, wenn die Maus am Schwanz hochgehoben wird	Möglich	= 0 Punkte
	Nicht möglich	= 1 Punkt
5. Neuroscore (Bederson)		
	Keine Verschlechterung	= 0 Punkte
	Krümmung der Vorderpfoten	= 1 Punkt
	Reduzierter Widerstand von links	= 2 Punkte
	Zirkelt beim ziehen am Schwanz	= 3 Punkte
	Spontanes zirkeln	= 4 Punkte
	Keine spontane Bewegung	= 5 Punkte
Totale Punktzahl		0-31 Punkte

Abbildung 12: Neuroscore für Überlebensversuche. Anhand von fünf Kategorien wird ein neurologisches Assessment vor und im 24h-Takt nach SAB-/Sham-Operation durchgeführt.

2.2 Etablierung der Gefäß-Isolation

Ziel der Gefäß-Isolation ist die Gewinnung von unterschiedlichen Gewebefractionen, um diese separat untersuchen zu können: Die dem Kortex oberflächlich aufliegenden pialen Gefäße, die intraparenchymalen Gefäße (beginnend ab der Penetration der pialen Gefäße in den Kortex) sowie gefäßfreies Kortexparenchym. Hierzu wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei vorbeschriebene Isolationsmethoden^{246,247} kombiniert und ein Protokoll mit einer Kombination aus mechanischen und chemischen Isolationsvorgängen etabliert (Abb. 13).

Im ersten Schritt werden die pialen Gefäße isoliert. Diese Isolation erfolgt in Anlehnung an das Protokoll nach Bowyer et al.²⁴⁶ Das Versuchstier wird nach dem unter 2.1.6 beschriebenen Protokoll mit auf 4°C temperierter 0,9% physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung, *isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B. Braun, Melsungen*) perfundiert. Zur Darstellung der dann blutleeren Gefäße wird im Anschluss mit einprozentiger, auf 4°C gekühlter Evans Blue - Lösung (*Evans Blue, E2129, Sigma Aldrich, München*) perfundiert. Nach Abschluss der Perfusion wird das Gehirn entnommen und für 9 Minuten in 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Alle weiteren Schritte werden auf Eis und unter einem Auflichtmikroskop durchgeführt. Das Gehirn wird in eine mit 4°C kalter NaCl-Lösung gefüllte Petrischale transferiert und mit dünnen Nadeln über den Bulbus olfactorius und das Kleinhirn fixiert. Der Circulus arteriosus willisi wird mit Pinzetten durchtrennt. Von der Gehirnbasis beginnend werden Dura mater und Arachnoidea zusammen mit den pialen Gefäßen abgehoben und in Kochsalzlösung (4°C) gesammelt. Die Gefäße werden bei 4°C für 10 Minuten bei 7000 Umdrehungen abzentrifugiert, der NaCl-Überstand abpipettiert und das übrigbleibende Gewebekonvolut (Pellet), das die Gefäße enthält, mittels Trockeneis schockgefroren und anschließend bei – 80°C gelagert.

Nach Entfernen der gesamten pialen Gefäße wird das Gehirn entlang der Fissura longitudinalis cerebri mit einem Skalpell in beide Hemisphären geteilt. Mit Gewebescheren wird der Kortex beider Hemisphären vom Marklager getrennt und auf Trockeneis für die weitere Isolation eingefroren und bei – 80°C gelagert.

Im zweiten Schritt werden in Anlehnung an Zellner et. al.²⁴⁷ aus dem gewonnenen Kortexparenchym die intrakortikalen Gefäße isoliert. Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt. Der gefrorene Kortex wird in eine Petrischale gegeben und mit 1 ml Minimum Essential Medium (*MEM 1X w/o L-Glut, Gibco™, life technologies, Darmstadt*) angetaut. Anschließend wird er mit dem Skalpell in maximal 5 x 5 mm messende Stücke zerkleinert. Die Kortex-Präparate und das MEM werden in einen Gewebehomogenisator (*Gewebehomogenisatoren Typ Potter-Ei-vehjem, 10ml, 432-0202/-0208, VWR, Darmstadt*) transferiert und unter Zugabe von weiteren 9 ml MEM homogenisiert. Im nächsten Schritt wird eine Ficoll-Dichtezentrifugation durchgeführt, um das Myelin von den restlichen Gewebekomponenten abzutrennen. Hierfür wird das Homogenisat mit weiteren 5 ml MEM in ein Zentrifugationsröhrchen (*Falcon 50 ml, VWR International GmbH, Darmstadt*) überführt und mit 15 ml 30%iger Ficoll-in-MEM-Lösung (*Ficoll® 400 BioChemica, A2252,0100, PanReac AppliChem ITW Reagents*) vermischt. Im Anschluss erfolgt die Ultrazentrifugation bei 4°C und einer Beschleunigung von 6000 x g für 20 Minuten. Hierbei trennen sich entsprechend des Prinzips der Dichte-Gradienten-Zentrifugation die unterschiedlichen Gewebefractionen. Nach Ultrazentrifugation wird die obenauf schwimmende Myelin-Schicht vorsichtig abpipettiert und der restliche Überstand abgegossen. Im verbleibenden Pellet befinden sich nun die intrakortikalen Gefäße sowie myelinfreies Parenchym. Dieses Pellet wird in 1%iger Rinder-Albumin-Lösung (*Bovine Serum Albumin, BSA, A3912, Sigma*

Aldrich, München) re-suspendiert und in ein Nylon Mikrosieb mit 40 µm großen Poren (*Strainer, Falcon® 40 µm Cell Strainer, 352340, Corning, Kaiserslautern*) gegeben. Entsprechend der Porengröße des Mikrosiebs werden bei dem nachfolgenden Waschgang mit PBS die Gefäße zurückgehalten, während Parenchymzellen in das darunterliegende Reaktionsgefäß (*Falcon 50 ml, VWR International GmbH, Darmstadt*) ausgewaschen werden. Die im Mikrosieb aufgefangenen Gefäße werden in ein separates Reaktionsgefäß (*Falcon 50 ml, VWR International GmbH, Darmstadt*), welches zuvor mit 1% Rinder-Albumin-Lösung benetzt und anschließend zweimalig mit PBS gewaschen wurde, ausgespült. Sowohl das Parenchym-beinhaltende als auch das Gefäße-beinhaltende Falcon-Reaktionsgefäß werden für 5 min bei 4°C und einer Beschleunigung von 3000x g abzentrifugiert. Die so erhaltene Gefäß- und Parenchym-Fraktion werden unter Verwendung einer mit 1% Rinder-Albumin-Lösung benetzten und anschließend zweimalig mit PBS gewaschenen Pipettenspitze in ein für Proteinprobenrückgewinnung optimiertes Mikroreaktionsgefäß (*Protein LoBind® Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg*) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die zuvor mechanisch isolierten pialen Gefäße werden demselben Protokoll unterzogen, um einen möglichen Einfluss des zweiten Isolationsschritts auf Proteinstabilität und-konzentration in den jeweiligen Gefäßproben für die nachfolgenden Analysen über alle Proben konstant zu halten.

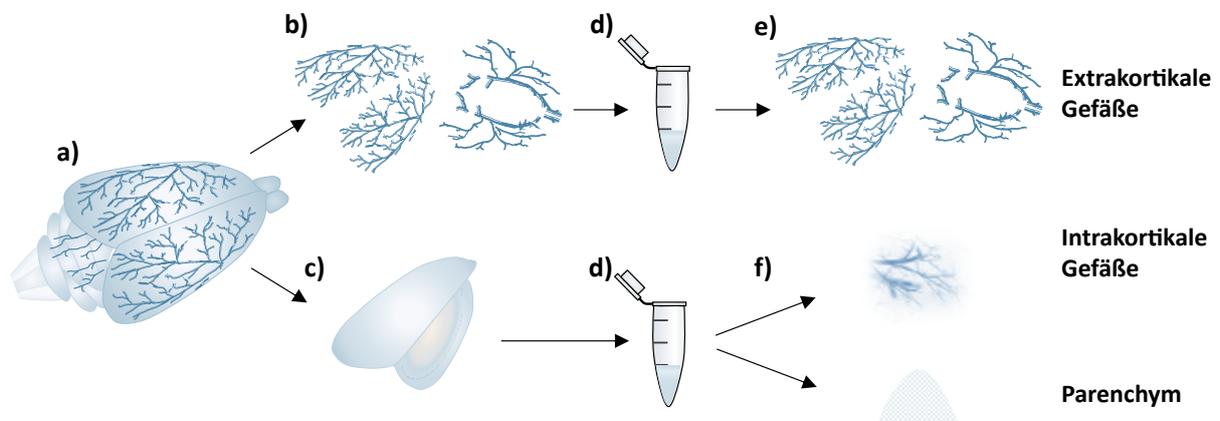


Abbildung 13: Schematische Darstellung der einzelnen Protokollschritte zur Gefäßisolation. Nach Perfusion mit 0,9% NaCl-Lösung und 1% Evans Blue Lösung (a) werden mechanisch die oberflächlichen extrakortikalen Gefäße entfernt (b) und der Kortex isoliert (c). Anschließend werden mittels chemomechanischem Isolationsprotokoll die intrakortikalen Gefäße inklusive Mikrozirkulation aus dem Kortex gewonnen und das verbleibende Parenchym aufgefangen (d, f). Parallel werden die oberflächlichen Gefäße demselben Isolationsprotokoll unterzogen, um eine aufgereinigte piale Gefäßfraktion zu erhalten und mögliche Einflussfaktoren des Isolationsprotokolls auf anschließende Analysen konstant zu halten (d, e). Modifiziert nach <http://jove.com/video/4285>

2.3 Gel-Elektrophorese und Westernblot

2.3.1 Theoretische Grundlagen von Gel-Elektrophorese und Westernblot

Der Westernblot ist seit seiner Entwicklung vor vierzig Jahren noch immer eines der meistverwendeten Verfahren zur Protein-Analyse.²⁵² Grundlage ist eine vorab durchgeführte Gel-Elektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-Page), mittels der eine Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse erzielt wird:²⁵³⁻²⁵⁵

Proteinproben werden mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) versetzt, welches sich an jeweils zwei Aminosäuren anlagert und so die Eigenladung eines Proteins durch die eigene Negativladung überdeckt. Die Abstoßkräfte zwischen diesen Negativladungen führen zusammen mit einer thermischen Denaturierung bei 95°C zu einem

Aufbrechen von Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteinprobe. Die so linear vorliegenden und durch die Anlagerung von SDS negativ geladenen Proteine können nun nach Anlegen einer elektrischen Spannung elektrophoretisch anhand ihrer Kettenlänge aufgetrennt werden. Zur Optimierung der Trennschärfe werden bei der SDS-Page ein Sammelgel und ein Trenngel verwendet. Diese unterscheiden sich hinsichtlich Porengröße, pH und Ionenzusammensetzung. Das Sammelgel soll dabei die aufzutrennenden

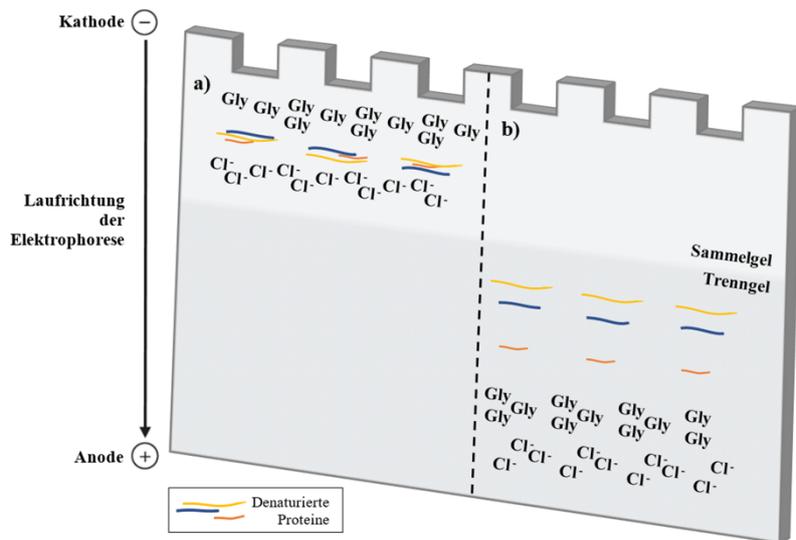


Abbildung 14: Schematische Darstellung der SDS-Page. Nach Anlegen elektrischer Spannung werden im Sammelgel die Proteine durch Chlorid-Ionen (Cl⁻) und Glycin (Gly) gebündelt. Nach Übertritt in das Trenngel mit höherem pH überholt Glycin aufgrund seiner nun ionisierten Form die denaturierten Proteine und diese werden freigegeben. Nun kann die Auftrennung der Proteine anhand der jeweiligen Molekülgröße erfolgen.

Proteine am Übergang in das Trenngel konzentrieren, so dass nach gesammeltem Übertritt in das Trenngel die Auftrennung der Proteine beginnen kann. Dieser Sammeleffekt wird durch Glycin und Chlorid aus den jeweiligen Pufferlösungen vermittelt (Abb. 14). Chlorid wandert aufgrund seiner negativen Ladung und kleinen Größe sehr schnell in Richtung Anode, es wird zum „führenden“ Ion. Glycin liegt bei pH des Sammelgels (pH = 6,8) als Zwitterion vor und wandert entsprechend der fehlenden Ladung langsamer durch das Gel, es ist das „folgende“ Molekül. Zwischen diesen beiden Fronten finden sich die durch SDS negativ geladenen Probenproteine und werden durch diese beiden Fronten gestapelt. Mit Erreichen des Trenngels steigt der pH-Wert (pH = 8,8) an und die Porengröße verringert sich. Glycin liegt aufgrund der pH-Änderung nun als ionisiertes Molekül vor, überholt die Probenproteine und wird zu einem führenden Molekül. Die Probenproteine, gesammelt am Übergang zum Trenngel, werden freigegeben zur elektrophoretischen Auftrennung. Da alle Probenproteine denaturiert linear und durch SDS negativ geladen vorliegen, ist ihre jeweilige Laufgeschwindigkeit von der dem Widerstand des Gels entgegengesetzten Molekülgröße abhängig. Die elektrophoretische Auftrennung der Probenproteine erfolgt somit anhand der Molekülgröße.

Nach Abschluss der Gel-Elektrophorese werden im Westernblot-Verfahren^{256,257} die Proteine durch Anlegen von elektrischer Spannung auf eine Membran übertragen (siehe unten). Die so an der Membran gebundenen Zielproteine können gezielt von gegen sie gerichtete Primärantikörper gebunden werden (Abb. 15). Anschließend wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper zugegeben, der an ein Immunokonjugat, hier Meerretichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP), gekoppelt ist. Zur Quantifizierung verwendet man das Verfahren der Chemolumineszenz: HRP setzt Luminol ($C_8H_7N_3O_2$) in seine oxidierte Form 3-aminophthalate um, welches Licht bei 425 nm emittiert. Dieses Signal kann mit einem lichtempfindlichen Halbleiterelement (charge-coupled device, CCD) aufgezeichnet und dargestellt werden. Da je ein Sekundärantikörper an einen an ein Zielprotein gebundenen Primärantikörper detektiert, kann das so erhaltene Signal mit der vorliegenden Proteinmenge korreliert werden.

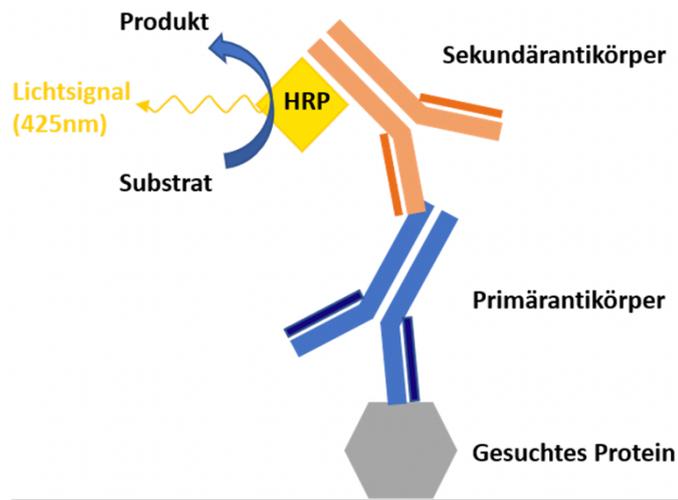


Abbildung 15: Graphische Darstellung des Westernblot-Prinzips. Ein zielgerichteter Primärantikörper bindet an das gesuchte Protein. Ein an HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper richtet sich gegen den Primärantikörper. Die Aktivierung von HRP führt zu einem Chemolumineszenzsignal, welches aufgezeichnet werden kann und eine Quantifizierung des vorhandenen gesuchten Proteins ermöglicht.

2.3.2 Praktische Durchführung von SDS-Page und Westernblot

2.3.2.1 Proteinaufreinigung aus isolierten Gefäßen

Die gefrorenen zuvor isolierten Gefäß- oder Parenchym pellets werden in 100 µl SDT-Puffer (4% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM DTT, Protease-Inhibitor (1 Tablette *cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*), Phosphatase-Inhibitor (1 Tablette *PhosSTOP EASYpack Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*) resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspensionen werden anschließend in Precellys® 0,5 ml Gefäße transferiert (*Precellys® 0.5 mL Soft Tissue Homogenizing (CK14), Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, France*) und mittels des Precellys® Evolution Systems (*Precellys® Evolution, P000062-PEV00-A, Bertin Technologies, Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, France*) in einem festgelegten Zyklus mit 10.000 rpm für 5 x 30 Sekunden, unterbrochen von jeweils 30-sekündigem Pausenintervall, homogenisiert. Im Anschluss werden die Proben für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend zur besseren Durchmischung für fünf Minuten überkopf-rotiert (*Elmi ROTAMIX RM1, 30 rpm, Programm F1*). Die Proben werden in reguläre 1,5 ml Eppendorf-Gefäße (*Eppendorf Safe-lock Tubes, Eppendorf Quality™, Hamburg*) transferiert, Probenreste aus dem Precellys-Gefäß werden mit weiteren 50µl SDT-Puffer ausgewaschen und in das 1,5ml Eppendorf-Gefäß transferiert. Zur Optimierung der Proteinisolation werden die Proben im Kühlraum mittels Ultraschalls für je 5 x 30 Sekunden mit jeweils dazwischen 30-sekündiger Kühlperiode auf Eis weiter ho-

mogenisiert (*VialTweeter UP200St, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow; Geräteeinstellungen: 100% power, 50% cycle*). Nach anschließender 30-minütiger Zentrifugation bei 18.000 x g und 15°C wird der Überstand mit den isolierten Proteinen abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.3.2.2 Vorbereitung der Gelelektrophorese-Proteinprobe

Das vorbereitete Proteinextrakt wird mit 4x Laemmli-Puffer (*4x Laemmli Sample Buffer #1610747, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen*) und 2.5M DTT im Verhältnis 8:3:1 versetzt, für fünf Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

Vorbereitung der Gelelektrophoresegele: Trenn- und Sammelgel werden entsprechend der Zusammensetzung in Tabelle 2 hergestellt, um die jeweils notwendigen unterschiedlichen pH-Werte der beiden Gele zu generieren

	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3 ml	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,02 ml
AcrylamidBis (30%)	4 ml	555 µl
Wasser (Millipore)	4,88 ml	2,94 ml
Ammonium-Persulfat (APS, 10%)	100 µl	45 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl	4,5 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der Gelelektrophorese, Mengenangaben für jeweils zwei Trenn- und zwei Sammelgele

Durchführung der SDS-Page: Das Elektrophoresekambersystem (*Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen*) wird mit den vorbereiteten Gelen zusammengesetzt und mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1% SDS) befüllt. Die Probenaschen werden mit 15 µl SDS-Proteinprobe (Gefäßproben) oder 10 µl SDS-Proteinprobe (Parenchymproben) befüllt, in eine der Taschen werden 6-8 µl Proteinstandard (*Precision Plus Protein™ Standard, Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen*) geladen. Nach Befüllen mit Running-Buffer wird die Gelelektrophorese bei 100 Watt Leistung und konstanter Spannung gestartet.

Westernblot: Zu Beginn wird die hier verwendete Polyvinylidenfluorid-Membran (*Immobilon-PSQ Membran, PVDF, 0,2 µm, Millipore, Darmstadt*) kurz mit 100% Methanol (*Methanol, >99,9%, Blotting Grade, Carl Roth, Karlsruhe*) aktiviert und anschließend mit Whatman-Papier und den Schwämmen für zehn Minuten im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) getränkt. Nach Lagerung im Kühlraum werden die Komponenten des Westernblots zusammengesetzt (Abb. 16): Beginnend von der Kathode werden ein Druckschwamm, Whatman-Papier, das SDS-Page-Gel, die PVDF-Membran, eine weitere Lage Whatman-Papier und ein weiterer Druckschwamm zusammengesetzt, fixiert und mit Kühlakkus in die Blot-Kammer positioniert. Für 90 Minuten wird im Kühlraum bei 100 V Spannung der Transfer durchgeführt. Die Membran wird mit 4% Milch (4% Skim Milk Pulver in TBST) für 1h bei Raumtemperatur (RT) geblockt und über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Art und Konzentration der verwendeten Antikörper listet Tabelle 3 auf. Am nächsten Morgen wird der Primärantikörper entfernt und die Membran für 1h RT mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert.

Waschschritte zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden mit TBST (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) durchgeführt. Die Entwicklung der Membranen erfolgt mit 1 ml Luminollösung (*Immobilon ECL detection reagent, Merck Millipore, Darmstadt*) mit anschließender Detektion des Chemolumineszenzsignals und Darstellung der Proteinbanden durch einen Fusion Fx7 Imager ausgestattet mit einer 4.2/10 Mio. Pixel CCD Kamera (*Peqlab, Erlangen; Software: Fusion imager, Peqlab, Erlangen*). Die Quantifizierung der Proteinbandenintensität erfolgt mittels der Software Image J (*public domain, Open source*).

Die folgenden Antikörperpaare werden jeweils nacheinander auf derselben Membran inkubiert und analysiert: 1) AQP4 und GFAP, 2) MAP-2 und VE-Cadherin, 3) sGC, p-Ser1177-eNOS und eNOS. Aufgrund überlappender Proteinbanden von p-Ser1177-eNOS und eNOS werden Membranen mit dieser Antikörperkombination nach Inkubation und Analyse von sGC und p-Ser1177-eNOS und vor Inkubation und Analyse von eNOS vollständig von allen Primär- und Sekundärantikörpern gereinigt („Stripping“). Hierzu werden sGC/p-Ser1177-inkubierte Membranen für 30 Sekunden mit einem Stripping-Puffer gereinigt (*Roti®-Free Stripping Buffer*

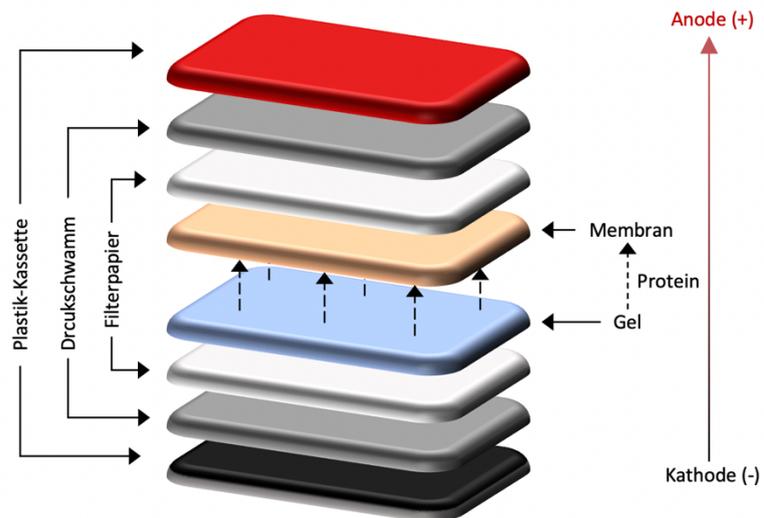


Abbildung 16: Graphischer Aufbau eines Westernblot-Sandwichs. Beginnend von der Kathode werden nacheinander angeordnet: Druckschwamm, Filterpapier (Whatman Papier), SDS-Page-Gel, PVDF-Membran, Filterpapier und Druckschwamm. Der Transfer erfolgt von Kathode zu Anode und entsprechend von SDS-Gel zur PVDF-Membran

2.0 ready-to-use, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und anschließend erneut für 1h bei Raumtemperatur mit 4% Milch geblockt. Der Strippingenerfolg wird durch erneute Inkubation mit dem gegen sGC und p-Ser1177-eNOS gerichteten Anti-Rb-Sekundärantikörper kontrolliert. Nur bei vollständigem Fehlen eines Signals des Sekundärantikörpers wird von einem erfolgreichen Stripping ausgegangen und mit der Inkubation und Analyse von eNOS fortgefahren.

Für die relative Proteinquantifizierung wird jede Membran in einem letzten Schritt mit einem anti- β -Actin-HRP-konjugiertem Antikörper für 20 Minuten bei RT inkubiert und analysiert. β -Actin zählt zu den sogenannten „Housekeeping“ Proteinen. Hiermit werden Proteine bezeichnet, die unabhängig von Zell- oder Gewebetyp eine ubiquitäre Expression zeigen und somit als Normalisierungsreferenz für die in einer Probe jeweils enthaltene Proteinkonzentration verwendet werden. Zur Berechnung der relativen Proteinkonzentration eines jeden Zielproteins innerhalb einer Probe wird die jeweilige Bandenintensität des Zielproteins zur Bandenintensität des Housekeeping-Proteins β -Actin normalisiert und somit als relative Proteinkonzentration angegeben. Ausgenommen hiervon ist p-Ser1177-eNOS, dessen Bandenintensität zur eNOS-Bandenintensität derselben Probe normalisiert wird, um den relativen Anteil an p-Ser1177-aktivierter eNOS zu bestimmen.

Primärantikörper	Firma	Produkt-Nr.	Gattung	Verdünnung	Sekundärantikörper
MAP-2(AP20)	Santa Cruz	sc-32791	Maus	1:2.000	HRP GT Anti-Ms
PDGFRβ	R+D Systems	AF1042	Ziege	1:200	HRP Ms Anti-Gt
VE-Cadherin	Abcam	ab33168	Kaninchen	1:500	HRP GT Anti-Rb
GFAP	Sigma	3893	Maus	1:750	HRP GT Anti-Ms
AQP 4	Millipore	AB2218	Kaninchen	1:1.000	HRP GT Anti-Rb
sGC β1	Cayman Chem	160897	Kaninchen	1:200	HRP GT Anti-Rb
eNOS	Abcam	Ab76198	Maus	1:200	HRP GT Anti-Ms
p-Ser1177-eNOS	Thermo Fischer	PA5-17917	Kaninchen	1:200	HRP GT Anti-Rb
HRP-β-Actin	Sigma	A3854	Maus	1:30.000	-
Sekundärantikörper	Firma	Produkt-Nr.	Gattung	Verdünnung	
HRP Goat anti-Mouse	Cell Signaling Technology	7076	Ziege	1: 7500	
HRP Mouse anti-Goat			Maus	1:7500	
HRP Goat anti-Rabbit	Thermo Fischer	31464	Ziege	1:7500	

Tabelle 2: Übersicht der für die Westernblots verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

2.4 Intravitalmikroskopie

2.4.1 Technischer Hintergrund

Die intravitale Mikroskopie ist eine der derzeit wichtigsten biomedizinischen Verfahren zur in vivo Darstellung von Gewebestrukturen sowie funktioneller Zusammenhänge in biologischen Systemen und Tiermodellen.^{258,259} Dabei hat sich innerhalb der Intravitalmikroskopie insbesondere die Multiphotonenmikroskopie aufgrund ihrer zahlenreichen Vorteile gegenüber der herkömmlichen Konfokalmikroskopie zunehmend etabliert.²⁶⁰⁻²⁶²

Grundlage der Intravitalmikroskopie ist die Generierung eines Fluoreszenzsignals durch Absorption von Photonen.²⁵⁹⁻²⁶² Dabei trifft ausgesandtes Licht auf ein Fluoreszenzmolekül und führt zu einer kurzzeitigen Anhebung eines Elektrons auf ein höheres Energieniveau, vorausgesetzt, das ausgesandte Photon besitzt die hierfür notwendige und vom jeweiligen Zielmolekül abhängige Energie.^{261,263,264} Wenn das so erregte Elektron wieder in seinen Ursprungszustand zurückfällt, kann es zum Aussenden eines Photons kommen.^{259,261,264} Dieses ausgesandte Photon ist von geringerer Energie und damit längerer Wellenlänge als das zur Anregung absorbierte Photon (*Stokes Shift*).²⁵⁹ Die Detektion dieser Photonen erlaubt die bildliche Darstellung der angeregten Zielstrukturen.

Zur Erzeugung dieser Fluoreszenz werden lineare von nicht-linearen optischen Verfahren unterschieden. Bei den linearen optischen Verfahren, wie der Konfokalmikroskopie, wird ein Photon zur Erzeugung der Fluoreszenz verwendet, entsprechend ist das erzeugte Signal linear abhängig von der verwendeten Lichtintensität.²⁶⁰ Bei den nicht-linearen Verfahren werden zwei oder mehr Photonen verwendet, das generierte Signal verhält sich damit supralinear zur Photonendichte und damit zur Lichtintensität (vgl. Jablonski-Diagramm, Abb. 17).²⁶⁰

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Darstellung intraparenchymaler Gefäße von maßgeblicher Bedeutung. Um diese darstellen zu können, wird eine entsprechende Eindringtiefe benötigt (deep tissue imaging). Die Konfokalmikroskopie ist hierfür ungeeignet,^{260,265} sie eignet sich insbesondere zur Darstellung von Zellen oder dünnem Gewebe.²⁵⁹ Dies liegt an der zunehmend auftretenden Streuung sowie Absorption mit steigender Eindringtiefe ins Gewebe.^{260,264} Da bei der Konfokalmikroskopie ein einzelnes Photon ausreicht, um ein Elektron des Fluoreszenzmoleküls anzuregen, kommt es auch über- und unterhalb des Fokuspunkts zu Anregung von Fluoreszenzmolekülen und somit Signalerzeugung (Abb. 18a).²⁶⁰ Um die damit erzeugte Unschärfe zu reduzieren, werden bei der Konfokalmikroskopie Lochblenden benutzt, die dieses außerhalb des Fokuspunkts generierte Signal herauszufiltern.²⁶³ Hierdurch werden jedoch auch Photonen, die aus dem Fokuspunkt entstammen aber durch Streuung abgelenkt werden, herausgefiltert, es kommt zur Signalreduktion.²⁵⁹

Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie (2PM) müssen zwei Photonen nahezu zeitgleich, innerhalb einer Attosekunde²⁵⁹ (10^{-18} s), auf dasselbe Molekül treffen, um ein Fluoreszenzmolekül anregen zu können. Entsprechend wird eine hohe Photonendichte benötigt,²⁶⁰ welche durch sogenannte gepulste Laser erreicht wird.^{259-261,264} Diese Laser senden kurze Pulse im Femtosekunden-Bereich²⁶⁴ mit hoher Frequenz aus, sodass bei insgesamt geringer Durchschnittsenergie hohe Spitzen-Intensitäten mit hohen Photonendichten erreicht werden können.^{259,264} Dabei entsteht nur im Fokuspunkt ein ausreichend hoher Photonenfluss, außerhalb des Fokuspunkts nimmt der Photonenfluss zum Quadrat des Abstands zum Fokuspunkt ab und reicht zur Fluoreszenz-Erzeugung nicht mehr aus.^{258,261} Das erzeugte Fluoreszenzsignal beschränkt

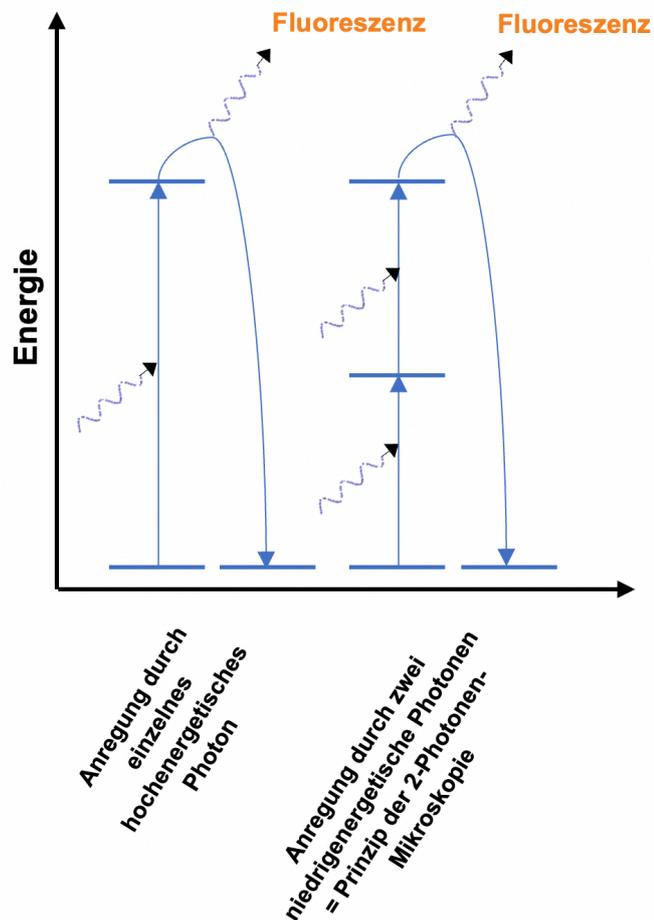


Abbildung 17: Jablonski-Diagramm. Grundlage der Multiphotonenmikroskopie. Zur Anregung auf dasselbe Energieniveau können statt eines einzelnen hochenergetischen Photons auch zwei simultan auftretende niedrigenergetische Photonen dienen, um Fluoreszenz bei der erneuten Freisetzung der so gewonnenen Energie zu erzeugen.

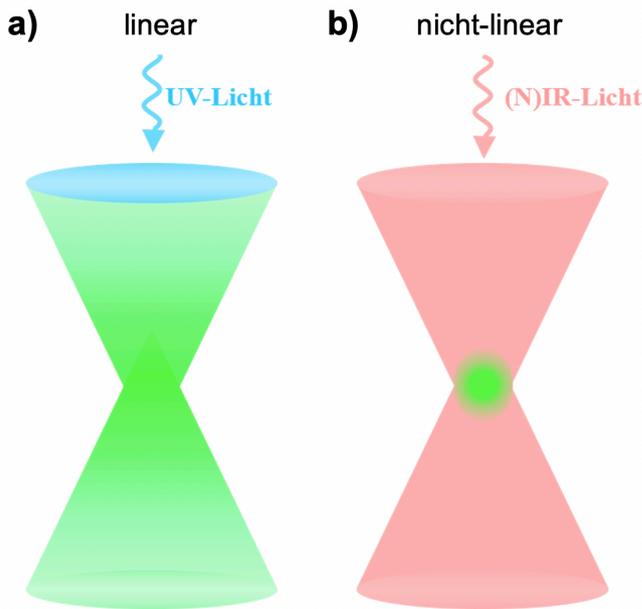


Abbildung 18: Darstellung der durch lineare und nicht-lineare Methoden erzeugten Fluoreszenz. a) Bei linearen Methoden besitzt jedes Photon ausreichend Energie zur Signalerzeugung, es wird auch oberhalb und unterhalb des Fokuspunkt ein Fluoreszenzsignal generiert. b) Bei nicht-linearen Verfahren, wie der Zwei-Photonenmikroskopie, reicht der Photonenfluss nur im Zentrum aus, um ein Fluoreszenzsignal zu generieren. Es kommt zur lokalen Bündelung des Fluoreszenzsignal im Fokuspunkt.

NIR-Licht einer geringeren Streuung^{258-260,263,264} und wird geringer von Gewebe absorbiert.^{258,259,264} Da im NIR-Wellenlängenbereich Wasser nahezu der einzige intrinsische Absorber im Gewebe ist, spricht man auch vom „Optischen Fenster“,²⁶⁰⁻²⁶² in dem es aufgrund der geringen Absorption zu einer höheren Eindringtiefe und gleichzeitig geringerer Phototoxizität im Gewebe kommt.²⁶⁴

Die Zweiphotonenmikroskopie erlaubt also aufgrund höherer Eindringtiefe, geringerer Phototoxizität und fokussierter Fluoreszenzerzeugung die hochauflösende bildliche Darstellung auch von tieferliegendem vitalem Gewebe bei gleichzeitig geringerer Phototoxizität.^{260,261,264}

2.4.2 Praktische Durchführung der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die Tiere werden 120 Minuten vor Mikroskopie-Beginn wie oben beschrieben narkotisiert. Alternativ wird die Intravitalmikroskopie unmittelbar nach SAB-Induktion unter Aufrechterhaltung der bereits laufenden Narkose durchgeführt. Alle Tiere sind während der Intravitalmikroskopie narkotisiert, analgisiert, intubiert und mechanisch ventiliert. Weiterhin wird mittels Rektalsonde sowie Heizfeld wie oben beschrieben eine konstante Körperkerntemperatur zwischen $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ aufrechterhalten.

2.4.2.1 Vorbereitende Prozeduren: Fensterpräparation, Durchblutungsmessung, Injektionskatheter

Zunächst werden jedem Tier ein Katheter in die Arteria und Vena femoralis (Außendurchmesser: 0,61 mm; Innendurchmesser: 0,28 mm. *Fine Bore Polythene Tubing, Smiths Medical International Ltd., Keene, USA*) gelegt. Über den arteriellen Katheter wird wie oben beschrieben

sich somit auf ein kleines fokales Volumen im Fokuspunkt (Abb. 18b).²⁵⁸⁻²⁶³ Entsprechend bedarf es im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie keiner Lochblenden zum Filtern einer außerhalb des Fokuspunkts erzeugten Fluoreszenz, es können im Gegenteil auch durch Streuung abgelenkte Photonen zur Bildgenerierung beitragen, da diese aus dem Fokuspunkt entspringen müssen.^{259,263} Zudem wird durch das kleine Exzitationsvolumen das Ausmaß an Phototoxizität deutlich reduziert.^{260,261,264}

Ein weiterer Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie liegt in der Verwendung von Licht im Nahe-Infrarot-Bereich (NIR). Im Gegensatz zu dem bei der Konfokalmikroskopie verwendeten kurzwelligeren Ultraviolett-Licht unterliegt das längerwellige

der MAP kontinuierlich gemessen, über den venösen Katheter erfolgt die spätere Gabe von Fluoreszenzfarbstoff sowie der Testsubstanzen.

Zur Darstellung der pialen und intraparenchymalen Gefäße mittels Zweiphotonenmikroskopie

muss zunächst der Schädelknochen über dem gewünschten Areal mittels Kraniektomie entfernt werden (Abb. 19). Die Intravitalmikroskopie wird über dem zur Gefäßperforation ipsilateralen A. cerebri media (MCA) Stromgebiet durchgeführt (Abb. 20). Zur Untersuchung dieses Gebiets wird der Schädel des narkotisierten Versuchstiers in der stereotaktischen Halterung fixiert. Es erfolgt ein Hautschnitt von nuchal entlang der Sutura sagittalis bis zur Sutura coronaria. Die Haut wird an beiden Seiten nach lateral aufgeklappt und darunter liegende Faszien mit Pinzetten vorsichtig durchtrennt. Um ein Austrocknen des Gewebes und Hitzebildung durch den Bohrvorgang zu verhindern, wird die gesamte Fläche kontinuierlich mit 0,9% NaCl-Flüssigkeit bedeckt gehalten. Anschließend wird mit einem Präzisions-Bohrer (*Rewatronik Products, Wald Michelbach*) und einem Diamant-Bohrkopf (*Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0.6 mm, Aesculap, Tuttlingen*) unter kontinuierlicher Spülung mit Kochsalzlösung zwei Millimeter lateral der Sutura sagittalis eine circa 5x5mm messende Kraniektomie durchgeführt. Der so geschaffene Knochendeckel wird vorsichtig mit einer Pinzette vom umliegenden Schädel gelöst und entfernt. Das darunter liegende Hirnparenchym wird unverzüglich mit 0,9% NaCl-Lösung bedeckt und kontinuierlich feucht gehalten.

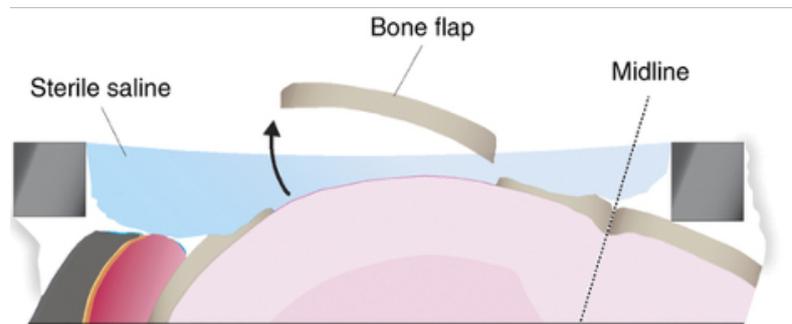


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Knochensfensters. Über dem Versorgungsgebiet der MCA seitlich der Mittellinie (midline) wird mittels Kraniektomie ein Knochendeckel („Bone flap“) entfernt und der freigelegte Bereich großzügig mit steriler NaCl-Lösung (sterile saline) bedeckt gehalten.

Es erfolgt ein Hautschnitt von nuchal entlang der Sutura sagittalis bis zur Sutura coronaria. Die Haut wird an beiden Seiten nach lateral aufgeklappt und darunter liegende Faszien mit Pinzetten vorsichtig durchtrennt. Um ein Austrocknen des Gewebes und Hitzebildung durch den Bohrvorgang zu verhindern, wird die gesamte Fläche kontinuierlich mit 0,9% NaCl-Flüssigkeit bedeckt gehalten.

Anschließend wird mit einem Präzisions-Bohrer (*Rewatronik Products, Wald Michelbach*) und einem Diamant-Bohrkopf (*Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0.6 mm, Aesculap, Tuttlingen*) unter kontinuierlicher Spülung mit Kochsalzlösung zwei Millimeter lateral der Sutura sagittalis eine circa 5x5mm messende Kraniektomie durchgeführt. Der so geschaffene Knochendeckel wird vorsichtig mit einer

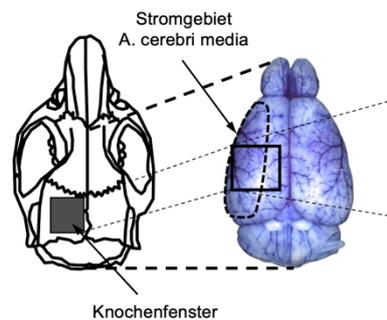


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Lokalisation sowie in-vivo-Aufnahme eines Knochensfensters über dem Versorgungsgebiet der MCA. Schematische Darstellung links abgewandelt von Friedrich, B., Müller, F., Feiler, S., Schöller, K. & Plesnila, N. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J Cereb Blood Flow Metabolism Official J Int Soc Cereb Blood Flow Metabolism* 32, 447–55 (2011).

Pinzette vom umliegenden Schädel gelöst und entfernt. Das darunter liegende Hirnparenchym wird unverzüglich mit 0,9% NaCl-Lösung bedeckt und kontinuierlich feucht gehalten.

Zur Überwachung der zerebralen Durchblutung während der Mikroskopie erfolgt nach durchgeführter Kraniektomie die Anlage eine LDF-Sonde wie oben beschrieben. Zu beachten ist hierbei, dass die Anlage der LDF-Sonde ipsilateral zum kranialen Fenster erfolgt, um die Durchblutungsdaten mit den Bilddaten des untersuchten Areals korrelieren zu können.

2.4.2.2 Erhebung der Bilddaten

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie wird an einem *LSM 7MP Axio Examiner*-Multiphotonenmikroskop (*Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen*) mit einem *W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC*-Objektiv (*Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen*) durchgeführt. Um ein ausreichendes Flüssigkeitsreservoir über dem kranialen Fenster zu schaffen, wird die Haut des Versuchstiers über beiden Schädelhälften mittels Hochnaht angehoben, und der so entstandene Raum mit 0,9% physiologischer Kochsalz-Lösung gefüllt. Anschließend wird das Versuchstier unter Beibehaltung des Operationssettings unter das 2PM-Mikroskop transferiert. Über den venösen Femoraliskatheter wird direkt vor Aufzeichnung 0,1 ml 0,5% Fluoreszeinisothiocyanate-(FITC)-Dextran (0,5% in NaCl-Lösung; *FITC, Merck, Darmstadt*) als Fluoreszenzfarbstoff verabreicht. Das Exzitationsmaximum von FITC-Dextran liegt bei 492 nm, das Emissionsmaximum bei 518 nm. Es erfolgt das manuelle Aufsuchen und Einstellen des gewünschten Hirnareals. Es werden 4 aneinandergrenzende Einzelbildblöcke (im Format 2x2) von je 300 μm Tiefe, 400 μm Kantenlänge und 3 μm Schichtabstand pro Einzelblockbild akquiriert (Gesamtmessdauer für vier Bildblöcke circa acht Minuten).

2.4.3 Bildanalyse

Alle Bilder werden mit der *Zen 2.3 SP1 Black Software* (*Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Jena*) ausgewertet. Mittels Softwarerendering werden die vier Einzelbildblöcke für die Auswertung zu einem Gesamtbildblock (2x2) mit circa 300 μm Tiefe, 800 μm Gesamtkantenlänge und 3 μm Schichtabstand zusammengefügt (Abb. 21).

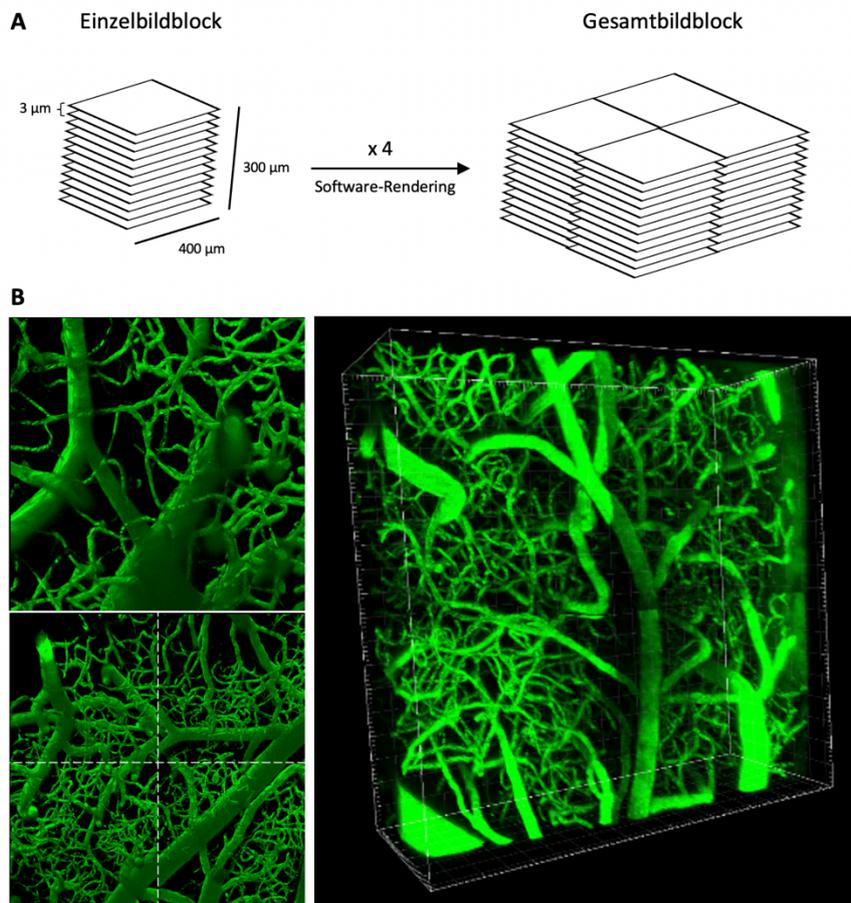


Abbildung 21: Darstellung der generierten 2PM-Aufnahmen. A) Schematische Darstellung eines Einzelbildblocks sowie der mittels Software-Rending generierten Gesamtbildblöcke. B) Darstellung einer 2-Photonen-Mikroskop-Aufnahme eines Einzelbildblocks (links oben), einer Frontalaufnahme eines 2x2 Gesamtbildblocks nach Bildrendering (links unten), sowie 3D-Darstellung eines 2x2-Gesamtbildblocks nach Bildrendering (rechts).

Anschließend werden alle Gefäße eines so entstandenen Gesamtbildblocks auf vorhandene Vasospasmen untersucht sowie der mittlere Durchmesser der Gefäße an nicht spastischen Gefäßabschnitten bestimmt (Abb. 22).

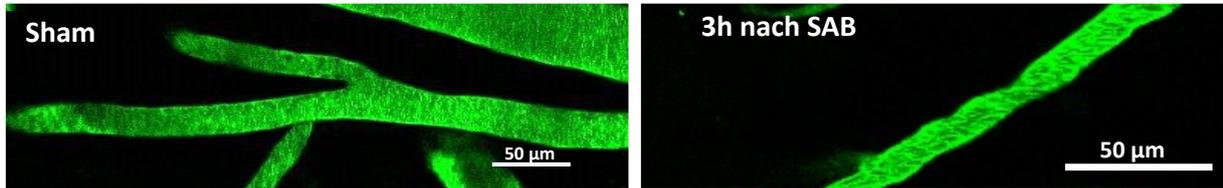


Abbildung 22: Beispielhafte 2-Photonen-Mikroskopie-Aufnahmen eines intraparenchymalen Gefäßes im MCA-Stromgebiet drei Stunden nach Shamoperation (links) sowie drei Stunden nach SAB-Induktion (rechts). Während sich nach Sham-Operation die Gefäße glatt bewandert und bildmorphologisch ohne pathologische Veränderungen darstellen, zeigen die Gefäße drei Stunden nach SAB-Induktion bereits typische perlschnurartige pathologische Konstriktionen.

Als Spasmus wird jede punktuelle Gefäßverengung mit einer Verringerung des Gefäßdurchmessers auf unter 90% des Durchmessers des restlichen Gefäßes definiert. Zur Bestimmung des Baseline-Gefäßdurchmessers erfolgt unmittelbar vor und nach einer Engstelle eine Messung des Durchmessers, der Mittelwert beider Messungen wird als Normwert für den Durchmesser des jeweiligen Gefäßes festgelegt. Anschließend wird der Gefäßdurchmesser an der engsten Stelle des Spasmus bestimmt und prozentual zum zuvor ermittelten mittleren Gefäßdurchmesser berechnet (Abb. 23).

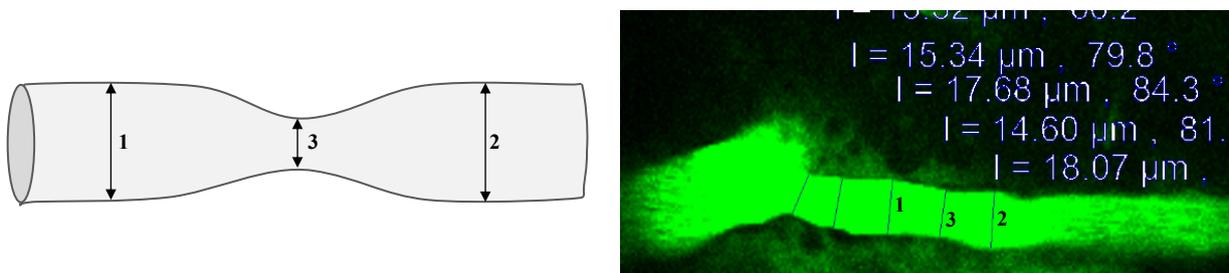


Abbildung 23: Beispielhafte Gefäßauswertung einer 2-Photonen-Mikroskopieaufnahme drei Stunden nach SAB-Induktion. Als Baseline-Durchmesser eines Gefäßes werden vor und nach einer optisch verengten Stelle die Durchmesser ausgemessen und deren Mittelwert bestimmt (hier 1 und 2). Dann wird der Durchmesser der verengten Stelle bestimmt (hier 3) und ins Verhältnis zum aus 1 und 2 bestimmten Mittelwert gesetzt.

Mittels der so berechneten prozentualen Einengung wird der jeweilige Spasmus anhand des verbleibenden Gefäßdurchmessers in folgende Schweregrade kategorisiert (aufsteigend von stärkster zu geringster Ausprägung): „< 10%“, „10 – 20%“, „20 – 30%“, „30 – 40%“, „40 – 50%“, „50 – 60%“, „60 – 70%“, „70 – 80%“ und „80 – 90%“ des mittleren Gefäßdurchmessers. Weiterhin werden die Gefäße und ihre Spasmen in eine piale und eine intraparenchymale Gruppe eingeteilt. Hierfür werden optisch die oberflächlichen dem Kortex aufliegenden pialen Gefäße verfolgt, bis sie ihren Verlauf ändern und das Parenchym nahezu senkrecht penetrieren. Alle nach der Penetrationsstelle abgehenden Gefäße werden als intraparenchymale Gefäße definiert. Auf diese Weise werden alle Gefäße eines jeden Gesamtbildblocks ausgewertet.

2.5 Testsubstanzen

2.5.1 sGC-Aktivator Bay 60-2770

Der sGC-Agonist Bay 60-2770 zählt zu den oben beschriebenen NO- und Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren (für Strukturformel siehe Abb. 24). Er zeichnet sich durch eine zehnfach höhere Wirkungsaktivität gegenüber Bay 58-2667 aus und ist somit ein hochpotenter sGC-Agonist.²⁴⁰ Experimentell wird Bay 60-2770 bereits seit vielen Jahren in einer Vielzahl an Pathologien getestet, darunter Herz-Kreislauf-Erkrankungen,²⁶⁶⁻²⁷⁰ pulmonale arterielle Hypertension,²⁷¹ Asthma bronchiale,²⁷² Leberfibrose,^{273,274} Sichelzellanämie,²⁷⁵ erektile Dysfunktion²⁷⁶⁻²⁷⁸ und dem Overactive-Bladder-Syndrom.²⁷⁹⁻²⁸¹

Drei Eigenschaften machen die Substanz für die vorliegende Studie besonders interessant: Bay 60-2770 zeigt die in der Wirkstoffgruppe zu erwartende vasodilatative Wirkung,^{270,271} insbesondere auch im Zusammenhang mit der Hämoglobin-vermitteltem NO-Inaktivierung.²⁸² Weiterhin zeigt Bay 60-2770 eine erhaltene bis sogar gesteigerte Wirkfunktion unter oxidativen Stress-Bedingungen^{266,276,279,283-285} und führt über Aktivierung der in Thrombozyten lokalisierten sGC zu einer Inhibition der Plättchenaggregation und -adhäsion.²⁸³ Sowohl NO-Scavenging, oxidativer Stress als auch Mikrothrombenbildung spielen im Rahmen der Early Brain Injury eine bedeutende Rolle (vgl. Kapitel 1.4 und 1.5).

Zusätzlich scheint Bay 60-2770 einen positiven Effekt auf postischämische Inflammation und Mitochondrienpathologie zu haben^{267,286} und über eine Stabilisierung der sGC-Expression und Hemmung der sGC-Untereinheiten-Degradation den sGC-cGMP-Signalweg zu stabilisieren.^{279,281}

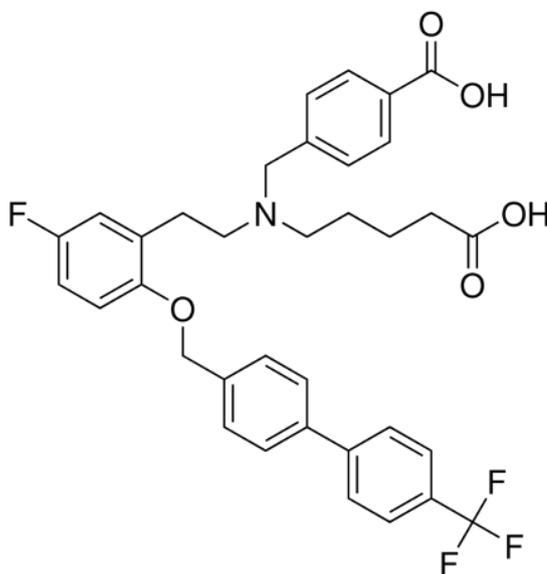


Abbildung 24: Strukturformel von Bay 60-2770:
 $C_{35}H_{33}F_4NO_5$; 4-[(4-Carboxy-butyl)-{2-[5-fluoro-2-(4'-trifluoromethyl-biphenyl-4-ylmethoxy)-phenyl]-ethyl}-amino)-methyl]-benzoic acid);
Molekulargewicht: 623,63 g/mol.

2.5.2 sGC-Stimulator Bay 41-2272

Bay 41-2272 gehört zur Wirkstoffklasse der sGC-Stimulatoren und ist somit ein NO-unabhängiger, Häm-abhängiger Agonist der sGC (für Strukturformel siehe Abb. 25). Auch Bay 41-2272 wurde bereits experimentell in einer Vielzahl von Pathologien getestet, darunter kardiovaskuläre Erkrankungen,^{269,287} pulmonale arterielle Hypertension,²⁸⁸ Asthma bronchiale,²⁷² chronisch obstruktive Lungenerkrankung,^{289,290} Lungenfibrose,²⁹¹ Sichelzellanämie,²⁷⁵ erektile Dysfunktion,²⁹² benigne Prostatahyperplasie²⁹³ und ebenfalls Overactive Bladder Syndrome.²⁸⁰ Dabei

zeigt auch Bay 41-2272 wiederholt die erwartete und gewünschte vasodilatative Wirkung^{287,288,294} und scheint ferner über Suppression von Leukozyten- und insbesondere T-Lymphozytenfunktion antiinflammatorisch zu wirken.^{275,295} Im Gegensatz zum sGC-Aktivator Bay 60-2770 verliert Bay 41-2272 entsprechend seiner Wirkstoffklasse seine Funktion in der Umgebung von oxidativem Stress.^{268,269,293,294} Bay 41-2272 führt außerdem über eine Inhibition der Phosphodiesterase 5 (PDE5) zu einer Steigerung der cGMP-Konzentration,²⁹⁶ auch wenn dieser Effekt im Vergleich zur sGC-Stimulation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.²⁹⁷

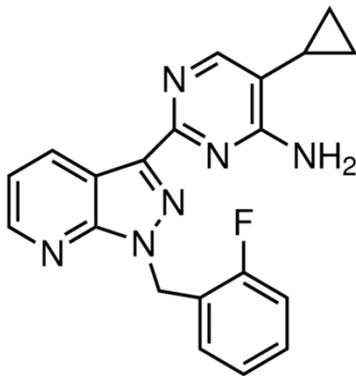


Abbildung 25: Strukturformel von Bay 41-2272:
 $C_{20}H_{17}FN_6$; 3-(4-Amino-5-cyclopropylpyrimidin-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine;
 Molekulargewicht 360,39 g/mol.

2.5.3 Aufbereiten der Testsubstanzen

Die Testsubstanzen Bay 60-2770 sowie Bay 41-2272 werden in Polyethylenglycol (PEG, *Bio Ultra*, 88440, *Sigma Aldrich*, München) und Ethanol 100% (*EtOH*, *Ethanol absolut zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Merck*, Darmstadt) gelöst. Zunächst wird eine Stammlösung hergestellt, von der ausgehend die jeweiligen Zielkonzentrationen hergestellt werden können. Für die Bay 60-2770-Stammlösung werden 10 mg Bay 60-2770 (in Pulverform vorliegend) in einer Mischung aus 10 ml reinem PEG und 10 ml 100% Ethanol gelöst und im Ultraschallbad bei 35°C komplett in Suspension gebracht. Die Bay 60-2770-Konzentration dieser Stammlösung beträgt $c_{\text{Bay 60-2770 Stammlösung}} = 0,5 \text{ mg/ml}$. Für die Bay 41-2272-Stammlösung werden 30 mg Bay 41-2272 (in Pulverform vorliegend) in einer Mischung aus 10 ml reinem PEG und 10 ml 100% Ethanol gelöst und im Ultraschallbad bei 35°C komplett in Suspension gebracht. Die Bay 41-2272-Konzentration dieser Stammlösung beträgt $c_{\text{Bay 41-2272 Stammlösung}} = 1,5 \text{ mg/ml}$. Um die PEG und Ethanol-Konzentration zu senken, um unerwünschte Störfaktoren zu vermeiden (u.a. Wirkung von PEG auf Gefäßpermeabilität und -durchmesser)^{298,299}, erfolgt die weitere Dilution bis zur jeweiligen Zieldosis mit Phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, *PBS*, *Sigma Aldrich*, München).

In den Experimenten wird ein Infusionsvolumen von 50 µl verwendet. Die Zieldosis für Bay 60-2770 beträgt 10 µg/kg Körpergewicht (siehe 2.5.4. Dosisfindung). Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 g pro Versuchstier müssen somit in den verwendeten 50 µl Infusionsvolumen insgesamt 0,25 µg Bay 60-2770 enthalten sein. Dies entspricht einer Konzentration von 5 µg/ml. Entsprechend muss 1 ml der Stammlösung ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$) mit 99 ml PBS verdünnt werden.

Für die Bay 41-2272-Versuche werden als Zieldosen die Konzentration 10 µg/kg KG, 50 µg/kg KG und 300 µg/kg KG definiert. Diese sollen im selben Versuchstier schrittweise durch kumulative Gabe von drei aufeinanderfolgenden Infusionen erreicht werden. Entsprechend werden Infusionslösungen mit den Verabreichungskonzentration 10 µg/kg KG, 40 µg/kg KG und 250 µg/kg KG benötigt. Bei einem Infusionsvolumen von 50 µl müssen somit Verdünnungen von 1:300, 1:75 und 1:12 aus der Stammlösung (c = 1,5 mg/ml) hergestellt werden (Tabelle 1).

	Δ Zielkonzentration	Infusionsvolumen	Körpergewicht (KG)	Benötigte Infusionskonzentration	Konzentration Stammlösung	Verdünnungsfaktor	Verdünnung
10 µg/kg KG	10 µg/kg KG	50 µl	25 g	5 µg/ml	1,5 mg/ml	1:300	1 ml Stammlösung in 299 ml PBS
50 µg/kg KG	40 µg/kg KG	50 µl	25 g	20 µg/ml	1,5 mg/ml	1:75	1 ml Stammlösung in 74 ml PBS
300 µg/kg KG	250 µg/kg KG	50 µl	25 g	125 µg/ml	1,5 mg/ml	1:12	1 ml Stammlösung in 11 ml PBS

***Tabelle 3:** Kumulative Zielkonzentrationen der Bay 41-2272-Versuchsreihe. Hiervon ausgehend werden die nötigen Verdünnungen der Stammlösung berechnet.*

Für die Vehikel-Lösungen wird jeweils analog eine Stammlösung bestehend aus einer Mischung aus 10 ml reinem PEG und 10 ml 100% Ethanol hergestellt, jedoch ohne Zusatz einer Testsubstanz. Diese Stammlösung wird identisch zum Verdünnungsprotokoll der jeweiligen Testsubstanz-Konzentrationslösung mit PBS verdünnt.

2.5.4 Dosisfindung

Zur Ermittlung der Wirkdosis wurden unterschiedliche Dosierungen der Testsubstanzen in steigenden Konzentrationen getestet und hinsichtlich ihrer Wirkung auf die zerebrale Durchblutung (Abb. 26) sowie auf den systemischen mittleren arteriellen Blutdruck untersucht (Abb. 27).

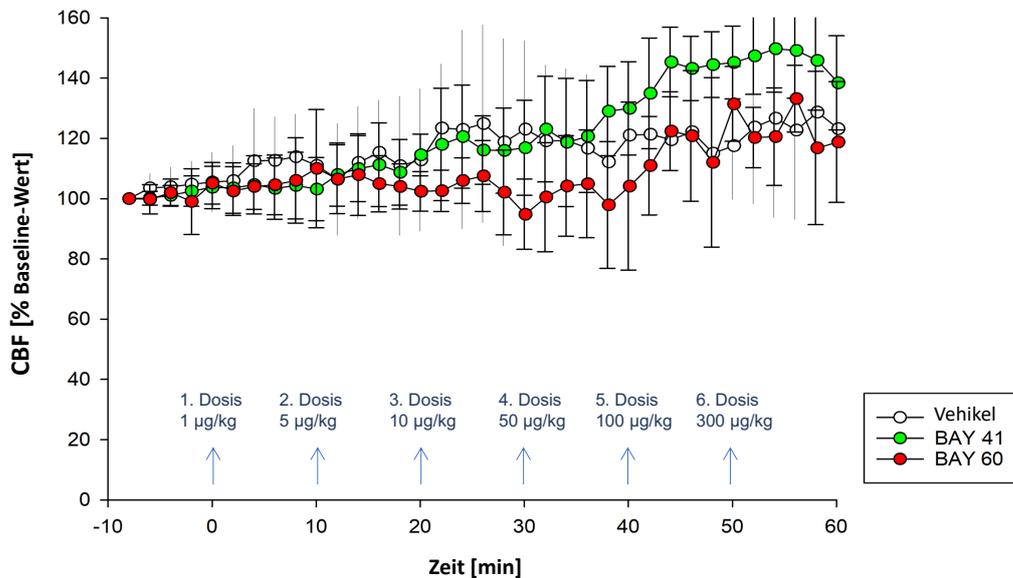


Abbildung 26: Zerebrale Durchblutung (CBF) von gesunden Tieren unter steigenden Dosen von Bay 60-2770 (BAY 60), Bay 41-2272 (BAY 41) sowie Vehikel. In gesunden Tieren mit unbeeinträchtigter physiologischer zerebraler Durchblutung zeigt sich ein leichter Anstieg des CBF-Signals erst ab einer kumulativen Zieldosis von 100µg/kg BAY 60 oder BAY 41, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Diese Daten wurden freundlicherweise von Burcu Seker zur Verfügung gestellt.

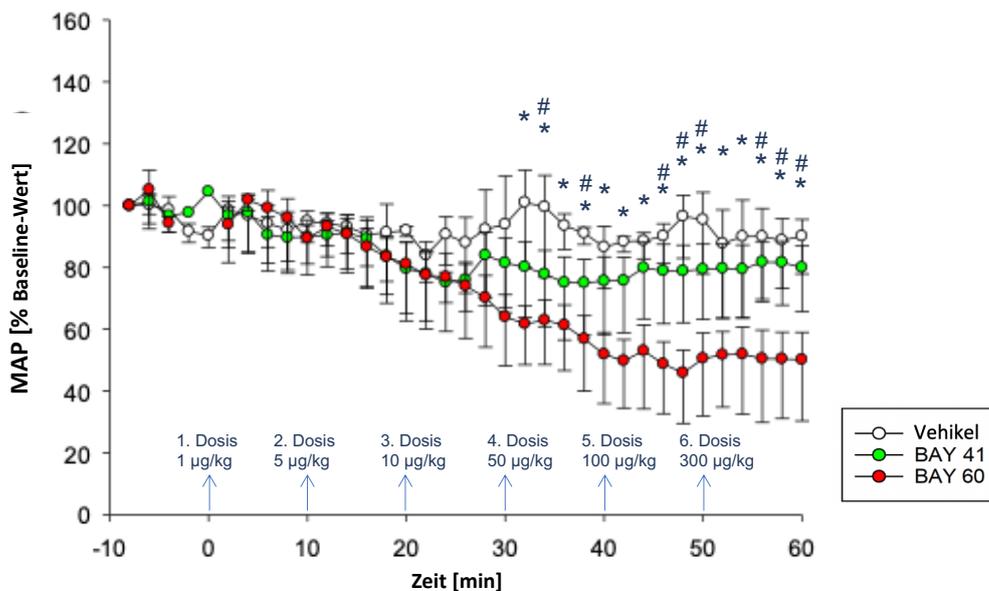


Abbildung 27: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von gesunden Tieren unter steigenden Dosen von Bay 60-2770 (BAY 60), Bay 41-2272 (BAY 41) sowie Vehikel. Bis zu einer kumulativen Zieldosis von 10 µg/kg BAY 60 zeigt sich kein signifikanter Abfall des MAP gegenüber einer Vehikel-Infusion (grüner Kasten). Aber einer kumulativen Zieldosis von 50 µg/kg BAY 60 zeigt sich ein signifikanter Abfall des MAP gegenüber Vehikel-behandelten sowie BAY 41 behandelten Tieren. Auch unter einer kumulativen Zieldosis von 300 µg/kg BAY 41 zeigt sich kein signifikanter MAP Abfall gegenüber Vehikel behandelten Tieren. *:#: $p < 0,05$; *: BAY 60 vs. Vehikel; #: BAY 60 vs. BAY 41.

Diese Daten wurden freundlicherweise von Burcu Seker zur Verfügung gestellt.

Aufgrund dieser Dosisfindungsversuche wurde für diese Arbeit für Bay 60-2770 eine Zieldosis von 10 µg/kg, für Bay 41-2272 die Zieldosen 10 µg/kg, 50 µg/kg und 300 µg/kg definiert: Unter diesen Dosen zeigen gesunde Versuchstiere jeweils keine systemischen Nebenwirkungen im Sinne eines Abfalls des mittleren arteriellen Blutdrucks, während die zerebrale Durchblutung stabil gehalten wird. Ähnlich zu den oben beschriebenen Versuchen mit inhalativem Stickstoffmonoxid soll mit beiden Versuchsstoffen, bei fehlender systemischer Nebenwirkung im Sinne eines MAP Abfalls, vorrangig eine Vasodilatation in pathologischen Gefäßstromgebieten induziert werden, aufgrund des hier vermuteten vermehrten Vorliegens von Häm-freier oder oxidiertes sGC nach SAB.

2.5.5 Applikation der Testsubstanzen

Die intravenöse Infusion von je 50 µl der Testsubstanzen oder des Vehikels erfolgt mittels einer Präzisions-Mikroinjektionspumpe (*Two-Syringe Microdialysis Pump, SP101IZ, World Precision Instruments, Sarasota, USA*) über 30 Minuten mit einer Volumenflussgeschwindigkeit von 1,67 µl/min. Zur Infusion wurde vorab die linke V. femoralis mit einem heparinisierten Katheter (Außendurchmesser: 0,61 mm; Innendurchmesser: 0,28 mm. *Fine Bore Polythene Tubing, Smiths Medical International Ltd., Keene, USA*) kanüliert.

2.6 Versuchsreihen

2.6.1 Validierung des Gefäßisolation-Protokolls

Zur Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben werden fünf naive Tiere dem Protokoll unterzogen. Die so gewonnen Proben werden mittels Westernblot hinsichtlich neuronaler, endothelialer, astrozytärer und perizytärer Marker untersucht. Hierfür werden Antikörper gegen MAP2-(Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) als neuronaler, gegen VE-(Vaskulär-endotheliales)-Cadherin als endothelialer, gegen AQP4 (Aquaporin 4) und GFAP (Saures Gliafaserprotein, engl. Glial Fibrillary Acidic Protein) als astrozytäre und gegen PDGFRβ (Platelet-derived Growth Factor Rezeptor β) als perizytärer Marker verwendet.

2.6.2 Standardisierungsreihe SAB-Induktion

Zur Gewährleistung von Reproduzierbarkeit sowie interner Validität wurde vor Versuchsbeginn eine Standardisierungsreihe zur Induktion einer SAB durchgeführt. Hierfür wurde bei 8 Tieren in Folge eine SAB ausgelöst und der Verlauf von ICP und LDF für 15 Minuten überwacht. Wie oben beschrieben gilt eine SAB als erfolgreich ausgelöst, wenn der ICP auf mindestens 60 mmHg ansteigt und der LDF Wert auf unter 20% des vorab gemessenen Ausgangswerts abfällt. Dabei darf der Ausgangswert des ICP nach Legen der ICP Sonde einen Wert von 7 mmHg nicht übersteigen. Erst nach erfolgreicher Standardisierung wird mit den nachfolgenden Tierversuchsreihen begonnen.

2.6.3 Charakterisierung von Enzymregulationen des eNOS-NO-sGC-Signalwegs nach SAB

Zur Untersuchung von Veränderungen des eNOS-NO-sGC-Signalwegs innerhalb der zerebralen Mikrozirkulation während der Early Brain Injury Phase nach SAB werden fünf Versuchsgruppen (Gruppengröße jeweils n = 5 Versuchstiere) festgelegt (Abb. 28): Als Referenzgruppe zur Bestimmung der physiologischen Ausgangswerte der in den Gefäßproben enthaltenden Proteine wird eine Gruppe naiver Tiere untersucht. Um den Einfluss von Narkose und Operation zu beurteilen, eine weitere Gruppe sechs Stunden nach Sham-Operation; zudem wird die zerebrale Mikrozirkulation in einer Gruppe jeweils 3, 24 und 72 Stunden nach SAB-Induktion untersucht. Alle Versuchstiergruppen werden dem Gefäßisoliations-Protokoll unterzogen. Mittels Westernblot wird die Proteinexpression von eNOS und sGC in der isolierten intrakortikalen Mikrozirkulation gegenüber den großen pialen Gefäßen untersucht. Zur Charakterisierung der eNOS-Aktivität wird der Anteil an Ser1177-phosphoryliertem eNOS (aktiviertes eNOS) an Gesamt-eNOS in den jeweiligen Gefäßproben bestimmt.

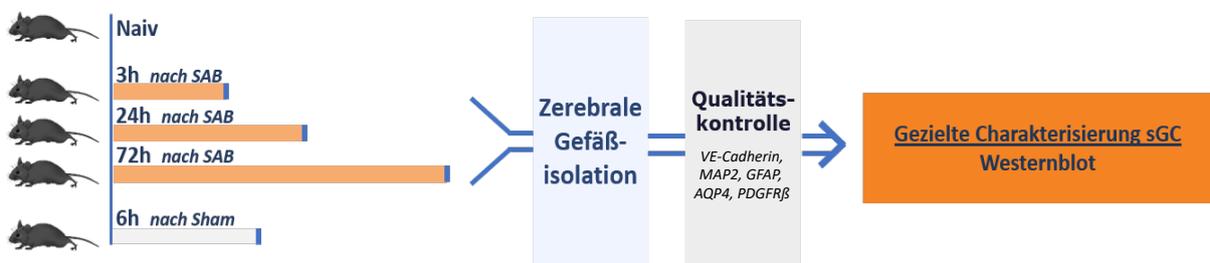


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Versuchsreihe zur Charakterisierung von endothelialen Enzymregulationen nach SAB. Zu den gegebenen Zeitpunkten werden Gefäß- sowie Parenchymproben isoliert und anschließend mittels Westernblot hinsichtlich der gewünschten Enzymkonzentrationen untersucht. Der Vergleich der jeweiligen Enzymkonzentration über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg erlaubt einen Rückschluss auf dessen Up- oder Down-Regulation nach SAB in den verschiedenen Gewebeproben. Gruppengröße jeweils n=5.

2.6.4 Randomisierung und Verblindung der Bay 60-2770 und Bay 41-2272 Versuche

Alle nachfolgend beschriebenen Versuchstierreihen wurden randomisiert und für den Untersucher verblindet durchgeführt. Die Zuführung der einzelnen Versuchstiere zu Sham- oder SAB-Operation erfolgte intraoperativ per Los erst unmittelbar vor Perforation des Circulus Willisii oder Zurückziehen des Filaments. Für jede Versuchsreihe wurden die jeweiligen Testsubstanzen und Vehikel von einer unabhängigen und weder an Durchführung noch Auswertung der Experimente beteiligten Person zufällig per Los einer aufsteigenden Zahlenfolge zugeordnet. Die Verabreichung der Infusion sowie die Auswertung der Bilddaten erfolgte somit ohne Kenntnis der Zugehörigkeit zur Testsubstanz- oder Vehikel-behandelten Versuchstiergruppe, ausschließlich unter Verwendung der verblindeten Versuchstiernummer. Die Kodierungsliste einer jeden Versuchsreihe wurde bis Abschluss sämtlicher Experimente und Auswertungen verschlossen aufbewahrt. Erst nach Auswertung aller Daten erfolgte die Entschlüsselung der einzelnen Versuchstiere mit Zuordnung in die mit Testsubstanz und mit Vehikel behandelte Versuchstiergruppe.

2.6.5 Akut-Versuche Bay 60-2770 3h nach SAB – In-vivo Quantifizierung der Mikrozirkulation mittels Zweiphotonen-Mikroskopie

Zur Untersuchung des Einflusses von Bay 60-2770 auf die frühe Mikrozirkulationsstörung nach SAB wird eine Versuchsreihe mit einer Versuchstierzahl $n = 24$ konzipiert (Abb. 29). Zwanzig Versuchstiere werden einer SAB-Operation unterzogen und erhalten drei Stunden nach SAB-Induktion verblindet eine intravenöse Infusion über eine Zeitdauer von 30 Minuten mit entweder Bay 60-2770 (Infusionsvolumen 50 μ l, Zieldosis 10 μ g/kg KG) oder Vehikel (Infusionsvolumen 50 μ l). Weitere fünf Tiere erhalten eine Sham-Operation und drei Stunden nach Sham-Operation eine intravenöse Infusion über 30 Minuten mit Bay 60-2770 (Infusionsvolumen 50 μ l, Zieldosis 10 μ g/kg KG).

Da sich bereits drei Stunden nach Induktion einer SAB mittels Fadenperforation deutliche Vasospasmen in der Mikrozirkulation zeigen,³ wird hier die Mikrozirkulation zu diesem Zeitpunkt in vivo mittels Zweiphotonen-Mikroskopie untersucht. Hierfür werden die Tiere 2,5 Stunden nach Auslösung der SAB erneut narkotisiert und intubiert.

Insgesamt werden zu acht Zeitpunkten (3 Stunden/180 Minuten bis 4h10m/250 Minuten nach SAB) Bildaufnahmen mit je 2 x 2 aneinandergrenzen Bildblöcken im Abstand von jeweils zehn Minuten akquiriert. Zum Zeitpunkt 20 und 10 Minuten vor Beginn der Infusion werden Ausgangs-Aufnahmen ($t = -20$ min, $t = -10$ min) erstellt, die zur Quantifizierung der Gefäßdurchmesser und Spasmenanzahl vor Infusion dienen. Nach diesen beiden Aufnahmen wird die verblindete Infusion von Testsubstanz oder Vehikel begonnen, unter Infusion werden drei Aufnahmen im Abstand von jeweils zehn Minuten angefertigt ($t = 0$ min, $t = 10$ min, $t = 20$ min). Zur Untersuchung eines möglichen andauernden oder erst verzögert auftretenden Effekts werden weitere drei Bildaufnahmen nach Abschluss der Infusion erstellt ($t = 30$ min, $t = 40$ min, $t = 50$ min). Nach Abschluss des Beobachtungszeitraums wird das Versuchstier wie oben beschrieben perfundiert und das Experiment beendet.

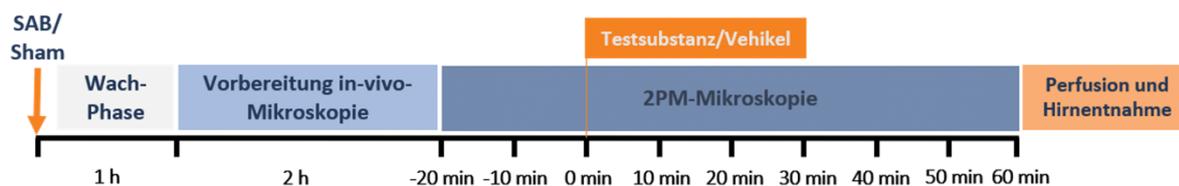


Abbildung 29: Zeitlicher Versuchsablauf der Akutversuche mit verblindeter Gabe von Bay 60-2770/Vehikel drei Stunden nach SAB (2-Photonen-Mikroskopie). Mittels 2-Photonen-Mikroskopie wird die Wirkung von Bay 60-2770 auf frühe Vasospasmen der Mikrozirkulation nach SAB evaluiert.

2.6.6 Akut-Versuche Bay 60-2770 3h nach SAB – Quantifizierung der Hirndurchblutung

Zur genaueren Untersuchung der zerebralen Durchblutung nach Gabe von Bay 60-2770 wird eine zweite Versuchsreihe mit $n = 18$ Versuchstieren durchgeführt (Abb. 30). Die Tiere werden randomisiert einer SAB ($n = 14$) oder Schein-Operation ($n = 4$) unterzogen und erhalten drei Stunden nach SAB-Induktion verblindet eine Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel. Drei Stunden nach SAB erfolgt die MAP- und CBF-Messung über 80 Minuten. Die Werte für Blut-

druck und Hirndurchblutung werden analog zu den Imaging-Versuchen alle 10 Minuten zu einem Wert gemittelt. Nach Abschluss des Experiments erfolgt die Perfusion und anschließende Hirnentnahme.

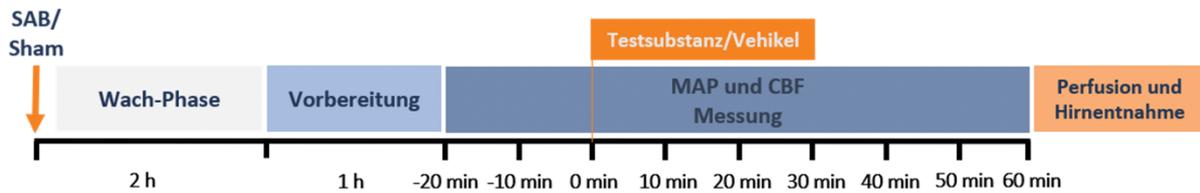


Abbildung 30: Zeitlicher Versuchsablaufs der Akutversuche mit verblindeter Gabe von Bay 60-2770/Vehikel drei Stunden nach SAB (MAP und CBF). Zur genaueren Untersuchung der Wirkung von Bay 60-2770 auf CBF und MAP werden Tiere ohne Einfluss von 2-Photonen-Mikroskopie untersucht.

2.6.7 Akut-Versuche Bay 41-2272 3h nach SAB ohne in vivo Mikroskopie

Zur explorativen Untersuchung des Einflusses von Bay 41-2272 auf die zerebrale Durchblutung wird eine Versuchsreihe mit $n = 6$ Versuchstieren durchgeführt (Abb. 31). Bei allen Versuchstieren wird eine SAB induziert; drei Stunden nach SAB-Induktion erfolgt eine 20-minütige Baseline-Messung von CBF und MAP, anschließend wird die 30-minütige Infusion von $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG Bay 41-2272 gestartet und CBF und MAP kontinuierlich weiter überwacht. Für Evaluation von verzögerten oder andauernden Therapieeffekten wird das Monitoring für weitere dreißig Minuten nach Beenden der Infusion fortgesetzt. Um die Wirkung von Bay 41-2272 in gesteigerter Dosis auszutesten wird unter Überwachung von CBF und MAP im Anschluss mittels Kurzinfusion die kumulative Gesamtdosis auf $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG Bay 41-2272 und nach weiteren zehn Minuten auf eine finale Gesamtdosis von $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG gesteigert. Zusätzlich wird zur explorativen supramaximalen Bay 60-2770-Stimulation im Anschluss ein Bolus mit $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG Bay 60-2770 gegeben.

Am Ende des Experiments wird das Tier nach obigem Protokoll perfundiert, das Gesamthirn entnommen und dieses bei -80°C gelagert.

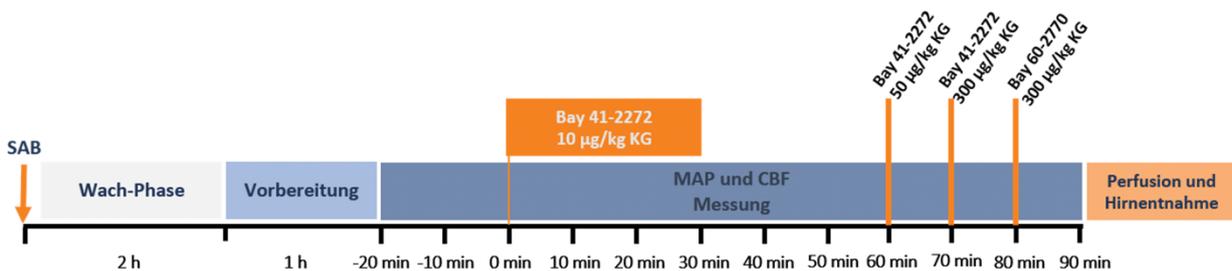


Abbildung 31: Zeitlicher Versuchsablauf der Akutversuche mit Gabe von Bay 41-2272 drei Stunden nach SAB zur Untersuchung der Wirkung von Bay 41-2272 auf CBF und MAP. Vor Beendigung des Versuchs wird zusätzlich eine supramaximale Stimulation mit $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ Bay 60-2770 durchgeführt.

2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm STABW) dargestellt, sofern nicht anderweitig angegeben. Zur Testung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk Test, bzw. bei Gruppengrößen mit $n \leq 5$ die visuelle Inspektion der QQ-Plots verwendet. Bei gegebener Normalverteilung wurden Gruppenvergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen mittels des Zweistichproben-t-Tests für unabhängige Stichproben („unpaired student t-test“) durchgeführt, bei ungleicher Varianz zwischen den beiden Gruppen wurde der Welch-Test verwendet. Normalverteilte abhängige Stichproben wurden mittels des gepaarten t-Test („paired t-test“) verglichen. Zum Vergleich von zwei nicht-normalverteilten Gruppen wurde für unabhängige Gruppen der Mann-Whitney-U-Test („Mann-Whitney test“) verwendet, für abhängige Gruppen der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test („Wilcoxon matched-pairs signed rank test“). Zum Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde bei Normalverteilung eine einfaktorielle ANOVA („ordinary one-way ANOVA“) verwendet, bei nicht-normalverteilten Gruppen der Kruskal-Wallis-Test. Als statistisch signifikant wurden alle p-Werte $< 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des Gefäßisoliationsprotokolls

3.1.1 Isolation extrakortikaler und intrakortikaler Gefäße

Mittels Auflichtmikroskopie wird der Erfolg der Gefäßisolation optisch beurteilt. Zunächst stellt sich das Gehirn durch die Evan's-Blue-Perfusion bläulich durch die Anfärbung der extrakortikalen Gefäße dar (Abb. 32 A). Nach Dissektion der Hirnhäute mit Entfernen der extrakortikalen Gefäße sowie anschließender anatomischer Abtrennung des Kortex der beiden Hemisphären stellen sich diese wie in Abb. 32 B dar. Es dürfen sich keine verbleibenden extrakortikalen Gefäße mehr zeigen, ebenso müssen die Hemisphären frei von Plexus choroideus sein. Abgelöste und in Meningen eingebettete extrakortikale Gefäße stellen sich wie in Abb. 32 C dar und können makroskopisch gesammelt werden.

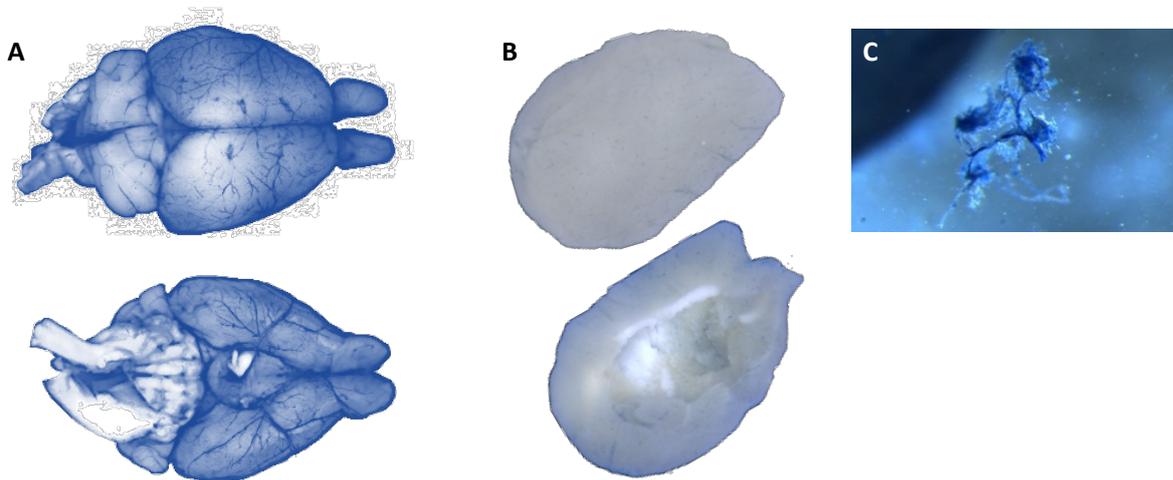


Abbildung 32: Auflichtmikroskopie eines entnommenen Gehirns nach Perfusion mit 1%-Evan's Blue Lösung (A, vgl. Abb. 13 a)) sowie einer im Anschluss gewonnenen Kortexhälfte (B, vgl. Abb. 13c)) nach mechanischer Entfernung (Isolation) der extrakortikalen Gefäße (C, vgl. Abb. 13 b)).

Nach mechanochemischer Isolation der intrakortikalen Gefäße aus den zuvor gewonnenen Kortexhemisphären (vgl. Kapitel 2.2) stellen sich diese wie in Abb. 33 c-g dar. Parallel zur Isolation der intrakortikalen Gefäße werden auch die extrakortikalen Gefäße dem mechanochemischen Isolationsprotokoll unterzogen, um auch hier eine optimale Aufbereitung der Gefäße zu erreichen und um gleichzeitig eventuelle Einflüsse des Isolationsprotokoll auf alle Probenarten konstant zu halten (Abb. 33 a). In der mikroskopischen Kontrolle wird der Erfolg der Isolation optisch insbesondere auf das ungewünschte verbliebene Vorliegen von Parenchymzellen in der Probe kontrolliert. Es zeigte sich optisch eine nahezu vollständige Aufreinigung der Gefäßproben mit nur einzelnen verbliebenen Parenchymzellen. Bei den extrakortikalen Gefäßen zeigen sich an vereinzelt Gefäßen verbliebene Reste der Meningen (Abb. 33 a) Im Gegenzug zeigen sich in der bei Isolation der intrakortikalen Gefäße parallel gewonnenen Parenchymprobe keine verbleibenden Gefäße (Abb. 33 b).

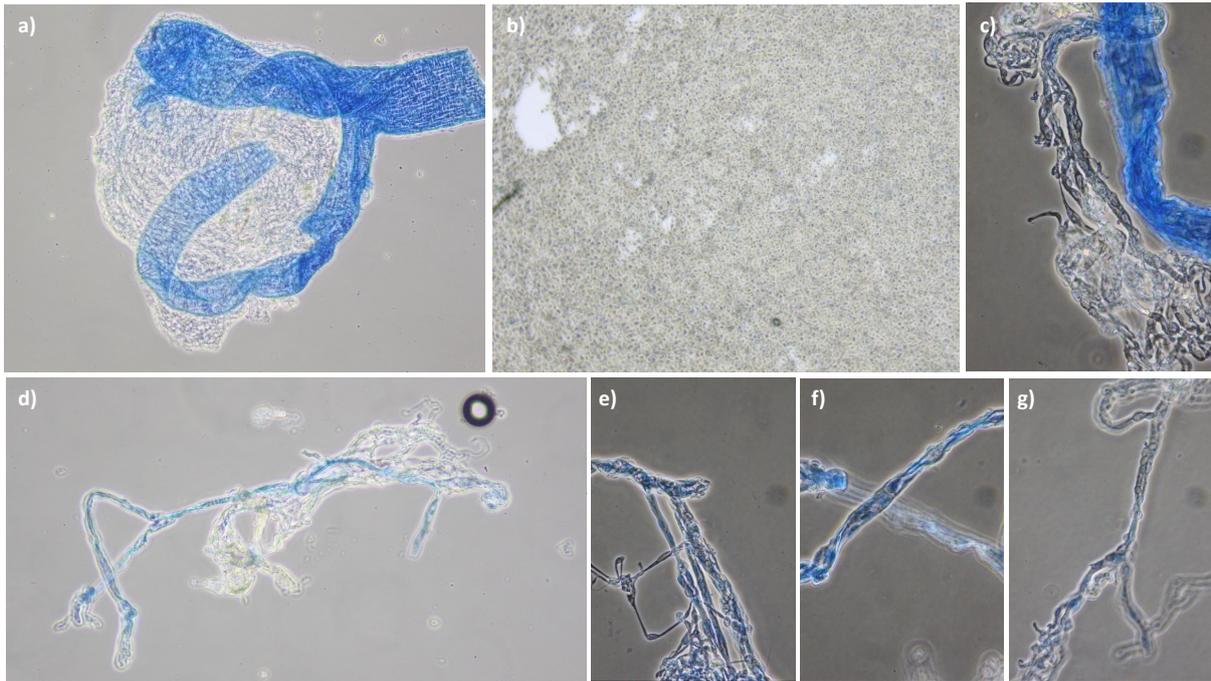


Abbildung 33: Auflichtmikroskopie der gewonnenen Gefäßfraktionen sowie des verbleibenden Parenchyms nach vollständigem Gefäßisoliationsprotokoll. a) Extrakortikales Gefäß mit verbleibenden Resten der Meningen, b) nach der Isolation verbleibendes gelöstes Parenchymgewebe, c-g) Beispiele isolierter intrakortikaler Gefäße.

3.1.2 Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben mittels Westernblot

Zur genaueren Charakterisierung der gewonnenen Gefäß- und Parenchymproben wurden die Proben hinsichtlich des Vorhandenseins von endothelialen, neuronalen, astrozytären und perizytären Markern untersucht.

VE-Cadherin als Marker für vaskuläre Endothelzellen zeigte sich jeweils in der extrakortikalen und der intrakortikalen Gefäßprobe signifikant erhöht gegenüber der Parenchymprobe (Abb. 34 A, $p < 0,01$).

Der neuronale Marker MAP2 zeigte in den Parenchymproben ein signifikant höheres Signal im Vergleich zu beiden Gefäßproben (Abb. 34 B, $p < 0,01$ vs. intrakortikale Gefäße, $p < 0,001$ vs. extrakortikale Gefäße).

Als astrozytäre Marker wurden Primärantikörper gegen GFAP und AQP4 verwendet (Abb. 35). In der Parenchymprobe zeigte sich für GFAP ein signifikant höheres Signal als in der intrakortikalen Gefäßprobe ($p < 0,05$), während die extrakortikale Gefäßprobe ein signifikant höheres Signal als die Parenchymprobe zeigte ($p < 0,05$). Im Gegensatz zu GFAP zeigte sich das AQP4-Signal sowohl in der intrakortikalen als auch der extrakortikalen Gefäßprobe signifikant erhöht gegenüber der Parenchymprobe ($p < 0,01$).

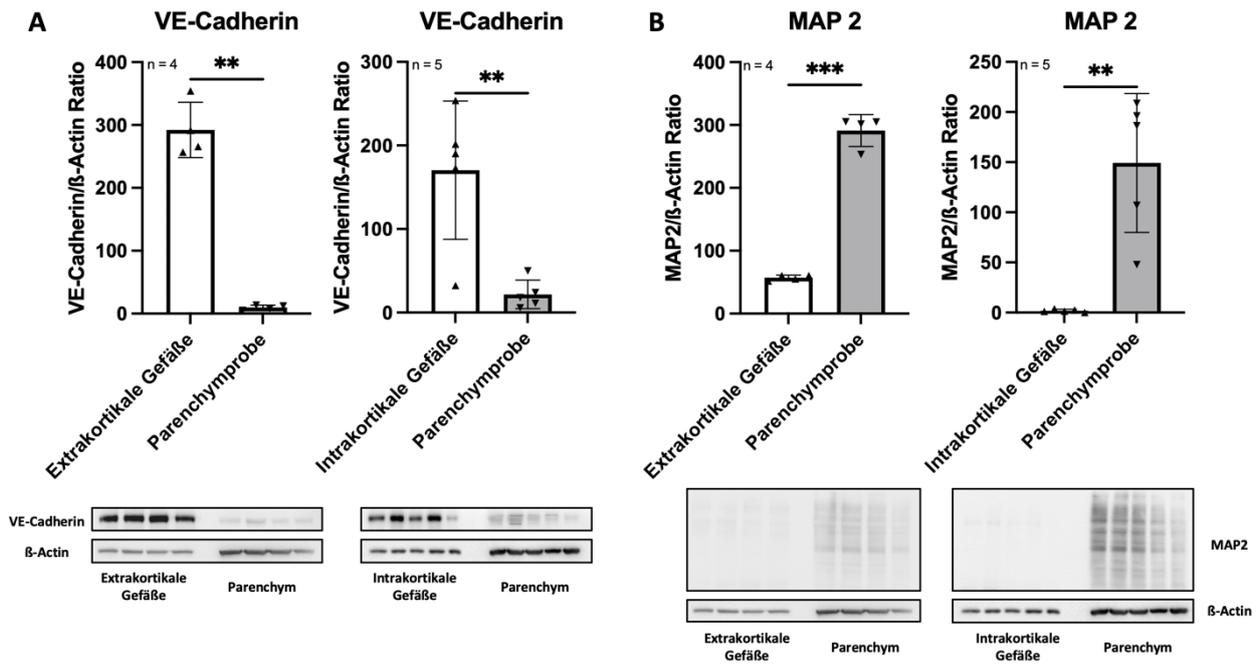


Abbildung 34: Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben für VE-Cadherin und MAP 2. A. Für den endothelialen Marker VE-Cadherin zeigt sich ein signifikant erhöhtes Signal in der jeweils untersuchten Gefäßprobe gegenüber der Parenchymprobe. B. Für den neuronalen Marker MAP2 zeigt sich jeweils ein signifikant erhöhtes in der Parenchymprobe gegenüber der jeweiligen Gefäßprobe (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

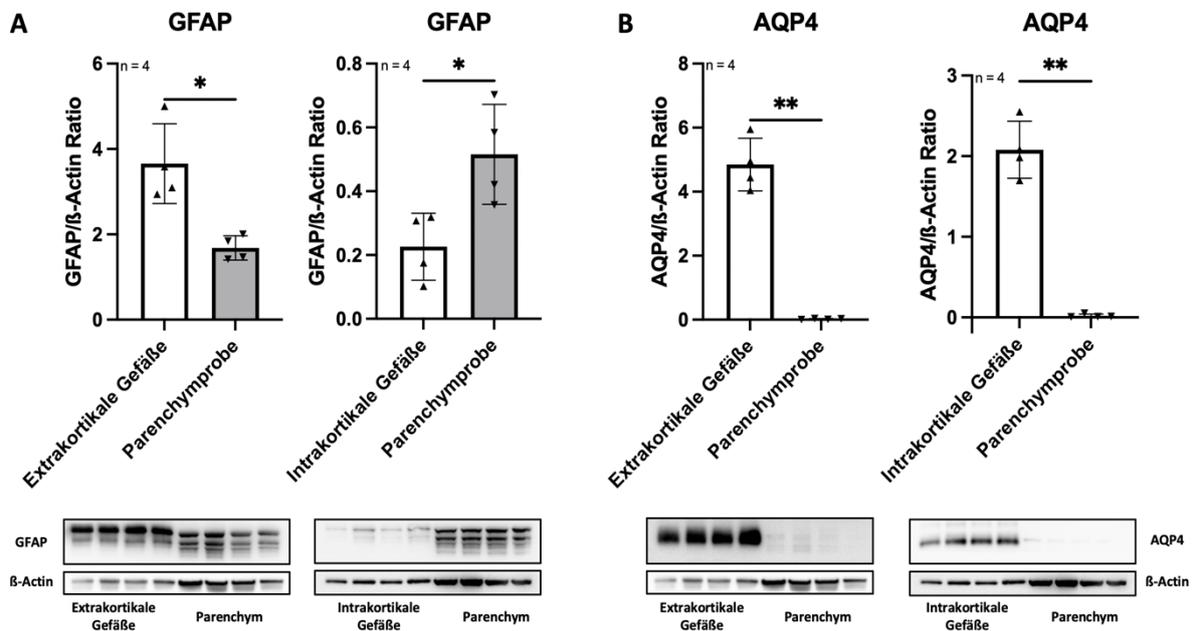


Abbildung 35: Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben für GFAP und AQP4. A. Für den astrozytären Marker GFAP zeigt sich ein signifikant erhöhtes Signal in der extrakortikalen Gefäßprobe gegenüber der Parenchymprobe, während sich GFAP in der Parenchymprobe signifikant erhöht gegenüber der intrakortikalen Gefäßprobe zeigt. B. Für den astrozytären Marker AQP4 zeigt sich in der jeweiligen Gefäßprobe ein signifikant erhöhtes Signal gegenüber der Parenchymprobe (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Der Perizyten-Marker PDGFR β zeigte sich in beiden Gefäßproben, den extra- und intrakortikalen Gefäßen, signifikant erhöht gegenüber der Parenchymprobe (Abb. 36, $p < 0,01$).

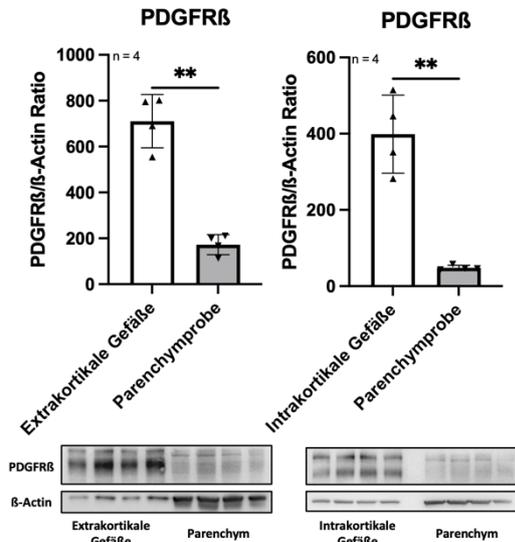


Abbildung 36: Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben für PDGFR β . Für den perizytären Marker PDGFR β zeigt sich ein signifikant erhöhtes Signal in der jeweils untersuchten Gefäßprobe gegenüber der Parenchymprobe (**: $p < 0,01$).

3.2 Standardisierungsreihe endovaskuläre SAB-Induktion

Der ICP Ausgangswert lag bei $4,5 \pm 2,0$ mmHg (Abb. 37 A). Nach SAB Induktion stieg dieser auf einen durchschnittlichen Maximalwert von $67,5 \pm 4,2$ mmHg an. Nach Erreichen dieses Spitzenwerts fiel der ICP wieder ab, um sich dann bei Werten von 20 mmHg einzupendeln. Zeitgleich fiel der CBF auf einen durchschnittlichen Minimalwert von $38,1 \pm 19$ % des Ausgangswerts ab, um sich anschließend wieder nahezu auf Ausgangsniveau zu erholen (Abb. 37 B). Anhand des Verlaufs dieser beider Parameter kann die Standardisierungsreihe als erfolgreich betrachtet und von einer suffizienten Reproduzierbarkeit ausgegangen werden.

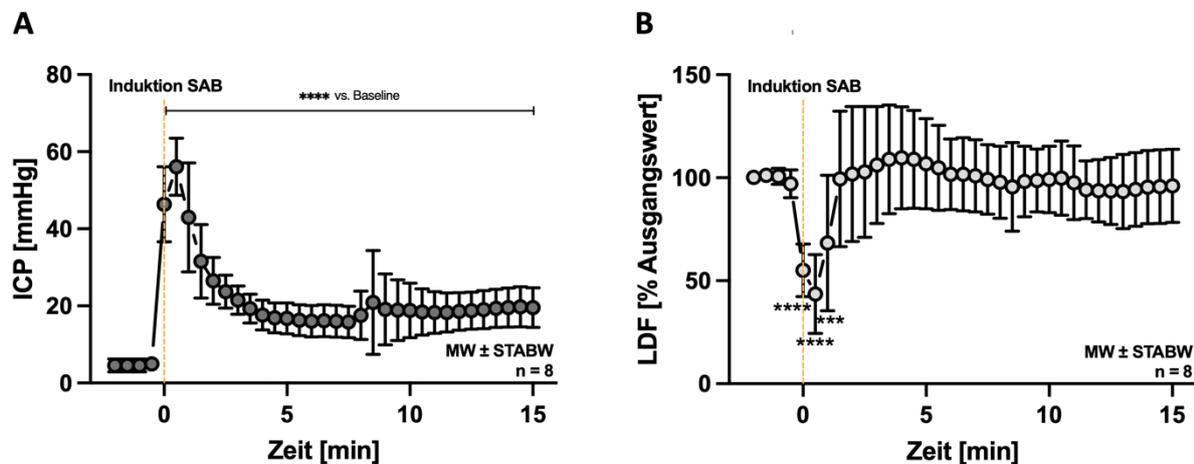


Abbildung 37: ICP- und LDF-Messwerte der Standardisierungsreihe. Jeweils über 30 Sekunden gemittelte ICP-Werte (A) und LDF-Werte (B) vor, während und bis 15 Minuten nach Auslösen der SAB. Es zeigt sich der charakteristische sprunghafte ICP-Anstieg bei parallelem Abfall des LDF-Signals unmittelbar nach SAB-Induktion. Während die ICP-Werte bis Ende der Überwachungsperiode signifikant gegenüber den Ausgangswerten erhöht bleiben, kommt es zu einer raschen Erholung der LDF-Werte innerhalb weniger Minuten auf Ausgangsniveau (***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$).
Anmerkung: Während für jedes Tier die erreichten ICP-Maximalwerte über 60 mmHg und LDF-Minimalwerte unter 20% liegen (Aufzeichnungsfrequenz 1Hz), sind hier jeweils über 30 Sekunden gemittelte Werte dargestellt, sodass diese Grenzwerte graphisch nicht abgebildet werden.

3.3 Charakterisierung endothelialer Enzymveränderungen des e-NOS-NO-sGC-Signalwegs nach experimenteller SAB

3.3.1 Induktion der Subarachnoidalblutung

Anhand des geplanten Zeitpunkts der Hirnentnahme nach SAB zur Gefäßisolation werden die Gruppen nachfolgend wie folgt benannt: SAB-3h entspricht der Versuchstiergruppe mit geplanter Perfusion und Hirnentnahme 3h nach Induktion der SAB, SAB-24h entspricht der Versuchstiergruppe mit geplanter Hirnentnahme 24h nach SAB, SAB-72h entspricht der Versuchstiergruppe mit geplanter Hirnentnahme 72h nach SAB.

Der ICP-Ausgangswert vor Induktion der SAB oder Sham-Operation lag in allen Untersuchungsgruppen bei unter 8 mmHg (Sham: $5,8 \pm 1,1$ mmHg, SAB-3h: $4,7 \pm 1,4$ mmHg, SAB-24h: $5,5 \pm 1,9$ mmHg, SAB-72h: $6,0 \pm 1,7$ mmHg, siehe Abb. 38 A). Unmittelbar nach SAB-Induktion stieg der ICP in allen drei SAB-Gruppen auf durchschnittliche Maximalwerte über 60 mmHg an (SAB-3h: $75,4 \pm 7,7$ mmHg, SAB-24h: $73,1 \pm 9,0$ mmHg, SAB-72h: $85,0 \pm 15,5$ mmHg; p vs. Sham jeweils $< 0,0001$) mit anschließendem Abfall auf Werte um 20 mmHg (t = 15 min; SAB-3h: $23,8 \pm 7,0$ mmHg, SAB-24h: $24,1 \pm 4,7$ mmHg, SAB-72h: $25,9 \pm 6,2$ mmHg; p vs. Sham jeweils $< 0,001$). Zwischen den SAB-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. In allen drei SAB-Gruppen fiel die CBF auf unter 20% des Ausgangswerts (durchschnittliche Minimalwerte: SAB-3h: $12,5 \pm 5,8\%$, SAB-24h: $6,5 \pm 6,4\%$, SAB-72h: $6,3 \pm 2,3\%$, p vs. Sham jeweils $< 0,001$, siehe Abb. 38 B) mit anschließender Erholung auf Ausgangswerte. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den SAB-Gruppen. Innerhalb der Sham-Gruppe verblieben ICP und CBF über den Verlauf stabil (t = 15min: ICP = $4,5 \pm 0,5$ mmHg, LDF = $107,0 \pm 10,7\%$).

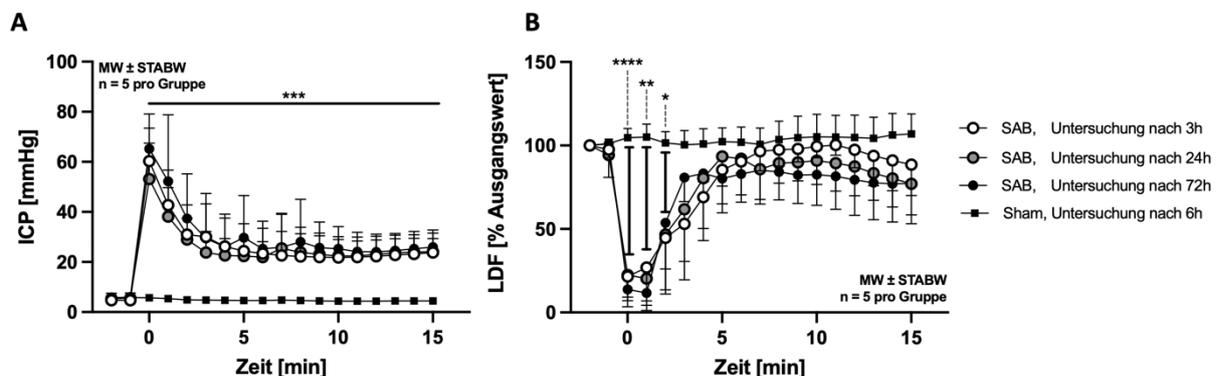


Abbildung 38: ICP- und LDF-Messwerte der Versuchstiergruppen während der SAB-/Sham-Operation zur späteren Charakterisierung endothelialer Enzymveränderungen nach SAB. Jeweils über 30 Sekunden gemittelte ICP-Werte (A) und LDF-Werte (B) vor, während und bis 15 Minuten nach Auslösen der SAB oder Sham-Operation. Während die ICP-Werte ab SAB-Induktion bis Ende der Überwachungsperiode dauerhaft signifikant gegenüber der Sham-Gruppe erhöht sind, kommt es in allen drei Gruppen zu einer raschen Erholung der LDF-Werte innerhalb weniger Minuten gegenüber der Sham Gruppe (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$ jeweils für jede SAB-Gruppe vs. Sham).

3.3.2 Vergleich des eNOS-NO-sGC Signalwegs zwischen intrakortikaler Mikrozirkulation und extrakortikaler Gefäße

Zum Vergleich der sGC-, eNOS-Expression und der Ser1177-Aktivierung zwischen den isolierten Mikrozirkulations-Gefäßen (nachfolgend als kleine intrakortikale Gefäße benannt) und den pialen extrakortikalen Gefäße zu verschiedenen Zeitpunkten nach experimenteller SAB wurden zunächst die intrakortikalen und extrakortikalen Gefäßproben aller Versuchstiere einer Versuchstiergruppe auf jeweils einem Westernblot pro Gruppe analysiert (Abb. 39 - 41).

Dabei zeigte sich in allen Versuchsgruppen die sGC (Abb. 39) und eNOS-Expression (Abb. 40) in den kleinen intrakortikalen Gefäßen gegenüber den pialen extrakortikalen Gefäßen erhöht. Während dieser Unterschied bei naiven Tieren nur einen Trend zeigte ($p = 0,055$ für sGC; $p = 0,105$ für eNOS), war dieser Unterschied in der Sham-, SAB-3h, SAB-24h und SAB-72h-Gruppe signifikant (sowohl sGC als auch NO: intrakortikal vs. extrakortikal: $p < 0,05$ für Sham, SAB-24h und SAB-72h; $p < 0,01$ für SAB-3h).

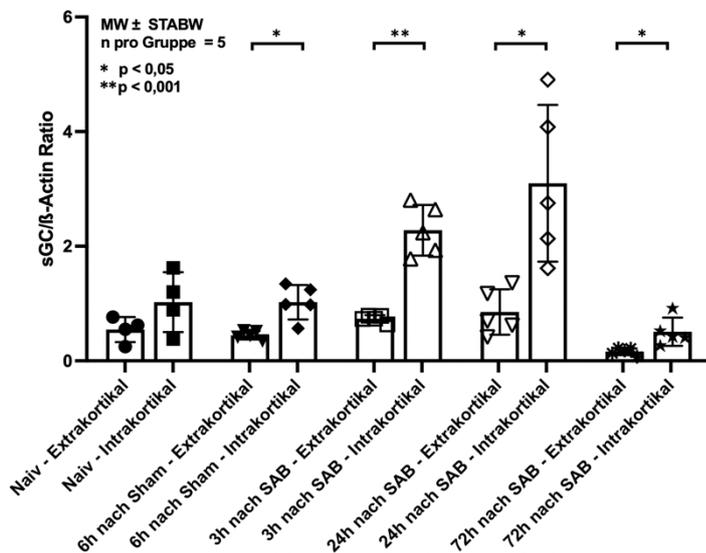


Abbildung 39: Vergleich der sGC Proteinexpression zwischen in- und extrakortikalen Gefäßen. In und extrakortikale Gefäße einer Versuchstiergruppe wurde zusammen einheitlich auf einem Westernblot analysiert.

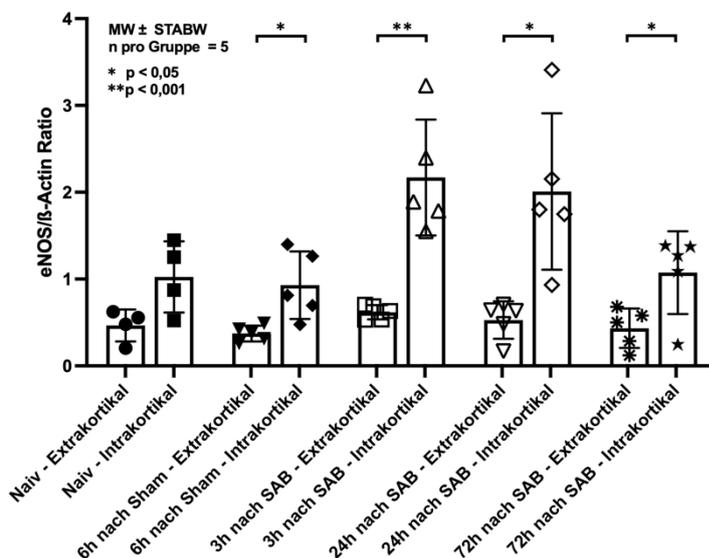


Abbildung 40: Vergleich der eNOS Proteinkonzentration zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen. Intra- und extrakortikale Gefäße einer Versuchstiergruppe wurde zusammen einheitlich auf einem Westernblot analysiert.

Gemessen anhand des relativen Anteils von p-Ser1177-eNOS (Abb. 41) zeigten kleine intrakortikale Gefäße zusätzlich höhere eNOS-Aktivierungswerte bei naiven Tieren, 6 Stunden nach Sham- und 3 Stunden nach SAB-Operation, wobei die beiden letztgenannten Werte statistische Signifikanz erreichten (intrakortikale vs. extrakortikal: Sham: $p < 0,05$, SAB-3h: $p < 0,01$). In der 24h- und der 72-Stunden-SAB Gruppe zeigten sich kein signifikanter Unterschied (24h: $p < 0,74$; 72h $p = 0,108$).

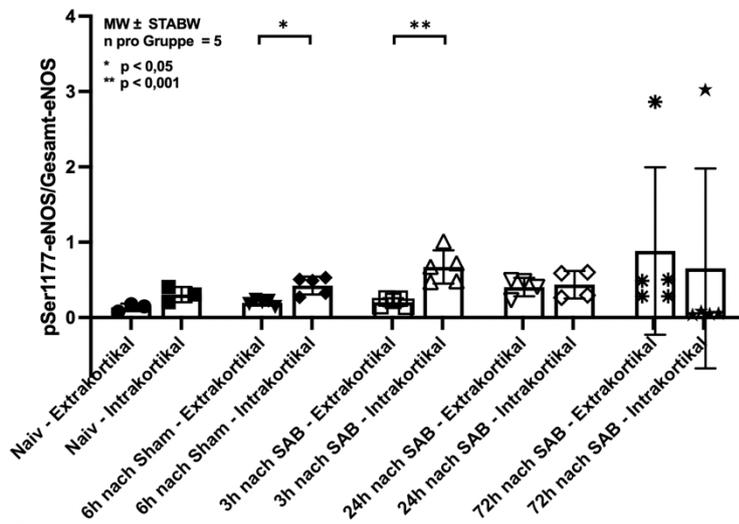


Abbildung 41: Vergleich der pSer1177-vermittelten eNOS Aktivierung zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen. Intra- und extrakortikale Gefäße einer Versuchstiergruppe wurde zusammen einheitlich auf einem Westernblot analysiert. Anmerkung: Beide Symbole oberhalb der Säulen der 72h nach SAB Gruppen stellen Messpunkte dar, keine Signifikanzzeichen.

Um besser für die Interblot-Variabilität zu korrigieren, generierten wir explorativ einen Index pro Versuchstiergruppe, der die Protein-Expression bzw. Aktivierung innerhalb der intrakortikalen Gefäße relativ zu den extrakortikalen Gefäßen angibt (Abb. 42):

$$\text{Index}_{\text{sGC, eNOS or p-Ser1177}} = \frac{\text{Auf } \beta\text{Actin normalisierter Protein} - \text{Wert}_{\text{intrakortikale Gefäße}}}{\text{Auf } \beta\text{Actin normalisierter Protein} - \text{Wert}_{\text{extrakortikale Gefäße}}}$$

Hier zeigte sich für die pSer1177-vermittelte eNOS Aktivierung eine erhöhte Aktivierung in der 3h-SAB Gruppe gegenüber der Sham-6h Gruppe ($p < 0,05$) mit anschließend kontinuierlicher und jeweils signifikanter Abnahme der eNOS-Aktivierung in der 24h-SAB (p vs. Sham $< 0,05$, p vs. 3h-SAB $< 0,001$) und 72h-SAB Gruppe (p vs. Sham $< 0,001$, p vs. 3h-SAB $< 0,0001$, p vs. 24h-SAB $< 0,05$). Für sGC- und eNOS-Proteinexpression wurde keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet.

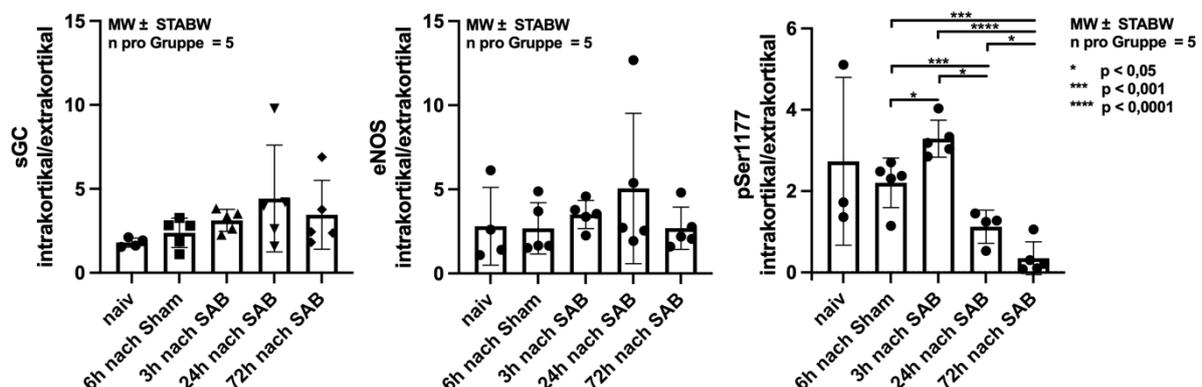


Abbildung 42: Relative Veränderung des Verhältnisses von sGC- und eNOS Proteinexpression sowie der pSer1177-vermittelten eNOS Aktivierung von intra- zu extrakortikalen Gefäßen.

3.3.3 Untersuchung der Veränderungen des eNOS-NO-sGC Signalwegs während der Early Brain Injury Phase nach SAB

Zur besseren Charakterisierung der zeitabhängigen Veränderungen der eNOS-, sGC-Expression und pSer1177-vermittelten eNOS-Aktivierung während der EBI-Phase wurde jeweils für einen Zeitpunkt ein Tier auf demselben Blot geblottet, um auf jedem Blot eine entsprechende Zeitreihe zu generieren (Abb. 43).

In den kleinen intrakortikalen Gefäßen zeigte sich 24h nach SAB eine signifikante Zunahme der sGC-Expression im Vergleich zu naiven Tieren und der Sham-6h Gruppe ($p < 0,05$, Abb. 43 A). In den großen extrakortikalen Gefäßen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der sGC-Expression über die verschiedenen Zeitpunkte und Gruppen hinweg.

Die eNOS-Expressionswerte zeigten in den kleinen intrakortikalen Gefäßen 24 Stunden nach SAB einen Trend zur Hochregulation gegenüber der 6h-Sham Gruppe ($p = 0,09$, Abb. 43 B), nicht jedoch gegenüber naiven Tieren ($p = 0,14$). In den großen extrakortikalen Gefäßen zeigte sich hingegen 24h nach SAB ein Trend zu reduzierten eNOS-Expressionswerten, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p = 0,06$ vs. naive Tiere).

Hinsichtlich der p-Ser1177-eNOS-Aktivierung in den großen Pialgefäßen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 43 C). Abnehmende Werte für p-Ser1177-eNOS ab 24 Stunden nach SAH erreichten im Vergleich zu naiven Tieren ebenfalls keine statistische Signifikanz (72h SAB vs. naiv: $p = 0,12$).

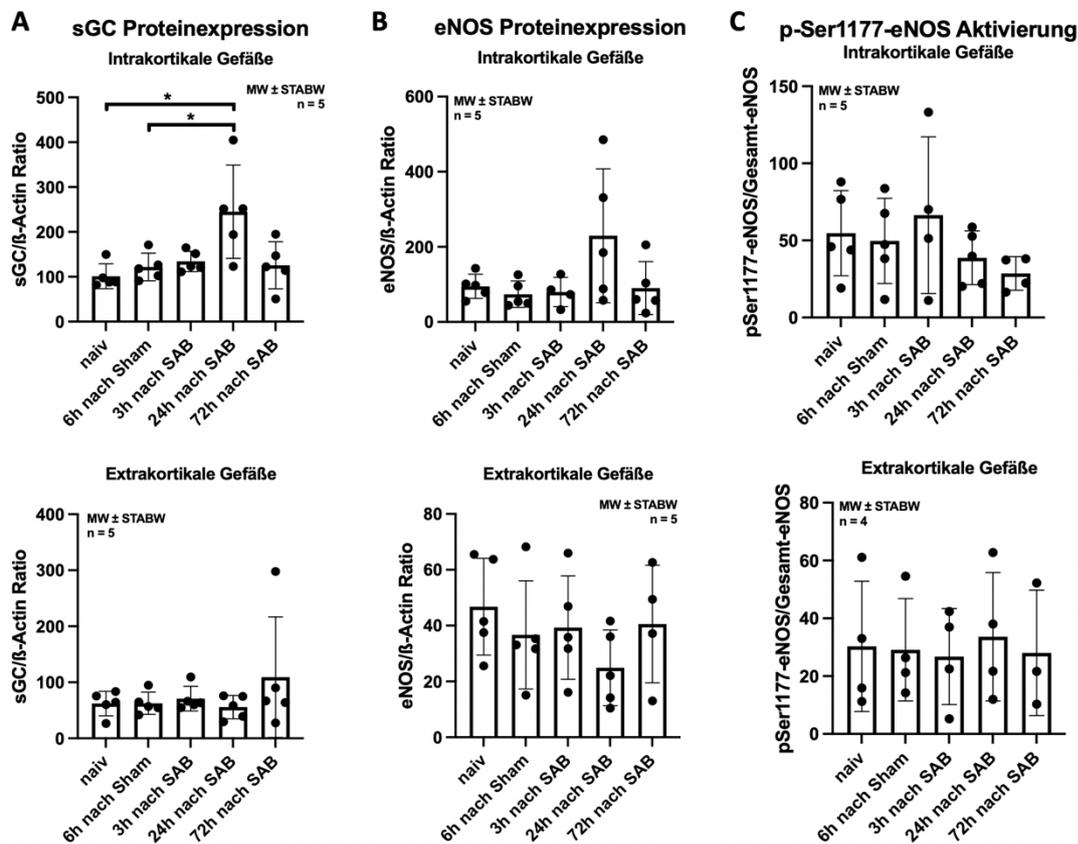


Abbildung 43: Vergleich der Expression von sGC und eNOS sowie der pSer-1177-vermittelten eNOS-Aktivierung in intrakortikalen und extrakortikalen Gefäßen während der Early Brain Injury Phase nach SAB. Pro Westernblot wurde je ein Tier einer Versuchsgruppe analysiert, um pro Blot eine Zeitreihe zu generieren.

Um den Effekt der Inter-Blot-Variabilität besser kontrollieren zu können, wurden in ein einer explorativen Analyse nachfolgend die absoluten Protein-Signalmessungen (normalisiert auf β -Actin als Housekeeping-Gen) durch relative Werte ersetzt (Abb. 44): Das normalisierte Protein-Signal der Gefäßprobe des Naiv-Tiers eines jeden Blots wurde als Referenzwert (Wert = 1) gesetzt und die normalisierten Protein-Signale der Gefäßproben der jeweils anderen Versuchstiere (6h-Sham, 3h-SAB, 24h-SAB, 72h-SAB) als Prozentsatz des gemessenen Wertes des naiven Tieres ausgedrückt.

In dieser explorativen Analyse zeigten sich die weiterhin die zuvor beobachteten Trends (deskriptive Beschreibung bei künstlich normalisierten Werten): sGC und eNOS zeigten 24 Stunden nach der SAB eine Hochregulierung in kleinen intrakortikalen Gefäßen im Vergleich zu naiven Sham-operierten Tieren, wobei eNOS 24 Stunden nach SAB in großen pialen Gefäßen hierzu gegenläufig eine Tendenz zur Herunterregulierung zeigte. Die p-Ser1177-vermittelte eNOS-Aktivierung zeigt in den kleinen intrakortikalen Gefäßen ab 24h nach SAB eine kontinuierliche Abnahme.

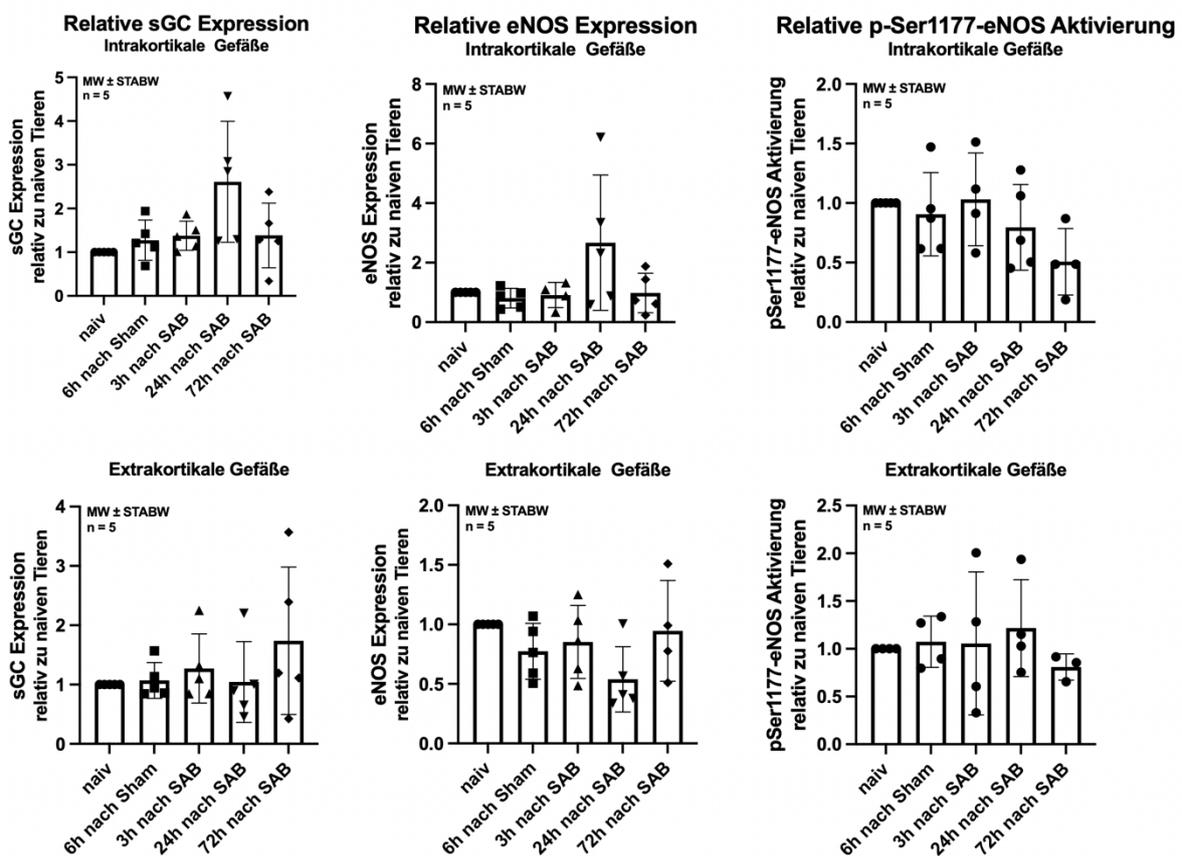


Abbildung 44: Relative Expression von sGC und eNOS sowie p-Ser1177-vermittelte eNOS-Aktivierung in intra- und extrakortikalen Gefäßen während der EBI gegenüber naiven Tieren.

3.4 Effekt von Bay 60-2270 und Bay 41-2272 nach experimenteller SAB

3.4.1 Bay 60-2770

3.4.1.1 Induktion der Subarachnoidalblutung

Bei allen drei Versuchstiergruppen lag der ICP-Ausgangswert vor Induktion der SAB bei unter 8 mmHg (SAB-Bay60: $5,5 \pm 2,6$ mmHg, SAB-Vehikel: $7,5 \pm 4,5$ mmHg, Sham-Bay60: $6,2 \pm 0,4$ mmHg, Abb. 45). Direkt nach Induktion der SAB zeigte sich der charakteristische Anstieg auf über 60 mmHg (durchschnittliche Maximalwerte ICP: SAB-Bay60: $82,9 \pm 20,9$ mmHg, SAB-Vehikel: $82,5 \pm 12,5$ mmHg; p vs. Sham jeweils $< 0,0001$) mit anschließendem Abfall auf Werte um 20 mmHg (t = 15 min; SAB-Bay 60: $22,7 \pm 3,9$ mmHg, p vs. Sham $< 0,001$; SAB-Vehikel: $28,3 \pm 4,8$ mmHg; p vs. Sham $< 0,0001$). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten ICP Werte oder deren Dynamik zwischen den beiden SAB Gruppen (p = 0,55). Weiterhin zeigte sich bei beiden SAB Gruppen der typische Abfall des CBF auf unter 20% des Ausgangswerts (durchschnittliche Minimalwerte LDF: SAB-Bay60: $12,1 \pm 5,3$ %, SAB-Vehikel: $15,8 \pm 10,1$ %; p vs. Sham jeweils $< 0,0001$) mit anschließendem erneutem Anstieg auf Ausgangswerte. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden SAB Gruppen (p = 0,30). Innerhalb der Sham-Gruppe verblieben ICP ($9,1 \pm 0,9$ mmHg) und CBF (LDF: $81,1 \pm 18,4$ %) während der Nachbeobachtungszeit stabil und zeigten sich im Verlauf unverändert.

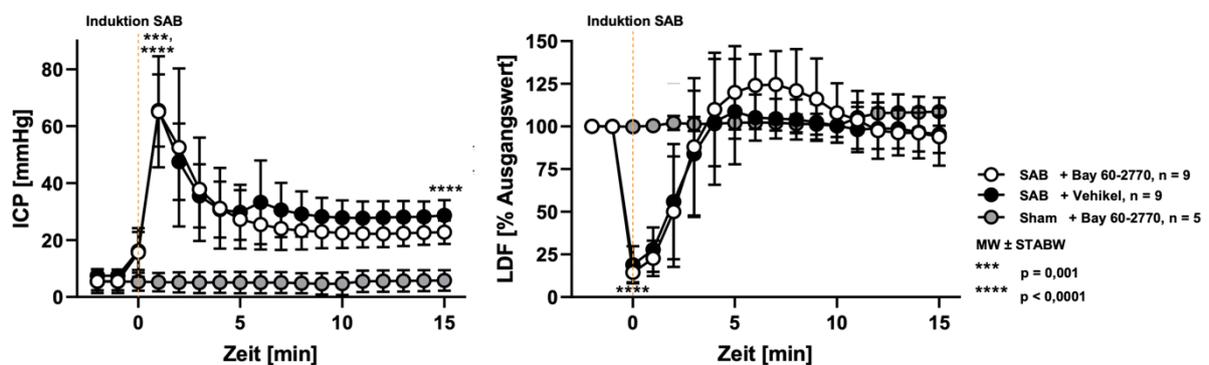


Abbildung 45: Mittlere ICP- und LDF-Werte der Bay 60-2770-Versuchstiergruppen vor, während und bis 15 Minuten nach Induktion der SAB, bzw. Sham-Operation, jeweils drei Stunden vor (verblindeter) Gabe von Bay 60-2770 oder Vehikel.

3.4.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Bei Beginn der In-vivo-Mikroskopie (t = -20 min) lag der mittlere arterielle Blutdruck bei $76,7 \pm 11,6$ mmHg (SAB + Bay60), $74,5 \pm 6,7$ mmHg (SAB + Vehikel) und $75,7 \pm 7,3$ mmHg (Sham + Bay60). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den MAP-Ausgangswerten (Kruskal-Wallis-Test: p = 0,997, Abb. 46). Während der Infusion (Zeitpunkte t = 0 bis t = 20 min) sowie in der anschließenden Postinfusionszeit (Zeitpunkte t = 30 – 50 min) zeigte sich im Verlauf in allen drei Gruppen ein signifikanter MAP-Abfall gegenüber den gruppeneigenen Ausgangswerten, in der Sham-operierten Gruppe kam es bereits während der beiden Baseline-Messungen, somit vor Beginn der Bay 60-2770-Infusion, zu einem signifikanten Abfall (p

< 0,05). Die gruppeninternen MAP-Mittelwerte der einzelnen Zeitpunkte mit zugehörigen Signifikanzen gegenüber den Ausgangsmessungen sind in Tabelle 4 summiert. Zwischen den drei Versuchsgruppen zeigte sich weder nach Ende der Infusion (t = 30 min; SAB + Bay60: 72,3 ± 14,0, SAB + Vehikel: 71,0 ± 7,0 mmHg, Sham + Bay60: 66,9 ± 2,7 mmHg; ordinary one-way ANOVA p = 0,49) noch am Ende der gesamten Messperiode (t = 50 min; SAB + Bay60: 71,0 ± 12,7, SAB + Vehikel: 69,6 ± 7,1 mmHg, Sham + Bay60: 68,6 ± 3,5 mmHg; ordinary one-way ANOVA p = 0,81) ein signifikanter Unterschied.

MAP	Zeitpunkt t								
	Gruppe	-20 min	-10 min	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
SAB + Bay 60-2770		76,7	74,0	74,8	73,5	71,4	72,3	72,2 [#]	71,1 [#]
SAB + Vehicle		74,5	73,7	74,3	74,3	72,2	71,0 ^{†, #}	70,4 ^{†, #}	69,6 ^{†, #}
Sham + Bay 60-2770		75,7 [†]	74,5 [#]	72,0	68,9 [#]	67,4 [#]	66,9 [#]	67,0 ^{†, #}	68,6 [#]

Tabelle 4: Mittlerer arterieller Blutdruck der drei Versuchstiergruppen über die Dauer des Experiments hinweg. Alle Werte in mmHg. # p < 0,05 vs. t = - 20 min; † p < 0,05 vs. t = - 10 min (paired t test)

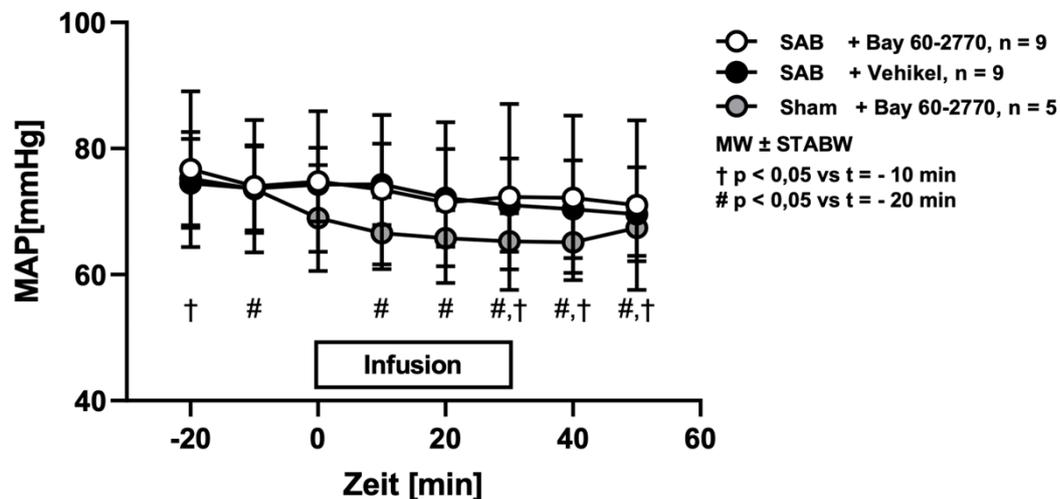


Abbildung 46: Graphische Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks der Bay 60-2770-Versuchsreihe während (verblindeter) Infusion von Bay60-2770 oder Vehikel. In allen drei Versuchsgruppen kam es über den Verlauf des Experiments zu einem signifikanten MAP-Abfall im Vergleich zum gruppeninternen Ausgangswert. Zwischen den Versuchstiergruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

3.4.1.3 Analyse der Mikrovasospasmen

3.4.1.3.1 Anzahl der Spasmen

In der SAB-Gruppe mit Bay 60-2770-Applikation zeigten sich in den Ausgangs-Aufnahmen vor Infusion von Bay 60-2770 insgesamt 75 (t = -20 min), bzw. 74 Gefäßspasmen (t = -10 min). Während der 30-minütigen Infusion von Bay 60-2770 stieg diese Zahl auf 85 Gefäßspasmen (t = 30 min) an, am Ende des Beobachtungszeitraums (30 min nach Ender der Infusion, t = 50 min) waren 87 Gefäßspasmen nachweisbar (Abb. 47). Dies entspricht einem prozentualen Anstieg auf 113% während und 116% nach Infusion. Dieser Anstieg zeigte sich ab dem Zeitpunkt t = 10 min an jedem der Zeitpunkte gegenüber beiden Ausgangs-Aufnahmen signifikant (p < 0,05). In den Baseline-Aufnahmen der SAB-Vehikel-Kontrollgruppe fanden sich vor Infusion des Vehikels 144 (t = -20 min) bzw. 145 Gefäßspasmen (t = -10 min). Über den Verlauf der Infusion sowie auch in der Postinfusionsperiode zeigte sich die absolute Gefäßspasmenzahl stabil mit diskreten Schwankungen zwischen 142 (t = 50 min) bis 150 (t = 30 min) Spasmen. Dies entspricht einer prozentualen Schwankung von 98,6 bis 104,2%. Hierbei zeigte sich innerhalb der Vehikelgruppe zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten (t = 30 min: p vs. (-20 min) = 0,19, p vs. (-10 min) = 0,27; t = 50 min: p vs. (-20 min) = 0,78, p vs. (-10 min) = 0,78).

Zwischen den beiden SAB-Gruppen (Bay 60-2770 und Vehikel) zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Spasmenanzahl (p-Werte zwischen 0,59 (t = 0 min) und 0,95 (t = 50 min))

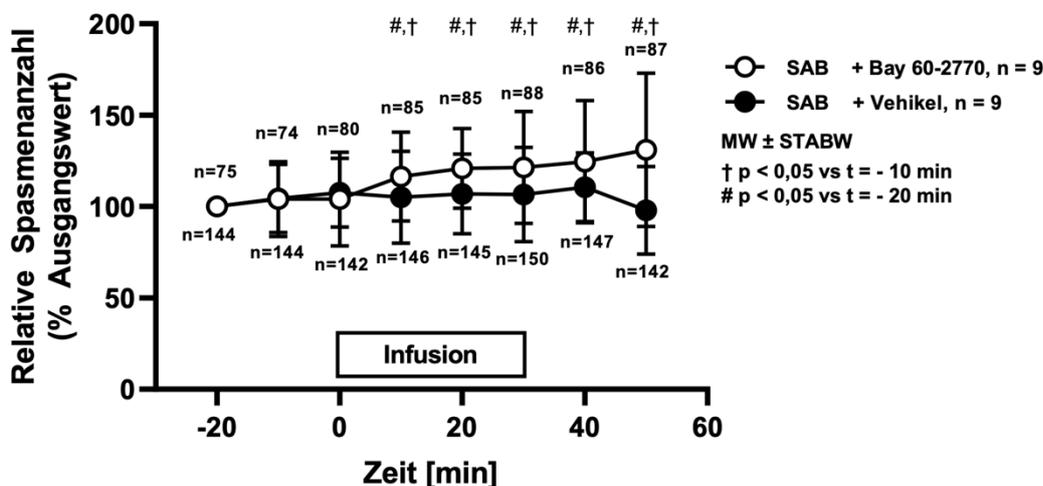


Abbildung 47: Prozentuale Veränderung der Gefäßspasmenanzahl unter Infusion von Bay 60-2770 bzw. Vehikel, gezählt über alle Imagingaufnahmen aller Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe hinweg. Zusätzlich eingefügt ist die absolute Gefäßspasmenzahl zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt, ebenfalls gezählt über alle Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe.

3.4.1.3.2 Analyse des Konstriktionsgrads der Spasmen

Als nächstes wurde untersucht, ob und inwieweit sich der Konstriktionsgrad einzelner Spasmen über die Zeit unter Therapie mit Bay 60-2770 im Vergleich zur Infusion der Kontrollsubstanz verändert (Abb. 48). Als Ausgangswert wurde hierfür der Durchmesser des jeweiligen

Gefäßspasmus zum Zeitpunkt $t = -20$ min an seiner engsten Stelle verwendet; der Durchmesser dieses Spasmus an allen folgenden Zeitpunkten wurde dann hierzu ins Verhältnis gesetzt. Dabei zeigt sich in der Bay 60-2770-Gruppe keine signifikante Veränderung der Spasmenstärke vor ($t = -10$ min), während (Zeitpunkte $t = 0$ bis $t = 20$ min) oder nach (Zeitpunkte $t = 30$ bis $t = 50$ min) der Infusion von Bay 60-2770 mit einer maximalen Fluktuation der Konstriktion zwischen $98,9 \pm 14,1$ % ($t = 30$ min; p vs. $t = -20$ min: 0,41) und $102,5 \pm 18,0$ % ($t = 10$ min; p vs. $t = -20$ min: 0,49) des Ausgangswerts. In der Kontroll-(SAB + Vehikel)-Gruppe zeigten sich die Gefäßspasmen hinsichtlich ihres Konstriktionsgrads ebenfalls vor ($t = -10$ min), während (Zeitpunkte $t = 0$ bis $t = 20$ min) oder nach (Zeitpunkte $t = 30$ bis $t = 50$ min) der Infusion weitestgehend gleichbleibend mit maximaler Fluktuation der Konstriktion zwischen $98,6 \pm 17,9$ % ($t = 30$ min; p vs. $t = -20$ min: 0,16) und $102,3 \pm 14,1$ % ($t = 0$ min; p vs. $t = -20$ min: 0,07) des Ausgangswerts.

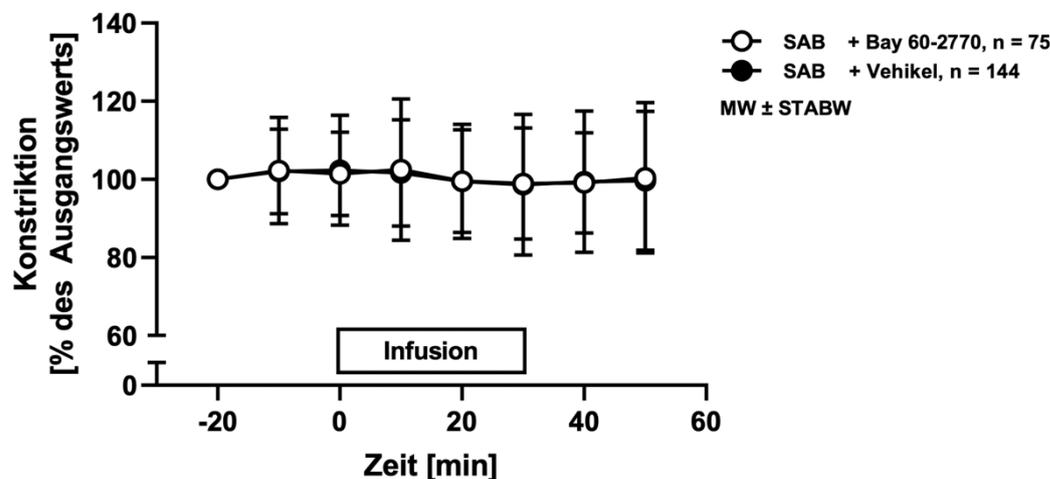


Abbildung 48: Änderung des relativen Konstriktionsgrads der MVS im Verlauf im Vergleich zum Ausgangswert. In beiden Gruppen zeigt sich im Verlauf keine relevante Änderung der Ausprägung des Konstriktionsgrads.

In einem nächsten Schritt wurde der Schweregrad der Mikrovasospasmen bestimmt, indem der geringste Gefäßdurchmesser im Bereich des Spasmus ins Verhältnis zum nicht-spastischen Gefäßdurchmesser des Trägergefäßes gesetzt wurde. Alle gemessenen Spasmen wurden in acht Schweregrade eingeteilt (Einengung auf 80-90%, 70-80%, 60-70%, 50-60%, 40-50%, 30-40%, 20-30% und 10-20% des nicht-spastischen Durchmessers): Dabei entspricht die Gruppe „80-90%“ der mildesten Kategorie mit einem verbleibenden Gefäßdurchmessers zwischen 80 und 90% des initialen Durchmessers beziehungsweise einer Verengung des Gefäßes um 10 - 20%. Die Gruppe „10-20%“ entspricht in dieser Einteilung der stärksten Spasmen-Kategorie mit einem verbleibenden Gefäßdurchmesser von 10 - 20 % und einer Einengung des Gefäßes um 80-90%.

In der Bay 60-2770 sowie der Vehikel-Gruppe ließ sich der größte Anteil der Spasmen der mildesten Kategorie, „80-90%“, zuordnen (Abb. 49). Insgesamt nahm die Anzahl der registrierten Spasmen mit steigendem Schweregrad ab, schwere Spasmen zeigten sich also seltener als milde Spasmen.

In der mit Bay 60-2770 therapierten Gruppe kam es zu einer diskreten Zunahme der absoluten Vasospasmenzahl in den Gruppen „20% - 30%“, „30% - 40%“, „40% - 50%“, „60-70%“ sowie „80-90%“ bei Abnahme der Vasospasmenzahl in den Gruppen „50-60“ und „70-80%“ (Abb. 49A). Insgesamt zeigte sich dabei keine eindeutige Verschiebung der Spasmenverteilung (deskriptive Statistik).

In der mit Vehikel behandelten Gruppe kam es zu einer diskreten Zunahme der absoluten Vasospasmenzahl in den Gruppen „10-20%“, „30-40%“, „40-50%“, „50-60%“ sowie „70-80%“. In den Gruppen „20-30%“ und „60-70%“ blieb die Anzahl der Vasospasmen über den Versuchsablauf hinweg konstant. In der Gruppe „80-90%“ zeigte sich eine diskrete Abnahme der Vasospasmenanzahl (Abb. 49 B). Auch hier zeigte sich keine eindeutige Verschiebung des Konstriktionsgrades der Vasospasmen.

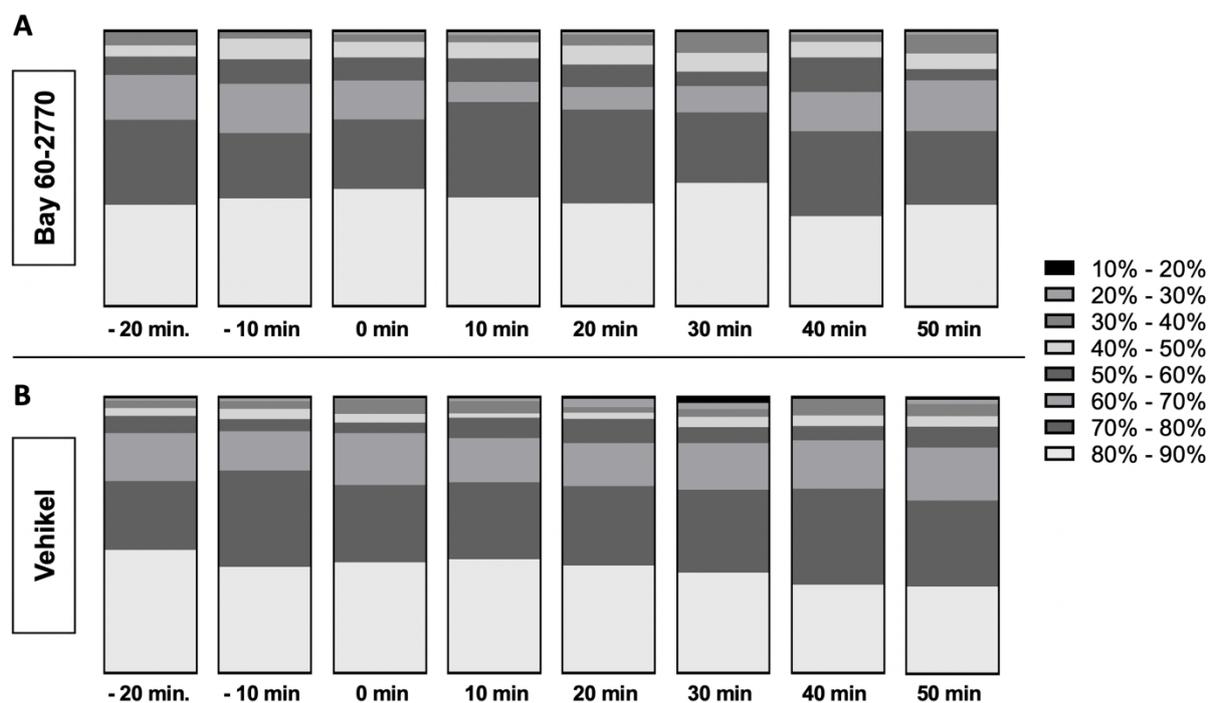


Abbildung 49: Ausprägung der Vasospasmenschwere innerhalb der Bay 60-2770- und der Vehikel-behandelten Gruppe über den zeitlichen Verlauf hinweg. Legendenerläuterung: „80-90%“ entspricht der mildesten Spasmenkategorie mit verbleibendem Gefäßdurchmesser zwischen 80 und 90% des initialen Durchmessers, entsprechend einer Verengung des Gefäßes um 10 - 20%. Restliche Kategorien folgend derselben Logik.

3.4.1.4 Effekt von Bay 60-2770 auf den nicht-spastischen Gefäßdurchmesser

Zur Beurteilung des Einflusses von Bay 60-2770 auf den Durchmesser nicht-spastischer zerebraler Gefäße nach SAB wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten alle Gefäße der Versuchstiere innerhalb einer Gruppe an Spasmen-freien Stellen vermessen und der Wert zum Zeitpunkt $t = -20$ min als Ausgangswert gesetzt. Innerhalb der Bay 60-2770-SAB-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied des mittleren Gefäßdurchmessers während ($t = 0$ min: $98,7 \pm 4,0\%$, $t = 10$ min: $96,6 \pm 6,5\%$, $t = 20$ min: $96,3 \pm 5,4\%$) oder nach ($t = 30$ min: $96,6 \pm 5,1\%$, $t = 40$ min: $96,0 \pm 5,1\%$, $t = 50$ min: $96,3 \pm 5,7\%$) Infusion von Bay 60-2770 (Abb. 50). Auch in der Vehikel-SAB-Gruppe zeigte sich der mittlere Gefäßdurchmesser während ($t = 0$

min: $98,6 \pm 3,1\%$, $t = 10$ min: $98,1 \pm 3,4\%$, $t = 20$ min: $97,3 \pm 3,9\%$) oder nach ($t = 30$ min: $96,8 \pm 4,0\%$, $t = 40$ min: $97,4 \pm 3,5\%$, $t = 50$ min: $96,5 \pm 3,8\%$.) Infusion der Vehikel-Lösung nicht signifikant verändert. In der Sham-operierten Gruppe zeigte sich der mittlere Gefäßdurchmesser während ($t = 0$ min: $99,6 \pm 3,1\%$, $t = 10$ min: $98,6 \pm 2,5\%$, $t = 20$ min: $98,6 \pm 3,5\%$) und nach ($t = 30$ min: $98,1 \pm 3,9\%$, $t = 40$ min: $98,0 \pm 4,3\%$, $t = 50$ min: $99,9 \pm 5,2\%$.) Infusion von Bay 60-2770 ebenfalls stabil.

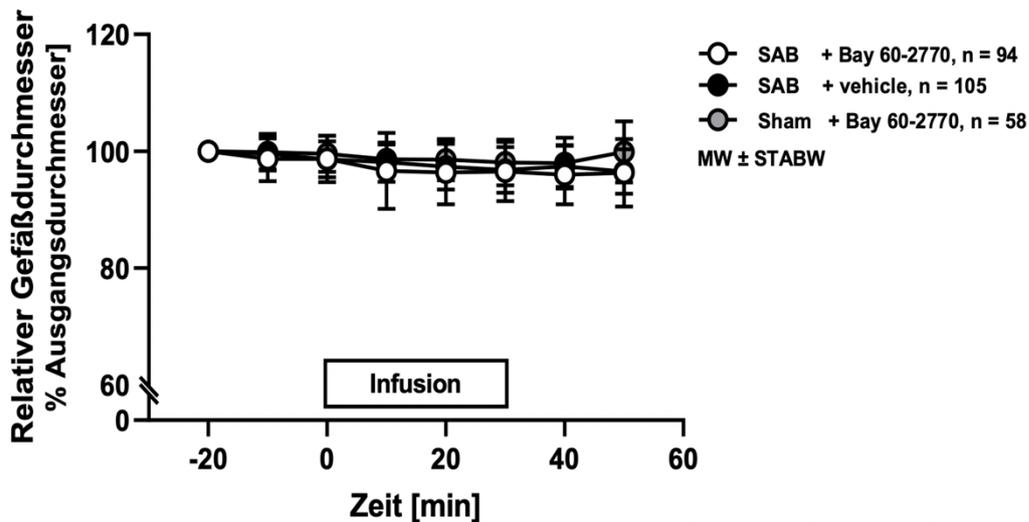


Abbildung 50: Veränderung des allgemeinen Gefäßdurchmessers zerebraler Gefäße unter Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel. Dargestellt ist hier die relative Veränderung des Gefäßdurchmessers von nicht-spastischen Gefäßen über die Dauer des Experiments hinweg.

3.4.1.5 Zerebrale Durchblutung im A. cerebri media Stromgebiet

Die zerebrale Durchblutung im linken Media-Stromgebiet wurde 20 Minuten vor bis 30 Minuten nach Infusion kontinuierlich mittels LDF gemessen. Während der Intravitalmikroskopie zeigte sich jedoch eine Interferenz des Lasers des 2-Photonenmikroskops mit dem photosensitiven Messsignal der LDF, sodass lediglich kurze Abschnitte zwischen den einzelnen 2-PM-Aufnahmen ausgewertet konnten (siehe Abb. 51 für exemplarische Versuchsaufzeichnung).

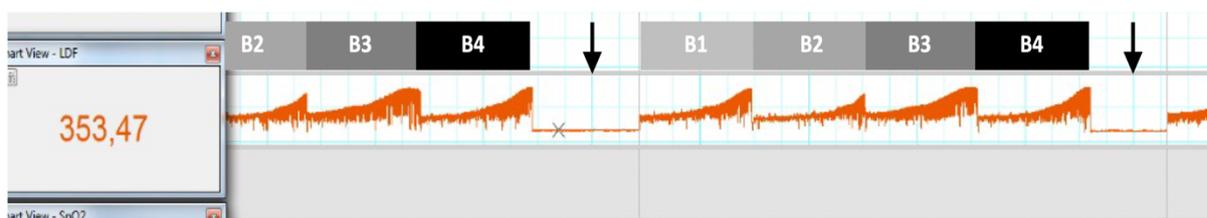


Abbildung 51: Exemplarischer Ausschnitt der intraexperimentellen LDF-Datenaufzeichnung mittels LabChart (orange). Während der 2PM kommt es durch die Aufnahme der vier Einzelbildblöcke (siehe Methodenteil, Kapitel 2.2.2.2; jeweilige Einzelbildblock-Aufzeichnung exemplarisch markiert mit B1-4) zu einer Verfälschung der photosensitiven LDF-Messung. Es verbleiben nur kurze auswertbare Messabschnitte zwischen den einzelnen 2PM-Messungen (schwarze Pfeile).

In der Analyse der auswertbaren Abschnitte der CBF-Messung zeigte sich in innerhalb beider SAB-Gruppen keine relevante Änderung der zerebralen Durchblutung vor ($t = -10$ min), während ($t = 0$ min bis $t = 20$ min) oder nach ($t = 30$ bis $t = 50$ min) der Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel (Abb. 52). So fiel der relative Wert bis Zeitpunkt $t = 50$ min in der SAB-Bay 60-2770-Gruppe auf $97,4 \pm 25,0\%$, innerhalb der SAB-Vehikel-Gruppe auf $87,4 \pm 21,6\%$ ab ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,22$). In der Sham-operierten Gruppe zeigte sich nach Beginn der Infusion von Bay 60-2770 ein kontinuierlicher und im Vergleich zu beiden SAB-Gruppen signifikanter Anstieg der zerebralen Durchblutung auf $130,7 \pm 19,4 \%$ des Ausgangswerts ($t = 50$ min; p vs. SAB + Bay60 $< 0,05$, p vs. SAB + Vehikel $< 0,01$).

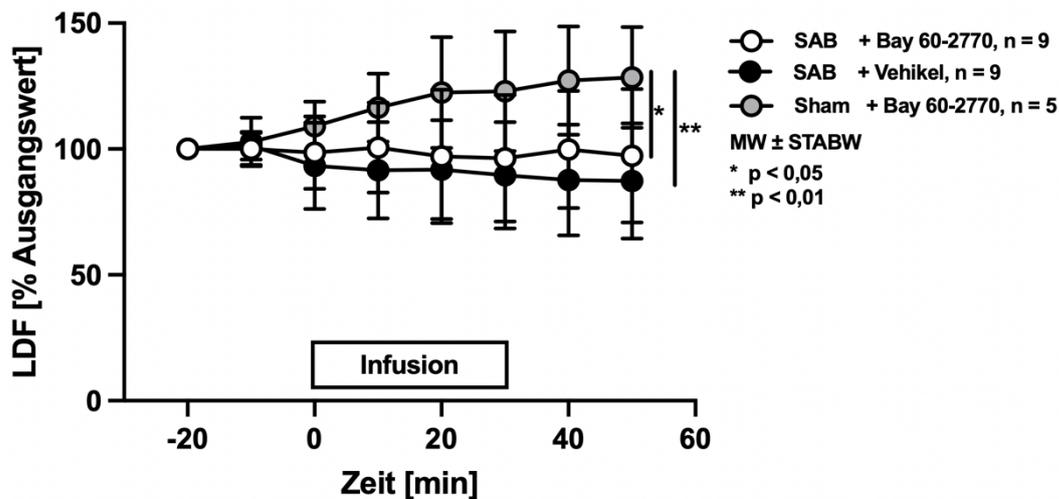


Abbildung 52: Zerebrale Durchblutung während (verblindeter) Behandlung mit Bay 60-2770 oder Vehikel, gemessen mittels LDF. Zur Auswertung standen nur eingeschränkt Messwerte zur Verfügung (siehe Abb. 51).

Aufgrund der technischen Interferenz der Durchblutungsmessung mittels LDF mit der 2-Photonen-Mikroskopie wurde nachfolgend in einer separaten Versuchsserie ohne in-vivo-Mikroskopie gezielt die Hirndurchblutung vor, während und nach Gabe von Bay 60-2770 oder Vehikel evaluiert.

3.4.1.6 Evaluation der zerebralen Durchblutung ohne in-vivo-Mikroskopie

3.4.1.6.1. Induktion der Subarachnoidalblutung

Der ICP-Ausgangswert lag nach Platzieren der intrakraniellen Messsonde in allen drei Versuchsgruppen unter 7 mmHg (SAB + Bay60: $5,3 \pm 1,5$ mmHg, SAB + Vehikel: $5,6 \pm 1,6$ mmHg, Sham + Bay60: $5,0 \pm 1,3$ mmHg, Abb. 53). In beiden SAB-Gruppen zeigte sich bei Induktion der SAB der charakterisierende ICP-Anstieg auf Werte über 60 mmHg (durchschnittliche ICP-Maximalwerte: SAB-Bay60: $81,4 \pm 10,0$ mmHg, SAB-Vehikel: $86,4 \pm 12,8$ mmHg; p vs. Sham jeweils $< 0,0001$) mit anschließendem Abfall auf Werte um 30 mmHg ($t = 15$ min; SAB + Bay60: p vs. Sham $< 0,01$; SAB + Vehikel: p vs. Sham $< 0,01$). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der ICP-Werte zwischen den beiden SAB-Gruppen ($t = 1$ min: p = 0,83; $t = 15$ min: p = 0,48). In der Durchblutungs-Messung zeigte sich in beiden SAB-Gruppen bei Induktion der SAB ein Abfall der CBF-Werte auf unter 20% des Ausgangswertes (durchschnittliche LDF-Minimalwerte: SAB-Bay60: $2,4 \pm 1,1$ %, SAB-Vehikel: $6,9 \pm 6,3$ %; p vs. Sham jeweils $< 0,0001$) mit anschließender Erholung dieser Werte in Richtung Ausgangswert. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden SAB-Versuchsgruppen ($t = 1$ min: p = 0,09; $t = 15$ min: p = 0,38). In der Sham-Gruppe zeigten sich ICP (Maximalwert: $6,1 \pm 1,3$ mmHg) und CBF (Minimalwert: $92,4 \pm 3,4$ %) über den 15-minütigen Überwachungszeitraum unverändert stabil.

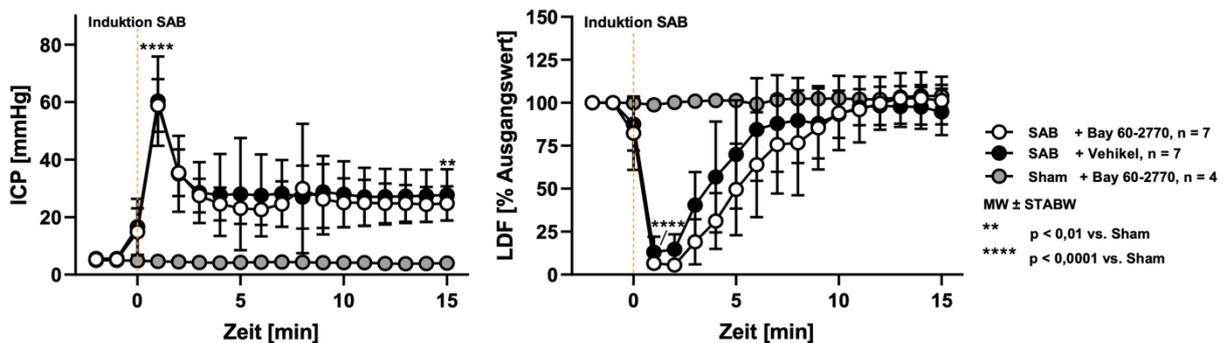


Abbildung 53: Mittlere ICP- und relative LDF-Werte der drei Versuchstiergruppen vor, während und bis 15 Minuten nach Induktion der SAB, bzw. Sham-Operation, jeweils drei Stunden vor Infusion.

3.4.1.6.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der MAP betrug in der SAB-Bay-60 2770-Gruppe zu Beginn $84,5 \pm 9,0$ mmHg und zeigte sich vor ($t = -10$ min), während ($t = 0$ min bis $t = 20$ min) und nach ($t = 30$ min bis $t = 50$ min) Infusion von Bay 60-2770 stabil mit einem Endwert von $79,8 \pm 8,3$ mmHg (p vs. $t = -20$ min: 0,24, Abb. 54). In der SAB-Vehikel-Gruppe lag der MAP-Ausgangswert bei $78,1 \pm 8,9$ mmHg. Im Verlauf zeigte sich der MAP-Wert vor ($t = -10$ min), während ($t = 0$ min bis $t = 20$ min) und nach ($t = 30$ min bis $t = 50$ min) Vehikel-Infusion ebenfalls stabil mit einem Endwert von $74,7 \pm 19,3$ mmHg (p vs. $t = -20$ min: 0,51). Der Ausgangswert der Sham-Gruppe lag bei $83,1 \pm 10,5$ mmHg. Während der Infusion kam es ab $t = 10$ min zu einem signifikanten Abfall auf einen Endwert von $68,6 \pm 6,9$ mmHg ($t = 50$ min; ab $t = 10$ min: p $< 0,05$ vs. $t = -20$ min und $t = -10$ min).

Zwischen den MAP-Werten der drei Versuchsgruppen zeigte sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

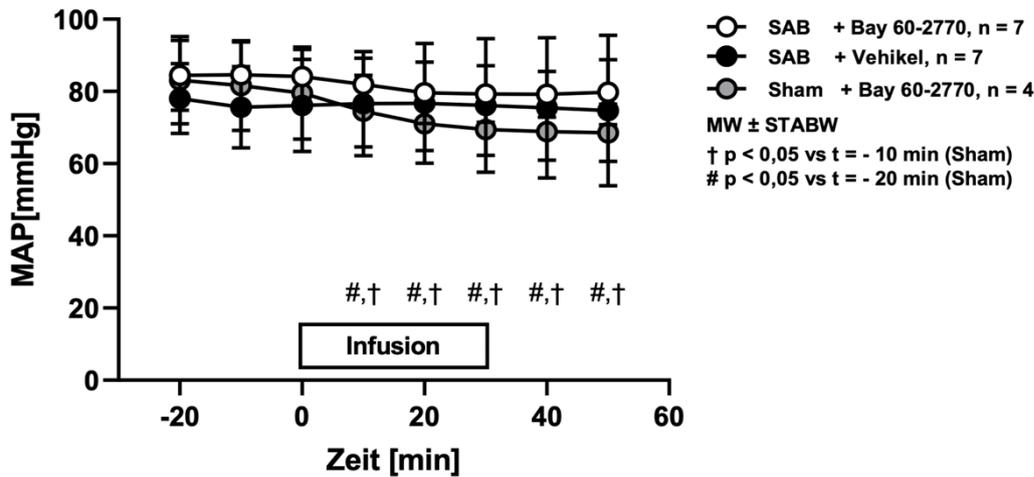


Abbildung 54: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) der drei Versuchstiergruppen während (verblindeter) Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel ohne begleitende 2PM.

3.4.1.6.3 Durchblutung im A. cerebri media-Territorium

Die zerebrale Durchblutung zeigte sich in der LDF in allen drei Versuchsgruppen vor ($t = -10$ min), während ($t = 0$ min bis $t = 20$ min) und nach ($t = 30$ min bis $t = 50$ min) der Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel stabil (Abb. 55). Dabei stieg der Wert der SAB-Bay 60-2770 Gruppe im Verlauf auf $107,6 \pm 9,7\%$ des Ausgangswerts, der Wert der SAB-Vehikel-Gruppe auf $105,1 \pm 5,9\%$. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,13$). Der Wert der Sham-Bay 60-2770-Gruppe betrug zum Versuchsende $99,9 \pm 3,3\%$, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zu den anderen Gruppen (p vs. SAB + Bay60: 0,19; p vs. SAB + Vehikel: 0,07).

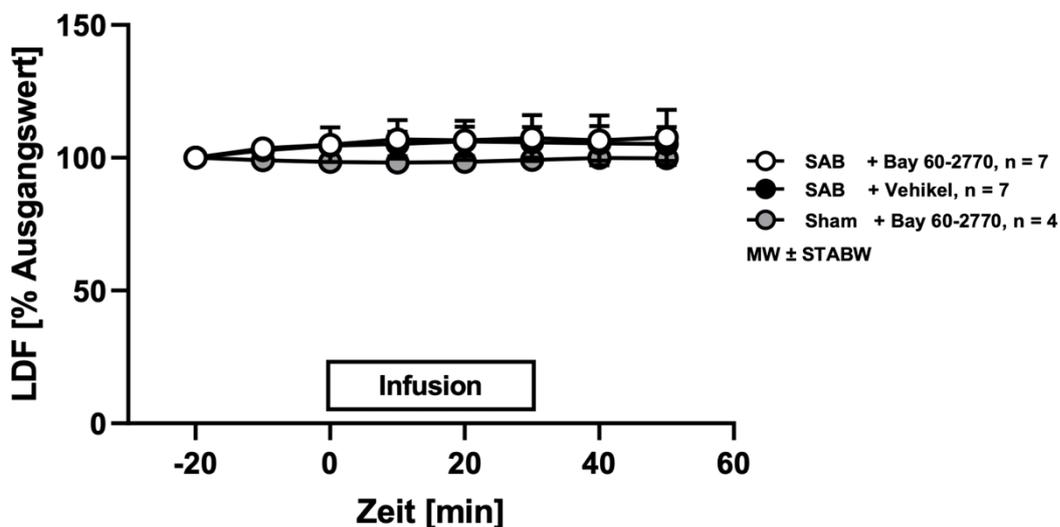


Abbildung 55: Zerebrale Durchblutung während (verblindeter) Behandlung mit Bay 60-2770 oder Vehikel, gemessen mittels LDF, ohne begleitende 2PM. Zur Auswertung standen nun die vollständigen über die Dauer des Experiments hinweg kontinuierlich erfassten LDF-Werte zur Verfügung.

3.4.2 Bay 41-2272 Versuche

3.4.2.1 Induktion der Subarachnoidalblutung

Der ICP-Ausgangswert lag zu Beginn bei $5,1 \pm 0,7$ mmHg. Nach Induktion der SAB zeigte sich bei allen Tieren der charakteristische schlagartige Anstieg auf über 60 mmHg (durchschnittlicher Maximalwert $86,7 \pm 14,2$ mmHg, p vs. -2 min < 0,001) mit anschließendem Abfall des ICPs auf Werte um 30 mmHg (p vs. -2 min < 0,001). Gleichzeitig dokumentierte sich im Rahmen der CBF Messung ein korrelierender Abfall der zerebralen Durchblutung im MCA-Gebiet auf LDF-Werte unter 20 % der Ausgangsdurchblutung (durchschnittlicher Minimalwert: $14,80 \pm 5,3$ %) mit anschließender Erholung auf nahezu Normwerte (Abb. 56).

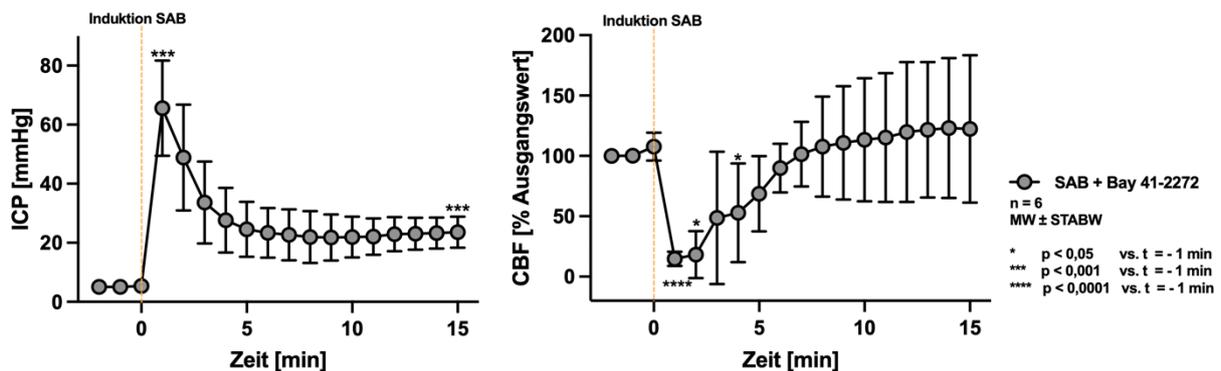


Abbildung 56: ICP und LDF-Werte der Bay 41-2272 Versuchsgruppe während Induktion der SAB.

3.4.2.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Zu Beginn lag der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in der Bay 41-2272 Versuchsgruppe bei $90,8 \pm 7,7$ mmHg (Abb. 57). Mit Beginn der ersten Dosis von $10 \mu\text{g/kg}$ KG Bay 41-2272 stieg der MAP im Laufe der 30-minütigen Infusion nicht-signifikant auf $95,93 \pm 10,14$ mmHg ($t = 20$ min; p vs. -20 min: 0,30). In der anschließenden Überwachungsphase ($t = 30 - 50$ min) sank der MAP ebenfalls nicht-signifikant auf $88,09 \pm 11,84$ mmHg ab ($t = 50$ min; p vs. -20 min: 0,63).

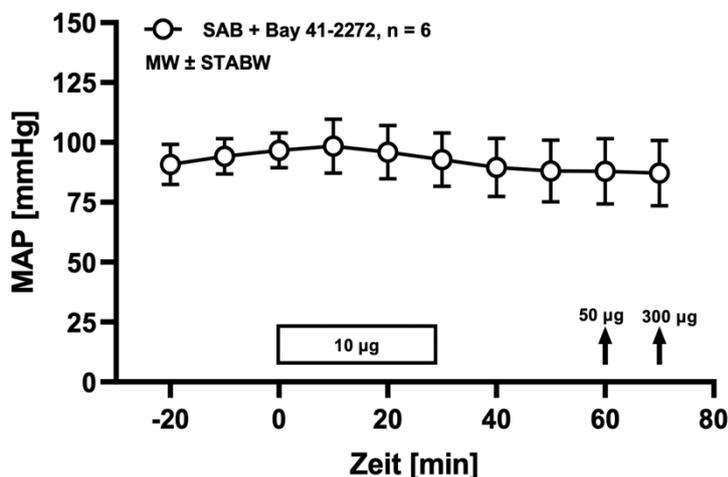


Abbildung 57: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) vor, während und nach Infusion von $10 \mu\text{g/kg}$ KG Bay 41-2272 sowie unter anschließender Dosissteigerung auf $50 \mu\text{g/kg}$ KG und $300 \mu\text{g/kg}$ KG.

Während der anschließenden Bolus-Dosissteigerung auf 50 µg/kg KG sowie 300 µg/kg KG Bay 41-2272 mit anschließender Überwachung über je zehn Minuten kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der MAP-Werte (t = 70 min, 50 µg/kg KG: 87,96 ± 12,42 mmHg, p vs. - 20 min: 0,61; t = 80 min, 300 µg/kg KG: 87,18 ± 12,40 mmHg, p vs. - 20 min: 0,36).

3.4.2.3 Durchblutung im A. cerebri media-Territorium

Die zerebrale Durchblutung im untersuchten linksseitigen Media-Territorium blieb vor, während und nach der Infusion von 10 µg/kg KG Bay 41-2272 stabil (100,8 ± 9,2 % des Ausgangswerts bei t=30 min, Abb. 58). Auch unter Dosissteigerung von Bay41 auf 50 µg/kg KG sowie 300 µg/kg KG kam es zu keiner relevanten Veränderung der gemessenen CBF-Werte (50µg: 98,7 ± 12,2%, 300 µg: 98,7 ± 12,7% des Ausgangswerts).

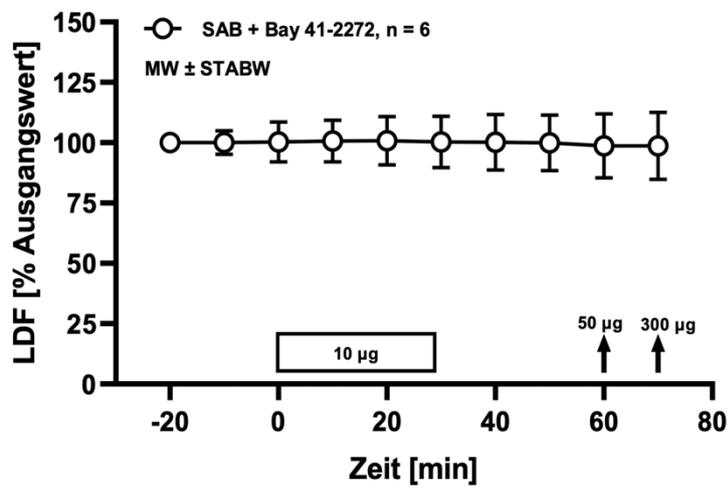


Abbildung 58: Entwicklung des relativen zerebralen Blutflusses (gemessen mittels LDF) vor, während und nach Infusion von 10 µg/kg KG Bay 41-2272 sowie unter Dosissteigerung auf 50 µg/kg KG und 300 µg/kg KG.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Modell der experimentellen Subarachnoidalblutung

Zahlreiche Tiermodelle wurden in der experimentellen Forschung zur Subarachnoidalblutung seit der Beschreibung der ersten Injektions- und Perforationsmodelle^{300,301} in den 70er Jahren entwickelt. Derzeit werden vorrangig zwei Tiermodelle verwendet: Das endovaskuläre Perforationsmodell und das Injektionsmodell.^{302,303} Dabei wird das Injektionsmodell gegenüber dem Perforationsmodell insgesamt häufiger angewendet,^{302,304} speziell im Mausmodell hat sich jedoch insbesondere das endovaskuläre Perforationsmodell etabliert.³⁰³

Das endovaskuläre Perforationsmodell beruht auf dem intravasalen Verschieben eines Filaments in der ACI bis zur Ruptur des Circulus arteriosus willisii an der Basis der MCA.^{3,249,302,305} Die genaue Durchführung dieser Methode ist in Kapitel 2.1.2 ausführlich beschrieben.

Beim autologen Injektionsmodell wird dem Versuchstier Eigenblut, bevorzugt aus der A. femoralis entnommen, und direkt in den Subarachnoidalraum gespritzt.³⁰⁶⁻³⁰⁸ Dabei existieren sowohl hinsichtlich Injektionsort als auch Frequenz verschiedene Modelle. So kann die Injektion einmalig³⁰⁸⁻³¹⁰ oder zweimalig, mit 24-48 Stunden Zeitabstand zwischen beiden Injektionen,^{306,307,309-311} und lokalisationsbezogen entweder in die Cisterna magna³⁰⁶⁻³¹¹ oder prächiasmatische Cisterna^{302,309,310,312} erfolgen. Eine entsprechende Heterogenität bezüglich der Verteilung von Blut im Subarachnoidalraum als auch der induzierten Vasospasmen ist beschrieben.^{302,310}

Anforderung an ein optimales experimentelles Tiermodell zur Forschung an Subarachnoidalblutung wurden bereits 2000 von Schwartz et al definiert.³¹³

- 1) Einheitliche Blutablagerung im Subarachnoidalraum
- 2) Gleichmäßiges Schwereausmaß der Subarachnoidalblutung
- 3) Ein einer Aneurysmaruptur möglichst nahekommender Mechanismus zur Induktion der SAB
- 4) Gleiche Blutverteilung im Subarachnoidalraum wie bei einer aneurysmatischen SAB
- 5) Leichte Durchführbarkeit
- 6) Vertretbarer Aufwand

Unter diesen Aspekten werden die Vor- und Nachteile beider Modelle deutlich:

Der wohl größte Vorteil des Injektionsmodells ist dessen niedrige Mortalitätsrate,^{306,308,310,314,315} sodass mit vertretbarem Aufwand genügend Versuchstierzahlen und Daten generiert werden können. Durch die Volumen- und/oder Geschwindigkeit-gesteuerte Injektion wird eine einheitliche Blutablagerung und ein gleichmäßiges Schwereausmaß der SAB erreicht, ebenso ist durch Injektion von Kochsalz-Lösung als Sham-Operation eine getrennte Untersuchung der Relevanz der ICP-Steigerung sowie der Blutablagerung im Subarachnoidal-Raum für pathophysiologische Veränderungen nach SAB möglich.^{302,308,310,315} Zudem ist das Modell leicht zu etablieren und kostengünstig durchzuführen.^{307,310}

Nachteil des Injektionsmodells ist die fehlende Gefäßruptur, damit fehlt eine wichtige pathophysiologische Komponente der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung. Entsprechend sind die Induktion der SAB und der konsekutive ICP-Anstieg unabhängig vom MAP und werden künstlich durch die verwendeten Infusionsvolumina und -geschwindigkeiten bestimmt.^{302,313,316} Dabei werden meist geringere ICP-Anstiege erreicht im Vergleich zu Studien mit endovaskulären Perforationsmodell. Dies entspricht einem geringeren Blutvolumen im Subarachnoidalraum mit entsprechend geringerer zerebraler Schädigung und einem nicht der klinischen Realität entsprechenden guten bis sehr guten funktionellen Outcome.^{306,314-316} Die verwendeten Volumina und Geschwindigkeiten unterscheiden sich zudem zwischen den einzelnen Studien und führen zu einer deutlichen Heterogenität der Studienergebnisse.^{302,313,316} Ein weiterer Nachteil der Methode ist die im hinteren Stromgebiet betonte Häufung von Vasospasmen. Durch die Injektion in die Cisterna magna kommt es zur vermehrten Verteilung des Blutes um die Arteria basilaris und nur geringer um das A. cerebri anterior oder media-Stromgebiet, zusätzlich kommt es zum Übertreten von Blut in den Spinalkanal.^{302,313} Auch wird häufig eine ausreichende Induktion von Vasospasmen nur bei zweimaliger Injektion erreicht.³⁰²

Das endovaskuläre Perforationsmodell zeichnet sich vor allem durch die genauere Imitation der Pathophysiologie aus. So kommt es durch die Perforation zu einer Gefäßruptur ähnlich der einer Aneurysmaruptur und einer vom Blutdruck abhängigen Subarachnoidalblutung mit entsprechend hohem und pathophysiologisch dem klinischen Verlauf beim Menschen entsprechenden ICP-Anstieg und begleitend ausgeprägtem Hirnödem.^{249,302,305,306,315,317-319} Es kommt zu einer Verteilung des Blutvolumens insbesondere im vorderen und Media-Stromgebiet und einer der humanen Klinik gleichenden Phase der Early Brain Injury mit begleitender Vasospasmenformierung.^{3,302,314}

Dieser dem klinischen Verlauf einer SAB sehr ähnliche pathophysiologische Ablauf der ausgelösten Subarachnoidalblutung bedingt auch die Nachteile dieses Modells. Da die Subarachnoidalblutung MAP-abhängig verläuft, ist sie schwer zu steuern, führt zum Übertritt eines nicht vorhersehbaren Blutvolumens in den Subarachnoidalraum und resultiert in einer starken zerebralen Schädigung mit entsprechend schlechtem funktionellen Outcome und hoher Mortalität.^{306,308,315} Entsprechend muss neben dem hohen technischen Aufwand dieser Methode auch mit höheren Versuchstierzahlen gerechnet werden.

Aufgrund der genaueren pathophysiologischen Abläufe und gleichartigen resultierenden zerebralen Gefäßschäden besitzt das endovaskuläre Perforationsmodell insbesondere hinsichtlich der Untersuchung von Early Brain Injury einen höheren translationalen Stellenwert³¹⁴ und wird trotz des höheren technischen Aufwands in dieser Arbeit verwendet.

4.1.2 Verwendung organischer Lösungsmittel

Das vom Hersteller empfohlene Lösungsmittel für Bay 60-2770 und Bay 41-2272 ist Dimethyl Sulfoxid (DMSO).^{320,321} In mehreren Publikationen wurden hiermit zufriedenstellende Lösungsergebnisse für Bay 60-2770 und Bay 41-2272 erzielt und beide Substanzen in verschiedenen Krankheitsmodellen erfolgreich eingesetzt.^{276,283,322,323}

Bereits 1975 zeigten jedoch De la Torre et al³²⁴ in einem Affenmodell eine direkte Wirkung von DMSO auf den intrakraniellen Druck (ICP). Weitere Studien bestätigten eine ICP-senkende Wirkung insbesondere nach Schädelhirntrauma und zerebralen Blutungen, sowohl im Tiermo-

dell^{325,326} als auch an Patienten.³²⁷⁻³²⁹ Ebenso konnte experimentell als auch klinisch eine Steigerung der Hirndurchblutung und des zerebralen Perfusionsdrucks unter DMSO-Therapie gezeigt werden.^{325,330,331}

Da in der vorliegenden Arbeit der intrakranielle Druck als Zielparameter der ausgelösten SAB verwendet wird und eine Erhöhung der Hirndurchblutung ein Zielparameter der pharmakologischen Intervention ist, eignet sich DMSO aufgrund eines möglichen intrinsischen pharmakologischen Effekts, der die Ergebnisse abfälschen könnte, nicht als Lösungsmittel. Es wurde ein alternatives, oben beschriebenes Lösungsprotokoll mit Ethanol und PEG etabliert. Für PEG wurde in mehreren tierexperimentellen Arbeiten ein membranstabilisierender und somit potentiell neuroprotektiver Effekt nach traumatischer ZNS-Verletzung beschrieben, jedoch ohne unmittelbaren Zusammenhang mit den funktionellen Hauptendpunkten der hier vorliegenden Studie ICP, CBF und MAP.^{332,333} Einzelne Arbeiten zeigen jedoch einen Effekt von PEG auf Gefäßpermeabilität sowie -durchmesser,^{298,299} sodass in dieser Arbeit nur der initiale Lösungsschritt mit PEG durchgeführt wurde, alle anschließenden Verdünnungsschritte mit PBS, und den potentiellen Einfluss von PEG möglichst gering zu halten. Zusätzlich zeigte sich in den Vorversuchen in der Vehikel-Kontroll-Gruppe kein Anhalt für einen Eigeneffekt dieser Lösungsmittelkombination, sodass nicht davon auszugehen ist, dass die beiden verwendeten Substanzen in der angewendeten Konzentration die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie relevant verfälscht haben.

4.1.3 Autoregulationsvorgänge als mögliche Störquelle

Das Gehirn ist ein hoch stoffwechselaktives Organ, das aufgrund fehlender eigener Energiespeichermöglichkeiten auf eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff und Energie angewiesen ist.³³⁴⁻³³⁶ Dieser hohe und kontinuierliche Energiebedarf spiegelt sich in der Verteilung des Herzzeitvolumens wider: Während das Gehirn nur 2% des Gesamtkörpergewichts ausmacht, bedarf es 15-20% des Herzzeitvolumens.³³⁴⁻³³⁷

Um diese konstante Durchblutung auch während verschiedener systemischer Perfusionssituationen aufrechterhalten zu können, findet eine konstante Gefäßautoregulation statt. Dabei ist der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) abhängig vom mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) sowie dem diesem entgegengesetzten intrakraniellen Druck (ICP) und lässt sich wie folgt mathematisch darstellen:^{334,338,339}

$$CPP = MAP - ICP$$

Die zerebrale Durchblutung (CBF) wird bestimmt vom CPP und dem zerebralen Gefäßwiderstand (cerebral vascular resistance, CVR):³³⁹

$$CBF = \frac{CPP}{CVR} \text{ somit } CBF = \frac{MAP-ICP}{CVR}$$

Anhand dieser Gleichung wird deutlich, dass zum Erhalt einer konstanten zerebralen Durchblutung sich der vaskuläre Widerstand gleichförmig zu einer Änderung im Perfusionsdruck verändern muss. Bei einem Anstieg des MAPs oder Abfall des ICPs muss es zu einem Anstieg des CVRs kommen und umgekehrt. Über diesen Mechanismus kann der CBF insbesondere in einem Bereich von 50 – 160 mmHg konstant gehalten werden.^{334,337-339} Oberhalb und unterhalb dieses Bereichs versagt eine Regulation des CVRs und der CBF verhält sich annähernd linear proportional zum MAP (Abb. 59).³³⁹

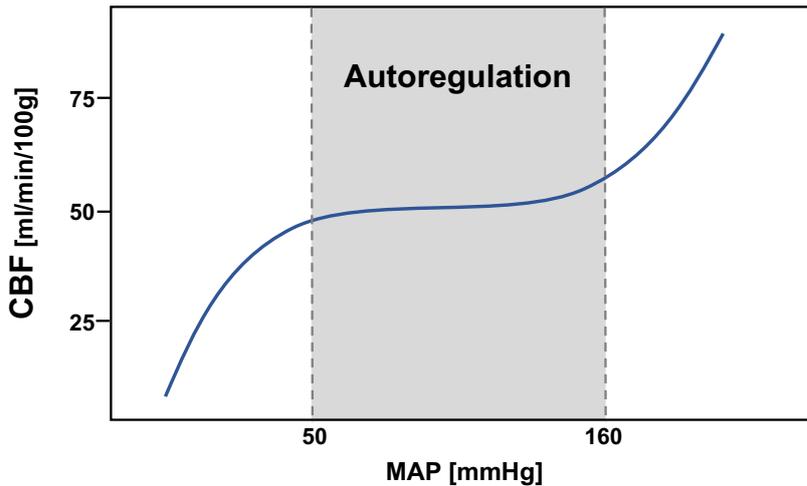


Abbildung 59: Graphische Darstellung der Autoregulation zerebraler Gefäße. Zwischen mittleren arteriellen Blutdruckwerten von 50 - 160 mmHg kann der zerebrale Blutfluss mittels Autoregulation der Gefäße konstant gehalten werden.

Der zerebrale Gefäßwiderstand wird im Wesentlichen durch vier Kompartimente beeinflusst: Myogene sowie neurogene Gefäßsteuerung, metabolische Einflüsse sowie endotheliale Signalkaskaden.³³⁸

Myogen kann bei Veränderung der Wandspannung eine kompensatorische Gegenregulation durch Aktivierung der das Gefäß umgebenden glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst werden.³³⁸ Bei erhöhtem intravasalem Druck, etwa durch schnelle intravasale Injektion oder arterielle Hypertension, können so durch gegenreaktive Vasokonstriktion Schwankungen im zerebralen Perfusionsdruck ausgeglichen und eine kontinuierliche zerebrale Durchblutung gewährleistet werden.³³⁸

Die endotheliale Gefäßregulation mit NO als ihrem Hauptmediator und dem nachfolgenden sGC-cGMP-Signalwegs wurde bereits zu Beginn der Arbeit ausführlich diskutiert.

Ebenso wie periphere werden auch zerebrale Blutgefäße sympathisch, parasympathisch und sensorisch innerviert.³³⁹ Der Einfluss dieser neurogenen Komponente ist in der Literatur vielfach diskutiert, da eine komplette sympathische oder parasympathische Denervierung der Gefäße keine relevante Beeinträchtigung der Gefäßautoregulation nach sich zieht.^{334,339}

Auch die metabolischen Parameter pO_2 , pCO_2 , Wasserstoffionen (H^+), Kalium (K^+) und Adenosin nehmen Einfluss auf den zerebralen Gefäßwiderstand und erlauben eine Anpassung des CBFs an lokale oder systemische Stoffwechselbedürfnisse.^{334,338,339}

Für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse sind dabei 1) die myogene Komponente aufgrund der intravenösen Verabreichung der Substanzen mit Veränderung des intravasalen Volumens sowie die 2) endotheliale Regulation aufgrund des zugrundeliegenden Wirkmechanismus der verwendeten Substanzen.

Insbesondere die myogene Komponente des zerebralen vaskulären Widerstands (engl. cerebrovascular resistance, CVR) ist hinsichtlich der hier durchgeführten intravenösen Volumeninfusion von Bedeutung. Bei beeinträchtigter Autoregulation der zerebralen Gefäße kann eine zu rapide und großvolumige Infusion zu einem intravasalen Druckanstieg und damit verändertem transmuralen Druckgradienten führen, der möglicherweise nicht mehr kompensiert werden kann. Als Resultat bestünde die Gefahr, unter Infusion eine vermeintlich pharmakologisch-

induzierte Vasodilatation zu beobachten, welcher jedoch eine gestörte Autoregulation der zerebralen Gefäße nach SAB zugrunde liegt.

Um diesem Effekt vorzubeugen, wählten wir zum einen ein sehr geringes Infusionsvolumen von 50 µl. Dies entspricht bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 1,5 – 1,875 ml der Versuchstiere (Referenzwert für 25g schwere Versuchstiere³⁴⁰) einem prozentualen Infusionsvolumen von 2,7 – 3,3 % des gesamtzirkulatorischen Volumens. Zur weiteren Vermeidung einer infusionsinduzierten Vasodilatation wählten wir einen Infusionszeitraum von 30 Minuten, um die Volumenbelastung weiter zu verteilen. Passend hierzu zeigte sich in den mit Vehikel-behandelten SAB-Versuchstiergruppen (siehe Ergebnis-Teil 3.4.1.5 und 3.4.1.6.3) kein signifikanter Anstieg des CBFs und somit keine infusionsinduzierte Vasodilatation.

4.1.4 Mittlerer arterieller Blutdruck, Narkoseprotokoll

Das endovaskuläre Perforationsmodell bedarf aufgrund seiner chirurgischen Invasivität einer adäquaten Anästhesie und Analgesie. Verschiedene Narkoseprotokolle wurden in der experimentellen SAB-Forschung etabliert, insbesondere Protokolle mit der Verwendung von Isofluran, Sevofluran, Barbituraten, Chloralhydrat, Ketamin/Xylazin oder Medetomidin/Midazolam/Fentanyl (MMF),^{341,342} Diese unterschiedlichen Narkoseprotokolle zeigen deutliche Unterschieden hinsichtlich der Pathophysiologie und der physiologischen Parameter nach experimenteller Subarachnoidalblutung.³⁴¹ So kommt es bei Verwendung von Isofluran und Barbituraten zu einem Verlust der Autoregulation zerebraler Gefäße sowie zu systemischer Vasodilatation mit konsekutiv erniedrigten MAP-Werten, ebenso ist ein Anstieg des ICPs unter Isofluran beschrieben.^{341,343,344} Die Verwendung von Chloralhydrat führt ebenso wie Isofluran zusätzlich zu erniedrigten MAP-Werten zu einem Verlust des Cushing-Reflex nach SAB-Induktion.³⁴¹

Beide hier verwendeten Substanzen, Bay 60-2770 und Bay 41-2272, haben das Potential den systemischen Blutdruck zu beeinflussen.^{282,287} Um diese Wirkung der beiden Substanzen bei den hier durchgeführten Experimenten als pharmakologische Nebenwirkung sicher beurteilen zu können, muss der Effekt des verwendeten Narkoseprotokolls auf den MAP als potenzieller zusätzlicher Einflussfaktor möglichst geringgehalten werden. Entsprechend der oben genannten hierfür relevanten Nebenwirkungen volatiler Anästhetika wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine Injektionsanästhesie gewählt. Da für die Dreifach-Kombination von Medetomidin/Midazolam/Fentanyl (MMF) ein nur geringer Einfluss auf MAP sowie ein Erhalt des physiologischen Cushing-Reflex nach SAB beschrieben wurde und dieses bereits vielfach erfolgreich im hier verwendeten endovaskulären SAB-Modells verwendet wurde,^{227,341,345} wurde das MMF-Protokoll im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Ein weiterer zentraler Faktor für die zerebrale Autoregulation ist der arterielle CO₂-Partialdruck (pCO₂). So führt eine Hyperkapnie mit Anstieg des pCO₂ zu einer reaktiven Vasodilatation und Steigerung der zerebralen Durchblutung, eine Hypokapnie mit Abfall des pCO₂ führt zu einer Vasokonstriktion mit Reduktion der zerebralen Durchblutung.^{346,347} Sowohl für Medetomidin, Midazolam als auch Fentanyl ist eine atemdepressive Wirkung beschrieben.³⁴⁸⁻³⁵⁰ Um eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse der zerebralen Mikrozirkulation durch eine narkose-bedingte Hypoventilation mit folgender Hyperkapnie zu vermeiden, wurden alle Versuchstiere intubiert und mit einem physiologischen Ziel-Wert des endexpiratorischen CO₂ von 30 mmHg konstant ventiliert.

4.1.5 Messung der zerebralen Durchblutung mittels Laser-Doppler-Flowmetrie und Einfluss der Zweiphotonenmikroskopie

Sowohl die Laser-Doppler-Flowmetrie als auch die Zweiphotonenmikroskopie sind lichtbasierte Verfahren. Im Rahmen der in vivo Mikroskopie-Versuche mit Bay 60-2770-Intervention zeigte sich eine deutliche Störung der Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) durch den Laser der Zweiphotonenmikroskopie, sodass die LDF-Messung bei diesen Versuchen nur eingeschränkt auswertbar ist. Zu den bekannten allgemeinen Nachteilen der LDF zählen die begrenzte Eindringtiefe, die eingeschränkte räumliche Auflösung sowie die Empfindlichkeit gegenüber Bewegungsartefakten und Veränderungen der Gewebetemperatur.^{351,352} Die Messmethode selbst beruht auf dem Doppler-Effekt, also der Veränderung einer Wellenfrequenz durch die Bewegung des jeweiligen Zielobjekts. Bei der Laser-Doppler-Flowmetrie wird das ausgesandte Laserlicht von den sich bewegenden Erythrozyten absorbiert und abhängig der Bewegungsgeschwindigkeit der fließenden Erythrozyten mit veränderter Wellenlänge reflektiert. Dieses Doppler-verschobene Laserlicht wird zusammen mit nicht-Doppler-verschobenem Laserlicht von der LDF-Sonde detektiert und analysiert.³⁵³ Da die 2PM ebenfalls auf Emission von Laserlicht basiert und die Detektion der LDF-Sonde nicht selektiv für das von ihr selbst ausgesandte Laserlicht ist, ist eine Beeinflussung des detektierten LDF-Signals durch das Laserlicht der 2PM denkbar.

Entsprechend wurde eine zweite Versuchsreihe mit ausschließlicher LDF-Messung und Bay 60-2770-Intervention durchgeführt, so dass eine durchgehende LDF-Messung möglich war. Zudem kann diese zweite Versuchsreihe als interne Kontrolle mit Reproduktion der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe gesehen werden. Somit wird die Aussagekraft der durchgeführten Intervention erhöht.

4.1.6 Westernblot-Verfahren

Alle Western Blots wurden nach einem standardisierten Methodenprotokoll durchgeführt mit Verwendung Gel-Zusammensetzungen, identischer Antikörperkonzentrationen, Blockierungs- und Antikörper-Inkubationszeiten sowie Belichtungszeiten. Dennoch ist eine perfekte Vergleichbarkeit zwischen zwei Western-Blots bei nie völlig ausschließbaren, wenn auch nur geringsten, Differenzen in den genannten Faktoren nicht erreichbar. Entsprechend ist der direkte Vergleich gemessener Proteinexpressionen von Proben auf unterschiedlichen Western-Blots nur eingeschränkt möglich (nachfolgend als Interblot-Variabilität bezeichnet). Um für diese zu adjustieren, wurden in explorativen Analysen relative Expressionsquotienten der auf einem Blot analysierten Proben gebildet (Verhältnis von intra- zu extrakortikalen Proteinexpressionen, Veränderungen der Proteinexpression relativ zu einem Naiv-Tier), um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Zusätzlich wurden die Proben zweifach analysiert: 1) Verteilung je einer gesamten Versuchstiergruppe pro Westernblot zur gezielten Darstellung der Unterschiede zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen zum entsprechenden Zeitpunkt sowie 2) Verteilung der Versuchstiergruppen über die Blots hinweg mit einem Versuchstier jeder Gruppe pro Blot zur besseren Darstellung der Veränderungen über den zeitlichen Verlauf nach SAB hinweg.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur zerebralen Gefäßisolation

Eines der Hauptziele der hier vorgelegten Studie war die Etablierung eines Gefäßisolutionsprotokolls zur gezielten Isolation der intrakortikalen Mikrozirkulation gegenüber den extrakortikalen Gefäßen durch Kombination zweier vorbeschriebener Methoden.^{246,247} Mittels des ersten Protokolls erfolgte die mechanische Isolation der extrakortikalen pialen Gefäße, gefolgt von einem kombinierten chemisch-mechanischen Protokoll zur Isolation der intrakortikalen Gefäße von Hirnparenchym.

In einem ersten Schritt konnte bereits durch mikroskopische Begutachtung die erfolgreiche Auftrennung zwischen Gefäßen und Parenchymproben verifiziert werden. Zur Validierung des Inhalts der gewonnenen Gefäß- und Parenchymproben wurde eine Western-Blot-Analyse für neuronale, endotheliale, perizytäre und astrozytäre Marker durchgeführt.

Es fanden sich stark angereicherte Signale für MAP2, ein neuronales Phosphoprotein und Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts,³⁵⁴ in den Parenchymproben, während in den Gefäßproben kaum bis kein Signal nachweisbar war, was auf eine feine Trennung von neuronalem Gewebe von Gefäßen hinweist. Gleichzeitig zeigte sich VE-Cadherin, ein hochspezifischer Marker für interzelluläre Adhärens-Verbindungen zwischen Gefäßendothelzellen,³⁵⁵ nach vollständig durchgeführtem Gefäßisolutionsprotokoll sowohl in der extra- als auch der intrakortikalen Gefäßprobe gegenüber der Parenchymprobe stark erhöht, was die erfolgreiche Anreicherung und damit Trennung von Gefäßen zu Parenchym in den jeweiligen Fraktionen unterstreicht.

Zur weiteren Charakterisierung der erhaltenen Gefäß- und Parenchymproben wurden alle Proben auch auf astrozytäre und perizytäre Marker untersucht. AQP4, ein Wasserkanal-Protein vorrangig in astrozytären Endfüßen mit direktem Kontakt zu Blutgefäßen exprimiert,³⁵⁶ war nahezu ausschließlich in Gefäß- und nicht in Parenchym-Proben nachweisbar. PDGFR β , ein Perizyten-spezifischer Antikörper,³⁵⁷ zeigte sich in Gefäßproben ebenfalls stark angereichert, in Parenchymproben zeigte sich nur ein geringes Signal.

Astrozytäre Endfüße und Perizyten bilden einen integralen Bestandteil der neurovaskulären Einheit, welche maßgeblich an der Regulation der zerebralen Durchblutung beteiligt ist.³⁵⁸ Im Rahmen der SAB-Pathophysiologie konnten mehrere Studien zeigen, dass es nach SAB zu einer frühen Beeinträchtigung der Funktion der neurovaskulären Einheit kommt.^{139,359-361} Das nahezu ausschließliche Signal für astrozytäre Endfüße sowie das stark angereicherte Signal für Perizyten in beiden Gefäßproben deutet auf eine nahezu vollständige Erhaltung der neurovaskulären Einheit während des Gefäßisolutionsprotokolls hin, wobei anscheinend einige Perizyten während des Protokolls in die parenchymalen Proben ausgewaschen wurden. Angesichts der starken Beteiligung an verschiedenen Krankheitspathophysiologien macht die Erhaltung der neurovaskulären Einheit diese angereicherten Gefäßproben noch wertvoller für weitere Analysen von funktionellen Veränderungen, z. B. in Proteinexpressionsanalysen.

Während AQP4 vorrangig im Bereich astrozytärer Endfüße exprimiert wird, ist GFAP ein Intermediärfilament und kommt vorrangig im Zytoplasma von Astrozyten, aber auch anderen Gliazellen des Nervensystems, vor.³⁵⁶ Nach Durchführung des Gefäßisolutionsprotokolls konnte GFAP hierzupassend deutlich in der Parenchymprobe nachgewiesen werden, zusätzlich jedoch auch in allen Gefäßproben.

Da GFAP im Gegensatz zu AQP4 im gesamten astrozytären Zellkörper exprimiert wird, ist es nicht überraschend, dass das GFAP-Signal nicht nur in der parenchymalen Probe, sondern auch in den Gefäßproben mit darin enthaltenen astrozytären Endfüßen nachgewiesen wurde. Interessanterweise zeigte sich das GFAP-Signal jedoch in der extrakortikalen Gefäßprobe deutlich gegenüber der Parenchymprobe erhöht. Eine mögliche Erklärung könnte die GFAP-Expression von meningealen Fibroblasten sein. Während GFAP im Allgemeinen eher als spezifischer Marker für Astrozyten angesehen wird, konnten Hainfeller et al. zeigen,³⁶² dass auch Fibroblasten GFAP exprimieren können, einschließlich der meningealen Fibroblasten. Diese erhöhten Signale könnten daher eine Kombination aus an der neurovaskulären Einheit noch anhängenden Astrozyten mit und meningealen Fibroblasten sein.

Nach Durchführung des hier präsentierten Gefäßisoliationsprotokolls zeigen sich somit in der gewonnenen intrakortikalen Gefäßprobe somit VE-Cadherin, PDGFR β und AQP4 als Marker für Endothelzellen, Perizyten und astrozytäre Endfüße angereichert, was den typischen Bestandteilen der Blut-Hirn-Schranke entspricht.³⁶³ Auch in den extrakortikalen Gefäßen zeigen sich diese Marker angereichert im Vergleich zur Parenchymprobe, zusätzlich zeigt sich hier jedoch auch GFAP im Vergleich zur Parenchymprobe angereichert. Im Gegensatz zu den Gefäßproben ist die Parenchymprobe durch eine signifikante Anreicherung von MAP2 als neuronalen Marker, ebenso findet sich ein deutliches GFAP-Signal als ubiquitärer Astrozytenmarker. Dies unterstreicht zusätzlich die erfolgreiche Isolation von Gefäßen gegenüber Parenchymgewebe, insbesondere gegenüber neuronalen Bestandteilen.

Zusammenfassend ermöglicht dieses neu etablierte kombinierte Gefäßisoliationsprotokoll eine bessere Trennung von kleinen intrakortikalen, großen extrakortikalen Gefäßen und Parenchym. Dies eröffnet die Möglichkeit der gezielteren Untersuchung von Störungen innerhalb der intrakortikalen Mikrozirkulation bei einer Vielzahl an zerebralen Pathologien ohne Einfluss von Veränderungen oder gemessenen Normwerten innerhalb der extrakortikalen Gefäße oder parenchymhaltigen Proben.

Trotz der hier durchgeführten Charakterisierung der erhaltenen Gefäß- und Parenchymproben müssen jedoch auch die Limitationen des etablierten Protokolls bedacht werden. So erfolgt die Auftrennung in die extrakortikale und intrakortikale Gefäßprobe zu Beginn des Protokolls durch mechanisches Entfernen der Meningen mit den darin enthaltenen Gefäßen. Durch diesen rein mechanischen Schritt kann keine scharfe Trennlinie gezogen werden, bis zu welchem Gefäßdurchmesser somit Proben in welche Gefäßprobe isoliert werden.

Eine Möglichkeit, dies weiter einzugrenzen, wäre die zusätzliche Darstellung der isolierten Gefäße mittels Immunhistochemischer Färbung zur gleichzeitig morphologischen Darstellung der Gefäße mittels endothelialer, neuronaler und glialer Marker. Insbesondere in Kombination mit Markern für glatte Muskelzellen sowie kann so eine genauere Differenzierung der Gefäße in Arterien, Arteriolen oder Kapillaren, ebenso in Venolen und Venen erfolgen.³⁶⁴ Dennoch erlaubt die hier präsentierte Methode die bereits deutlich selektivere Untersuchung von enzymatischen Veränderungen der Mikrozirkulation, weshalb diese im nachfolgenden Schritt zur Untersuchung der Veränderungen des eNOS-sGC Signalwegs in der Mikrozirkulation nach SAB verwendet wurde.

4.2.2 Charakterisierung der Veränderungen des vaskulären NO-sGC-Signalwegs nach experimenteller SAB

4.2.2.1 Methodisch-bedingte Unterschiede zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen

Eine Dysfunktion des eNOS-NO-sGC Signalwegs wird als relevanter Mechanismus der Pathophysiologie der Early Brain Injury nach SAB betrachtet.¹⁰¹ Während experimentelle *in-vivo* Imaging-Studien bereits die direkte Untersuchung der für die EBI charakteristischen Mikrovasospasmen auf Ebene der Mikrozirkulation erlauben, wurden Untersuchungen zu mikrozirkulatorischen Gefäßveränderungen auf proteinchemischer Ebene meist stellvertretend an besser zugänglichen pialen Gefäßen (insb. A. basilaris) oder Gesamthirn-Lysaten untersucht.²⁴¹⁻²⁴⁵ Eine Untersuchung der Veränderungen solcher proteinchemischer Veränderungen gezielt in der Mikrozirkulation gestaltete sich bislang jedoch technisch schwierig.

Mit Etablierung des neuen Gefäßisoliationsprotokolls konnte im Rahmen der hier vorgelegten Studie Veränderungen des eNOS-NO-sGC Signalwegs in intrakortikalen Gefäßen durchgeführt werden, ohne auf stellvertretende Großgefäße, wie die A. basilaris, oder Gesamthirn-Lysate mit beigemengtem Parenchym zurückgreifen zu müssen.

Hierbei zeigte sich unabhängig der gewählten Versuchsgruppe eine deutlich höhere Proteinkonzentration für sGC und eNOS in den intrakortikalen Gefäßen gegenüber den extrakortikalen Gefäßen. Dies ist am ehesten durch die zu erwartende höhere Dichte an Kapillaren und Arteriolen in der intrakortikalen Gefäßprobe zu erklären, wohingegen sich in der extrakortikalen Gefäßprobe mikroskopisch sichtbar vorrangig großlumige Gefäße sowie begleitend meningeale Strukturen befinden. Während Arteriolen und Kapillaren primär aus Endothelzellen, Perizyten, im Bereich des Gehirns im Rahmen der neurovaskulären Einheit zusätzlich astrozytären Endfüßen und wenigen glatten Gefäßmuskelzellen (Arteriolen) bestehen, nimmt mit zunehmender Gefäßgröße der relative Anteil an Gefäßmuskelzellen und insbesondere elastischem Bindegewebe zu.³⁶⁴ Die beobachtete relativ geringere eNOS und sGC Konzentration in der extrakortikalen Gefäßprobe ist somit zu einem Anteil auch auf einen relativ höheren Anteil an elastischem Gefäßbindegewebe und meningealen Strukturen gegenüber der intrakortikalen Gefäßprobe zurückzuführen, unterstreicht jedoch die erreichte Mehranreicherung intrakortikaler und mikrozirkulatorischer Gefäße in der intrakortikalen Gefäßprobe und den hiermit erreichten Mehrgewinn hinsichtlich der gezielten Analyse der Mikrozirkulation anhand des neu etablierten Gefäßisoliationsprotokolls.

Hinsichtlich der pSer1177-vermittelten eNOS-Aktivierung fand sich keine allgemeine Erhöhung in den intrakortikalen gegenüber den extrakortikalen Gefäßen. Diese wird jedoch auch nicht auf die Gesamtproteinkonzentration normalisiert (β -Actin), sondern auf die jeweilige in der Probe vorhandene eNOS. Ein ähnlicher Effekt wie oben beschrieben ist somit nicht zu erwarten.

4.2.2.2 Spezifische Veränderungen des eNOS-NO-sGC Signalwegs nach SAB in intra- und extrakortikalen Gefäßen

Trotz der allgemeinen Erhöhung von eNOS und sGC in intrakortikalen Gefäßproben zeigte sich diese 3h und 24h nach SAB deutlicher ausgeprägt. Um die Veränderungen nach SAB in

der Mikrozirkulation deutlicher darzustellen und gleichzeitig für die Interblot-Variabilität bei jeweils einer gesamten Versuchsgruppe pro Western-Blot zu korrigieren, analysierten wir die relative sGC- und eNOS-Proteinexpression in intrakortikalen Gefäßen im Verhältnis zu den jeweiligen extrakortikalen Gefäßen. Hier zeigte sich bei 24 h nach SAB eine relative, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der sGC-Expression in den intrakortikalen Gefäßen. Zusätzlich zeigte sich zunächst eine Zunahme der relativen pSer1177-vermittelten eNOS-Aktivierung in intrakortikalen Gefäßen 3h nach SAB gegenüber Sham-operierten Tieren, gefolgt von einer signifikanten und progredienten Abnahme 24 bis 72 Stunden nach SAB.

Eine Dysfunktion der eNOS im Rahmen der EBI nach SAB wurde bereits in mehreren Studien diskutiert, als mögliche Ursachen wurden unter anderem oxidativer Stress und Mangel an Ko-Faktoren diskutiert.^{206,210} Der deutliche Abfall des Anteils an pSer1177-eNOS in den intrakortikalen Gefäßen in dieser Studie zeigt zusätzlich eine Störung der aktivierenden Phosphorylierung von eNOS als Pathomechanismus der eNOS-Dysfunktion während EBI an.

Zur gezielteren Darstellung des zeitlichen Verlaufs der sGC-, eNOS-Expression und eNOS-Aktivierung nach SAB wurden die Gefäßproben im nächsten Schritt entsprechend im Sinne von Zeitreihen (pro Western-Blot ein Versuchstier aus jeder Versuchsgruppe) aufgetragen. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der sGC-Proteinkonzentration in intrakortikalen Gefäßen 24h nach SAB gegenüber naiven und Sham-operierten Tieren. Ein ähnlicher, jedoch geringerer Effekt zeigte sich für eNOS. Auch nach explorativer Korrektur für die Interblot-Variabilität zeigte sich eine relative Erhöhung der sGC- und eNOS-Proteinexpression in intrakortikalen Gefäßen 24h nach SAB.

Die hier ausschließlich in intrakortikalen Gefäßen beobachtete signifikante Erhöhung der sGC-Proteinkonzentration zusammen mit dem begleitend beobachteten Trend einer erhöhten eNOS-Expression 24 Stunden nach SAB zeigt eine kompensatorische Hochregulierung dieser beiden Enzyme insbesondere in der intrakortikalen Mikrozirkulation, nicht jedoch in den extrakortikalen Gefäßen im Rahmen der Early Brain Injury nach SAB an. Diese während der EBI selektiv in den intrakortikalen Gefäßen beobachtete Veränderung ist gut vereinbar mit den Ergebnissen von *in-vivo* Imaging Studien,^{228,359} die während EBI ebenfalls vorrangig eine Störung der Mikrozirkulation nachweisen konnten bei bekannter erst später auftretender Vasospasmus-Formation der großen extrakortikalen Gefäße.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Studie erstmalig mittels proteinchemischer Methoden gezeigt werden, dass es nach SAB während EBI zu Veränderungen der sGC- und eNOS-Proteinexpression speziell in den intrakortikalen Gefäßen, jedoch noch nicht in den extrakortikalen Gefäßen kommt. Dies unterstreicht die Relevanz der gezielten Untersuchung der intrakortikalen Mikrozirkulation, sowohl für pathophysiologische Prozesse als auch für therapeutische Ansätze nach SAB. Ebenso konnte eine reduzierte Aktivierung der eNOS durch pSer1177-Phosphorylierung als weiterer Pathomechanismus der eNOS-Dysfunktion in intrakortikalen Gefäßen nach SAB identifiziert werden.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Analyse von sGC und eNOS mittels Westernblot zunächst lediglich eine Aussage über die Proteinexpression als solche zulässt, nicht jedoch über deren jeweilige Funktionalität. Mit der Analyse von pSer1177 konnte der Anteil an pSer1177-aktiviertem eNOS untersucht werden, inwieweit dieser Anteil der eNOS jedoch auch funktionell aktiv ist, kann nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden. Hierfür müsste

eine Analyse der produzierten NO-Level ergänzt werden. Zudem besitzt eNOS multiple aktivierende sowie deaktivierende Phosphorylierungsstellen, welche sich zusätzlich auf die Aktivität der eNOS auswirken können.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Die Veränderung dieser zusätzlichen Phosphorylierungsstellen während EBI sollte weiter untersucht werden.

Da es nach SAB aufgrund vermehrten oxidativen Stresses³⁶⁵ zu einer vermehrten Degradation von sGC kommen kann,^{366,367} kann trotz Nachweis von sGC mittels Untereinheiten-spezifischer sGC Antikörper im Westernblot die gesamte sGC möglicherweise bereits funktionslos in Untereinheiten degradiert vorliegen. Zum Funktionsnachweis könnte beispielsweise die Veränderung der cGMP-Konzentration in den intra- und extrakortikalen Gefäßen nach SAB mit etablierten ELISAs untersucht werden.

4.2.3 Effekt der sGC nach experimenteller Subarachnoidalblutung

4.2.3.1 Erwarteter Wirkmechanismus der sGC-modulierenden Substanzen nach experimenteller Subarachnoidalblutung

Beide in dieser Studie eingesetzten Substanzen führen zu einer Stimulation der löslichen Guanylatzyklase: Während Bay 60-2770 als sGC-Aktivator insbesondere auf die oxidierte und somit inaktive Form der sGC wirkt, führt Bay 41-2272 zu einer Stimulation der physiologisch reduzierten sGC.^{268,269} Erfolgreiche Stimulation der sGC führt über Synthese von cGMP mit anschließender cGMP-vermittelter Phosphorylierung und Aktivierung multipler nachgeschalteter intrazellulärer Signalwege unter anderem zur im Rahmen dieser Studie untersuchten Vasodilatation notwendigen Relaxation der glatten Muskelzellen. Nach SAB kommt es jedoch durch Störung des NO-sGC-cGMP-Signalwegs zu Vasokonstriktion mit Formierung von Mikrovasospasmen in Form von perlschnurartigen Mikrovasospasmen.^{101,207} Die Abhängigkeit dieser Mikrozirkulationsstörung insbesondere vom Vorliegen eines NO-Mangels konnte bereits in zahlenreichen tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden, ebenso die mutmaßliche Verbesserung der Mikrozirkulation durch NO-Zufuhr.^{227,368-370}

Da oxidativer Stress ein Bestandteil der frühen posthämorrhagischen Hirnschädigung nach SAB ist³⁶⁵ und entsprechend von einem vermehrten Vorliegen oxidiertes sGC auszugehen ist, wurde der Großteil dieser Studie mit einem sGC-Aktivator durchgeführt. Hierfür wurde mit Bay 60-2770 ein potenter Aktivator²⁴⁰ zur Generierung möglichst eindrücklicher Effekte ausgewählt. Es wurde dennoch auch der sGC-Stimulator Bay 41-2272 untersucht, um den Anteil der Stimulation noch im physiologisch reduzierten Zustand vorliegender sGC nach SAB mit beurteilen zu können.

Eine erfolgreiche Stimulation der sGC sollte ähnlich zu der von Terpolilli et al.²²⁷ beobachteten Vasodilatation nach Gabe von inhalativem NO zu einer Reduktion der Vasospasmen mit Vasodilatation führen. Das funktionelle Korrelat sollte durch Verbesserung der Mikrozirkulationsstörung eine beobachtbare Zunahme der zerebralen Durchblutung sein.

4.2.3.2 Wirkung des sGC-Aktivators Bay 60-2770 auf die Mikrozirkulationsstörung nach experimenteller SAB

Gruppeninterne Vorversuche ergaben die Zieldosis von 10 µg/kg KG für eine intravenöse Verabreichung von Bay 60-2770. Unter höheren Dosen wurde in gruppeninternen Vorversuchen in gesunden Tieren ein systemisch relevanter vasodilatativer Effekt mit Abfall des mittleren

arteriellen Blutdrucks verzeichnet, welche diese Dosierung für die Pharmakotherapie bei SAB aufgrund der Gefahr einer systemischen Hypotension mit folglich reduziertem zerebralem Perfusiondruck ausschließen. Unter der entsprechend gewählten Dosis von 10 g/kg KG, verabreicht über 30 Minuten, zeigte sich keine quantitative Verbesserung der Mikrovasospasmen drei Stunden nach SAB bei fehlender signifikanter Veränderung der absoluten und relativen Spasmenanzahl, sowohl innerhalb der Interventionsgruppe als auch im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe. Qualitativ zeigte sich ebenfalls keine Verbesserung der Mikrovasospasmen im Sinne einer Verschiebung der Spasmenstärke hin zu einem geringeren Schweregrad.

Eine generalisierte Vasodilatation als therapeutischer Effekt kann bei ausschließlicher Auswertung der punktuellen Einengungen der Mikrovasospasmen durch eine erhaltene Konstriktions-/Baselinedurchmesser-Ratio kaschiert werden. Daher führten wir eine Analyse des allgemeinen Gefäßdurchmessers mit Verlaufsbeobachtung unter Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel durch. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied bei der mit Bay 60-2770 behandelten SAB-Gruppe, weder im zeitlichen Verlauf innerhalb der Gruppe noch im Vergleich zur Vehikel-kontrollierten SAB-Gruppe. Somit zeigt Bay 60-2770 in der verabreichten Dosis auch in Hinblick auf eine allgemeine Vasodilatation nach SAB keine therapeutische Wirkung. Interessanterweise zeigte sich auch der mittlere arterielle Gefäßdurchmesser in der Sham-operierten-Kontrollgruppe unter Bay 60-2770-Therapie unverändert, so dass die fehlende therapeutische Wirkung nicht primär im Zusammenhang mit der SAB-Pathologie zu stehen scheint.

Bei Interferenz durch die laserbasierte Zweiphotonenmikroskopie wurde in einer zweiten separaten Versuchsreihe mittels Laser-Doppler-Flowmetrie die zerebrale Durchblutung als physiologisches Korrelat einer möglichen Verbesserung der Mikrozirkulation gemessen. Auch hier zeigte sich keine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf innerhalb der SAB-Gruppe unter oder nach der Bay 60-2770-Infusion. Da sich auch kein signifikanter Unterschied zur Vehikel-behandelten SAB-Gruppe zeigte, kann auch nicht von einem protektiven Effekt von Bay 60-2770 im Sinne einer Stabilisierung oder eines Erhalts der zerebralen Durchblutung ausgegangen werden. Da auch in dieser zweiten Versuchsreihe die Sham-operierte Gruppe keine signifikante Veränderung unter Bay 60-2770-Therapie zeigte, scheint erneut nicht die SAB-Pathologie ursächlich für die fehlende therapeutische Wirkung zu sein.

Im Rahmen der frühen posthämorrhagischen Hirnschädigung nach SAB ist eine gestörte Autoregulation der zerebralen Gefäße bekannt.^{95,371} Eine durch sGC-Aktivierung induzierte systemische Vasodilatation mit Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks könnte so zu einer fehlenden oder zu geringen Reaktion der zerebralen Gefäße führen. Dies könnte sich in einem trotz sGC-Stimulation unveränderten CBF bzw. bildmorphologisch gleichbleibende Vasokonstriktion äußern und einen vorhandenen zerebralen Wirkeffekt kaschieren. Hiergegen sprechen jedoch einerseits die konstanten Werte des MAP-Monitorings während Infusion von Bay 60-2770 in der SAB-Gruppe, ebenso der fehlende Effekt auf den CBF der Sham-operierten Gruppe mit Bay 60-2770-Therapie. Die zerebrale Autoregulation der Sham-operierten Gruppe sollte intakt sein und einen vorhandenen zerebralen Wirkeffekt von Bay 60-2770 aufzeigen.

Somit zeigt sich in dieser Studie sowohl bildmorphologisch als auch in einer zweiten Versuchsreihe mittel CBF-Messung kein therapeutischer Effekt der verabreichten Bay 60-2770-Dosis auf die Mikrozirkulationsstörung nach SAB.

Mehrere potenzielle Ursachen müssen hierfür diskutiert werden. So musste die initial angestrebte Dosis von 50 µg/kg KG Bay 60-2770 in dieser Studie aufgrund von Vorversuchen mit hierunter deutlich induzierter arterieller Hypotension auf 10 µg/kg KG reduziert werden. Diese reduzierte Dosis ist möglicherweise zu gering, um eine ausreichende Wirkung auf zerebrale Gefäße zu zeigen. Da jedoch auch klinisch eine arterielle Hypotension mit konsekutiver CPP-Minderung eine gefürchtete und zu vermeidende Komplikation nach SAB ist,³⁷² limitiert diese Nebenwirkung nicht nur diese Studie, sondern auch einen potenziellen klinischen Einsatz.

Weiterhin führt oxidativer Stress, wie im Rahmen der Early Brain Injury vorkommend,³⁶⁵ zu einer Verschiebung des sGC-Redox-Equilibriums hin zu einem zunehmenden Vorliegen oxidiertes sGC.²⁶⁹ Oxidierte und Häm-freie sGC werden vermehrt über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut,^{366,367} vermutlich vermittelt über die Ubiquitin E3 Ligase „C-terminus of Hsc70-interacting protein“ (CHIP).^{373,374} Die Kinetik dieser sGC-Degradation nach experimenteller SAB ist noch nicht hinreichend untersucht, könnte jedoch eine mögliche pharmakologische Intervention beeinträchtigen. Eine in-vitro-Studie der durch radikale Sauerstoffspezies (ROS)-induzierten sGC-Degradation in urethralen glatten Muskelzellen zeigte interessanterweise einen stabilisierenden Effekt von Bay 60-2770 auf den ROS-induzierten sGC-Abbau,²⁷⁹ was einen früheren Interventionszeitpunkt nach experimenteller SAB zur Diskussion stellt.

Im Gehirn werden vor allem die beiden sGC-Isoformen $\alpha_1\beta_2$ (NO-GC 1) und $\alpha_2\beta_2$ (NO-GC 2) exprimiert.^{375,376} Dabei ist eine unterschiedliche Verteilung sowohl neuronal hinsichtlich Prä- und Postsynapse bekannt,³⁷⁷⁻³⁸¹ als auch hinsichtlich der Expression in verschiedenen Hirnregionen. So findet sich NO-GC 1 betont in Striatum und Cerebellum, NO-GC 2 insbesondere im Hippocampus.³⁸² In vaskulärem Gewebe wiederum ist insbesondere NO-GC 1 exprimiert.³⁸³ Ob dies auch auf die zerebrale Mikrozirkulation übertragbar ist, oder auch hier regionsspezifische Unterschiede bestehen, ist bislang nicht bekannt. Zusätzlich besteht eine deutliche Heterogenität innerhalb der sGC-Untereinheiten mit unterschiedlichen Splicing-Varianten in verschiedenen humanen Geweben als Grundlage gewebespezifischer sGC-Aktivität.³⁸⁴ Welche Isoform und in welcher Splicing Variante sGC in der zerebralen Mikrozirkulation vorliegt, ist also nicht abschließend bekannt und könnte einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie haben. Während für manche sGC-Agonisten eine Selektivität hinsichtlich der sGC-Isoformen bekannt ist,³⁸² werden von Bay 60-2770 und auch Bay 41-2272 beide sGC-Isoformen stimuliert.^{323,382} Trotz der in verschiedenem Gewebe bestehenden sGC-Heterogenität sollte diese also keinen Einfluss auf einen potenziellen Wirkungseffekt innerhalb dieser Studie haben.

4.2.3.3 Wirkung des sGC-Stimulators Bay 41-2272 auf die zerebrale Durchblutung nach experimenteller SAB

Bay 41-2272 zeigt neben der über sGC-Stimulation vermittelten vasodilatatorischen Wirkung^{287,294} auch antiinflammatorische Effekte^{275,295} und scheint zusätzlich, wenn auch in geringerem Ausmaß,²⁹⁷ über Inhibition von PDE5 zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration zu führen.²⁹⁶ Im Gegensatz zu Bay 60-2770 wirkt Bay 41-2272 jedoch nur auf die reduzierte sGC,^{268,269,294} stimuliert jedoch ebenfalls beide sGC-Isoformen, NO-GC 1 und NO-GC 2.³⁸² Exploratorisch führten wir einen Therapieversuch mit Bay 41-2272 durch, auch zur Mitbeurteilung der Stimulation noch im reduzierten Zustand vorliegender sGC nach SAB. Dabei zeigte sich unter der Infusion von 10 µg/kg KG Bay 41-2272 keine Veränderung der zerebralen Durchblutung im Stromgebiet der A. cerebri media. Auch unter Steigerung der Dosis auf 50 µg/kg KG und einer Maximaldosis von 300 µg/kg KG zeigte sich keine signifikante Verbesserung der

zerebralen Durchblutung. Der systemische Blutdruck zeigte sich unter allen drei Dosen ebenfalls konstant. In den gruppeninternen Vorversuchen zeigte sich in gesunden Kontrolltieren jedoch eine Steigerung der zerebralen Durchblutung unter der Maximaldosis. Das fehlende Ansprechen auf die Infusion scheint somit durch die SAB-Pathologie bedingt zu sein, vermutlich aufgrund eines vermehrten Vorliegens von oxidiertem sGC. Dies steht weiterhin im Einklang mit einer nur untergeordneten Rolle der PDE5-Inhibition²⁹⁷ als Wirkmechanismus. Einschränkung ist jedoch zu sagen, dass diese Versuchsreihe exploratorisch ohne Sham-Bay41-2272- oder SAB-Vehikel-kontrollierte Vergleichsgruppen durchgeführt wurde.

4.2.3.4 Alternativer NO-vermittelte Signalwege zur Vasodilatation

Neben Dosislimitation der eingesetzten Substanzen sowie frühzeitiger sGC-Degradation nach SAB muss auch ein alternativer cGMP-unabhängiger Wirkungsweg des inhalativen NOs nach SAB²²⁷ überlegt werden.

Wie bereits unter 1.5.1 beschrieben führt der NO-sGC-cGMP-Signalweg über verschiedene Regulationsmechanismen zu einer verminderten Kontraktilität der glatten Muskelzellen mit resultierender Vasodilatation. Neben dem oben beschriebenen Myosin Leichtketten Signalweg sind auch verschiedene Ionenkanäle an der Kontraktilität der SMCs beteiligt, die teilweise ebenfalls cGMP abhängig sind.

Bereits 1994 untersuchten Bolotina et al.³⁸⁵ einen direkten Effekt von NO auf Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle (BK-Kanäle) vaskulärer glatter Muskelzellen. Dabei zeigten sie einen persistierend signifikanten vasodilatativen Effekt von NO auch unter Inhibition von sGC durch Methylenblau. Diese während sGC-Blockade durch NO weiterhin induzierte Vasodilatation konnte durch Einsatz von Charybdotoxin, einem BK-Kanal-spezifischen Inhibitor, aufgehoben werden. Ähnliche Ergebnisse konnten unter Blockade von sGC durch 1H-[1,2, 4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one (ODQ) gezeigt werden,³⁸⁶ so dass eine direkte und cGMP-unabhängige Stimulation der an der Vasodilatation beteiligten BK-Kanäle durch NO diskutiert wird.³⁸⁷ Neben dieser direkten Stimulation der BK-Kanäle scheint auch eine Inhibition von 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) durch NO eine Rolle bei der BK-Aktivität zu spielen. 20-HETE wird von glatten Muskelzellen Cytochrom-P450-vermittelt aus Arachnoidonsäure synthetisiert und führt über Inhibition von BK-Kanälen zu Vasokonstriktion.³⁸⁸ Unter sGC-Blockade konnten mehrere Studien experimentell einen inhibitorischen Effekt von NO auf 20-HETE zeigen, der zu einer cGMP-unabhängigen NO-vermittelten Vasodilatation führte.³⁸⁹⁻³⁹¹

Insgesamt führt NO somit über drei mögliche Signalwege zu der an einer Vasodilatation beteiligten BK-Kanal-Aktivierung (vgl. Abb. 60):³⁸⁷

- 1) sGC-cGMP-PKG vermittelte Phosphorylierung der BK-Kanäle
- 2) Direkte NO-vermittelte Aktivierung der BK-Kanäle
- 3) NO-vermittelte Inhibition von 20-HETE mit Disinhibition der BK-Kanäle

Dabei scheint NO nicht selektiv einen dieser Signalwege zu bedienen, sondern über eine Kombination dieser zu wirken. So konnte insbesondere auch in zerebralen Gefäßen mit Untersuchung der A. cerebri media von Ratten und Hasen sowohl in vitro als auch in vivo eine gleichzeitig stattfindende cGMP-abhängige und cGMP-unabhängige BK-Kanal-vermittelte Vasodilatation nachgewiesen werden.³⁹¹⁻³⁹³ Der unter inhalativem NO gesehene vasodilatative Effekt nach SAB²²⁷ beruht möglicherweise also, wenn auch nur teilweise, auf einem sGC-cGMP-unabhängigem Mechanismus.

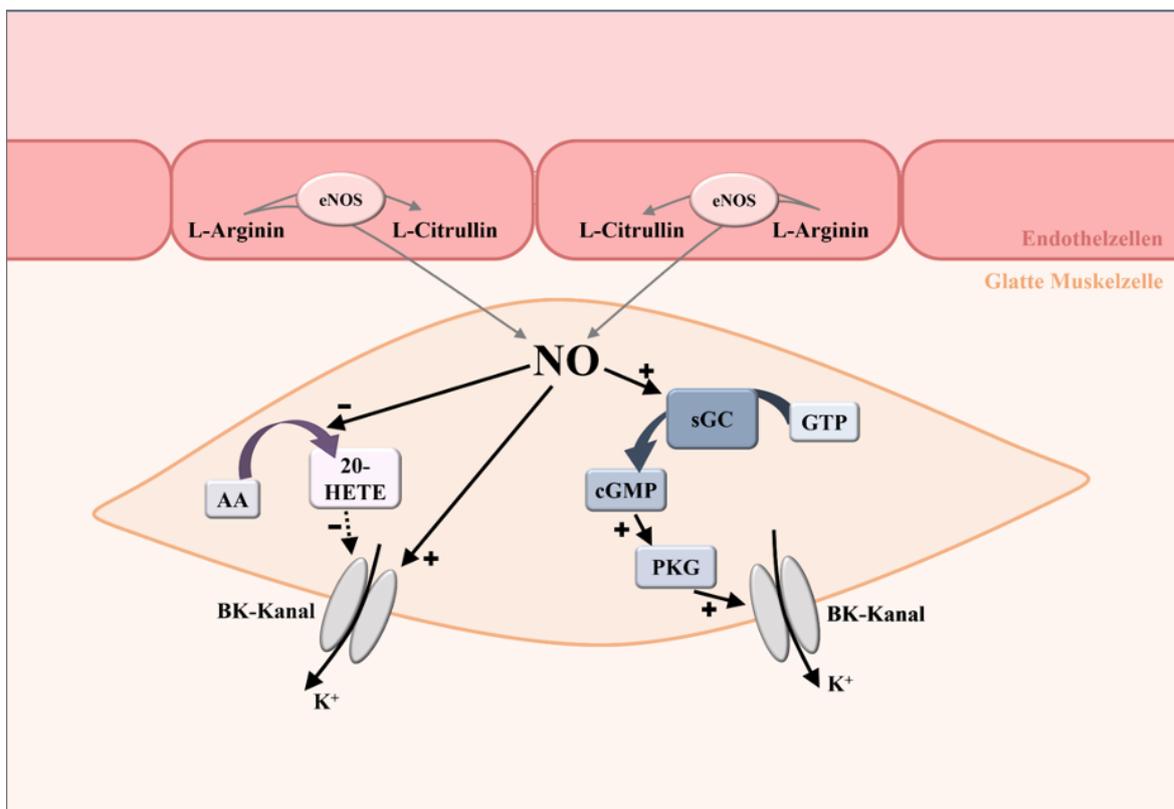


Abbildung 60: Mögliche Wirkmechanismen von NO auf BK-Kanäle mit resultierender vasodilatatorischer Wirkung: NO kann sGC-cGMP-abhängig über eine Aktivierung der PKG zur Phosphorylierung und Aktivierung von BK-Kanälen führen. Über eine Hemmung der 20-HETE-Synthese aus

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Subarachnoidalblutung (SAB) zählt zu den hämorrhagischen Schlaganfällen und ist durch eine hohe Letalität sowie eine schlechte funktionelle Prognose bei Überlebenden gekennzeichnet. Ursächlich ist häufig die Ruptur eines Aneurysmas eines intrakraniellen arteriellen Gefäßes.⁴⁻⁶ Hierbei kommt es in der Regel zu einem plötzlichen Anstieg des intrakraniellen Drucks, Abfall des zerebralen Perfusionsdrucks sowie der zerebralen Durchblutung (CBF) mit Gefahr der globalen zerebralen Ischämie, gestörter Gefäß-Autoregulation sowie mechanischer Kompression durch Hämatombildung. Die innerhalb der ersten 72 Stunden anschließend auftretenden Veränderungen werden unter dem Begriff der Early Brain Injury (EBI) zusammengefasst und umfassen morphologische Gefäßveränderungen, metabolisches Versagen, eine gestörte Ionen-Homöostase, oxidativen Stress, Zellapoptose und inflammatorische Vorgänge.^{92,93,95}

Als ein wesentlicher Bestandteil der Pathophysiologie der EBI wurden in den letzten Jahren Vasospasmen der Mikrozirkulation des Gehirns identifiziert. Während Vasospasmen der großen intrakraniellen Gefäße erst ab Tag 3-14 nach SAB beobachtet werden,⁷³⁻⁷⁶ treten diese Mikrovasospasmen bereits früh nach der initialen Blutung auf und konnten in mehreren experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen werden.¹⁰³⁻¹⁰⁷ Es wird vermutet, dass eine Dysfunktion des eNOS-NO-sGC Signalwegs zur Ausbildung dieser Mikrovasospasmen beiträgt, da eine experimentelle Erhöhung der NO-Spiegel in mehreren tierexperimentellen Studien zu einer Verbesserung der Durchblutung der zerebralen Mikrozirkulation und der verbleibenden neurologischen Defizite führte. Eine dedizierte proteinchemische Untersuchung der Veränderungen des eNOS-NO-sGC in den Gefäßen der Mikrozirkulation war bislang technisch nicht möglich, bisherige Untersuchungen griffen meist stellvertretend auf die Untersuchung großer, extrakortikaler Gefäße oder auf Gesamthirn-Lysate inklusive Parenchyms zurück.

Dennoch deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass eine Aktivierung des eNOS-NO-sGC-Signalwegs ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Mikrozirkulation und zur Reduktion der Schäden nach einer SAB sein könnte.

Im Rahmen der hier vorgelegten Doktorarbeit wurde zunächst ein neues mechanochemisches Protokoll zur gezielten Isolation der intrakortikalen Gefäße inklusive der Mikrozirkulation etabliert. Die dabei gewonnenen Proben mit intrakortikalen Gefäßen, extrakortikalen Gefäßen und abgetrenntem Parenchym wurden anschließend im Westernblot-Verfahren mittels endothelialer, neuronaler, perizytärer und astroglialer Marker charakterisiert und validiert. In den Proben der intrakortikalen und extrakortikalen Gefäße zeigte sich dabei eine erfolgreiche Isolation der gesamten neurovaskulären Einheit bestehend aus vaskulären Endothel-Zellen, Perizyten und Astrozyten-Endfüßen, bei nur gering nachweisbaren verbleibenden neuronalen Parenchymzellen. Eine erhöhte Expression von GFAP, einem vorrangig astrozytären Parenchymmarker, in der extrakortikalen Gefäßprobe ist vermutlich auf Ko-Expression von GFAP durch meningeale Fibroblasten zu erklären.

Passend zur erfolgreichen Isolation von Gefäßproben konnten in der Parenchymprobe bei deutlichem Nachweis neuronaler und astroglialer Zellen kaum mehr vaskuläre Strukturen nachgewiesen werden.

Nach Etablierung des Gefäßisoliations-Protokolls wurde im murinen endovaskulären SAB-Perforationsmodell die Veränderung der eNOS- und sGC-Expression sowie der eNOS-Aktivierung

innerhalb der ersten 72 Stunden nach SAB speziell in der intrakortikalen Mikrozirkulation untersucht. Hier zeigte sich 24 Stunden nach SAB eine Hochregulierung von sGC und eNOS ausschließlich in den intrakortikalen, nicht jedoch in den großen extrakortikalen Gefäßen. Nach einer initial vermehrten eNOS-Aktivierung 3 Stunden nach SAB zeigte sich eine anschließend kontinuierliche Abnahme der eNOS-Aktivierung bis 72 Stunden nach SAB, ebenfalls ausschließlich in den intrakortikalen Gefäßen. Diese Ergebnisse unterstreichen zum einen die Beteiligung des eNOS-NO-sGC Signalwegs an der Pathophysiologie der Mikrovasospasmen im Rahmen der Early Brain Injury nach SAB. Zum anderen unterstreicht dies deutlich die Relevanz der gezielten Untersuchung der intrakortikalen Mikrozirkulation, sowohl für das bessere Verständnis pathophysiologischer Vorgänge als auch zur Testung therapeutische Ansätze während der EBI nach SAB.

In Tiermodellen konnte durch Zufuhr exogenen NOs eine Besserung der Mikrozirkulationsstörung mit Steigerung des CBFs bei gleichzeitiger Reduktion der Mikrovasospasmen gezeigt werden.²²⁷ Da NO über den NO-sGC-cGMP-Signalweg zu einer physiologischen Vasodilatation führt,^{142,143,151,153} sollte eine Stimulation mit direkter Modulation von sGC zu einem ähnlichen Effekt führen.

Im Rahmen dieser Studie wurde der Effekt des sGC-Aktivators Bay 60-2770 und des sGC-Stimulators Bay 41-2272 auf die Mikrozirkulationsstörung 3 Stunden nach experimenteller SAB im Mausmodell untersucht. Dabei zeigte sich weder bildmorphologisch in der *in-vivo* Zweiphotonen-Mikroskopie der Mikrozirkulation noch in der biophysikalischen Darstellung anhand des CBFs mittels Laser-Doppler-Flowmetry-Messung eine signifikante Besserung der Mikrozirkulation nach Infusion der beiden Substanzen. Die maximal verabreichbare Dosis war jedoch aufgrund einer systemischen Vasodilatation mit begleitender arterieller Hypotonie bei höheren Konzentrationen der beiden Testsubstanzen eingeschränkt, sodass eine nicht ausreichbare Dosierung als Ursache für den fehlenden Therapieeffekt in Frage kommt.

Neben primär pharmakologischen Ursachen dieses fehlenden sGC-vermittelten Therapieeffekts muss jedoch auch eine fehlende Funktionalität der sGC diskutiert werden. Möglicherweise kommt es im Rahmen der EBI trotz Hochregulierung der sGC zu einer vorzeitigen Proteindegradierung, sodass diese für eine Stimulation mittels sGC-Aktivatoren oder -Stimulatoren nicht mehr zugänglich ist. Eine Untersuchung der in den Gefäßproben enthaltenen cGMP-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf nach SAB, beispielsweise mittels eines ELISAs, würde in der Zukunft zu einem besseren Verständnis der verbleibenden Funktionalität von sGC nach SAB und der mikrozirkulatorischen Pathophysiologie während der EBI beitragen.

Zusammenfassend konnte die Relevanz der gezielten Untersuchung der Mikrozirkulation für das Verständnis der Pathophysiologie und zur Entwicklung neuer Therapieansätze während der ersten 72 Stunden nach SAB gezeigt werden. Die erfolgreiche Etablierung des neuen Gefäßisolationsprotokolls kann in Zukunft maßgeblich dazu beitragen, diese Veränderungen gezielt zu untersuchen. Trotz mittels dieses Protokolls gezeigter Hochregulation von sGC und eNOS in der intrakortikalen Mikrozirkulation nach SAB, verblieb eine pharmakologische Modulation von sGC mit dem sGC-Aktivator Bay 60-2770 und dem sGC-Stimulator Bay 41-2272 ohne therapeutischen Erfolg. Zukünftige Forschung sollte sich auf die detaillierte Untersuchung der Mikrozirkulation und des eNOS-NO-sGC-Signalwegs konzentrieren, um neue pharmakologische Ansätze zu entwickeln und deren Wirksamkeit in klinischen Studien zu testen, um die Versorgung und Therapie der Subarachnoidalblutung zu verbessern.

6. Englische Zusammenfassung

Subarachnoid hemorrhage (SAH) belongs to the group of hemorrhagic strokes characterized by high mortality and poor functional prognosis among survivors. Rupture of an intracranial arterial aneurysm is one of the most common causes for SAH.⁴⁻⁶ This often results in a sudden increase in intracranial pressure, a decrease in cerebral perfusion pressure and in cerebral blood flow (CBF), with the risk of global cerebral ischemia, disrupted vascular autoregulation, and mechanical compression due to hematoma formation. The initial 72 hours following SAH, known as Early Brain Injury (EBI), encompass a series of pathophysiological changes including vascular morphological alterations, metabolic breakdown, disrupted ion homeostasis, oxidative stress, cellular apoptosis, and inflammation.^{92,93,95} Despite recent studies highlighting the role of microcirculatory vasospasms and dysfunction of the eNOS-NO-sGC signaling pathway during EBI,¹⁰³⁻¹⁰⁷ a dedicated protein-chemical examination of changes in the eNOS-NO-sGC signaling pathway specifically within the microvasculature has not been technically feasible. Many studies therefore have used large extracortical vessels or whole brain lysates as proxy for their investigations due to these technical limitations.

In this doctoral thesis, a novel mechanochemical protocol for the targeted isolation of intracortical vessels including the microcirculation was established in a mouse model. Using endothelial, neuronal, pericyte, and astroglial markers, Western blot characterization of these samples demonstrated successful isolation of small intracortical vessels, as well as separated large extracortical vessels. Western blot analysis further showed successful isolation of the entire neurovascular unit, consisting of vascular endothelial cells, pericytes and astrocytic endfeet, within these vessel fractions with minimal neuronal parenchymal cells remaining.

This successfully established isolation protocol was then applied to an endovascular perforation SAH mouse model, allowing for the detailed characterization of changes in eNOS and sGC expression and eNOS activity specifically in intracortical vessels including the microcirculation. Within the first 24 hours post-SAH, a significant upregulation of sGC and eNOS was detected in intracortical vessels, which did not occur in larger extracortical vessels. After an initial increase in eNOS activity 3 hours post-SAH, again seen exclusively in intracortical vessel, a continuous decrease in eNOS activity was observed in these vessels. These results not only highlight the importance of the eNOS-NO-sGC signaling pathway regarding the pathophysiology of EBI after SAH but also show the importance of the separate investigation of changes in the microvasculature compared to large extracortical arteries.

In a second step, the effect of the sGC-activator Bay 60-2770 and the sGC-stimulator Bay 41-2272 on microvascular dysfunction three hours after SAH was investigated in an endovascular perforation SAH mouse model. Using 2-Photon-Microscopy in-vivo imaging and laser doppler flowmetry (LDF), neither morphological changes in the microvasculature, i.e. reduction in microvasospasms, nor improvement in functional representation, i.e. an increase in CBF, were detected following infusion of the two substances. This may be either due to insufficient dosing, as systemic vasodilation and arterial hypotension at higher concentrations limit the use of higher dosages, or due to premature protein degradation of sGC, despite upregulated expression levels in the microvasculature, preventing its activation.

In summary, this thesis shows the importance of targeted investigation of changes in the microcirculation to better understand the pathophysiology and potential treatment targets during EBI in SAH. The successful establishment of the new vessel isolation protocol can significantly contribute to specifically investigating these microcirculatory changes in the future. Despite the demonstrated upregulation of sGC and eNOS in the intracortical microcirculation during EBI using this protocol, a first pharmacological intervention using the sGC activator Bay 60-2770 and the sGC stimulator Bay 41-2272 remained without therapeutic success. Future research

should focus on the detailed examination of the microcirculation and the eNOS-NO-sGC signaling pathway to develop novel pharmacological approaches and test their effectiveness in clinical trials to improve the management and treatment of subarachnoid hemorrhage during EBI.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Darstellung der drei Meningen und der sich im Subarachnoidalraum befindlichen Gefäße.....	4
Abbildung 2: A. Graphische Darstellung des Circulus arteriosus willisi an der Schädelbasis. B. Darstellung einer Subarachnoidalblutung aus einem Aneurysma an der Schädelbasis mit Blutverteilung im Subarachnoidalraum.....	6
Abbildung 3: Vasospasmen der Mikrozirkulation (Arteriolen) nach Subarachnoidalblutung.....	10
Abbildung 4: Mechanismen der Early Brain Injury nach Subarachnoidalblutung mit Störung der Mikrozirkulation.	11
Abbildung 5: Lineare Darstellung der Domänen-Struktur der eNOS.....	13
Abbildung 6: Struktur der sGC.....	14
Abbildung 7: Häm-Bindungsmechanismus der sGC	15
Abbildung 8: Darstellung der endothelialen Dysfunktion während Ischämie.	17
Abbildung 9: Wirkung von exogenem inhalativen NO auf die Mikrozirkulation drei Stunden nach experimenteller SAB	18
Abbildung 10: Darstellung der Wirkmechanismen von sGC-Aktivatoren und sGC-Stimulatoren.	20
Abbildung 11: Schematische Darstellung der endovaskulären Perforation am Abgang der A. cerebri media (MCA).....	24
Abbildung 12: Neuroscore für Überlebensversuche.....	26
Abbildung 13: Schematische Darstellung der einzelnen Protokollschritte zur Gefäßisolation ..	28
Abbildung 14: Schematische Darstellung der SDS-Page.....	29
Abbildung 15: Graphische Darstellung des Westernblot-Prinzips	30
Abbildung 16: Graphischer Aufbau eines Westernblot-Sandwichs	32
Abbildung 17: Jablonski-Diagramm. Grundlage der Multiphotonenmikroskopie.....	34
Abbildung 18: Darstellung der durch lineare und nicht-lineare Methoden erzeugten Fluoreszenz.	35
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Knochenfensters	36
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Lokalisation sowie in-vivo-Aufnahme eines Knochenfensters über dem Versorgungsgebiet der MCA.....	36
Abbildung 21: Darstellung der generierten 2PM-Aufnahmen.....	37
Abbildung 22: Beispielhafte 2-Photonen-Mikroskopie-Aufnahmen eines intraparenchymalen Gefäßes im MCA-Stromgebiet	38
Abbildung 23: Beispielhafte Gefäßauswertung einer 2-Photonen-Mikroskopieaufnahme drei Stunden nach SAB-Induktion	38

Abbildung 24: Strukturformel von Bay 60-2770.....	39
Abbildung 25: Strukturformel von Bay 41-2272.....	40
Abbildung 26: Zerebrale Durchblutung (CBF) von gesunden Tieren unter steigenden Dosen von Bay 60-2770 (BAY 60), Bay 41-2272 (BAY 41) sowie Vehikel.....	42
Abbildung 27: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von gesunden Tieren unter steigenden Dosen von Bay 60-2770 (BAY 60), Bay 41-2272 (BAY 41) sowie Vehikel	42
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Versuchsreihe zur Charakterisierung von endothelialen Enzymregulationen nach SAB.....	44
Abbildung 29: Zeitlicher Versuchsablauf der Akutversuche mit verblindeter Gabe von Bay 60-2770/Vehikel drei Stunden nach SAB (2-Photonen-Mikroskopie)	45
Abbildung 30: Zeitlicher Versuchsablaufs der Akutversuche mit verblindeter Gabe von Bay 60-2770/Vehikel drei Stunden nach SAB (MAP und CBF)	46
Abbildung 31: Zeitlicher Versuchsablauf der Akutversuche mit Gabe von Bay 41-2272 drei Stunden nach SAB.....	46
Abbildung 32: Auflichtmikroskopie eines entnommenen Gehirns nach Perfusion mit 1%-Evan's Blue Lösung	48
Abbildung 33: Auflichtmikroskopie der gewonnenen Gefäßfraktionen sowie des verbleibenden Parenchyms nach vollständigem Gefäßisolationsprotokoll.....	49
Abbildung 34: Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben für VE-Cadherin und MAP 2	50
Abbildung 35: Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben für GFAP und AQP4	50
Abbildung 36: Charakterisierung der isolierten Gefäß- und Parenchymproben für PDGFRβ	51
Abbildung 37: ICP- und LDF-Messwerte der Standardisierungsreihe.....	51
Abbildung 38: ICP- und LDF-Messwerte der Versuchstiergruppen während der SAB-/Sham-Operation zur späteren Charakterisierung endothelialer Enzymveränderungen nach SAB	52
Abbildung 39: Vergleich der sGC-Proteinexpression zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen.....	53
Abbildung 40: Vergleich der eNOS Proteinkonzentration zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen.....	53
Abbildung 41: Vergleich der pSer1177-vermittelten eNOS Aktivierung zwischen intra- und extrakortikalen Gefäßen	54
Abbildung 42: Relative Veränderung des Verhältnisses von sGC- und eNOS Proteinexpression sowie der pSer1177-vermittelten eNOS Aktivierung von intra- zu extrakortikalen Gefäßen.....	54
Abbildung 43: Vergleich der Expression von sGC und eNOS sowie der pSer-1177-vermittelten eNOS-Aktivierung in intrakortikalen und extrakortikalen Gefäßen während der Early Brain Injury Phase nach SAB.....	55
Abbildung 44: Relative Expression von sGC und eNOS sowie p-Ser1177-vermittelte eNOS-Aktivierung in intra- und extrakortikalen Gefäßen während der EBI gegenüber naiven Tieren.	56
Abbildung 45: Mittlere ICP- und LDF-Werte der Bay 60-2770-Versuchstiergruppen	57

Abbildung 46: Graphische Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks der Bay 60-2770-Versuchsreihe während (verblindeter) Infusion von Bay60-2770 oder Vehikel.....	58
Abbildung 47: Prozentuale Veränderung der Gefäßspasmenanzahl unter Infusion von Bay 60-2770 bzw. Vehikel.....	59
Abbildung 48: Änderung des relativen Konstriktionsgrads der MVS im Verlauf im Vergleich zum Ausgangswert	60
Abbildung 49: Ausprägung der Vasospasmenschwere innerhalb der Bay 60-2770- und der Vehikel-behandelten Gruppe über den zeitlichen Verlauf hinweg	61
Abbildung 50: Veränderung des allgemeinen Gefäßdurchmessers zerebraler Gefäße unter Infusion von Bay 60-2770 oder Vehikel	62
Abbildung 51: Exemplarischer Ausschnitt der intraexperimentellen LDF-Datenaufzeichnung mittels LabChart (orange)	62
Abbildung 52: Zerebrale Durchblutung während (verblindeter) Behandlung mit Bay 60-2770 oder Vehikel, gemessen mittels LDF	63
Abbildung 53: Mittlere ICP- und relative LDF-Werte der drei Versuchstiergruppen	64
Abbildung 54: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) der drei Versuchstiergruppen.....	65
Abbildung 55: Zerebrale Durchblutung während (verblindeter) Behandlung mit Bay 60-2770 oder Vehikel, gemessen mittels LDF, ohne begleitende 2PM	65
Abbildung 56: ICP und LDF-Werte der Bay 41-2272 Versuchsgruppe während Induktion der SAB.	66
Abbildung 57: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) vor, während und nach Infusion von 10 µg/kg KG Bay 41-2272	66
Abbildung 58: Entwicklung des relativen zerebralen Blutflusses (gemessen mittels LDF) vor, während und nach Infusion von 10 µg/kg KG Bay 41-2272	67
Abbildung 59: Graphische Darstellung der Autoregulation zerebraler Gefäße	71
Abbildung 60: Mögliche Wirkmechanismen von NO auf BK-Kanäle mit resultierender vasodilatatorischer Wirkung.....	82

8. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der Gelelektrophorese</i>	31
<i>Tabelle 2: Übersicht der für die Westernblots verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.</i>	33
<i>Tabelle 3: Kumulative Zielkonzentrationen der Bay 41-2272-Versuchsreihe</i>	41
<i>Tabelle 4: Mittlerer arterieller Blutdruck der drei Versuchstiergruppen über die Dauer des Experiments hinweg</i>	58

9. Abkürzungsverzeichnis

20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
2PM	2-Photonen-Mikroskopie
ABP	Actin-Binding-Proteins
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonium-Persulfat
AQP4	Aquaporin 4
BBB	Blood Brain Barrier
BH4	Tetrahydrobiopterin
BM	Basalmembran
CBF	Cerebral Blood Flow
CC	Coiled-coil signaling-Helix
CCD	Charge-coupled device
cGMP	Cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CHIP	C-terminus of Hsc70-interacting protein
CNG-Kanäle	Cyclic Nucleotide–Gated ion channels
CO	Kohlenstoffmonoxid
CPP	Cerebral Perfusion Pressure
CSD	Cortical Spreading Depolarizations
DCI	Delayed Cerebral Ischemia
EBI	Early Brain Injury
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
exCO ₂	Endexpiratorisches CO ₂
GCS	Glasgow Coma Score
GFAP	Gliales saures Faserprotein
Gly	Glycin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanate
H-NOX	Häm-NO-O ₂ -bindende Domäne
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase).
ICB	Intrazerebrale Blutung
ICP	Intracranial Pressure, intrakranieller Druck
iNO	inhalatives NO

iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KG	Körpergewicht
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie
MAP	Mean Arterial Pressure, mittlerer arterieller Druck
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MCA	A. cerebri media
MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase
MVS	Mikrovasospasmen
NaCl	Kochsalz
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NIR	Nahe-Infrarot-Bereich
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PBS	Phosphate buffered saline
PDEs	Phosphodiesterasen
PDGFR β	Platelet-derived Growth Factor Rezeptor β
PEG	Polyethylenglycol
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SAB	Subarachnoidalblutung
SAH	Subarachnoid hemorrhage
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
sGC	Soluble Guanylate Cyclase, lösliche Guanylat-Cyclase
SMCs	Smooth Muscle Cells, glatte Muskelzellen
TEMED	Tetramethylethyldiamin
VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales-Cadherin
WFNS	World Federation of Neurological Surgeons

10. Literatur

- 1 Uhl, E., Lehmborg, J., Steiger, H.-J. & Messmer, K. Intraoperative Detection of Early Microvasospasm in Patients with Subarachnoid Hemorrhage by Using Orthogonal Polarization Spectral Imaging. *Neurosurgery* **52**, 1307-1317 (2003). <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000065154.04824.9e> PMID - 12762876
- 2 Pennings, F. A., Bouma, G. J. & Ince, C. Direct Observation of the Human Cerebral Microcirculation During Aneurysm Surgery Reveals Increased Arteriolar Contractility. *Stroke* **35**, 1284-1288 (2004). <https://doi.org/10.1161/01.str.0000126039.91400.cb> PMID - 15087565
- 3 Friedrich, B., Müller, F., Feiler, S., Schöller, K. & Plesnila, N. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J Cereb Blood Flow Metabolism Official J Int Soc Cereb Blood Flow Metabolism* **32**, 447-455 (2011). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.154> PMID - 22146194
- 4 Sacco, R. L. *et al.* An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **44**, 2064-2089 (2013). <https://doi.org/10.1161/str.0b013e318296aeca> PMID - 23652265
- 5 Collaborators, G. B. D. S. *et al.* Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurology* **18**, 439-458 (2019). [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(19\)30034-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(19)30034-1) PMID - 30871944
- 6 Stahmeyer, J. T., Stubenrauch, S., Geyer, S., Weissenborn, K. & Eberhard, S. The frequency and timing of recurrent stroke. *Deutsches Aerzteblatt Online* (2019). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0711>
- 7 Ojaghihaghghi, S., Vahdati, S. S., Mikaeilpour, A. & Ramouz, A. Comparison of neurological clinical manifestation in patients with hemorrhagic and ischemic stroke. *World J Emerg Medicine* **8**, 34 (2017). <https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.01.006> PMID - 28123618
- 8 Armin, S. S., Colohan, A. R. T. & Zhang, J. H. Traumatic subarachnoid hemorrhage: our current understanding and its evolution over the past half century. *Neurol Res* **28**, 445-452 (2013). <https://doi.org/10.1179/016164106x115053> PMID - 16759448
- 9 Modi, N., Agrawal, M. & Sinha, V. Post-traumatic subarachnoid hemorrhage: A review. *Neurol India* **64**, 8 (2016). <https://doi.org/10.4103/0028-3886.178030> PMID - 26954974
- 10 Long, B., Koefman, A. & Runyon, M. S. Subarachnoid Hemorrhage: Updates in Diagnosis and Management. *Emerg Med Clin N Am* **35**, 803-824 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.emc.2017.07.001> PMID - 28987430
- 11 Marder, C. P., Narla, V., Fink, J. R. & Fink, K. R. T. Subarachnoid hemorrhage: beyond aneurysms. *Ajr Am J Roentgenol* **202**, 25-37 (2014). <https://doi.org/10.2214/ajr.12.9749> PMID - 24370126
- 12 Carpenter, C. R. *et al.* Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis Describing the Diagnostic Accuracy of History, Physical Examination, Imaging, and Lumbar Puncture With an Exploration of Test Thresholds. *Acad Emerg Medicine Official J Soc Acad Emerg Medicine* **23**, 963-1003 (2016). <https://doi.org/10.1111/acem.12984> PMID - 27306497
- 13 Serrone, J. C., Maekawa, H., Tjahjadi, M. & Hernesniemi, J. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: pathobiology, current treatment and future directions. *Expert Rev Neurother* **15**, 367-380 (2015). <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1018892> PMID - 25719927
- 14 Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **139** <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000659> PMID - 30700139
- 15 Lovelock, C. E., Rinkel, G. J. E. & Rothwell, P. M. Time trends in outcome of subarachnoid hemorrhage: Population-based study and systematic review. *Neurology* **74**, 1494-1501 (2010). <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3181dd42b3> PMID - 20375310

- 16 Rincon, F., Rossenwasser, R. H. & Dumont, A. The Epidemiology of Admissions of Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage in the United States. *Neurosurgery* **73**, 217-223 (2013). <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000430290.93304.33> PMID - 23615089
- 17 Gijn, J. v. & Rinkel, G. J. E. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain* **124**, 249-278 (2001). <https://doi.org/10.1093/brain/124.2.249> PMID - 11157554
- 18 Macdonald, R. L. & Schweizer, T. A. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet* **389**, 655-666 (2017). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30668-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30668-7) PMID - 27637674
- 19 Nieuwkamp, D. J. *et al.* Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurology* **8**, 635-642 (2009). [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(09\)70126-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(09)70126-7) PMID - 19501022
- 20 Huang, J. & Gelder, J. M. v. The Probability of Sudden Death from Rupture of Intracranial Aneurysms: A Meta-analysis. *Neurosurgery* **51**, 1101 (2002). <https://doi.org/10.1097/00006123-200211000-00001> PMID - 12383354
- 21 Johnston, S. C., Selvin, S. & Gress, D. R. The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. *Neurology* **50**, 1413-1418 (1998). <https://doi.org/10.1212/wnl.50.5.1413> PMID - 9595997
- 22 Asch, C. J. v. *et al.* Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurology* **9**, 167-176 (2010). [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(09\)70340-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(09)70340-0) PMID - 20056489
- 23 Rouanet, C. & Silva, G. S. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: current concepts and updates. *Arq Neuro-psiquiat* **77**, 806-814 (2019). <https://doi.org/10.1590/0004-282x20190112> PMID - 31826137
- 24 Claassen, J. & Park, S. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet* **400**, 846-862 (2022). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00938-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00938-2)
- 25 Korja, M., Lehto, H. & Juvela, S. Lifelong Rupture Risk of Intracranial Aneurysms Depends on Risk Factors. *Stroke* **45**, 1958-1963 (2014). <https://doi.org/doi:10.1161/STROKEAHA.114.005318>
- 26 Rinkel, G. J. E., Djibuti, M., Algra, A. & Gijn, J. v. Prevalence and Risk of Rupture of Intracranial Aneurysms. *Stroke* **29**, 251-256 (1998). <https://doi.org/doi:10.1161/01.STR.29.1.251>
- 27 Florez, W. A. *et al.* Intracranial hypertension in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurg Rev*, 1-9 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10143-020-01248-9> PMID - 32008128
- 28 Keedy, A. An overview of intracranial aneurysms. *Mcgill J Medicine Mjm Int Forum Adv Medical Sci Students* **9**, 141-146 (2006).
- 29 Diaz, O. & Rangel-Castilla, L. Chapter 67 Endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Handb Clin Neurology* **136**, 1303-1309 (2016). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53486-6.00067-3> PMID - 27430470
- 30 Rass, V. & Helbok, R. Early Brain Injury After Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage. *Curr Neurol Neurosci Rep* **19**, 78 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11910-019-0990-3>
- 31 Grory, B. M. *et al.* Distinguishing Characteristics of Headache in Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage. *Headache J Head Face Pain* **58**, 364-370 (2018). <https://doi.org/10.1111/head.13218> PMID - 29105063
- 32 Moore, S. A., Rabinstein, A. A., Stewart, M. W. & Freeman, W. D. Recognizing the signs and symptoms of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Expert Rev Neurother* **14**, 757-768 (2014). <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.922414> PMID - 24949896
- 33 Schatlo, B., Fathi, A.-R. & Fandino, J. Management of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Swiss Med Wkly* **144** (2014). <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13934> PMID - 24782062

- 34 Papanikolaou, J. *et al.* Cardiac and central vascular functional alterations in the acute phase of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med* **40**, 223-232 (2012). <https://doi.org/10.1097/ccm.0b013e31822e9fab> PMID - 21926590
- 35 Komatsuzaki, M., Takasusuki, T., Kimura, Y. & Yamaguchi, S. Assessment of the ECG T-Wave in Patients With Subarachnoid Hemorrhage. *J Neurosurg Anesth* **Publish Ahead of Print** (2019). <https://doi.org/10.1097/ana.0000000000000624> PMID - 31290770
- 36 Lanzino, G., Kongable, G. L. & Kassell, N. F. Electrocardiographic Abnormalities After Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage. *J Neurosurg Anesth* **6**, 156-162 (1994). <https://doi.org/10.1097/00008506-199407000-00002> PMID - 8081095
- 37 Sijercic, S., Krdzalic, A., Avdagic, H. & Krdzalic, G. Incidence of Cardiac Dysfunction After Brain Injury. *Medical Archives* **72**, 316 (2018). <https://doi.org/10.5455/medarh.2018.72.316-318> PMID - 30524160
- 38 Wan, W. H., Ang, B. T. & Wang, E. The Cushing Response: A case for a review of its role as a physiological reflex. *J Clin Neurosci* **15**, 223-228 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2007.05.025> PMID - 18182296
- 39 Cushing, H. Concerning a definite regulatory mechanism of the vasomotor centre which controls blood pressure during cerebral compression. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **12**, 290-292 (1901).
- 40 Polmear, A. Sentinel Headaches in Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage: What is the True Incidence? A Systematic Review. *Cephalalgia* **23**, 935-941 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.2003.00596.x> PMID - 14984225
- 41 Nakagawa, D. *et al.* Detection of microbleeds associated with sentinel headache using MRI quantitative susceptibility mapping: pilot study. *Journal of Neurosurgery* **130**, 1391-1397 (2019). <https://doi.org/10.3171/2018.2.jns1884> PMID - 29799347
- 42 Hunt, W. E. & Hess, R. M. Surgical Risk as Related to Time of Intervention in the Repair of Intracranial Aneurysms. *Journal of Neurosurgery* **28**, 14-20 (1968). <https://doi.org/10.3171/jns.1968.28.1.0014> PMID - 5635959
- 43 Fisher, C. M., Kistler, J. P. & Davis, J. M. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* **6**, 1-9 (1980). <https://doi.org/10.1227/00006123-198001000-00001>
- 44 Drake CG, H. W., Sano K, et al. Report of World Federation of Neurological Surgeons Committee on a Universal Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale. *Journal of Neurosurgery* **68** (1988). <https://doi.org/10.3171/jns.1988.68.6.0985>
- 45 Cavanagh, S. J. & Gordon, V. L. Grading Scales Used in the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Critical Review. *J Neurosci Nurs* **34**, 288-295 (2002). <https://doi.org/10.1097/01376517-200212000-00002> PMID - 12506811
- 46 Chiang, V. L., Claus, E. B. & Awad, I. A. Toward more rational prediction of outcome in patients with high-grade subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **46**, 28-35; discussion 35-26 (2000).
- 47 Rosen, D. S. & Macdonald, R. L. Subarachnoid Hemorrhage Grading Scales: A Systematic Review. *Neurocrit Care* **2**, 110-118 (2005). <https://doi.org/10.1385/ncc:2:2:110> PMID - 16159052
- 48 Egawa, S. *et al.* Impact of neurointensivist-managed intensive care unit implementation on patient outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Crit Care* **32**, 52-55 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.11.008> PMID - 26703419
- 49 Müller, D. & Müller, O. [Neurointensive Care: Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage - State of the Art]. *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie Ains* **53**, 654-667 (2018). <https://doi.org/10.1055/s-0043-118963> PMID - 30423595
- 50 Rinkel, G. J. E. & Klijn, C. J. M. Prevention and treatment of medical and neurological complications in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Pract Neurology* **9**, 195-209 (2009). <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.182444> PMID - 19608769

- 51 Hoh, B. L. *et al.* 2023 Guideline for the Management of Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **54**, e314-e370 (2023). <https://doi.org:10.1161/str.0000000000000436>
- 52 Fugate, J. E. & Rabinstein, A. A. Intensive Care Unit Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Curr Neurol Neurosci* **12**, 1-9 (2011). <https://doi.org:10.1007/s11910-011-0230-y> PMID - 21986684
- 53 Jaschinski, U. Intensivtherapie nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung. *Der Anaesthetist* **65**, 951-970 (2016). <https://doi.org:10.1007/s00101-016-0242-8> PMID - 27900416
- 54 Addis, A., Baggiani, M. & Citerio, G. Intracranial Pressure Monitoring and Management in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care* **39**, 59-69 (2023). <https://doi.org:10.1007/s12028-023-01752-y>
- 55 Thilak, S. *et al.* Diagnosis and management of subarachnoid haemorrhage. *Nat Commun* **15**, 1850 (2024). <https://doi.org:10.1038/s41467-024-46015-2>
- 56 Treggiari, M. M. *et al.* Guidelines for the Neurocritical Care Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care* **39**, 1-28 (2023). <https://doi.org:10.1007/s12028-023-01713-5>
- 57 Bernardini, G. L. & DeShaies, E. M. Critical care of intracerebral and subarachnoid hemorrhage. *Curr Neurol Neurosci* **1**, 568-576 (2001). <https://doi.org:10.1007/s11910-001-0064-0> PMID - 11898571
- 58 Ahmed, S. I. *et al.* Endovascular Coiling Versus Neurosurgical Clipping for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cureus* **11**, e4320 (2019). <https://doi.org:10.7759/cureus.4320> PMID - 31183299
- 59 Lindgren, A. *et al.* Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for people with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* **8**, CD003085 (2018). <https://doi.org:10.1002/14651858.cd003085.pub3> PMID - 30110521
- 60 Luo, M., Yang, S., Ding, G. & Xiao, Q. Endovascular coiling versus surgical clipping for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Res Med Sci* **24**, 88 (2019). https://doi.org:10.4103/jrms.jrms_414_18 PMID - 31741660
- 61 Molyneux, A. J. *et al.* International subarachnoid aneurysm trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion. *Lancet* **366**, 809-817 (2005). [https://doi.org:10.1016/s0140-6736\(05\)67214-5](https://doi.org:10.1016/s0140-6736(05)67214-5) PMID - 16139655
- 62 Steiner, T. *et al.* European Stroke Organization Guidelines for the Management of Intracranial Aneurysms and Subarachnoid Haemorrhage. *Cerebrovasc Dis* **35**, 93-112 (2013). <https://doi.org:10.1159/000346087> PMID - 23406828
- 63 Wolf, S. *et al.* Effectiveness of Lumbar Cerebrospinal Fluid Drain Among Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* **80**, 833-842 (2023). <https://doi.org:10.1001/jamaneurol.2023.1792>
- 64 Sehba, F. A., Hou, J., Pluta, R. M. & Zhang, J. H. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol* **97**, 14-37 (2012). <https://doi.org:10.1016/j.pneurobio.2012.02.003> PMID - 22414893
- 65 Stachniak, J. B., Layon, A. J., Day, A. L. & Gallagher, T. J. Craniotomy for Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage: Is Course, Cost, or Outcome Affected by Age? *Stroke* **27**, 276-281 (1996). <https://doi.org:10.1161/01.str.27.2.276> PMID - 8571423
- 66 Øie, L. R. *et al.* Incidence and case fatality of aneurysmal subarachnoid hemorrhage admitted to hospital between 2008 and 2014 in Norway. *Acta Neurochir*, 1-9 (2020). <https://doi.org:10.1007/s00701-020-04463-x> PMID - 32601806
- 67 Lindberg, M., Angquist, K.-A., Fodstad, H., Fugl-Meyer, K. & Fugl-Meyer, A. R. Self-reported prevalence of disability after subarachnoid haemorrhage, with special emphasis on return to

- leisure and work. *Brit J Neurosurg* **6**, 297-304 (1992). [https://doi.org:10.3109/02688699209023787](https://doi.org/10.3109/02688699209023787) PMID - 1382451
- 68 Vergouwen, M. D. I. *et al.* Definition of Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage as an Outcome Event in Clinical Trials and Observational Studies: Proposal of a Multidisciplinary Research Group. *Stroke* **41**, 2391-2395 (2010). [https://doi.org:10.1161/strokeaha.110.589275](https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.589275) PMID - 20798370
- 69 van Gijn, J., Kerr, R. S. & Rinkel, G. J. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet* **369**, 306-318 (2007). [https://doi.org:10.1016/S0140-6736\(07\)60153-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60153-6)
- 70 Sehba, F. A. & Friedrich, V. Cerebral Vasospasm: Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* **115**, 199-205 (2012). [https://doi.org:10.1007/978-3-7091-1192-5_37](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1192-5_37) PMID - 22890669
- 71 Robertson, E. G. CEREBRAL LESIONS DUE TO INTRACRANIAL ANEURYSMS. *Brain* **72**, 150-185 (1949). [https://doi.org:10.1093/brain/72.2.150](https://doi.org/10.1093/brain/72.2.150) PMID - 18136707
- 72 Stehouwer, B. L., Kleij, L. A. v. d., Hendrikse, J., Rinkel, G. J. & Vis, J. B. D. Magnetic resonance imaging and brain injury in the chronic phase after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A systematic review. *Int J Stroke Official J Int Stroke Soc* **13**, 24-34 (2017). [https://doi.org:10.1177/1747493017730781](https://doi.org/10.1177/1747493017730781) PMID - 28920537
- 73 Allcock, J. M. & Drake, C. G. Postoperative Angiography in Cases of Ruptured Intracranial Aneurysm. *J Neurosurg* **20**, 752-759 (1963). [https://doi.org:10.3171/jns.1963.20.9.0752](https://doi.org/10.3171/jns.1963.20.9.0752)
- 74 Ecker, A. & Riemenschneider, P. A. Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg* **8**, 660-667 (1951). [https://doi.org:10.3171/jns.1951.8.6.0660](https://doi.org/10.3171/jns.1951.8.6.0660)
- 75 Fletcher, T. M., Taveras, J. M. & Pool, J. L. Cerebral vasospasm in angiography for intracranial aneurysms. Incidence and significance in one hundred consecutive angiograms. *Arch Neurol* **1**, 38-47 (1959). [https://doi.org:10.1001/archneur.1959.03840010040005](https://doi.org/10.1001/archneur.1959.03840010040005)
- 76 Stornelli, S. A. & French, J. D. Subarachnoid Hemorrhage--Factors in Prognosis and Management. *J Neurosurg* **21**, 769-780 (1964). [https://doi.org:10.3171/jns.1964.21.9.0769](https://doi.org/10.3171/jns.1964.21.9.0769)
- 77 Carrera, E. *et al.* Transcranial Doppler for predicting delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **65**, 316-323; discussion 323-314 (2009). [https://doi.org:10.1227/01.NEU.0000349209.69973.88](https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000349209.69973.88)
- 78 Crowley, R. W. *et al.* Angiographic Vasospasm Is Strongly Correlated With Cerebral Infarction After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **42**, 919-923 (2011). [https://doi.org:10.1161/strokeaha.110.597005](https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.597005) PMID - 21350201
- 79 Alaraj, A., Charbel, F. T. & Amin-Hanjani, S. Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* **31**, 651-659 (2009). [https://doi.org:10.1179/174313209X382395](https://doi.org/10.1179/174313209X382395)
- 80 Eddleman, C. S., Hurley, M. C., Naidech, A. M., Batjer, H. H. & Bendok, B. R. Endovascular options in the treatment of delayed ischemic neurological deficits due to cerebral vasospasm. *Neurosurg Focus* **26**, E6 (2009). [https://doi.org:10.3171/2008.11.FOCUS08278](https://doi.org/10.3171/2008.11.FOCUS08278)
- 81 Dankbaar, J. W. *et al.* Relationship between vasospasm, cerebral perfusion, and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neuroradiology* **51**, 813-819 (2009). [https://doi.org:10.1007/s00234-009-0575-y](https://doi.org/10.1007/s00234-009-0575-y) PMID - 19623472
- 82 Rabinstein, A. A. *et al.* Predictors of Cerebral Infarction in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **35**, 1862-1866 (2004). [https://doi.org:10.1161/01.str.0000133132.76983.8e](https://doi.org/10.1161/01.str.0000133132.76983.8e) PMID - 15218156
- 83 Stein, S. C., Levine, J. M., Nagpal, S. & LeRoux, P. D. Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: how strong is the evidence? *Neurosurgical Focus* **21**, 1-7 (2006). [https://doi.org:10.3171/foc.2006.21.3.2](https://doi.org/10.3171/foc.2006.21.3.2)
- 84 Brown, R. J., Kumar, A., Dhar, R., Sampson, T. R. & Dinger, M. N. The relationship between delayed infarcts and angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.

- Neurosurgery* **72**, 702-707; discussion 707-708 (2013). <https://doi.org/10.1227/neu.0b013e318285c3db> PMID - 23313984
- 85 Biondi, A. *et al.* Intra-arterial nimodipine for the treatment of symptomatic cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: preliminary results. *Ajnr Am J Neuroradiol* **25**, 1067-1076 (2004).
- 86 Deshaies, E. M., Boulos, A. S., Drazin, D. & Popp, A. J. Evidence-based pharmacotherapy for cerebral vasospasm. *Neurol Res* **31**, 615-620 (2009). <https://doi.org/10.1179/174313209x382377> PMID - 19108757
- 87 Macdonald, R. L. *et al.* 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 Neurology* **10**, 618-625 (2011). [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(11\)70108-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(11)70108-9) PMID - 21640651
- 88 Macdonald, R. L. *et al.* Clazosentan to Overcome Neurological Ischemia and Infarction Occurring After Subarachnoid Hemorrhage (CONSCIOUS-1): Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Dose-Finding Trial. *Stroke* **39**, 3015-3021 (2008). <https://doi.org/10.1161/strokeaha.108.519942> PMID - 18688013
- 89 Pluta, R. M. *et al.* Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res* **31**, 151-158 (2013). <https://doi.org/10.1179/174313209x393564> PMID - 19298755
- 90 Budohoski, K. P. *et al.* The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **85**, 1343-1353 (2014). <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307711> PMID - 24847164
- 91 Geraghty, J. R. & Testai, F. D. Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: Beyond Vasospasm and Towards a Multifactorial Pathophysiology. *Curr Atheroscler Rep* **19**, 50 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0690-x> PMID - 29063300
- 92 Kusaka, G., Ishikawa, M., Nanda, A., Granger, D. N. & Zhang, J. H. Signaling Pathways for Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **24**, 916-925 (2004). <https://doi.org/10.1097/01.wcb.0000125886.48838.7e> PMID - 15362722
- 93 Lieshout, J. H. v. *et al.* An introduction to the pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Rev* **41**, 917-930 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0827-y> PMID - 28215029
- 94 Macdonald, R. L. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol* **10**, 44-58 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.246> PMID - 24323051
- 95 Sehba, F. A., Pluta, R. M. & Zhang, J. H. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol* **43**, 27-40 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8155-z> PMID - 21161614
- 96 Lauzier, D. C. *et al.* Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Incidence and Mechanisms. *Stroke* **54**, 1426-1440 (2023). <https://doi.org/10.1161/strokeaha.122.040072>
- 97 Bederson, J. B. *et al.* Acute Vasoconstriction after Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery* **42**, 352-362 (1998). <https://doi.org/10.1097/00006123-199802000-00091> PMID - 9482187
- 98 Honda, M. *et al.* Early Cerebral Circulatory Disturbance in Patients Suffering Subarachnoid Hemorrhage Prior to the Delayed Cerebral Vasospasm Stage: Xenon Computed Tomography and Perfusion Computed Tomography Study. *Neurol Med-chir* **52**, 488-494 (2012). <https://doi.org/10.2176/nmc.52.488> PMID - 22850497
- 99 Schubert, G. A., Seiz, M., Hegewald, A. A., Manville, J. & Thomé, C. Early Brain Injury or Cerebral Vasospasm. *Acta Neurochir Suppl* **110**, 35-38 (2011). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0353-1_6 PMID - 21116911
- 100 Plesnila, N. Pathophysiological Role of Global Cerebral Ischemia following Subarachnoid Hemorrhage: The Current Experimental Evidence. *Stroke Res Treat* **2013**, 1-7 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/651958> PMID - 23844316

- 101 Terpolilli, N. A., Brem, C., Bühler, D. & Plesnila, N. Are We Barking Up the Wrong Vessels?: Cerebral Microcirculation After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **46**, 3014-3019 (2015). <https://doi.org/10.1161/strokeaha.115.006353> PMID - 26152299
- 102 Herz, D. A., Baez, S. & Shulman, K. Pial Microcirculation in Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **6**, 417-424 (1975). <https://doi.org/10.1161/01.str.6.4.417> PMID - 239472
- 103 Friedrich, V., Flores, R., Muller, A. & Sehba, F. A. Luminal platelet aggregates in functional deficits in parenchymal vessels after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* **1354**, 179-187 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.040> PMID - 20654597
- 104 Hart, M. N. Morphometry of brain parenchymal vessels following subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **11**, 653-655 (1980). <https://doi.org/10.1161/01.str.11.6.653> PMID - 7210073
- 105 Sehba, F. A., Friedrich, V., Makonnen, G. & Bederson, J. B. Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *Journal of Neurosurgery* **106**, 321-329 (2007). <https://doi.org/10.3171/jns.2007.106.2.321> PMID - 17410718
- 106 Sun, B. L. *et al.* Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol* **29**, 235-241 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9316-8>
- 107 Sun, Y. *et al.* Multimodal MRI characterization of experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* **316**, 53-62 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.027>
- 108 Honma, Y., Clower, B. R., Haining, J. L. & Smith, R. R. Comparison of Intimal Platelet Accumulation in Cerebral Arteries in Two Experimental Models of Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery* **24**, 487-490 (1989). <https://doi.org/10.1227/00006123-198904000-00001> PMID - 2710294
- 109 Suzuki, S. *et al.* Cerebral Microthrombosis in Symptomatic Cerebral Vasospasm. *Neurol Med-chir* **30**, 309-316 (1990). <https://doi.org/10.2176/nmc.30.309> PMID - 1699146
- 110 Stein, S. C., Browne, K. D., Chen, X.-H., Smith, D. H. & Graham, D. I. Thromboembolism and Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: An Autopsy Study. *Neurosurgery* **59**, 781-788 (2006). <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000227519.27569.45> PMID - 16915120
- 111 Sehba, F. A., Mostafa, G., Friedrich, V. & Bederson, J. B. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* **102**, 1094-1100 (2005). <https://doi.org/10.3171/jns.2005.102.6.1094> PMID - 16028769
- 112 Ohkuma, H., Ogane, K., Fujita, S., Manabe, H. & Suzuki, S. Impairment of anti-platelet-aggregating activity of endothelial cells after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **24**, 1541-1545 (1993). <https://doi.org/10.1161/01.str.24.10.1541> PMID - 8378959
- 113 Frijns, C. J. *et al.* Early circulating levels of endothelial cell activation markers in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: associations with cerebral ischaemic events and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**, 77-83 (2006). <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.064956>
- 114 Juvela, S., Hillbom, M. & Kaste, M. Platelet thromboxane release and delayed cerebral ischemia in patients with subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* **74**, 386-392 (1991). <https://doi.org/10.3171/jns.1991.74.3.0386> PMID - 1993903
- 115 Sabri, M., Ai, J., Lakovic, K. & Macdonald, R. L. Cerebral Vasospasm: Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* **115**, 185-192 (2012). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1192-5_35 PMID - 22890667
- 116 Mees, S. D., Bergh, W. M. v. d., Algra, A. & Rinkel, G. J. E. Antiplatelet therapy for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Db Syst Rev* (2007). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd006184.pub2> PMID - 17943892
- 117 Mees, S. M. D., Rinkel, G. J. E., Hop, J. W., Algra, A. & Gijn, J. v. Antiplatelet Therapy in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review. *Stroke* **34**, 2285-2289 (2003). <https://doi.org/10.1161/01.str.0000083621.44269.3e> PMID - 12881605
- 118 Lidington, D., Wan, H. & Bolz, S. S. Cerebral Autoregulation in Subarachnoid Hemorrhage. *Front Neurol* **12**, 688362 (2021). <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.688362>

- 119 Hayman, E. G., Wessell, A., Gerzanich, V., Sheth, K. N. & Simard, J. M. Mechanisms of Global Cerebral Edema Formation in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care* **26**, 301-310 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12028-016-0354-7>
- 120 Koide, M., Ferris, H. R., Nelson, M. T. & Wellman, G. C. Impaired Cerebral Autoregulation After Subarachnoid Hemorrhage: A Quantitative Assessment Using a Mouse Model. *Front Physiol* **12**, 688468 (2021). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.688468>
- 121 Santos, G. A. *et al.* Pathophysiologic differences in cerebral autoregulation after subarachnoid hemorrhage. *Neurology* **86**, 1950-1956 (2016). <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000002696>
- 122 Xiao, M., Li, Q., Feng, H., Zhang, L. & Chen, Y. Neural Vascular Mechanism for the Cerebral Blood Flow Autoregulation after Hemorrhagic Stroke. *Neural Plast* **2017**, 5819514 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/5819514>
- 123 Somjen, G. G. Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization. *Physiol Rev* **81**, 1065-1096 (2001). <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1065> PMID - 11427692
- 124 Bosche, B. *et al.* Recurrent spreading depolarizations after subarachnoid hemorrhage decreases oxygen availability in human cerebral cortex. *Ann Neurol* **67**, 607-617 (2010). <https://doi.org/10.1002/ana.21943> PMID - 20437558
- 125 Dreier, J. P. *et al.* Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain* **129**, 3224-3237 (2006). <https://doi.org/10.1093/brain/awl297> PMID - 17067993
- 126 Woitzik, J. *et al.* Delayed Cerebral Ischemia and Spreading Depolarization in Absence of Angiographic Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **32**, 203-212 (2011). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.169> PMID - 22146193
- 127 Busija, D., Bari, F., Domoki, F., Horiguchi, T. & Shimizu, K. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. *Prog Neurobiol* **86**, 417-433 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.008> PMID - 18835324
- 128 Nedergaard, M. & Hansen, A. J. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* **449**, 395-398 (1988). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91062-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91062-1) PMID - 3395856
- 129 Dreier, J. P. *et al.* Nitric Oxide Scavenging by Hemoglobin or Nitric Oxide Synthase Inhibition by N -Nitro-L-Arginine Induces Cortical Spreading Ischemia When K + Is Increased in the Subarachnoid Space. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **18**, 978-990 (1998). <https://doi.org/10.1097/00004647-199809000-00007> PMID - 9740101
- 130 Offenhauser, N., Windmuller, O., Strong, A. J., Fuhr, S. & Dreier, J. P. The gamut of blood flow responses coupled to spreading depolarization in rat and human brain: from hyperemia to prolonged ischemia. *Acta Neurochir Suppl* **110**, 119-124 (2011). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0353-1_21
- 131 Döczi, T. The pathogenetic and prognostic significance of blood-brain barrier damage at the acute stage of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. Clinical and experimental studies. *Acta Neurochir* **77**, 110-132 (1985). <https://doi.org/10.1007/bf01476215> PMID - 4072781
- 132 Germanò, A., d'Avella, D., Imperatore, C., Caruso, G. & Tomasello, F. Time-Course of Blood-Brain Barrier Permeability Changes After Experimental Subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochir* **142**, 575-581 (2000). <https://doi.org/10.1007/s007010050472> PMID - 10898366
- 133 Johshita, H., Kassell, N. F. & Sasaki, T. Blood-brain barrier disturbance following subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Stroke* **21**, 1051-1058 (1990). <https://doi.org/10.1161/01.str.21.7.1051> PMID - 2368106
- 134 Li, Y., Yang, H., Ni, W. & Gu, Y. Effects of deferoxamine on blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage. *Plos One* **12**, e0172784 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172784> PMID - 28249040

- 135 Ansar, S., Larsen, C., Maddahi, A. & Edvinsson, L. Subarachnoid hemorrhage induces enhanced expression of thromboxane A2 receptors in rat cerebral arteries. *Brain Res* **1316**, 163-172 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.031> PMID - 20026315
- 136 Ayer, R. E. & Zhang, J. H. Acta Neurochirurgica Supplementum. *Acta Neurochir Suppl* **104**, 33-41 (2008). https://doi.org/10.1007/978-3-211-75718-5_7 PMID - 18456995
- 137 Feiler, S., Plesnila, N., Thal, S. C., Zausinger, S. & Schöller, K. Contribution of Matrix Metalloproteinase-9 to Cerebral Edema and Functional Outcome following Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* **32**, 289-295 (2011). <https://doi.org/10.1159/000328248> PMID - 21912109
- 138 Kwon, I., Kim, E. H., Zoppo, G. J. d. & Heo, J. H. Ultrastructural and temporal changes of the microvascular basement membrane and astrocyte interface following focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* **87**, 668-676 (2009). <https://doi.org/10.1002/jnr.21877> PMID - 18831008
- 139 Li, Z. *et al.* Blood-brain barrier permeability change and regulation mechanism after subarachnoid hemorrhage. *Metab Brain Dis* **30**, 597-603 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9609-1>
- 140 Sehba, F. A. & Friedrich, V. Cerebral microvasculature is an early target of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* **115**, 199-205 (2013). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1192-5_37
- 141 Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376 (1980). <https://doi.org/10.1038/288373a0> PMID - 6253831
- 142 Furchgott, R. F. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi* **23**, 435-440 (1987). <https://doi.org/10.1540/jsmr1965.23.435>
- 143 Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc National Acad Sci* **84**, 9265-9269 (1987). <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265> PMID - 2827174
- 144 Epstein, F. H., Moncada, S. & Higgs, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New Engl J Med* **329**, 2002-2012 (1993). <https://doi.org/10.1056/nejm199312303292706> PMID - 7504210
- 145 Forstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* **33**, 829-837, 837a-837d (2012). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- 146 Dirnagl, U., Niwa, K., Lindauer, U. & Villringer, A. Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol-heart C* **267**, H296-H301 (1994). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.1.h296> PMID - 8048594
- 147 Lavi, S., Egbarya, R., Lavi, R. & Jacob, G. Role of Nitric Oxide in the Regulation of Cerebral Blood Flow in Humans. *Circulation* **107**, 1901-1905 (2003). <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000057973.99140.5a> PMID - 12665500
- 148 Richards, H. K., Kozniowska, E., Czosnyka, M. & Pickard, J. D. Changes in transcranial Doppler flow velocity waveform following inhibition of nitric oxide synthesis. *Acta Neurochir* **139**, 63-70 (1997). <https://doi.org/10.1007/bf01850870> PMID - 9059714
- 149 Tanaka, K. Is Nitric Oxide Really Important for Regulation of the Cerebral Circulation? Yes or No? *Keio J Medicine* **45**, 14-27 (1996). <https://doi.org/10.2302/kjm.45.14> PMID - 8882464
- 150 White, R. P., Vallance, P. & Markus, H. S. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on dynamic cerebral autoregulation in humans. *Clin Sci* **99**, 555-560 (2000). <https://doi.org/10.1042/cs0990555> PMID - 11099400
- 151 Furchgott, R. F. Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide. *Bioscience Rep* **19**, 235-251 (1999). <https://doi.org/10.1023/a:1020537506008> PMID - 10589989
- 152 Chachlaki, K. & Prevot, V. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. *Brit J Pharmacol* (2019). <https://doi.org/10.1111/bph.14800> PMID - 31347144

- 153 Lucas, K. A. *et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**, 375-414 (2000).
- 154 Nakamura, K., Koga, Y., Sakai, H., Homma, K. & Ikebe, M. cGMP-Dependent Relaxation of Smooth Muscle Is Coupled With the Change in the Phosphorylation of Myosin Phosphatase. *Circ Res* **101**, 712-722 (2007). <https://doi.org:10.1161/circresaha.107.153981> PMID - 17673671
- 155 Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. & Sibley, D. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol Rev* **62**, 525-563 (2010). <https://doi.org:10.1124/pr.110.002907> PMID - 20716671
- 156 Vaandrager, A. B. & Jonge, H. R. d. Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* **157**, 23-30 (1996). <https://doi.org:10.1007/bf00227877> PMID - 8739225
- 157 Randriamboavonjy, V. & Fleming, I. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there? *Pharmacol Reports Pr* **57 Suppl**, 59-65 (2005).
- 158 Smolenski, A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost* **10**, 167-176 (2012). <https://doi.org:10.1111/j.1538-7836.2011.04576.x> PMID - 22136590
- 159 Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 2783-2802 (2008). <https://doi.org:10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x> PMID - 18588525
- 160 Steinert, J. R., Chernova, T. & Forsythe, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* **16**, 435-452 (2010). <https://doi.org:10.1177/1073858410366481>
- 161 Terpolilli, N. A., Moskowitz, M. A. & Plesnila, N. Nitric Oxide: Considerations for the Treatment of Ischemic Stroke. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **32**, 1332-1346 (2012). <https://doi.org:10.1038/jcbfm.2012.12> PMID - 22333622
- 162 Crane, B. R. *et al.* Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate. *Science* **279**, 2121-2126 (1998). <https://doi.org:10.1126/science.279.5359.2121> PMID - 9516116
- 163 Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, P. & Böhme, E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: A cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Co* **164**, 678-685 (1989). [https://doi.org:10.1016/0006-291x\(89\)91513-1](https://doi.org:10.1016/0006-291x(89)91513-1) PMID - 2573351
- 164 Panda, K., Ghosh, S. & Stuehr, D. J. Calmodulin Activates Intersubunit Electron Transfer in the Neuronal Nitric-oxide Synthase Dimer. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 23349-23356 (2001). <https://doi.org:10.1074/jbc.m100687200> PMID - 11325964
- 165 Billaud, M. *et al.* Regulation of Cellular Communication by Signaling Microdomains in the Blood Vessel Wall. *Pharmacol Rev* **66**, 513-569 (2014). <https://doi.org:10.1124/pr.112.007351> PMID - 24671377
- 166 Rafikov, R. *et al.* eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol* **210**, 271-284 (2011). <https://doi.org:10.1530/joe-11-0083> PMID - 21642378
- 167 Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605 (1999). <https://doi.org:10.1038/21224> PMID - 10376603
- 168 Michell, B. J. *et al.* Identification of Regulatory Sites of Phosphorylation of the Bovine Endothelial Nitric-oxide Synthase at Serine 617 and Serine 635*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 42344-42351 (2002). <https://doi.org:10.1074/jbc.m205144200> PMID - 12171920
- 169 Mount, P. F., Kemp, B. E. & Power, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* **42**, 271-279 (2007). <https://doi.org:10.1016/j.yjmcc.2006.05.023> PMID - 16839566
- 170 Watts, V. L. & Motley, E. D. Role of Protease-Activated Receptor-1 in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Thr495 Phosphorylation. *Exp Biol Med* **234**, 132-139 (2008). <https://doi.org:10.3181/0807-rm-233> PMID - 19064940

- 171 Boo, Y. C. *et al.* Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol-heart C* **283**, H1819-H1828 (2002). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00214.2002> PMID - 12384459
- 172 Boo, Y. C. *et al.* Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase at Ser1179 by Akt-independent Mechanisms ROLE OF PROTEIN KINASE A*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 3388-3396 (2002). <https://doi.org/10.1074/jbc.m108789200> PMID - 11729190
- 173 Fisslthaler, Dimmeler, Hermann, Busse & Fleming. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* **168**, 81-88 (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00627.x> PMID - 10691783
- 174 Evgenov, O. V. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 755-768 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrd2038> PMID - 16955067
- 175 Montfort, W. R., Wales, J. A. & Weichsel, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid Redox Sign* **26**, 107-121 (2017). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6693> PMID - 26979942
- 176 Craven, P. A. & DeRubertis, F. R. Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Protein Struct Mol Enzym* **745**, 310-321 (1983). [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(83\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(83)90063-8) PMID - 6134553
- 177 Gerzer, R., Radany, E. W. & Garbers, D. L. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Bioph Res Co* **108**, 678-686 (1982). [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(82\)90883-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(82)90883-x) PMID - 6128979
- 178 Ohlstein, E. H., Wood, K. S. & Ignarro, L. J. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: Effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys* **218**, 187-198 (1982). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90335-6) PMID - 6128958
- 179 Zhao, Y., Schelvis, J. P. M., Babcock, G. T. & Marletta, M. A. Identification of Histidine 105 in the β 1 Subunit of Soluble Guanylate Cyclase as the Heme Proximal Ligand †. *Biochemistry-us* **37**, 4502-4509 (1998). <https://doi.org/10.1021/bi972686m> PMID - 9521770
- 180 Horst, B. G. & Marletta, M. A. Physiological activation and deactivation of soluble guanylate cyclase. *Nato Sci S A Lif Sci* **77**, 65-74 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.04.011> PMID - 29704567
- 181 Follmann, M. *et al.* The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. *Angewandte Chemie Int Ed* **52**, 9442-9462 (2013). <https://doi.org/10.1002/anie.201302588> PMID - 23963798
- 182 Purohit, R. *et al.* YC-1 Binding to the β Subunit of Soluble Guanylyl Cyclase Overcomes Allosteric Inhibition by the α Subunit. *Biochemistry-us* **53**, 101-114 (2013). <https://doi.org/10.1021/bi4015133> PMID - 24328155
- 183 Stone, J. R. & Marletta, M. A. Spectral and Kinetic Studies on the Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Nitric Oxide †. *Biochemistry-us* **35**, 1093-1099 (1996). <https://doi.org/10.1021/bi9519718> PMID - 8573563
- 184 Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Biochemistry-us* **81**, 533-559 (2012). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-050410-100030> PMID - 22404633
- 185 Ma, X., Sayed, N., Beuve, A. & Akker, F. v. d. NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *Embo J* **26**, 578-588 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601521> PMID - 17215864
- 186 Zhao, Y., Brandish, P. E., Ballou, D. P. & Marletta, M. A. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc National Acad Sci* **96**, 14753-14758 (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14753> PMID - 10611285

- 187 Ballou, D. P., Zhao, Y., Brandish, P. E. & Marletta, M. A. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: The simple NO-binding model is incorrect. *Proc National Acad Sci* **99**, 12097-12101 (2002). <https://doi.org:10.1073/pnas.192209799> PMID - 12209005
- 188 Bellamy, T. C., Wood, J. & Garthwaite, J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc National Acad Sci* **99**, 507-510 (2002). <https://doi.org:10.1073/pnas.012368499> PMID - 11752394
- 189 Cary, S. P. L., Winger, J. A. & Marletta, M. A. Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *P Natl Acad Sci Usa* **102**, 13064-13069 (2005). <https://doi.org:10.1073/pnas.0506289102> PMID - 16131543
- 190 Chang, F.-J., Lemme, S., Sun, Q., Sunahara, R. K. & Beuve, A. Nitric Oxide-dependent Allosteric Inhibitory Role of a Second Nucleotide Binding Site in Soluble Guanylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 11513-11519 (2005). <https://doi.org:10.1074/jbc.m412203200> PMID - 15649897
- 191 Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. Butyl Isocyanide as a Probe of the Activation Mechanism of Soluble Guanylate Cyclase INVESTIGATING THE ROLE OF NON-HEME NITRIC OXIDE. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35741-35748 (2007). <https://doi.org:10.1074/jbc.m705557200> PMID - 17916555
- 192 Martin, E., Berka, V., Sharina, I. & Tsai, A.-L. Mechanism of Binding of NO to Soluble Guanylyl Cyclase: Implication for the Second NO Binding to the Heme Proximal Site. *Biochemistry-us* **51**, 2737-2746 (2012). <https://doi.org:10.1021/bi300105s> PMID - 22401134
- 193 Yoo, B.-K., Lamarre, I., Martin, J.-L., Rappaport, F. & Negrerie, M. Motion of proximal histidine and structural allosteric transition in soluble guanylate cyclase. *Proc National Acad Sci* **112**, E1697-E1704 (2015). <https://doi.org:10.1073/pnas.1423098112> PMID - 25831539
- 194 Russwurm, M. & Koesling, D. NO activation of guanylyl cyclase. *Embo J* **23**, 4443-4450 (2004). <https://doi.org:10.1038/sj.emboj.7600422> PMID - 15510222
- 195 Kang, Y., Liu, R., Wu, J.-X. & Chen, L. Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase. *Nature* **574**, 206-210 (2019). <https://doi.org:10.1038/s41586-019-1584-6> PMID - 31514202
- 196 Ma, X., Sayed, N., Baskaran, P., Beuve, A. & Akker, F. v. d. PAS-mediated Dimerization of Soluble Guanylyl Cyclase Revealed by Signal Transduction Histidine Kinase Domain Crystal Structure. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1167-1178 (2008). <https://doi.org:10.1074/jbc.m706218200> PMID - 18006497
- 197 Rothkegel, C. *et al.* Dimerization Region of Soluble Guanylate Cyclase Characterized by Bimolecular Fluorescence Complementation in Vivo. *Mol Pharmacol* **72**, 1181-1190 (2007). <https://doi.org:10.1124/mol.107.036368> PMID - 17715400
- 198 Buechler, W. A., Nakane, M. & Murad, F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Bioph Res Co* **174**, 351-357 (1991). [https://doi.org:10.1016/0006-291x\(91\)90527-e](https://doi.org:10.1016/0006-291x(91)90527-e) PMID - 1671207
- 199 Harteneck, C., Koesling, D., Söling, A., Schultz, G. & Böhme, E. Expression of soluble guanylyl cyclase. *Febs Lett* **272**, 221-223 (1990). [https://doi.org:10.1016/0014-5793\(90\)80489-6](https://doi.org:10.1016/0014-5793(90)80489-6) PMID - 1977619
- 200 Kamisaki, Y. *et al.* Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biological Chem* **261**, 7236-7241 (1986).
- 201 Zabel, U., Häusler, C., Weeger, M. & Schmidt, H. H. H. W. Homodimerization of Soluble Guanylyl Cyclase Subunits DIMERIZATION ANALYSIS USING A GLUTATHIONES-TRANSFERASE AFFINITY TAG. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 18149-18152 (1999). <https://doi.org:10.1074/jbc.274.26.18149> PMID - 10373411
- 202 Liu, Y., Ruoho, A. E., Rao, V. D. & Hurley, J. H. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis. *Proc National Acad Sci* **94**, 13414-13419 (1997). <https://doi.org:10.1073/pnas.94.25.13414> PMID - 9391039

- 203 Sehba, F. A., Schwartz, A. Y., Chereshev, I. & Bederson, J. B. Acute Decrease in Cerebral Nitric Oxide Levels After Subarachnoid Hemorrhage. *J Cerebr Blood F Met* **20**, 604-611 (2000). <https://doi.org:10.1097/00004647-200003000-00018> PMID - 10724124
- 204 Kajita, Y. *et al.* Combined effect of L-arginine and superoxide dismutase on the spastic basilar artery after subarachnoid hemorrhage in dogs. *Journal of Neurosurgery* **80**, 476-483 (1994). <https://doi.org:10.3171/jns.1994.80.3.0476> PMID - 8113861
- 205 Khaldi, A., Zauner, A., Reinert, M., Woodward, J. J. & Bullock, M. R. Measurement of Nitric Oxide and Brain Tissue Oxygen Tension in Patients after Severe Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery* **49**, 33 (2001). <https://doi.org:10.1097/00006123-200107000-00005> PMID - 11440457
- 206 Sabri, M. *et al.* Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *J Cerebr Blood Flow Metabolism* **31**, 190-199 (2010). <https://doi.org:10.1038/jcbfm.2010.76> PMID - 20517322
- 207 Pluta, R. M. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Therapeut* **105**, 23-56 (2005). <https://doi.org:10.1016/j.pharmthera.2004.10.002> PMID - 15626454
- 208 Macdonald, R. L. & Weir, B. K. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* **22**, 971-982 (2018). <https://doi.org:10.1161/01.str.22.8.971> PMID - 1866764
- 209 Lundberg, J. O., Gladwin, M. T. & Weitzberg, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 623-641 (2015). <https://doi.org:10.1038/nrd4623> PMID - 26265312
- 210 Pluta, R. M. Cerebral Vasospasm, New Strategies in Research and Treatment. 139-147 (2008). https://doi.org:10.1007/978-3-211-75718-5_28 PMID - 18456999
- 211 Pluta, R. M. *et al.* Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *Journal of Neurosurgery* **84**, 648-654 (1996). <https://doi.org:10.3171/jns.1996.84.4.0648> PMID - 8613858
- 212 Ignarro, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiology Pharmacol Official J Pol Physiological Soc* **53**, 503-514 (2002).
- 213 Kasuya, H. *et al.* Nitric oxide synthase and guanylate cyclase levels in canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* **82**, 250-255 (1995). <https://doi.org:10.3171/jns.1995.82.2.0250> PMID - 7529302
- 214 Jung, C. S. *et al.* 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. *Journal of Neurosurgery* **101**, 836-842 (2004). <https://doi.org:10.3171/jns.2004.101.5.0836> PMID - 15543672
- 215 Jung, C. S., Lange, B., Zimmermann, M. & Seifert, V. The CSF concentration of ADMA, but not of ET-1, is correlated with the occurrence and severity of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett* **524**, 20-24 (2012). <https://doi.org:10.1016/j.neulet.2012.06.076>
- 216 Jung, C. S. *et al.* Association of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase with cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* **107**, 945-950 (2007). <https://doi.org:10.3171/jns-07/11/0945> PMID - 17977265
- 217 Li, H. *et al.* Increased cerebrospinal fluid concentrations of asymmetric dimethylarginine correlate with adverse clinical outcome in subarachnoid hemorrhage patients. *J Clin Neurosci* **21**, 1404-1408 (2014). <https://doi.org:10.1016/j.jocn.2013.11.038> PMID - 24814854
- 218 Sobey, C. G. Cerebrovascular Dysfunction After Subarachnoid Haemorrhage: Novel Mechanisms And Directions For Therapy. *Clin Exp Pharmacol P* **28**, 926-929 (2001). <https://doi.org:10.1046/j.1440-1681.2001.03550.x> PMID - 11703398
- 219 Sehba, F. A., Ding, W. H., Chereshev, I. & Bederson, J. B. Effects of S-Nitrosoglutathione on Acute Vasoconstriction and Glutamate Release After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **30**, 1955-1961 (1999). <https://doi.org:10.1161/01.str.30.9.1955> PMID - 10471450

- 220 Afshar, J. K. B., Pluta, R. M., Boock, R. J., Thompson, B. G. & Oldfield, E. H. Effect of intracarotid nitric oxide on primate cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* **83**, 118-122 (1995). <https://doi.org:10.3171/jns.1995.83.1.0118> PMID - 7782826
- 221 Fathi, A. R., Pluta, R. M., Bakhtian, K. D., Qi, M. & Lonser, R. R. Reversal of cerebral vasospasm via intravenous sodium nitrite after subarachnoid hemorrhage in primates: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery* **115**, 1213-1220 (2011). <https://doi.org:10.3171/2011.7.jns11390> PMID - 21888479
- 222 Pluta, R. M., Dejam, A., Grimes, G., Gladwin, M. T. & Oldfield, E. H. Nitrite Infusions to Prevent Delayed Cerebral Vasospasm in a Primate Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Jama* **293**, 1477-1484 (2005). <https://doi.org:10.1001/jama.293.12.1477> PMID - 15784871
- 223 Ito, Y., Isotani, E., Mizuno, Y., Azuma, H. & Hirakawa, K. Effective Improvement of the Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage with Low-Dose Nitroglycerin. *J Cardiovasc Pharm* **35**, 45-50 (2000). <https://doi.org:10.1097/00005344-200001000-00006> PMID - 10630732
- 224 Agrawal, A. *et al.* Role of Intraventricular Sodium Nitroprusside in Vasospasm Secondary to Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage: A 5-year Prospective Study with Review of the Literature. *Min - Minim Invasive Neurosurg* **52**, 5-8 (2009). <https://doi.org:10.1055/s-0028-1085454> PMID - 19247898
- 225 Raabe, A. *et al.* Effect of Intraventricular Sodium Nitroprusside on Cerebral Hemodynamics and Oxygenation in Poor-grade Aneurysm Patients with Severe, Medically Refractory Vasospasm. *Neurosurgery* **50**, 1006 (2002). <https://doi.org:10.1097/00006123-200205000-00013> PMID - 11950403
- 226 Li, Y.-S. *et al.* Neuroprotection by inhaled nitric oxide in a murine stroke model is concentration and duration dependent. *Brain Res* **1507**, 134-145 (2013). <https://doi.org:10.1016/j.brainres.2013.02.031> PMID - 23473843
- 227 Terpolilli, N. A. *et al.* Nitric oxide inhalation reduces brain damage, prevents mortality, and improves neurological outcome after subarachnoid hemorrhage by resolving early pial microvasospasms. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 2096-2107 (2016). <https://doi.org:10.1177/0271678X15605848>
- 228 Terpolilli, N. A. *et al.* Inhalation of Nitric Oxide Prevents Ischemic Brain Damage in Experimental Stroke by Selective Dilatation of Collateral Arterioles. *Circ Res* **110**, 727-738 (2012). <https://doi.org:10.1161/circresaha.111.253419> PMID - 22207711
- 229 Fung, C. *et al.* Inhaled Nitric Oxide Treatment for Aneurysmal SAH Patients With Delayed Cerebral Ischemia. *Frontiers in Neurology* **13** (2022). <https://doi.org:10.3389/fneur.2022.817072>
- 230 Ko, F. N., Wu, C. C., Kuo, S. C., Lee, F. Y. & Teng, C. M. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* **84**, 4226-4233 (1994). <https://doi.org:10.1182/blood.v84.12.4226.bloodjournal84124226>
- 231 Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *New Engl J Medicine* **369**, 319-329 (2013). <https://doi.org:10.1056/nejmoa1209657> PMID - 23883377
- 232 Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *New Engl J Medicine* **369**, 330-340 (2013). <https://doi.org:10.1056/nejmoa1209655> PMID - 23883378
- 233 Buys, E. S. *et al.* Discovery and development of next generation sGC stimulators with diverse multidimensional pharmacology and broad therapeutic potential. *Nato Sci S A Lif Sci* **78**, 72-80 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.niox.2018.05.009> PMID - 29859918
- 234 Becker, E. M. *et al.* NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *Bmc Pharmacol* **1**, 13 (2001). <https://doi.org:10.1186/1471-2210-1-13> PMID - 11801189
- 235 Stasch, J.-P. *et al.* NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **410**, 212-215 (2001). <https://doi.org:10.1038/35065611> PMID - 11242081

- 236 Stasch, J.-P. & Hobbs, A. J. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications Handbook of experimental pharmacology* 277-308 (2009).
- 237 Sandner, P. From molecules to patients: exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators. *Biol Chem* **399**, 679-690 (2018). <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0155> PMID - 29604206
- 238 Makrynitsa, G. I., Zompra, A. A., Argyriou, A. I., Spyroulias, G. A. & Topouzis, S. Therapeutic Targeting of the Soluble Guanylate Cyclase. *Curr Med Chem* **26**, 2730-2747 (2019). <https://doi.org/10.2174/0929867326666190108095851>
- 239 Stasch, J. P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Brit J Pharmacol* **136**, 773-783 (2002). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704778> PMID - 12086987
- 240 Kumar, V. *et al.* Insights into BAY 60-2770 Activation and S-Nitrosylation-Dependent Desensitization of Soluble Guanylyl Cyclase via Crystal Structures of Homologous Nostoc H-NOX Domain Complexes. *Biochemistry-us* **52**, 3601-3608 (2013). <https://doi.org/10.1021/bi301657w> PMID - 23614626
- 241 Nishizawa, S., Yamamoto, S., Yokoyama, T., Ryu, H. & Uemura, K. Chronological Changes of Arterial Diameter, cGMP, and Protein Kinase C in the Development of Vasospasm. *Stroke* **26**, 1916-1921 (1995). <https://doi.org/doi:10.1161/01.STR.26.10.1916>
- 242 Lan, S. H. *et al.* Upregulation of Connexin 40 Mediated by Nitric Oxide Attenuates Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage via the Nitric Oxide-Cyclic Guanosine Monophosphate-Protein Kinase G Pathway. *World Neurosurg* **136**, e476-e486 (2020). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.01.026>
- 243 Kim, P., Schini, V. B., Sundt, T. M. & Vanhoutte, P. M. Reduced production of cGMP underlies the loss of endothelium-dependent relaxations in the canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Circ Res* **70**, 248-256 (1992). <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.70.2.248>
- 244 Xu, L. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ regulates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage via modulating vascular smooth muscle cells phenotypic conversion. *Mol Med Rep* **24** (2021). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12500>
- 245 Toğuşlu, G. *et al.* Ameliorating the effects of Adalimumab on rabbits with experimental cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **26**, 847-852 (2020). <https://doi.org/10.14744/tjtes.2019.52504>
- 246 Bowyer, J. F. *et al.* A visual description of the dissection of the cerebral surface vasculature and associated meninges and the choroid plexus from rat brain. *J Vis Exp*, e4285 (2012). <https://doi.org/10.3791/4285>
- 247 Zellner, A. *et al.* CADASIL brain vessels show a HTRA1 loss-of-function profile. *Acta Neuropathol* **136**, 111-125 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1853-8>
- 248 Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthr Cartilage* **20**, 256-260 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.02.010> PMID - 22424462
- 249 Bühler, D., Schüller, K. & Plesnila, N. Protocol for the induction of subarachnoid hemorrhage in mice by perforation of the Circle of Willis with an endovascular filament. *Transl Stroke Res* **5**, 653-659 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12975-014-0366-6> PMID - 25123204
- 250 Thal, S. C. & Plesnila, N. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *J Neurosci Meth* **159**, 261-267 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.016> PMID - 16945419
- 251 Schwarzmaier, S. M. *et al.* Perfusion pressure determines vascular integrity and histomorphological quality following perfusion fixation of the brain. *J Neurosci Methods* **372**, 109493 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109493>
- 252 Moritz, C. P. 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *J Proteomics* **212**, 103575 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575> PMID - 31706026

- 253 Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970). <https://doi.org:10.1038/227680a0> PMID - 5432063
- 254 Schägger, H. Membrane Protein Purification and Crystallization (Second Edition). 85-103 (2003). <https://doi.org:10.1016/b978-012361776-7/50005-x>
- 255 Svasti, J. & Panijpan, B. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A simple explanation of why it works. *J Chem Educ* **54**, 560 (1977). <https://doi.org:10.1021/ed054p560>
- 256 Burnette, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203 (1981). [https://doi.org:10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org:10.1016/0003-2697(81)90281-5) PMID - 6266278
- 257 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc National Acad Sci* **76**, 4350-4354 (1979). <https://doi.org:10.1073/pnas.76.9.4350> PMID - 388439
- 258 Schießl, I. M. & Castrop, H. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy. *Pflügers Archiv - European J Physiology* **468**, 1505-1516 (2016). <https://doi.org:10.1007/s00424-016-1832-7> PMID - 27352273
- 259 Oheim, M., Michael, D. J., Geisbauer, M., Madsen, D. & Chow, R. H. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliver Rev* **58**, 788-808 (2006). <https://doi.org:10.1016/j.addr.2006.07.005> PMID - 17055106
- 260 Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2**, 932-940 (2005). <https://doi.org:10.1038/nmeth818> PMID - 16299478
- 261 So, P. T. C., Dong, C. Y., Masters, B. R. & Berland, K. M. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annu Rev Biomed Eng* **2**, 399-429 (2000). <https://doi.org:10.1146/annurev.bioeng.2.1.399> PMID - 11701518
- 262 König, K. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc-oxford* **200**, 83-104 (2000). <https://doi.org:10.1046/j.1365-2818.2000.00738.x> PMID - 11106949
- 263 Rubart, M. Two-Photon Microscopy of Cells and Tissue. *Circ Res* **95**, 1154-1166 (2004). <https://doi.org:10.1161/01.res.0000150593.30324.42> PMID - 15591237
- 264 Wang, B. G., KÖNig, K. & Halbhauer, K. J. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *J Microsc-oxford* **238**, 1-20 (2010). <https://doi.org:10.1111/j.1365-2818.2009.03330.x> PMID - 20384833
- 265 Shih, A. Y. *et al.* Two-Photon Microscopy as a Tool to Study Blood Flow and Neurovascular Coupling in the Rodent Brain. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **32**, 1277-1309 (2011). <https://doi.org:10.1038/jcbfm.2011.196> PMID - 22293983
- 266 Bice, J. S., Keim, Y., Stasch, J.-P. & Baxter, G. F. NO-independent stimulation or activation of soluble guanylyl cyclase during early reperfusion limits infarct size. *Cardiovasc Res* **101**, 220-228 (2014). <https://doi.org:10.1093/cvr/cvt257> PMID - 24259501
- 267 Lee, K. H. *et al.* Cardioprotective effects of PKG activation by soluble GC activator, BAY 60-2770, in ischemia-reperfusion-injured rat hearts. *Plos One* **12**, e0180207 (2017). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0180207> PMID - 28671970
- 268 Tawa, M. *et al.* Soluble Guanylate Cyclase Redox State Under Hypoxia or Hypoxia/Reoxygenation in Isolated Monkey Coronary Arteries. *J Pharmacol Sci* **125**, 169-175 (2014). <https://doi.org:10.1254/jphs.14046fp> PMID - 24859780
- 269 Tawa, M. & Okamura, T. Soluble guanylate cyclase redox state under oxidative stress conditions in isolated monkey coronary arteries. *Pharmacol Res Perspectives* **4**, e00261 (2016). <https://doi.org:10.1002/prp2.261> PMID - 27713826
- 270 Tawa, M., Shimosato, T., Iwasaki, H., Imamura, T. & Okamura, T. Vasorelaxing effects of the soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 in nitrate-tolerant monkey and canine coronary arteries. *Naunyn-schmiedeberg's Archives Pharmacol* **388**, 381-385 (2015). <https://doi.org:10.1007/s00210-014-1083-0> PMID - 25582420

- 271 Rojas-Moscoso, J. A. *et al.* The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 potently relaxes the pulmonary artery on congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Surg Int* **30**, 1031-1036 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00383-014-3561-3> PMID - 25062768
- 272 Ghosh, A. *et al.* Soluble guanylate cyclase as an alternative target for bronchodilator therapy in asthma. *Proc National Acad Sci* **113**, E2355-E2362 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1524398113> PMID - 27071111
- 273 Knorr, A. *et al.* Nitric Oxide-independent Activation of Soluble Guanylate Cyclase by BAY 60-2770 in Experimental Liver Fibrosis. *Arzneimittelforschung* **58**, 71-80 (2011). <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296471> PMID - 18412020
- 274 Xie, G. *et al.* Role of Differentiation of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Progression and Regression of Hepatic Fibrosis in Rats. *Gastroenterology* **142**, 918-927.e916 (2012). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.017> PMID - 22178212
- 275 Ferreira, W. A. *et al.* Beneficial Effects of Soluble Guanylyl Cyclase Stimulation and Activation in Sickle Cell Disease are Amplified by Hydroxyurea: In Vitro and In Vivo Studies. *J Pharmacol Exp Ther* **374**, jpet.119.264606 (2020). <https://doi.org/10.1124/jpet.119.264606> PMID - 32631869
- 276 Estancial, C. S., Rodrigues, R. L., Nucci, G. D., Antunes, E. & Mónica, F. Z. Pharmacological characterisation of the relaxation induced by the soluble guanylate cyclase activator, BAY 60-2770 in rabbit corpus cavernosum. *Bju Int* **116**, 657-664 (2015). <https://doi.org/10.1111/bju.13105> PMID - 25715977
- 277 Lasker, G. F. *et al.* The sGC activator BAY 60-2770 has potent erectile activity in the rat. *Am J Physiol-heart C* **304**, H1670-H1679 (2013). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00062.2013> PMID - 23585129
- 278 Silva, F. H. *et al.* Prolonged Therapy with the Soluble Guanylyl Cyclase Activator BAY 60-2770 Restores the Erectile Function in Obese Mice. *J Sex Medicine* **11**, 2661-2670 (2014). <https://doi.org/10.1111/jsm.12682> PMID - 25196910
- 279 Alexandre, E. C. *et al.* Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Degradation and Impairment of Nitric Oxide-Mediated Responses in Urethra from Obese Mice: Reversal by the sGC Activator BAY 60-2770. *J Pharmacol Exp Ther* **349**, 2-9 (2014). <https://doi.org/10.1124/jpet.113.211029> PMID - 24421320
- 280 Füllhase, C. *et al.* Reduction of obstruction related bladder overactivity by the guanylyl cyclase modulators BAY 41-2272 and BAY 60-2770 alone or in combination with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *NeuroUrol Urodynam* **34**, 787-793 (2015). <https://doi.org/10.1002/nau.22665> PMID - 25230878
- 281 Leiria, L. O. *et al.* The Soluble Guanylyl Cyclase Activator BAY 60-2770 Ameliorates Overactive Bladder in Obese Mice. *J Urology* **191**, 539-547 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.09.020> PMID - 24050894
- 282 Raat, N. J. H. *et al.* Direct sGC Activation Bypasses NO Scavenging Reactions of Intravascular Free Oxy-Hemoglobin and Limits Vasoconstriction. *Antioxid Redox Sign* **19**, 2232-2243 (2013). <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5181> PMID - 23697678
- 283 Mendes-Silverio, C. B. *et al.* Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. *Plos One* **7**, e47223 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047223> PMID - 23144808
- 284 Tawa, M., Shimosato, T., Iwasaki, H., Imamura, T. & Okamura, T. Different Influences of Extracellular and Intracellular Superoxide on Relaxation Through the NO/sGC/cGMP Pathway in Isolated Rat Iliac Arteries. *J Cardiovasc Pharm* **65**, 160-167 (2015). <https://doi.org/10.1097/fjc.000000000000173> PMID - 25329747
- 285 Tawa, M., Shimosato, T., Iwasaki, H., Imamura, T. & Okamura, T. Effects of Peroxynitrite on Relaxation through the NO/sGC/cGMP Pathway in Isolated Rat Iliac Arteries. *J Vasc Res* **51**, 439-446 (2015). <https://doi.org/10.1159/000371491> PMID - 25634663
- 286 Wang, D. Z., Jones, A. W., Wang, W. Z., Wang, M. & Korhuis, R. J. Soluble guanylate cyclase activation during ischemic injury in mice protects against postischemic inflammation at the

- mitochondrial level. *Am J Physiol-gastr L* **310**, G747-G756 (2016). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00323.2015> PMID - 26950856
- 287 Prawez, S. *et al.* BAY 41-2272 Treatment Improves Acetylcholine-Induced Aortic Relaxation in L-NAME Hypertensive Rats. *Int J Angiology* **25**, 235-240 (2016). <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579625> PMID - 27895434
- 288 Tawa, M. *et al.* Stimulation of nitric oxide-sensitive soluble guanylate cyclase in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Life Sci* **203**, 203-209 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.045> PMID - 29705351
- 289 Paul, T. *et al.* Therapeutic effects of soluble guanylate cyclase stimulation on pulmonary hemodynamics and emphysema development in guinea pigs chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Physiol-lung C* **317**, L222-L234 (2019). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00399.2018> PMID - 31166128
- 290 Paul, T. *et al.* Soluble guanylate cyclase stimulation reduces oxidative stress in experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Plos One* **13**, e0190628 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190628> PMID - 29304131
- 291 Lambers, C. *et al.* Combined Activation of Guanylate Cyclase and Cyclic AMP in Lung Fibroblasts as a Novel Therapeutic Concept for Lung Fibrosis. *Biomed Res Int* **2019**, 1-10 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/1345402> PMID - 30984775
- 292 Nunes, K. P., Teixeira, C. E., Priviero, F. B. M., Toque, H. A. & Webb, R. C. Beneficial Effect of the Soluble Guanylyl Cyclase Stimulator BAY 41-2272 on Impaired Penile Erection in db/db-/- Type II Diabetic and Obese Mice. *J Pharmacol Exp Ther* **353**, 330-339 (2015). <https://doi.org/10.1124/jpet.114.220970> PMID - 25740897
- 293 Calmasini, F. B. *et al.* Soluble Guanylate Cyclase Modulators, BAY 41-2272 and BAY 60-2770, Inhibit Human and Rabbit Prostate Contractility. *Urology* **94**, 312.e319-312.e315 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.04.023> PMID - 27131967
- 294 Tawa, M. *et al.* Responsiveness of rat aorta and pulmonary artery to cGMP generators in the presence of thiol or heme oxidant. *J Pharmacol Sci* **140**, 43-47 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.04.002> PMID - 31036520
- 295 Carvalho, M. U. W. B. *et al.* BAY 41-2272 inhibits human T lymphocyte functions. *Int Immunopharmacol* **77**, 105976 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105976> PMID - 31732450
- 296 Mullershausen, F., Russwurm, M., Friebe, A. & Koesling, D. Inhibition of Phosphodiesterase Type 5 by the Activator of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase BAY 41-2272. *Circulation* **109**, 1711-1713 (2004). <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000126286.47618.bd> PMID - 15066950
- 297 Bischoff, E. & Stasch, J.-P. Effects of the sGC Stimulator BAY 41-2272 Are Not Mediated by Phosphodiesterase 5 Inhibition. *Circulation* **110**, e320-e321 (2004). <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000142209.28862.12> PMID - 15381669
- 298 Bertuglia, S., Veronese, F. M. & Pasut, G. Polyethylene glycol and a novel developed polyethylene glycol-nitric oxide normalize arteriolar response and oxidative stress in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol-heart C* **291**, H1536-H1544 (2006). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01114.2005> PMID - 16489107
- 299 Chiang, E. T. *et al.* Protective effects of high-molecular weight Polyethylene Glycol (PEG) in human lung endothelial cell barrier regulation: Role of actin cytoskeletal rearrangement. *Microvasc Res* **77**, 174-186 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.11.007> PMID - 19121327
- 300 Svendgaard, N. A., Edvinsson, L., Owman, C. & Sahlin, C. Increased sensitivity of the basilar artery to norepinephrine and 5-hydroxytryptamine following experimental subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol* **8**, 191-195 (1977).
- 301 Barry, K. J., Gogjian, M. A. & Stein, B. M. Small animal model for investigation of subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Stroke* **10**, 538-541 (1979). <https://doi.org/10.1161/01.str.10.5.538>

- 302 Leclerc, J. L. *et al.* A Comparison of Pathophysiology in Humans and Rodent Models of Subarachnoid Hemorrhage. *Front Mol Neurosci* **11**, 71 (2018). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00071> PMID - 29623028
- 303 Marbacher, S. *et al.* Systematic Review of In Vivo Animal Models of Subarachnoid Hemorrhage: Species, Standard Parameters, and Outcomes. *Transl Stroke Res* **10**, 250-258 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0657-4> PMID - 30209798
- 304 Megyesi, J. F. & Findlay, J. M. Cerebral Vasospasm. 99-102 (2001). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6232-3_21 PMID - 11563318
- 305 Feiler, S., Friedrich, B., Schöller, K., Thal, S. C. & Plesnila, N. Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring. *J Neurosci Meth* **190**, 164-170 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.05.005> PMID - 20457182
- 306 Amki, M. E. *et al.* Long-Lasting Cerebral Vasospasm, Microthrombosis, Apoptosis and Paravascular Alterations Associated with Neurological Deficits in a Mouse Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol* **55**, 2763-2779 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0514-6> PMID - 28455691
- 307 Güresir, E., Schuss, P., Borger, V. & Vatter, H. Rat Cisterna Magna Double-Injection Model of Subarachnoid Hemorrhage – Background, Advantages/Limitations, Technical Considerations, Modifications, and Outcome Measures. 325-329 (2014). https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_56 PMID - 25366646
- 308 Lin, C.-L. *et al.* A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *J Neurosci Meth* **123**, 89-97 (2003). [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(02\)00344-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(02)00344-8) PMID - 12581852
- 309 Cai, J. *et al.* A Novel Intravital Method to Evaluate Cerebral Vasospasm in Rat Models of Subarachnoid Hemorrhage: A Study with Synchrotron Radiation Angiography. *Plos One* **7**, e33366 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033366> PMID - 22428033
- 310 Kikkawa, Y., Kurogi, R. & Sasaki, T. The Single and Double Blood Injection Rabbit Subarachnoid Hemorrhage Model. *Transl Stroke Res* **6**, 88-97 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12975-014-0375-5> PMID - 25381219
- 311 Raslan, F. *et al.* A modified double injection model of cisterna magna for the study of delayed cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Transl Stroke Medicine* **4**, 23 (2012). <https://doi.org/10.1186/2040-7378-4-23> PMID - 23194464
- 312 Zhang, X.-S. *et al.* Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res* **1624**, 113-124 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.020> PMID - 26210617
- 313 Schwartz, A. Y., Masago, A., Sehba, F. A. & Bederson, J. B. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J Neurosci Meth* **96**, 161-167 (2000). [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(00\)00156-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(00)00156-4) PMID - 10720681
- 314 Lee, J.-Y., Sagher, O., Keep, R., Hua, Y. & Xi, G. COMPARISON OF EXPERIMENTAL RAT MODELS OF EARLY BRAIN INJURY AFTER SUBARACHNOID HEMORRHAGE. *Neurosurgery* **65**, 331-343 (2009). <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000345649.78556.26> PMID - 19625913
- 315 Titova, E., Ostrowski, R. P., Zhang, J. H. & Tang, J. Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm. *Neurol Res* **31**, 568-581 (2009). <https://doi.org/10.1179/174313209x382412> PMID - 19108759
- 316 Lee, J.-Y., Huang, D.-L., Keep, R. & Sagher, O. Characterization of an improved double hemorrhage rat model for the study of delayed cerebral vasospasm. *J Neurosci Meth* **168**, 358-366 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.10.029> PMID - 18096241
- 317 Parra, A. *et al.* Mouse model of subarachnoid hemorrhage associated cerebral vasospasm: methodological analysis. *Neurol Res* **24**, 510-516 (2002). <https://doi.org/10.1179/016164102101200276>

- 318 Schöller, K. *et al.* Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res* **1142**, 237-246 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.034>
- 319 Thal, S. C. *et al.* Brain edema formation and neurological impairment after subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation. *J Neurosurg* **111**, 988-994 (2009). <https://doi.org/10.3171/2009.3.Jns08412>
- 320 *Produktdatenübersicht* Bay 41-2272, Sigma Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b8810?lang=de®ion=DE> (
- 321 *Produktdatenübersicht* Bay 60-2770, Sigma Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml2281?lang=de®ion=DE> (
- 322 Elgert, C., Rühle, A., Sandner, P. & Behrends, S. A novel soluble guanylyl cyclase activator, BR11257, acts as a non-stabilising partial agonist of sGC. *Biochem Pharmacol* **163**, 142-153 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.007> PMID - 30753814
- 323 Sömmer, A., Sandner, P. & Behrends, S. BAY 60–2770 activates two isoforms of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase: Evidence for stable insertion of activator drugs. *Biochem Pharmacol* **147**, 10-20 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.010> PMID - 29155144
- 324 Torre, J. C. d. I. *et al.* DIMETHYL SULFOXIDE IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM TRAUMA. *Annals of the New York Academy of Sciences* **243**, 362-389 (1975). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb25377.x> PMID - 805558
- 325 Camp, P. E., James, H. E. & Werner, R. Acute dimethyl sulfoxide therapy in experimental brain edema: Part I. Effects on intracranial pressure, blood pressure, central venous pressure, and brain water and electrolyte content. *Neurosurgery* **9**, 28-33 (1981). <https://doi.org/10.1227/00006123-198107000-00005>
- 326 James, H. E., Camp, P. E., Harbaugh, R. D., Marshall, L. F. & Werner, R. Comparison of the effects of DMSO and pentobarbitone on experimental brain oedema. *Acta Neurochir* **60**, 245-255 (1982). <https://doi.org/10.1007/bf01406310> PMID - 7072538
- 327 Karaca, M., Bilgin, U. Y., Akar, M. & Torre, J. C. d. I. Dimethyl sulphoxide lowers ICP after closed head trauma. *Eur J Clin Pharmacol* **40**, 113-114 (1991). <https://doi.org/10.1007/bf00315149> PMID - 2060538
- 328 Marshall, L. F., M.D, Camp, P. E., M.D & Bowers, S. A. Dimethyl Sulfoxide for the Treatment of Intracranial Hypertension: A Preliminary Trial. *Neurosurgery* **14**, 659-663 (1984). <https://doi.org/10.1227/00006123-198406000-00002>
- 329 Waller, F. T., Tanabe, C. T. & Paxton, H. D. TREATMENT OF ELEVATED INTRACRANIAL PRESSURE WITH DIMETHYL SULFOXIDE of sub- 0 PMID - 6576703. *Annals of the New York Academy of Sciences* **411**, 286-292 (1983).
- 330 Brown, F. D., Johns, L. M. & Mullan, S. Dimethyl sulfoxide in experimental brain injury, with comparison to mannitol. *Journal of Neurosurgery* **53** (1980). <https://doi.org/10.3171/jns.1980.53.1.0058>
- 331 Kulali, A., Akar, M. & Baykut, L. Dimethyl sulfoxide in the management of patient with brain swelling and increased intracranial pressure after severe closed head injury. *Min - Minim Invasive Neurosurg* **33**, 177-180 (1990). <https://doi.org/10.1055/s-2008-1053579> PMID - 2290457
- 332 Baptiste, D. C. *et al.* Systemic Polyethylene Glycol Promotes Neurological Recovery and Tissue Sparing in Rats After Cervical Spinal Cord Injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **68**, 661-676 (2009). <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181a72605>
- 333 Koob, A. O., Colby, J. M. & Borgens, R. B. Behavioral recovery from traumatic brain injury after membrane reconstruction using polyethylene glycol. *Journal of Biological Engineering* **2**, 9 (2008). <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-9>
- 334 Cipolla, M. J. The Cerebral Circulation. *Colloquium Ser Integr Syst Physiology Mol Funct* **1**, 1-59 (2009). <https://doi.org/10.4199/c00005ed1v01y200912isp002>

- 335 Smith, K. J. & Ainslie, P. N. Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise. *Exp Physiol* **102**, 1356-1371 (2017). <https://doi.org/10.1113/ep086249> PMID - 28786150
- 336 Venkat, P., Chopp, M. & Chen, J. New insights into coupling and uncoupling of cerebral blood flow and metabolism in the brain. *Croat Med J* **57**, 223-228 (2016). <https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.223> PMID - 27374823
- 337 Muoio, V., Persson, P. B. & Sendeski, M. M. The neurovascular unit – concept review. *Acta Physiol* **210**, 790-798 (2014). <https://doi.org/10.1111/apha.12250> PMID - 24629161
- 338 Armstead, W. M. Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. *Anesthesiol Clin* **34**, 465-477 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2016.04.002> PMID - 27521192
- 339 Paulson, O. B., Strandgaard, S. & Edvinsson, L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovas Brain Met* **2**, 161-192 (1990).
- 340 Ludwig-Maximilians-Universität, Z. U., Stabsstelle Arbeitssicherheit und Nachhaltigkeit. Referenzwerte der Maus, <https://www.sicherheitswesen.verwaltung.uni-muenchen.de/downloadbereich/tierschutz/normalwerte_maus.pdf> (
- 341 Hockel, K., Trabold, R., Schöller, K., Török, E. & Plesnila, N. Impact of anesthesia on pathophysiology and mortality following subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Transl Stroke Medicine* **4**, 5 (2012). <https://doi.org/10.1186/2040-7378-4-5> PMID - 22414527
- 342 Marbacher, S. *et al.* Systematic Review of In Vivo Animal Models of Subarachnoid Hemorrhage: Species, Standard Parameters, and Outcomes. *Transl Stroke Res* (2018). <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0657-4>
- 343 Wang, Z., Schuler, B., Vogel, O., Arras, M. & Vogel, J. What is the optimal anesthetic protocol for measurements of cerebral autoregulation in spontaneously breathing mice? *Exp Brain Res* **207**, 249-258 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00221-010-2447-4> PMID - 20972776
- 344 Li, C. X., Patel, S., Auerbach, E. J. & Zhang, X. Dose-dependent effect of isoflurane on regional cerebral blood flow in anesthetized macaque monkeys. *Neurosci Lett* **541**, 58-62 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.007>
- 345 Lenz, I. J., Plesnila, N. & Terpolilli, N. A. Role of endothelial nitric oxide synthase for early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **41**, 1669-1681 (2021). <https://doi.org/10.1177/0271678x20973787>
- 346 Meng, L. & Gelb, A. W. Regulation of cerebral autoregulation by carbon dioxide. *Anesthesiology* **122**, 196-205 (2015). <https://doi.org/10.1097/aln.0000000000000506>
- 347 Poulin, M. J., Liang, P. J. & Robbins, P. A. Dynamics of the cerebral blood flow response to step changes in end-tidal PCO₂ and PO₂ in humans. *J Appl Physiol (1985)* **81**, 1084-1095 (1996). <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.81.3.1084>
- 348 Gonzalez Castro, L. N., Mehta, J. H., Braynov, J. B. & Mullen, G. J. Quantification of respiratory depression during pre-operative administration of midazolam using a non-invasive respiratory volume monitor. *Plos One* **12**, e0172750 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172750>
- 349 Hill, R., Santhakumar, R., Dewey, W., Kelly, E. & Henderson, G. Fentanyl depression of respiration: Comparison with heroin and morphine. *Br J Pharmacol* **177**, 254-266 (2020). <https://doi.org/10.1111/bph.14860>
- 350 Lerche, P. & Muir, W. W., 3rd. Effect of medetomidine on breathing and inspiratory neuromuscular drive in conscious dogs. *Am J Vet Res* **65**, 720-724 (2004). <https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.720>
- 351 Casadevall, M. *et al.* Limitations of laser-Doppler velocimetry and reflectance spectrophotometry in estimating gastric mucosal blood flow. *Am J Physiol* **263**, G810-815 (1992). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1992.263.5.G810>
- 352 Obeid, A. N., Barnett, N. J., Dougherty, G. & Ward, G. A critical review of laser Doppler flowmetry. *Journal of Medical Engineering & Technology* **14**, 178-181 (1990). <https://doi.org/10.3109/03091909009009955>

- 353 Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G. & Steenbergen, W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in Medical Science* **24**, 269-283 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0524-0>
- 354 Sánchez, C., Díaz-Nido, J. & Avila, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* **61**, 133-168 (2000). [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00046-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00046-5) PMID - 10704996
- 355 Vestweber, D. VE-Cadherin. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology* **28**, 223-232 (2008). <https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.158014> PMID - 18162609
- 356 Preston, A. N., Cervasio, D. A. & Laughlin, S. T. Visualizing the brain's astrocytes. *Methods Enzymol* **622**, 129-151 (2019). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.006> PMID - 31155050
- 357 Su, X., Huang, L., Qu, Y., Xiao, D. & Mu, D. Pericytes in Cerebrovascular Diseases: An Emerging Therapeutic Target. *Front Cell Neurosci* **13**, 519 (2019). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00519> PMID - 31824267
- 358 Alarcon-Martinez, L., Yemisci, M. & Dalkara, T. Pericyte morphology and function. *Histol Histopathol* **36**, 633-643 (2021). <https://doi.org/10.14670/hh-18-314>
- 359 Balbi, M., Koide, M., Schwarzmaier, S. M., Wellman, G. C. & Plesnila, N. Acute changes in neurovascular reactivity after subarachnoid hemorrhage in vivo. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **37**, 178-187 (2015). <https://doi.org/10.1177/0271678x15621253> PMID - 26676226
- 360 Balbi, M., Koide, M., Wellman, G. C. & Plesnila, N. Inversion of neurovascular coupling after subarachnoid hemorrhage in vivo. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **37**, 3625-3634 (2016). <https://doi.org/10.1177/0271678x16686595> PMID - 28112024
- 361 Balbi, M., Vega, M. J., Loubopoulos, A., Terpolilli, N. A. & Plesnila, N. Long-term impairment of neurovascular coupling following experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **40**, 1193-1202 (2020). <https://doi.org/10.1177/0271678x19863021>
- 362 Hainfellner, J. A. *et al.* Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 449-461 (2001). <https://doi.org/10.1093/jnen/60.5.449>
- 363 Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* **16**, 1-13 (2004). [https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016)
- 364 Pugsley, M. K. & Tabrizchi, R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods* **44**, 333-340 (2000). [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00125-8)
- 365 Østergaard, L. *et al.* The Role of the Microcirculation in Delayed Cerebral Ischemia and Chronic Degenerative Changes after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metabolism* **33**, 1825-1837 (2013). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.173> PMID - 24064495
- 366 Hoffmann, L. S. *et al.* Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Brit J Pharmacol* **157**, 781-795 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00263.x> PMID - 19466990
- 367 Stasch, J.-P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* **116**, 2552-2561 (2006). <https://doi.org/10.1172/jci28371> PMID - 16955146
- 368 Li, Q. *et al.* Hemoglobin induced NO/cGMP suppression Deteriorate Microcirculation via Pericyte Phenotype Transformation after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Sci Rep* **6**, 22070 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep22070>
- 369 Sehba, F. A., Friedrich, V., Jr., Makonnen, G. & Bederson, J. B. Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *J Neurosurg* **106**, 321-329 (2007). <https://doi.org/10.3171/jns.2007.106.2.321>
- 370 Sun, B. L. *et al.* L-arginine improves cerebral blood perfusion and vasomotion of microvessels following subarachnoid hemorrhage in rats. *Clin Hemorheol Microcirc* **29**, 391-400 (2003).

- 371 Guo, Z.-N. *et al.* The Role of Nitric Oxide and Sympathetic Control in Cerebral Autoregulation in the Setting of Subarachnoid Hemorrhage and Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol* **53**, 3606-3615 (2016). <https://doi.org:10.1007/s12035-015-9308-x> PMID - 26108186
- 372 Jr, E. S. C. *et al.* Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **43**, 1711-1737 (2012). <https://doi.org:10.1161/str.0b013e3182587839> PMID - 22556195
- 373 Meurer, S. *et al.* Oxidative stress induces CHIP-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of soluble guanylyl cyclase. *Bmc Pharmacol* **7**, S34 (2007). <https://doi.org:10.1186/1471-2210-7-s1-s34>
- 374 Xia, T. *et al.* Chaperone-dependent E3 ligase CHIP ubiquitinates and mediates proteasomal degradation of soluble guanylyl cyclase. *Am J Physiol-heart C* **293**, H3080-H3087 (2007). <https://doi.org:10.1152/ajpheart.00579.2007> PMID - 17873020
- 375 Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C. & Koesling, D. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* **335**, 125-130 (1998). <https://doi.org:10.1042/bj3350125> PMID - 9742221
- 376 Wang, Q., Mergia, E., Koesling, D. & Mittmann, T. Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience* **360**, 180-189 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.neuroscience.2017.07.063> PMID - 28782641
- 377 Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. H. W. & Valtschanoff, J. G. Synaptic Localization of Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylyl Cyclase in the Hippocampus. *J Neurosci* **22**, 8961-8970 (2002). <https://doi.org:10.1523/jneurosci.22-20-08961.2002> PMID - 12388603
- 378 Koesling, D., Mergia, E. & Russwurm, M. Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. *Current Medicinal Chemistry* **23**, 2653-2665 (2016). <https://doi.org:10.2174/0929867323666160812145050> PMID - 27776472
- 379 Neitz, A., Mergia, E., Eysel, U. T., Koesling, D. & Mittmann, T. Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Eur J Neurosci* **33**, 1611-1621 (2011). <https://doi.org:10.1111/j.1460-9568.2011.07654.x> PMID - 21410795
- 380 Neitz, A. *et al.* Postsynaptic NO/cGMP Increases NMDA Receptor Currents via Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Hippocampus. *Cereb Cortex* **24**, 1923-1936 (2014). <https://doi.org:10.1093/cercor/bht048> PMID - 23448871
- 381 Neitz, A., Mergia, E., Neubacher, U., Koesling, D. & Mittmann, T. NO regulates the strength of synaptic inputs onto hippocampal CA1 neurons via NO-GC1/cGMP signalling. *Pflügers Archiv - European J Physiology* **467**, 1383-1394 (2015). <https://doi.org:10.1007/s00424-014-1571-6> PMID - 25010738
- 382 Peters, S. *et al.* cGMP Imaging in Brain Slices Reveals Brain Region-Specific Activity of NO-Sensitive Guanylyl Cyclases (NO-GCs) and NO-GC Stimulators. *Int J Mol Sci* **19**, 2313 (2018). <https://doi.org:10.3390/ijms19082313> PMID - 30087260
- 383 Martin, E., Golunski, E., Laing, S. T., Estrera, A. L. & Sharina, I. G. Alternative splicing impairs soluble guanylyl cyclase function in aortic aneurysm. *Am J Physiol-heart C* **307**, H1565-H1575 (2014). <https://doi.org:10.1152/ajpheart.00222.2014> PMID - 25239802
- 384 Sharina, I. G. *et al.* α 1 Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Splice Forms as Potential Regulators of Human sGC Activity. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 15104-15113 (2008). <https://doi.org:10.1074/jbc.m710269200> PMID - 18381288
- 385 Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850-853 (1994). <https://doi.org:10.1038/368850a0> PMID - 7512692
- 386 Mistry, D. K. & Garland, C. J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BKCa) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Brit J Pharmacol* **124**, 1131-1140 (1998). <https://doi.org:10.1038/sj.bjp.0701940> PMID - 9720783

- 387 Tanaka, Y., Koike, K. & Toro, L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* **40**, 125-153 (2004). <https://doi.org/10.1540/jsmr.40.125> PMID - 15655302
- 388 Campbell, W. B. & Harder, D. R. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors and Vascular Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Regulation of Tone. *Circ Res* **84**, 484-488 (1999). <https://doi.org/10.1161/01.res.84.4.484> PMID - 10066684
- 389 Roman, R. J., Maier, K. G., Sun, C. W., Harder, D. R. & Alonso-Galicia, M. Renal And Cardiovascular Actions Of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid And Epoxyeicosatrienoic Acids. *Clin Exp Pharmacol P* **27**, 855-865 (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03349.x> PMID - 11071299
- 390 Sun, C.-W. *et al.* Nitric Oxide-20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Interaction in the Regulation of K⁺ Channel Activity and Vascular Tone in Renal Arterioles. *Circ Res* **83**, 1069-1079 (1998). <https://doi.org/10.1161/01.res.83.11.1069> PMID - 9831701
- 391 Sun, C.-W., Falck, J. R., Okamoto, H., Harder, D. R. & Roman, R. J. Role of cGMP versus 20-HETE in the vasodilator response to nitric oxide in rat cerebral arteries. *Am J Physiol-heart C* **279**, H339-H350 (2000). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.1.h339> PMID - 10899074
- 392 Alonso-Galicia, M., Hudetz, A. G., Shen, H., Harder, D. R. & Roman, R. J. Contribution of 20-HETE to Vasodilator Actions of Nitric Oxide in the Cerebral Microcirculation. *Stroke* **30**, 2727-2734 (1999). <https://doi.org/10.1161/01.str.30.12.2727> PMID - 10583004
- 393 Onoue, H. & Katusic, Z. S. Role of Potassium Channels in Relaxations of Canine Middle Cerebral Arteries Induced by Nitric Oxide Donors. *Stroke* **28**, 1264-1271 (1997). <https://doi.org/10.1161/01.str.28.6.1264> PMID - 9183360

11. Posterpräsentation

“The sGC-activator Bay 60-2770 has no influence on microvasospasms after experimental subarachnoid hemorrhage”. S. Katzdobler, B. Seker, N. A. Terpolilli, I. Westermayer, N. Plesnila. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Apr 1;37(1 Suppl):98–168.

Kongress: Brain 2017 - 28th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & 13th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (Berlin, 01. - 04. April 2017)

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Nikolaus Plesnila, der mir die Durchführung dieser Doktorarbeit und eine umfassende wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht hat. Ebenso für seine kontinuierliche Unterstützung, seine wertvollen Ratschläge und sein unermüdlisches Engagement. Seine wissenschaftliche Expertise und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten haben mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei meiner Betreuerin, Prof. Dr. Nicole Terpolilli, für ihre ständige Unterstützung und ihre ermutigenden Worte. Ihre ausgezeichnete fachkundige Anleitung und ihr konstruktives Feedback zu jeder Tages- und Nachtzeit waren für den Fortschritt meiner Forschung von unschätzbarem Wert. Ihre Geduld und ihr Verständnis haben mich stets motiviert, weiterzumachen und mein Bestes zu geben.

Nicole Heumos, Bernhard Groschup, Andreas Zellner, Rebecca Siemel, Burcu Seker und Farida Hellal danke ich für ihre ständige Unterstützung bei dem Erlernen neuer Methoden, für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen zur optimalen Versuchsumsetzung und für das stets bereitwillige *trouble shooten*, egal zu welcher Tages- und Uhrzeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und für eine allzeit angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre sorgten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Phase dieser Doktorarbeit unterstützt haben und stets ein offenes Ohr sowie motivierende Worte für mich hatten. Ohne die fortlaufende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Katzdobler, Sabrina Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Endotheliales NO-sGC Signaling nach experimenteller Subarachnoidalblutung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.07.2025

Ort, Datum

Sabrina Maria Katzdobler

Unterschrift Sabrina Maria Katzdobler