



**Technische Universität München**

Fakultät für Medizin

Aus der Klinik für Neurochirurgie

**Die Rolle des Endothels bei der „cortical spreading ischemia“ (CSI)**

**Andreas Benedikt Bauer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr.med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ute Lindauer

2. Prof. Dr. Claus Zimmer

Die Dissertation wurde am 25.09.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.09.2019 angenommen.

# Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. Lindauer für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die uneingeschränkte Unterstützung, sowohl während der technischen Durchführung der Versuche, als auch beim Anfertigen der schriftlichen Ausarbeitung.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen der Laborgruppe, die mich zu jederzeit tatkräftig unterstützt haben und mir viele nützliche Tipps weitergeben konnten.

Bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich für die gute Stimmung im Labor und die gegenseitige Hilfe und Motivation bedanken.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit danken.

# Inhalt

1. Kurzzusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	6
2.1. Der Schlaganfall als ernstzunehmendes Krankheitsbild der modernen Gesellschaft ...	6
2.2. Zerebrale Blutung als Unterform des Schlaganfalls .....	6
2.3. Klinik der Subarachnoidalblutung.....	7
2.4. Pathophysiologie der Autoregulation der zerebralen Durchblutung .....	7
2.5. Reaktion des Endothels .....	8
2.6. Vasospasmus als alleiniger Pathomechanismus hinter der DIND? .....	9
2.8. <i>Cortical spreading depolarisation</i> – Pathophysiologie .....	10
2.9. CSD – Reaktionen des zerebralen Blutflusses im gesunden Gewebe .....	11
2.10. CSD nach Subarachnoidalblutung - CSI.....	12
2.11. Zelluntergang bei der CSI .....	13
3. Material und Methoden.....	16
3.1. Gründe für die Wahl des Modells .....	16
3.2. Versuchsaufbau.....	17
3.2.1. Entnahme des Gehirns .....	17
3.2.2. Präparation der Arterie.....	18
3.2.3. Druckaufbau und Teststimulation der äquilibrierten Arterie .....	18
3.2.4. Zeitablauf.....	19
3.3. Verwendete Substanzen und Materialien .....	19
3.4. Experimentelles Design.....	23
3.4.1. Reihe 1: repetitive CSI Reihe zur Zeitkontrolle .....	23
3.4.2. Reihe 2: repetitive CSI Reihe unter unspezifischer Blockade der NO-Synthase durch L-NNA.....	24
3.4.3. Reihe 3: funktionelle Testungen des Endothels mit Acetylcholin .....	24
3.4.4. Reihe 4: repetitive CSI Reihe im Wechsel mit Acetylcholin und unter unspezifischer Blockade der NO-Synthase durch L-NNA.....	24
3.4.5. Reihe 5: repetitive CSI Reihe nach der funktionellen Zerstörung des Endothels durch Luft Applikation.....	24
3.4.6. Reihe 6-8: Untersuchungen der Reversibilität nach Gabe des Ca <sup>2+</sup> Kanalblockers Nimodipin.....	25
3.5. Experimentelles Paradigma .....	25
3.6. Statistische Auswertung .....	27
4. Ergebnisteil.....	28
4.1. Kriterien einer intakten Gefäßreaktion .....	28
4.2. Reihe 1: Repetitive Zeitkontrolle .....	31

4.3. Reihe 2: Blockade mit L-NNA.....	32
4.4. Kontrolle der endothelialen Integrität: Acetylcholin – Test .....	34
4.5. Reihe 4: repetitive Ach und CSI Reihe unter L-NNA – Blockade .....	37
4.6. Luftversuche .....	39
4.7. Reihe 5: Luft Versuch- Zeitkontrolle.....	41
4.8.1 Reihe 6-8: Nimodipin – Versuche .....	43
4.8.2 Reihe 6-8: Vehikel – Versuche.....	46
5. Diskussion .....	47
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	47
5.2. Kritik am gewählten Modell .....	48
5.3. Vasodilatoren aus dem Endothel als potentielle Schutzmechanismen vor einer CSI .	48
5.3.1. NO .....	49
5.3.2. Prostaglandin I <sub>2</sub> .....	53
5.3.3. EETs .....	56
5.3.4. Hydrogen Sulfid (H <sub>2</sub> S) .....	58
5.3.5 CO.....	61
5.4. Ausblick.....	63
6. Abkürzungsverzeichnis .....	64
7.Literaturverzeichnis .....	67

## 1. Kurzzusammenfassung

Subarachnoidalblutungen gelten als Unterform des Schlaganfalls und betreffen hauptsächlich jüngere Patienten. Das klinische Bild ist oftmals gravierend. Vor allem sekundäre Komplikationen, wie die verspätet einsetzende neurologische Verschlechterung (engl.: delayed ischemic neuronal deficit (DIND)), tragen einen Großteil zum schlechten *outcome* der Patienten bei. Lange Zeit war die Ursache dieser DINDs ungeklärt. Eine mangelnde Korrelation zwischen klinischem Bild und radiologisch nachgewiesenen Vasospasmen der großen zerebralen Gefäße ließen vermuten, dass nicht zwingend die oft postulierten Vasospasmen dessen Ursache dafür seien. Vielmehr gerät immer mehr der Pathomechanismus der *cortical spreading ischemia* (CSI) in den Fokus der Forschung.

Bei der CSI handelt es sich um eine Depolarisationswelle, die sich über den Cortex ausbreitet und gefolgt wird von einer langandauernden kritischen Vasokonstriktion der zerebralen Gefäße und einem deutlichen Perfusionsdefizit. Es kommt zu Folgeschäden des betroffenen Bereichs. Im Gegensatz dazu beschreibt eine *cortical spreading depolarisation* (CSD) im gesunden Cortex eine neuronal astrozytäre Depolarisationswelle, die von einer Hyperämie begleitet wird und im weiteren Verlauf von einer milden vorübergehenden Oligämie gefolgt wird, ohne dass sich bleibende Schäden im betroffenen Gewebe einstellen. Ursächlich für die gestörte Gefäßreaktion bei CSI scheint die Kombination aus Azidose, Hyperkalämie und verminderter Bioverfügbarkeit des Stickstoffmonoxid (NO) zu sein, wie es nach einer Subarachnoidalblutung (SAB) auftritt. Doch welche vasoaktiven Agenzien genau für die Entstehung der kritischen Vasokonstriktion verantwortlich sind und aus welchen Zellen diese stammen, ist noch nicht abschließend geklärt. Klinisch von Bedeutung scheint der Mechanismus der CSD, bzw. CSI bei einer ganzen Reihe von neurologischen Krankheitsbildern wie der Migräneaura, dem Schädel –Hirn -Trauma und eben auch der SAB zu sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Endothel eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der CSI spielt. Mit Hilfe des Modells der isolierten Arterie konnte die Reaktion der *Arteria cerebri media* der männlichen Ratte auf einen CSI-Puffer getestet werden. Dieser Puffer wurde von einer Arbeitsgruppe in Berlin entwickelt und imitiert das Milieu, wie es während Subarachnoidalblutungen an den zerebralen

Gefäßen auftritt. Nach dem Tonusaufbau und der funktionellen Testung der Arterie mittels standardisierter Testreaktion auf eine milde Hyperkaliämie, wurde mit den Versuchen begonnen. Der verwendete CSI Puffer führte in repetitiven Kontrollen zu einer stabilen und signifikanten Vasodilation im Sinne einer *CSD-induzierten Hyperämie (CSH)*. Wie bereits in einer Studie der Arbeitsgruppe gezeigt, konnte auch hier nach unspezifischer Blockade der *NO-Synthase* mittels N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin (L-NNA) die Reaktion in eine Vasokonstriktion umgewandelt werden, wie sie während der *CSI* auftritt. Eine funktionelle Überprüfung des Endothels erfolgte durch eine Testreaktion mittels Acetylcholin. Nach unspezifischer *NOS* Blockade wurde die Vasodilation auf Acetylcholin aufgehoben. Nach erfolgreicher Reproduktion dieser Befunde wurde nun eine funktionelle Schädigung des Endothels durch transiente intraluminale Luftapplikation über einen definierten Zeitraum erreicht. Dies wurde im Anschluss mittels aufgehobener Acetylcholinreaktion funktionell bestätigt. Die Vitalität der glatten Muskelzellschicht des Gefäßes wurde durch eine Hyperkaliämie-reaktion, welche endothelunabhängig vermittelt wird, sichergestellt. Bei diesen Gefäßen zeigte sich nun ebenfalls - analog zu den *NO-Synthase*-inhibierten Gefäßen - eine konstante Vasokonstriktion nach Gabe des *CSI* – Puffers. Die Applikation des Calciumkanalblockers Nimodipin stellte die ursprüngliche Vasodilation der Arterie nach *CSD* wieder her. Diese direkt *in vitro* dargestellte endothelunabhängige Vasodilation des Gefäßes auf Nimodipin bestätigt den klinischen Nutzen dieses Medikaments in der SAB Therapie.

Die in Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten Versuche stellen somit die bedeutende Rolle des Endothels bei dem Pathomechanismus der *CSI* dar.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Der Schlaganfall als ernstzunehmendes Krankheitsbild der modernen Gesellschaft**

Die Durchblutung des Gehirns ist von herausragender Bedeutung für den Organismus. Bei lediglich 2% des Körpergewichtes braucht das Gehirn in Ruhe ca. 13% des Herzminutenvolumens. Eine mangelnde Durchblutung führt auf zellulärer Ebene innerhalb von Minuten zum Tod der Zelle (Smith et al. 1984). Der massive Zelluntergang im Gehirn spiegelt sich im Schlaganfall wieder. Dieses Krankheitsbild stellt weltweit die zweithäufigste Todesursache dar (Feigin et al. 2014). Auch rangiert es weit oben unter den Ursachen für bleibende körperliche Behinderungen (Johnston et al. 2009). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass 90% der Schlaganfälle mit mindestens einem von 10 Risikofaktoren assoziiert sind (O'Donnell et al. 2010). Durch Veränderungen des Lebensstils und der damit verbundenen steigenden Prävalenz dieser Risikofaktoren für einen Schlaganfall gewinnt dieses Krankheitsbild und somit auch die Forschung nach den Ursachen und der Therapie weiter an Stellenwert (Bonita et al. 2004).

### **2.2. Zerebrale Blutung als Unterform des Schlaganfalls**

Der klinische Begriff Schlaganfall beinhaltet zwei grundlegend verschiedene Ursachen: den ischämischen (ca. 80% aller Fälle) und den hämorrhagischen Infarkt (ca. 20%).

Die Subarachnoidalblutung (SAB) gilt als Sonderform der Blutungen mit einem Anteil von ca. 10% an allen Schlaganfällen (Pobereskin 2001). So betrifft das Krankheitsbild im Durchschnitt in den Industrienationen ungefähr 10 aus 100.000 Personen (Ingall et al. 2000), wie oben erwähnt mit ansteigender Tendenz. Besonderes Augenmerk verdient diese Sonderform der Blutung jedoch aufgrund des jungen Durchschnittsalters der Betroffenen von ca. 50 Jahren, dem Vorkommen in nahezu allen Altersschichten und der hohen Rate an Mortalität (bis zu 40%) und Morbidität (Ingall et al. 2000).

### 2.3. Klinik der Subarachnoidalblutung

Ätiologie der SAB ist meistens ein rupturiertes, sakkuläres Aneurysma eines der zerebralen Gefäße. Dieses initiale Ereignis führt häufig zu schwersten Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Hirnnervenausfällen und sensomotorischen Defiziten. Die Menge des in den Subarachnoidalraum ausgetretenen Blutes ist ein wichtiger prognostischer Parameter für das *outcome* des Patienten (Bederson et al. 2009). Kennzeichnend für diese Art der Blutung sind auch die schwerwiegenden Komplikationen. Als frühe Komplikationen gelten unter anderem die Entwicklung eines Hydrozephalus und einer respiratorischen Insuffizienz. Mit einer hohen Mortalität behaftet ist vor allem aber die Rezidivblutung, welche bei optimaler medizinischer Versorgung in ca. 7% Prozent der Fälle klinisch von Bedeutung wird (Naidech et al. 2005). Nach diesen ersten frühen Komplikationen kann es ab dem 3. Tag bis ca. zum 14. Tag nach der initialen Blutung zu verzögerten zerebralen Ischämien (*delayed cortical ischemia* = DCI) kommen. Klinisch zeigen sich diese vor allem in einer Bewusstseinsminderung und neu aufgetretenen fokalen Defiziten (Hijdra et al. 1986), (Brouwers et al. 1993). Die DCI gilt als wichtigster Faktor für das *outcome* des Patienten nach überstandener Initialphase (Kassell et al. 1990).

### 2.4. Pathophysiologie der Autoregulation der zerebralen Durchblutung

Das Herzminutenvolumen ist bis auf maximal 25 Liter pro Minute steigerbar. Um jedoch die Durchblutungsverhältnisse aufrecht zu erhalten und die bezogen auf das Organgewicht am besten versorgten Gewebearten, wie das Myokard, die Nieren, das Verdauungssystem und das Gehirn weiterhin genügend Blut zukommen zu lassen, ist ein ausgereiftes Regulationssystem notwendig. Die physiologische Autoregulation der zerebralen Blutgefäßdurchmesser spielt eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses bei Schwankungen im Perfusionsdruck.

Eine gestörte Autoregulation des zerebralen Gefäßsystems geht mit einem erhöhten Risiko für Vasospasmen einher (Budohoski et al. 2014). Im Tiermodell



konnte gezeigt werden, dass eine SAB ab der zweiten bis dritten Stunde, bis zu mehreren Monaten nach dem Ereignis zu einer Störung im zerebralen Blutfluss führen kann (Jakubowski et al. 1982). Auch am Patienten konnte diese Störung der Autoregulation meist innerhalb der ersten 72 Stunden nachgewiesen werden. Diese korreliert auch mit dem Schweregrad der SAB (Schmieder et al. 2006).

## 2.5. Reaktion des Endothels

Das Endothel ist Teil der komplexen Regulierung des Gefäßdurchmessers. In den Zellen des Endothels wird zu diesem Zweck unter anderem Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sorgt, stimuliert durch die Wandschubspannung ausgehend vom Blutfluß, für ein permanent stabiles NO-Niveau (Faraci und Heistad 1998). Stickstoffmonoxid bindet und aktiviert das Enzym Guanylatcyclase, welches die Synthese von cyclischem Guanylmophosphat (cGMP) aus Guanyltriphosphat (GTP) fördert. Das cGMP entfaltet seine Wirkung an den benachbarten Muskelzellen der Mediaschicht der Gefäßwand durch eine abhängige Proteinkinase. Durch Phosphorylierung von Ionenkanälen sinkt unter anderem der intrazelluläre Calciumlevel und letztendlich der Vasotonus des Gefäßes (Francis et al. 2010).

Doch nicht nur für den Ruhetonus spielt NO eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Gefäßreaktion auf Neurotransmitter (Acetylcholin, Substanz P) und Entzündungsmediatoren (Bradykinin, Histamin) (Faraci und Heistad 1998).

Einige Gefäßreaktionen setzen ein konstantes NO – Niveau voraus. Dies konnte nachgewiesen werden für die Reaktion auf Azidose (Lindauer et al. 2001), sensorische Stimulation (Lindauer et al. 1999), physiologische Hyperkaliämie (Dreier et al. 1995) und Hyperkapnie (Iadecola et al. 1994b).

Die Endothelzelle beeinflusst nicht nur die gesamte Gefäßwand und benachbarte Endothelzellen, sondern auch naheliegende Neuronen und Gliazellen. Mit einer funktionalen Störung des Endothels geht eine Veränderung des zerebralen Blutflusses einher. Hypoperfusion, Abschwächung der Reaktivität auf Vasodilatoren und letztendlich Zelluntergang stehen hierbei im Fokus. Der enge Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und verschiedensten

neurologischen Krankheitsbildern, wie Alzheimer und anderen Demenzformen, zeigen die enge Verbindung zwischen Endothel und umgebenden Zellen im Gehirn (Iadecola 2010).

## **2.6. Vasospasmus als alleiniger Pathomechanismus hinter der DIND?**

Lange Zeit galt der Vasospasmus als der Schlüsselpathomechanismus hinter der Entwicklung verzögerter neurologischer Defizite (Kassell et al. 1985). Hirnschnitte zeigen, dass sich die zerebralen Ischämien als Ursache der *delayed ischemic neuronal deficits (DIND)* nicht etwa an territoriale Grenzen der großen zerebralen Arterien halten, sondern über den Cortex verteilt sind (Dreier et al. 2002). Diese pathologischen Befunde und einige neuere Studien lassen an der Vasospasmustheorie allerdings zweifeln. So weisen 21% der Patienten, welche die Initialblutung überlebt haben, später neurologische Defizite (*DIND*) auf, ohne dass ein Vasospasmus nachgewiesen werden konnte (Alaraj et al. 2009). Umgekehrt entwickeln nur ca. 20-30% der Patienten nach einem Vasospasmus neurologische Defizite (Alaraj et al. 2009).

Auch konnte durch die Behandlung mit dem Endothelin Rezeptor Antagonisten Clazosentan zwar das Auftreten von angiographisch nachweisbaren Vasospasmen der großen Arterien um 65% reduziert werden, das klinische *outcome* verbesserte sich jedoch nicht signifikant (Macdonald 2008).

Somit kann der lange Zeit postulierte Vasospasmus nur unzureichend als Ursache gelten.

## **2.7. Cortical spreading depolarisation als ursächliche Pathologie?**

Leao Aristides beschrieb 1944 als Erster die CSD im Rahmen eines Experiments zur künstlichen Erzeugung epileptischer Potentiale durch elektrische Stimulation am Cortex des Kaninchens (Aristides A. P. Leao). Lange Zeit galt die CSD als Zufallsfund im Tierexperiment, ein Nachweis am menschlichen Cortex war technisch mit dem EEG nicht messbar. Erst als Untersuchungen zur Migräneaura ähnliche wellenartige Veränderungen im zerebralen Blutfluss zeigten, wurde die CSD als mögliche Ursache auch am menschlichen Cortex in Betracht gezogen

(Olesen et al. 1981). Mit dem technischen Fortschritt und der Einführung funktioneller Kernspintomographie, besserem Monitoring, sowie stereotaktischer neurochirurgischer Techniken (Sramka et al. 1977-1978) war es möglich geworden, die CSD genauer zu erforschen. Das Phänomen der CSD wurde letztendlich nicht nur bei der Migräneaura nachgewiesen, sondern zeigte sich auch bei einigen anderen zerebralen Krankheitsbildern, wie dem Schädel-Hirn-Trauma (Mayevsky et al. 1996), dem ischämischen Insult (Nakamura et al. 2010) oder der Subarachnoidalblutung. Ein örtlicher und auch zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CSD und zerebralen Schädigungen konnte von der COSBID (*cooperative study on brain injury and depolarizations*)– Gruppe gezeigt werden (Dreier et al. 2009).

Die genaue Bedeutung der CSD in den jeweiligen neurologischen Krankheitsbildern bleibt Gegenstand der Forschung.

## **2.8. *Cortical spreading depolarisation* – Pathophysiologie**

Die *cortical spreading depolarisation* (CSD) ist ein reversibler Zusammenbruch der Elektrolythomöostase, gekennzeichnet durch eine Depolarisation von neuronalen Nervenzellen, und ist assoziiert mit einem Einstrom von Kationen und Wasser nach intrazellulär (Dreier et al. 2009). Vor allem Natrium und Calcium strömen in die Zellen, Kalium im Gegenzug in den extrazellulären Raum. Der geänderte Elektrolytgradient verändert so das physiologische Gleichgewicht. Der pH-Wert im Extrazellulärraum fällt auf ca. 6,9. (Kraig und Nicholson 1978). Durch diesen Zusammenbruch des chemischen Gradienten über der Zellmembran kommt es zum Verlust der elektrischen Aktivität. Der Einstrom von Elektrolyten und Wasser führt zu einem Zellödem und einem Auseinanderweichen der Dendriten (Takano et al. 2007). Diese Depolarisationswelle der Zellmembran benachbarter Neuronen ist noch nicht im Detail verstanden. Durch ausströmendes Kalium der vormals betroffenen Zelle (Grafstein et al. 1956) und exzitatorische Neurotransmitter (Kunkler et al. 2005) könnte eine Depolarisation der Zellmembran erklärt werden. Die Vorgänge setzen sich wellenartig mit einer Geschwindigkeit von wenigen Millimetern pro Minute radiär in alle Richtungen fort und es zeigt sich das Bild der *cortical spreading depolarisation*. Es handelt sich

biochemisch um einen hoch energetischen Prozess. Unter großem O<sub>2</sub>- und Glucoseverbrauch wird mit Hilfe verschiedener Mechanismen das physiologische Niveau wiederhergestellt. Das Parenchym erholt sich ohne neuronale Schäden (Nedergaard und Hansen 1988). Unter anderem an der Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse beteiligt ist die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe, die benachbarten Astrozyten und die intrazelluläre Calciumpufferung. Lediglich das Calcium und der pH-Wert brauchen etwas länger, bis sich das Ausgangsniveau wieder einstellt (Mutch und Hansen 1984). Ein gesteigerter Glucose Metabolismus kann bis zu 15 Minuten nach der Repolarisation gemessen werden (Gjedde et al. 1981).

## **2.9. CSD – Reaktionen des zerebralen Blutflusses im gesunden Gewebe**

Im intakten Gewebe zeigt sich im Tiermodell mit dem Einsetzen der *CSD* eine kurze und variable vasokonstriktorische Phase und somit eine Hypoperfusion. Im Anschluss folgt eine kurze - ca. eine Minute - aber deutliche Vasodilation bis zu 200% des Ausgangsdurchmessers. Abschließend vasokonstringiert das Gefäß wieder auf ca. 70 - 80% seines Ausgangsdurchmessers für mehrere Stunden (Fabricius et al. 1995). Während dieser Phase ist die physiologische Gefäßreaktion auf exzitatorische Reizung, die sogenannte neurovaskuläre Kopplung, weiter beeinträchtigt (Piilgaard und Lauritzen 2009) und das Gefäß zeigt sich für den Zeitraum von bis zu 75 Minuten nach der Induktion einer *CSD* wenig reagibel auf direkt pial applizierte externe Stimulanzen (Wahl et al. 1987), Hyperkapnie (Lauritzen 1984) oder corticocorticale Stimulation (Piilgaard und Lauritzen 2009). Es bildet sich ein Missverhältnis zwischen erhaltenem Neurometabolismus und gestörter Durchblutung.

## 2.10. CSD nach Subarachnoidalblutung - CSI

Anders verhält sich jedoch die Gefäßantwort bei lokal gestörter Funktion der kleinen Gefäße, sodass es nach der elektrischen Depression nicht zu einer initialen Hyperämie kommt, sondern die CSD zu einem schweren Vasospasmus der kleinen Gefäße führt (Dreier et al. 1998). Blutabbauprodukte im Subarachnoidalraum und somit direkt am Gefäß gelten als mögliche Ursache dafür (Dreier et al. 2000). Aus den Erythrozyten freigesetztes Kalium und Hämoglobin führen zu erhöhten basalen extrazellulären Konzentrationen der beiden Substanzen. Die Kombination aus lokalen Kaliumwerten über 20mM und einem verminderten NO-Niveau ist hier von großer Bedeutung (Petzold et al. 2003). Die NO Verfügbarkeit könnte unter anderem durch NO-Bindung des freigewordenen Hämoglobins, endogene NO-Synthase Inhibitoren, eine gestörte endotheliale NO-Synthase, zugrunde gegangene perivaskuläre Nervenendigungen oder Sauerstoffradikale sinken (Macdonald et al. 2007).

Das Kalium könnte als Blutabbauprodukt anfallen, durch verminderte Aktivität der Natrium–Kaliumpumpe ansteigen, durch Mikrothromben verursacht oder durch Aktivierung von neuronalen Kaliumkanälen agglomerieren (Dreier et al. 1998; Windmuller et al. 2005).

Die CSD geht mit erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentrationen und erniedrigten pH Werten einher (Windmuller et al. 2005). Kaliumwerte über 20mM führen an den zerebralen Gefäßen zu einer Vasokonstriktion. Ein niedriger pH – Wert im Gegenzug wirkt vasodilatatorisch. Die permissive Rolle des NO ist wahrscheinlich für die Vasodilation auf CSD im gesunden Gewebe verantwortlich, da NO die Azidose induzierte Vasodilation verstärkt und so im Gesamten der vasokonstriktorisches Reiz der Hyperkaliämie in den Hintergrund rückt (Windmuller et al. 2005; Golding et al. 2001a). Bei Dysfunktion der kleinen Gefäße führt unter anderem eine verminderte Verfügbarkeit von NO zu einem Überwiegen der vasokonstriktiven Agenzien. Es beginnt ein Zirkulus vitiosus der inversen Gefäßantwort auf CSD.

Die sich ausbreitende Vasokonstriktion führt zu vorübergehenden Minderdurchblutung. Daraus resultiert ein Perfusionsdefizit im Gewebe, welches metabolisch nicht mehr in der Lage ist, auf die Veränderungen an der Zellmembran wie oben beschrieben, zu reagieren. Für die Einschränkung des

Metabolismus verantwortlich, ist zum einen eine verminderte O<sub>2</sub> Verfügbarkeit durch Verminderung des Blutflusses, zum anderen ein gesteigerter Energieverbrauch (Sukhotinsky et al. 2008). Dies wiederum führt zu einer Dysfunktion der ATP abhängigen Na<sup>2+</sup> - und Calcium<sup>2+</sup> - Kanäle, sodass das nach intrazellulär strömende Natrium und Calcium in den Zellen agglomeriert. Dem Kationeneinstrom folgt Wasser aus dem Extrazellulärraum in die Zelle, was zu einem zytotoxischen Ödem führen kann. Die erhöhten intrazellulären Calciumwerte können auch über Interaktion mit den Mitochondrien einen Zelltod der Neuronen und Astrozyten induzieren (Gwag et al. 1999).

Diese Vorgänge auf zellulärer Ebene unterhalten das Perfusionsdefizit weiter. Das Zeitintervall der kortikalen Depolarisation wird im Gegenzug durch das Perfusionsdefizit verlängert. Durch die anhaltende Depolarisation bleibt ein Überwiegen der vasokonstriktorisch wirkenden Agenzien bestehen (Sukhotinsky et al. 2008).

Es zeigt sich insgesamt eine inverse Antwort der Hämodynamik mit einer Reduktion des zerebralen Blutflusses auf 15 -20 % des Ausgangswertes (Dreier et al. 1998). Das Gesamtbild aus der verlängerten Depolarisation als Reaktion auf eine CSD, der inversen Gefäßantwort und dem daraus resultierenden Perfusionsdefizit wird als „*cortical spreading ischemia*“ oder *CSI* bezeichnet (Dreier et al. 2002; Dreier et al. 1998). So wird aus einer kurzen Depolarisation mit konsekutiver Hyperämie im gesunden Gewebe eine langandauernde Depolarisationswelle mit begleitendem Perfusionsdefizit. Dieses Perfusionsdefizit kann zu kortikaler Ischämie und letztendlich zu weitverbreiteten kortikalen Nekrosen führen (Dreier et al. 2000).

## **2.11. Zelluntergang bei der CSI**

Zubkov *et al.* konnten bei einer Autopsie an einer Patientin, welche nach einem radiologisch nachgewiesenen schwerem Vasospasmus nach SAB verstarb, Stunden nach dem Tod die Apoptose der Endothelzellen der Intima betroffener Arterien nachweisen (Zubkov et al. 2000). Doch nicht nur in diesem publizierten Fallbericht konnten pathologische Veränderungen an den betroffenen Gefäßen gesichert werden, sondern auch in Tierstudien nach artifizieller SAB zeigte sich

histologisch eine Ablösung und Einrisse in der Endothelschicht (Friedrich et al. 2010).

Als möglicher Mediator für die Apoptose der Endothelzellen könnte ein hoher intrazelluläre Calciumspiegel gelten (Gwag et al. 1999). Doch auch freie Radikale oder der zytotoxische Effekt des freigesetzten Hämoglobins kommen als potentielle Ursachen für den Zelltod im betroffenen vaskulären System in Frage (Takenaka et al. 1993).

## 2.12 Die Rolle des Calciums für die Vasomotorik

Calcium spielt im Endothel eine vielfältige Rolle in der Signalübertragung. Im Weiteren soll jedoch primär die Rolle des Calciums für die Vasomotorik behandelt werden. Über *gap junctions* kann Calcium aus den Endothelzellen auch an den benachbarten glatten Muskelzellen der Mediaschicht der Gefäßwand zu einer Reaktion führen. Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration im Zytosol wird bei glatten Gefäßmuskelzellen hauptsächlich durch spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle vermittelt (Vogalis et al. 1991). Die Kontraktion von Myozyten der glatten Gefäßmuskulatur wird primär durch das Zusammenspiel von Calcium und dem Enzym Myosin-Leichtketten-Kinase über das intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Rezeptorprotein Calmodulin vermittelt. Das Enzym phosphoryliert Serin in Position 19 innerhalb der regulatorischen Untereinheit, der so genannten *Myosin Regulatory Light Chain 20* ( $MLC_{20}$ ) des Myosinköpfchens (Kamm und Stull 1985). Das aktivierte Myosin sorgt für eine Kontraktion des Aktinfilaments. Auch eine direkte Wirkung des Calcium-Calmodulin Komplexes über eine Beeinträchtigung der inhibitorischen Effekte des Caldesmons sorgt für eine Modulation des Gefäßtonus (Adelstein und Sellers 1987). Daraus resultiert letzten Endes eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle und es folgt eine Vasokonstriktion.

Neben diesen direkt auf das Gefäß wirkenden Funktionen haben Calciumkationen noch weitere Bedeutung als intrazelluläre Botenstoffe, z.B. bei der Apoptose oder auch für die Genexpression. Die Bedeutung des  $Ca^{2+}$  an der kritischen Vasokonstriktion betroffener Gefäße wird nicht zuletzt auch an der Wirkung des Calciumkanalblockers Nimodipin gezeigt. Nach Applikation konnte experimentell

eine Vasodilation mit konsekutiver Steigerung des zerebralen Blutflusses herbeigeführt werden (Dreier et al. 1998; Windmuller et al. 2005). Auch klinisch findet das Medikament zur Prophylaxe der DIND seit längerer Zeit Anwendung.

### **2.13 Die medikamentöse Therapie der CSI**

Die beschriebene funktionelle Dysfunktion des Endothels bereits früh im Krankheitsverlauf und der oben beschriebene Pathomechanismus mit einem Überwiegen der vasokonstriktorisches Reize auf die Gefäße könnten auch Gründe für die Wirksamkeit von einer Reihe von vasodilatatorisch wirkenden Medikamenten sein. Neben dem oben beschriebenen Calciumkanalblocker Nimodipin, wird auch eine Reihe von vasodilatatorisch wirkenden Medikamenten in unterschiedlichen Applikationsformen in klinischen Studien getestet. So zum Beispiel Magnesiumsulfat, Statine, Fasudilhydrochlorid, Erythropoetin, Endothelin-1 Antagonisten, NO Vorstufen und Sildenafil (Siasios et al. 2013). Auf einige dieser Medikamente wird im Laufe dieser Arbeit noch näher eingegangen.

### **2.14. Zusammenfassung und Herleiten der Aufgabenstellung**

Lindauer et. al zeigte in einer Studie, dass das Endothel für die Vasodilation als Reaktion auf Azidose keine relevante Bedeutung hat (Lindauer et al. 2001).

Unzureichend untersucht bleibt jedoch die Rolle des Endothels bei dem Pathomechanismus der CSI. Hinter diesem multifaktoriellen Ereignis an den zerebralen Gefäßen könnte der Schlüssel zum Verständnis der verspäteten neurologischen Verschlechterung von SAB Patienten liegen. Auch erste klinische Arbeiten zeigten bereits eine mögliche Dysfunktion des Endothels nach Subarachnoidalblutung (Bergstrom et al. 2014).

Untersucht wurde daher in den beschriebenen Versuchen die Reaktion der isolierten *Arteria cerebri media* (MCA) der Ratte auf einen artifiziellen CSI Puffer mit und ohne funktionell aktiven Endothel.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Gründe für die Wahl des Modells

Für die Untersuchung der Rolle des Endothels bei CSI wurde das *in vitro* Modell der isolierten Arterie verwendet. Dieses eignet sich speziell für differenzierte Betrachtungen der Abläufe in den einzelnen Kompartimenten der Gehirnperfusion. Im *in vivo* Tiermodell dagegen fällt die genauere Lokalisierung der Reaktionen oft schwer. Neben den zerebralen Gefäßen selbst spielen sowohl Neuronen, als auch die Neuroglia eine wichtige Rolle in der Vasomotorik (Paulson et al. 1989). Die oft zeitgleich ablaufenden Reaktionen verschiedenster Gewebearten sorgen hier für eine erschwerte Differenzierung (Faraci und Sobey 1998). An der isolierten Arterie finden sich lediglich drei verschiedene Kompartimente mit Auswirkungen auf den Tonus des Gefäßes: das Endothel (Andresen et al. 2006), die glatte Gefäßmuskulatur (Golding et al. 1998) und das perivaskuläre Nervengeflecht der Adventitia (Lindauer et al. 2001; Ignacio et al. 1997). Neben dem oben genannten Vorteil ist auch eine technisch einfachere Applikation lokal wirkender Substanzen ohne systemische Interaktion möglich, wie die Änderung der Elektrolytkonzentrationen, des pH-Wertes und die Gabe von Medikamenten.

Das verwendete *in vitro* Modell wurde von Dacey und Duling entwickelt (Dacey, R G Jr und Duling 1982; Duling et al. 1981) und von Bryan et al. überarbeitet (Bryan, R M Jr et al. 1996). Ein präpariertes und isoliertes Stück der Arterie wird kanüliert und mit intraluminalem Puffer perfundiert. Die strikte Trennung zwischen intra-/und extraluminalem Kreislauf wird über den gesamten Versuch beibehalten. Bei der Präparation wird das Gefäß vom umliegenden Parenchym befreit, die Adventitia jedoch geschont, um den physiologischen NO-Spiegel nicht zu beeinflussen (Lindauer et al. 2001). Die Arterie baut durch schrittweise Erhöhung des hydrostatischen Drucks einen spontanen Ruhetonus auf (Johnson et al. 1998). Der myogene Ruhetonus wird hier von spannungsabhängigen Calcium Kanälen beeinflusst (Knot und Nelson 1998a). Nach Abschluss der Äquilibration bleibt der Druck innerhalb des Gefäßes konstant, lediglich der Durchmesser ändert sich (isobarer Versuchsaufbau). Im Vergleich zu den Arterienringpräparaten findet hier keine pharmakologische Vorkontraktion, wie etwa durch verschiedene

Prostaglandine oder Serotonin, statt. Die pharmakologische Beeinflussung beim Versuchsaufbau kann sogar die gesamte Vasomotorik verändern (Dacey, R G Jr und Bassett 1987). Daher scheint das Modell der isolierten Arterie wie oben beschrieben, näher an der physiologischen Gefäßantwort zu liegen (Halpern und Kelley 1991). Unphysiologisch an diesem Modell ist zum einen der konstante isobare Fluss ohne pulsatile Spitzen, zum anderen scheinen die Gefäßantworten teilweise zu exzessiv auszufallen (Davis und Hill 1999).

### **3.2. Versuchsaufbau**

Der Aufbau der Versuche erfolgte stets in drei Schritten: Der Entnahme des Gehirns, der Präparation der Arterie und abschließend dem Druckaufbau.

#### **3.2.1. Entnahme des Gehirns**

Die männliche Ratte *Wistar* (n=93; 220g-330g) wurde mittels kombinierter N<sub>2</sub>O/Isofluran Narkose anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde anhand fehlender Stellreflexe sichergestellt. Anschließend wurde das Tier per Kleintierguillotine dekapitiert. Mit einer Schere wurde das Fell in Sagittalrichtung durchtrennt. Die Schädelkalotte, sowie die lateralen Übergänge zur Muskulatur wurden mittels Skalpell durchtrennt. Die kurze Nackenmuskulatur und die nasale Schuppe wurden per Rongeur präpariert. Die eröffnete knöcherne Schädelkalotte wurde durch eine Halsteadklammer mit Druck nach lateral aufgehebelt und das Großhirn freigelegt. Dieses wurde von frontal mittels eines feinen Spatels aus der Schädelbasis gehebelt und in eine Petrischale überführt. Diese war gefüllt mit 4 Grad kaltem physiologischen Puffer. Das gesamte Gewebe war hierbei vom Puffer bedeckt. Um die Kühlung sicherzustellen, wurde die Petrischale eingebettet in Eis. Die Präparation wurde zeitlich unter 10 Minuten durchgeführt. Der basale Pol des Großhirns im Speziellen der *Circulus arteriosus Willisii* wurde dabei nicht manipuliert.

### 3.2.2 Präparation der Arterie

Die weitere Präparation erfolgte mikrochirurgisch unter dem OP-Mikroskop. Unter optimalen Sichtverhältnissen wurde zunächst mittels einer Mikroschere ein ca. 1,5cm langes Teilstück der *arteria cerebri media* (MCA) samt Übergängen in den Circulus arteriosus Willisii T-förmig herausgeschnitten. Das Gefäß wurde anschließend stumpf mit einer Pinzette aus der pialen Scheide gelöst und atraumatisch von Bindegewebe befreit. Anschließend wurde die *arteria cerebri media* per Pipette in die mit extraluminalem Puffer gefüllte Versuchskammer überführt. Hier wurde die Arterie zunächst auf der proximalen Seite über das überstehende Stück des Circulus arteriosus Willisii auf eine Glaskanüle aufgezo-gen und mittels 8-0 Fadenligatur befestigt. Um die physiologische Flussrichtung zu wahren, wurde die proximale Seite der Arterie auf die *inflow* Seite des intraluminalen Systems aufgezo-gen. Anschließend wurde das distale Ende der Arterie auf die *outflow* Glaskanüle auf dieselbe Art und Weise wie am proximalen Pol aufgezo-gen und ebenfalls per 8-0 Fadenligatur fixiert. Die Arterie wurde auf beiden Seiten soweit kanüliert, bis sich ein ca. 15mm langes, abgangsfreies Stück Arterie präsentierte. Falls doch ein arterieller Abgang im untersuchten Bereich war, wurde dieser mittels 10-0 Fadenligatur verschlossen. Es wurde jeweils nur immer eine Arterie pro Tier für einen Versuch verwendet.

### 3.2.3. Druckaufbau und Teststimulation der äquilibrierten Arterie

Im Anschluss an die Präparation wurde die kanülierte Arterie über 15 Minuten einem steigenden hydrostatischen Druck ausgesetzt. Dies geschah durch schrittweises Anheben des *inflow* und *outflow* Gefäßes über das Niveau des Arteriographen. Der Zieldruck betrug 80 mmHg. Das extraluminale System wurde gleichzeitig mit einer Rate von 20 ml/min mit kaltem extraluminalem Puffer erneuert. Nach Druckadaption wurde das extraluminale System über eine Stunde mittels Durchlauferhitzer auf 37 Grad erwärmt. Während der Äquilibration wurde sowohl der pH-Wert, als auch die Temperatur in regelmäßigen Abständen gemessen. Innerhalb dieser Stunde entwickelte die Arterie einen spontanen Ruhetonus ohne pharmakologische

Beeinflussung. Ein Ruhetonus unter 30% Reduktion im Vergleich zu dem Zustand vor Äquilibration galt als Abbruchkriterium.

Um die Reaktivität der Arterie zu testen wurde sie mit einer 20 mM Kalium Lösung über 5 Minuten umspült und anschließend 10 Minuten ausgewaschen, damit der Ruhetonus wiederhergestellt wird. Nur Arterien die eine Vasodilation über 30 % zum Ruhetonus boten wurden verwendet.

Die hier angewendeten Kriterien gelten als allgemein anerkannt für eine intakte Gefäßfunktion (Bryan, R M Jr et al. 1996).

### 3.2.4. Zeitablauf

1. Hirnpräparation 10 min
  2. Präparation der Arterie ca. 20 min
  3. Druckaufbau 15 min
  4. Äquilibration 60 min
  5. K<sup>+</sup>-Testreaktion 5 min
  6. Auswaschen 10 min
- 

Zeit vor Versuchsstart: ca. 120 Minuten

### 3.3. Verwendete Substanzen und Materialien

Pufferlösungen:

Aqua dest.	
Reinstwasseranlage Milli Q	Millipore
Biopack Endfilter	Millipore
Chemikalien: Natriumchlorid Kaliumchlorid Magnesiumsulfat	

Natriumdihydrogenphosphat Kalziumchlorid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Pyruvat Glucose Bovines Albumin 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) Natriumhydroxid Chlorwasserstoff	} Sigma
Zubehör: Bechergläser Messzylinder Blutgasanalysator Rapidlab 348 Analysewaage ABT 320-4M Präzisionswaage 572 Sartorius Microbalance CPA2P Einmal Waagschalen	Simax Brand Siemens Kern Kern Sartorius Roth

Arbeitsplatz:

Inverses Mikroskop	Leica
Videokamera	JVC
Monitor	Sony
Pumpe Masterflex L/S	Cole-Parmer
Wärmebad	Thermo Scientific
Heizspirale	
Schläuche	Tygon
Plastik-Schlauchverbinder	NeoLab
Kammer	
In-/Outflowgefäße: Original Perfuser Spritzen	Braun
Glaskapillaren	World Precision Instruments

Tiere:

Männliche Wistar Ratten 220-240g	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland Die Experimente wurden im Zeitraum von Anfang Juli 2012 bis Anfang Februar 2014 durchgeführt. Die Tiere wurden vor der Tötung in der experimentellen Tierhaltung der experimentellen Neurochirurgie (Bestandteil der Versuchstierhaltung des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar der TU München gehalten, Genehmigung nach Tierschutzgesetz: Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken nach §4 Abs. 3 Tierschutzgesetz, Dokumentationsnummer des ZPF: AZ 40-12-10
-------------------------------------	---

Narkose:

Sauerstoff	
Lachgas	
Isofluran	cp Pharma
Isofluran Verdampfer	

Päparation:

Guillotine	World Precision Instruments
Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Zellkulturschale	BD Bioscience
Spritze zum Spülen der Arterie: Omnifex	Braun
Nahtmaterial 10.0/8.0 Ethilon	Johnson&Johnson
OP Mikroskop	Leica
Lichtquelle KL 1500 LED	Olympus

Testsubstanzen:

Nimodipin	Sigma
L-NNA (N <sup>G</sup> -nitro-L-Arginin)	Sigma
Acetylcholin	Sigma
DMSO 0,1%	Sigma

Zusammensetzung und Konzentrationen der verwendeten Agenzien:

Extraluminaler Puffer:

3 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid), 144 mM NaCl,  
3 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,21 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 mM EDTA, 2  
mM Pyruvat, 5 mM Glucose

Intraluminaler Puffer:

wie extraluminal ,nur mit zusätzlich gelöstem 1g/100ml bovinem Albumin

Die Puffer wurden mit 0,1 M NaOH auf einen pH – Wert von 7,4 +/- 0,05 titriert.

Acetylcholin:

wie extraluminal mit zusätzlich 1 mM Ach gelöst

CSI:

3 mM MOPS, 60 mM NaCl, 50 mM KCl, 0,1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,21 mM  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 mM EDTA, 2mM Pyruvat, 5 mM Glucose

Der CSI – Puffer wurde mit 0,1 M NaOH auf einen pH – Wert von 6,9 +/- 0.05 titriert.

L-NNA:

0,5 mM L-NNA zusätzlich

## Nimodipin:

0,1 mM / 0,01 mM / 0,001 mM Nimodipin zusätzlich

Nimodipin wurde im Lösungsmittel DMSO (= Dimethylsulfoxid) in der Konzentration 0,1% im extraluminalen Puffer gelöst. Dazu wurde zuerst das Medikament zusammen mit dem Lösungsmittel und dem extraluminalen Puffer im Verhältnis 1:1 in ein Eppendorf Tube gegeben und auf einer Rüttelplatte vermengt. Anschließend wurde der Inhalt des Eppendorf Tube in die Restmenge Puffer gegeben und über 30 Minuten bei 55 Grad erwärmt und durchmischt. In 2 eigenen Vehikelversuchen (im Ergebnisteil dargestellt) zeigt sich keine Tonusbeeinflussung durch DMSO.

Die Herstellung des extraluminalen Puffersystems, basierend auf der Zugabe von 3mM MOPS, stellt einen konstanten pH über den gesamten Versuch sicher und ist damit eine unkomplizierte Alternative zur den mit Bicarbonat gepufferten Systemen. Eine Beeinflussung der Vasomotorik durch MOPS über Interaktion mit  $Ca^{2+}$  kann nicht sicher ausgeschlossen werden, liegt jedoch im in einem ähnlichen Rahmen wie bei vergleichbaren Experimenten und wird deshalb bei der Interpretation der Ergebnisse außer Acht gelassen (Altura et al. 1980; Karaki et al. 1981).

### **3.4. Experimentelles Design**

#### **3.4.1. Reihe 1: repetitive CSI Reihe zur Zeitkontrolle**

Eine repetitive Versuchsreihe mit jeweils dreimaliger Applikation des CSI-Puffers unter Normalbedingungen wurde durchgeführt um die Konstanz des Ruhetonus und der Reaktion auf CSI zu testen (Dreier et al. 2000). Der CSI-Puffer wurde jeweils für 10 Minuten eingewaschen und anschließend gemessen. Nach jeder Applikation wurde das System für 10 Minuten mit extraluminalem Puffer gespült (n=8)



### **3.4.2. Reihe 2: repetitive CSI Reihe unter unspezifischer Blockade der NO-Synthase durch L-NNA**

Nach der Reaktion auf CSI unter Normalbedingungen wurde L-NNA in MOPS gepufferter extraluminaler Lösung für 20 Minuten eingewaschen und verblieb den restlichen Versuch im extraluminalen System. Unter dieser Blockade aller NO-Isoformen durch L-NNA wurde eine weitere repetitive CSI Reihe durchgeführt (Faraci und Heistad 1998; Dreier et al. 1998; Dietrich et al. 1994) (n=7)

### **3.4.3. Reihe 3: funktionelle Testungen des Endothels mit Acethylcholin**

Überprüft wurde in einer wechselnden repetitiven Reihe die Vasodilation auf CSI und die Reaktion des rein endothelial wirkenden Acethylcholin (Furchgott 1983). Das Acethylcholin wurde wie der CSI Puffer für 10 Minuten eingewaschen, auch hier erfolgte die Messung nach dieser Zeit (n=4).

### **3.4.4. Reihe 4: repetitive CSI Reihe im Wechsel mit Acethylcholin und unter unspezifischer Blockade der NO-Synthase durch L-NNA**

Nach den Reaktionen auf CSI und Acethylcholin unter Normalbedingungen wurde wie in Reihe 2 bereits erläutert der NO-Synthase Blocker L-NNA eingewaschen und eine repetitive Reihe unter diesen Bedingungen getestet (n=4).

### **3.4.5. Reihe 5: repetitive CSI Reihe nach der funktionellen Zerstörung des Endothels durch Luft Applikation**

Nach der Testung der Reaktionen auf CSI und Acethylcholin unter Normalbedingungen wurde über 10 Minuten 5 ml Luft durch die Arterie von proximal nach distal appliziert, um das Endothel funktionell zu zerstören (Hayashi und Hester 1987; Horiuchi et al. 2002). Anschließend wurde nach einer 10 minütigen Erholungsphase eine K<sup>+</sup>-Testreaktion durchgeführt und danach repetitiv CSI und Acethylcholin im Wechsel gegeben (n=12).

### **3.4.6. Reihe 6-8: Untersuchungen der Reversibilität nach Gabe des Ca<sup>2+</sup> Kanalblockers Nimodipin**

Der Versuchsablauf wurde wie in Reihe 5 durchgeführt. Abweichend wurde nach der einmaligen Reaktion auf Acetylcholin und CSI bei funktionell zerstörtem Endothel der Ca<sup>2+</sup>-Kanalblocker Nimodipin über 20 Minuten eingewaschen, zuvor wurden in zwei Versuchen noch eine Vehikelkontrolle durchgeführt. Das Medikament verblieb danach im System. Unter Anwesenheit des Nimodipin und unter funktionell nicht intaktem Endothel wurde abschließend nochmals eine Reihe mit Acetylcholin und CSI durchgeführt. Es wurde in anderen Arbeiten bereits gezeigt, dass Nimodipin eine CSI wieder zu einer *cortical spreading hyperämia* (CSH) zurückführen kann (Windmuller et al. 2005).

**Reihe 6** 0,1mM Nimodipin; n=2

**Reihe 7** 0,01mM Nimodipin; n=2

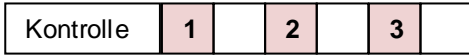
**Reihe 8** 0,001mM Nimodipin; n= 7

### **3.5. Experimentelles Paradigma**

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit an  $n= 93$  Tieren gearbeitet. Davon wurden  $n=46$  in die Auswertung aufgenommen. 23 Tiere wurden im Rahmen der Einarbeitungsphase verwendet, diese wurden nicht in die Auswertung aufgenommen, um eine adäquate Qualität der operativen Versuchsvorbereitung zu gewährleisten. Bei weiteren 24 Tieren wurden die jeweiligen Versuchsreihen vorzeitig abgebrochen, da die beschriebenen Einschlusskriterien in Bezug auf die Testreaktionen nicht eingehalten werden konnten. Dies war zum Teil aufgrund von manuellen Fehlern bei der Präparation oder auch durch Verunreinigung des verwendeten destillierten Wassers begründet.

**Insgesamt: n = 46**

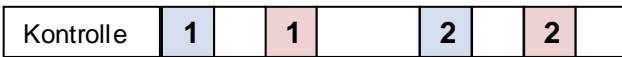
**Reihe 1**



**Reihe 2**



**Reihe 3**



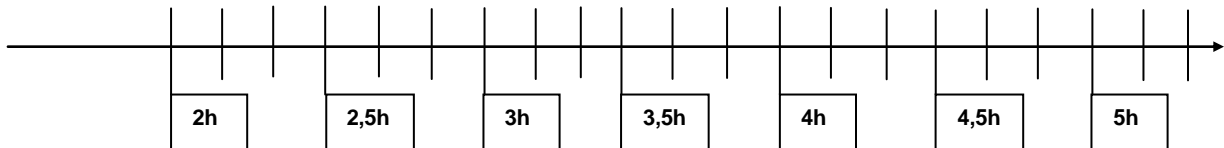
**Reihe 4**



**Reihe 5**



**Reihe 6-8**



- CSI 10 min
- Puffer 10 min
- Acethylcholin 10 min
- Kalium 5 min
- L-NNA 20 min
- Nimodipin 20 min
- Luft 10 min



Ab diesem Zeitpunkt permanent im System



Ab diesem Zeitpunkt gilt das Endothel als funktionell inaktiviert



### 3.6. Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Zuhilfenahme des Programms *sigma stat* 3.5. Die Signifikanz wurde für Einzelreaktionen im Vergleich zum Ruhetonus mittels gepaarten t-Test bestimmt. Für wiederholte Verlaufsreaktionen innerhalb einer Arterie wurde die Signifikanz durch eine *repeated measures ANOVA* getestet. Bei normalverteilten Daten wurde eine *one way ANOVA* Varianzanalyse und anschließend ein post-hoc Test nach Bonferri angeschlossen. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels *repeated measures ANOVA on ranks* und anschließend mittels Student-Newman-Keuls Test getestet.  $p < 0,05$  wurde als signifikant,  $p < 0,001$  als hochsignifikant angesehen.

## 4. Ergebnisteil

### 4.1. Kriterien einer intakten Gefäßreaktion

Nach der Präparation der Arterie, wie oben beschrieben, wurde der intraluminale Druck hydrostatisch schrittweise auf 80 mmHg gesteigert und das extraluminale Puffersystem mittels Wasserbad auf 37 Grad erhitzt.

Im Folgenden wurde eine Äquilibrationsphase von insgesamt 60 Minuten eingehalten. Hier stellte sich bei intakter Vasoaktivität ein Ruhetonus ein. Der Gefäßdurchmesser war signifikant kleiner, als vor der Drucksteigerung. Wie Voruntersuchungen gezeigt haben, löst die Drucksteigerung über L-Typ Calcium Kanäle eine Membrandepolarisation aus und führt letztendlich zu einer Vasokonstriktion (Knot und Nelson 1998b). Der korrekte Aufbau eines Ruhetonus wurde als 1. Gütekriterium festgelegt. (Bryan, R M Jr et al. 1996)

Anschließend wurde für einen Zeitraum von 5 Minuten ein mit 20mmol Kalium aufgesättigter, extraluminale Puffer in die Versuchskammer appliziert. Die Messungen erfolgten jeweils nach 3 und nach 5 Minuten. Hier zeigte sich eine deutliche Dilation, im Vergleich zu dem 3 mmol Kalium enthaltenden extraluminale Puffer. Eine erhaltene Dilation um mindestens 20% des Ausgangswertes wurde als 2. Gütekriterium verwendet.

Als 3. Gütekriterium einer intakten Vasoaktivität wurde die in Voruntersuchungen aus Berlin beobachtete Dilation der Arterie auf die Zugabe des CSI-Puffers zu Hilfe genommen (Dreier et al. 2009).

Nur wenn alle drei Gütekriterien erfüllt wurden, erfolgte die weitere Untersuchung des Gefäßes.

Bei den im Folgenden angegebenen Daten handelt es sich um die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung.

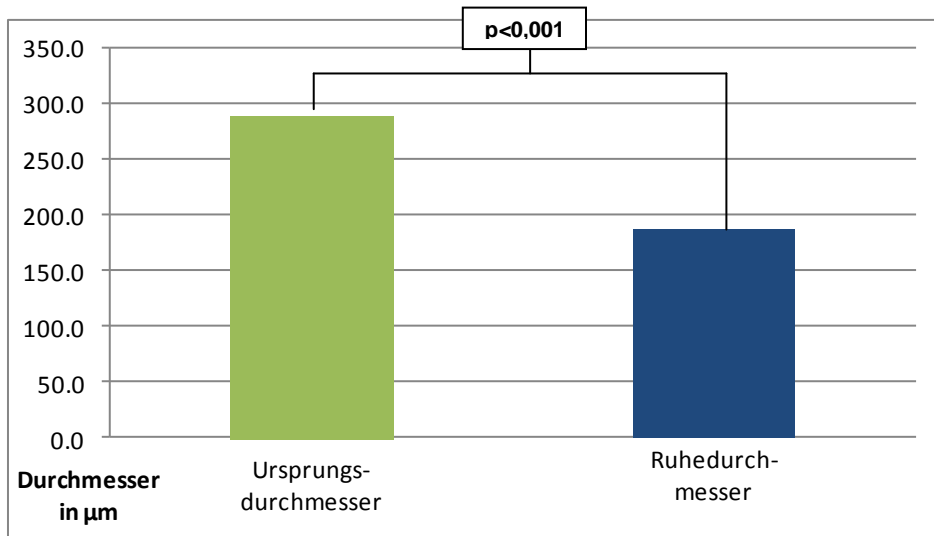
n = 46

**Ursprungsdurchmesser:** 289.1  $\mu\text{m}$  +/- 29.5  $\mu\text{m}$

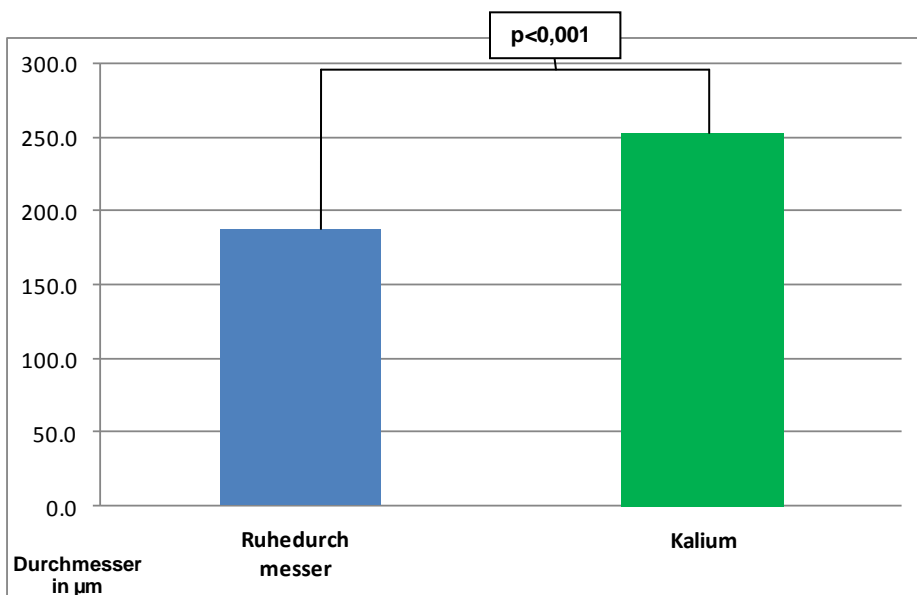
**Ruhedurchmesser:** 188.0  $\mu\text{m}$  +/- 26.2  $\mu\text{m}$

**Vasodilation auf 20 mm Kalium:** 253.0  $\mu\text{m}$  +/- 37.7  $\mu\text{m}$

**Signifikanz:**  $p < 0.001$



*Diagramm 1: Ausgangsarteriendurchmesser nach der Präparation im Vergleich zum Basistonus nach stattgehabter Äquilibrationphase von einer Stunde.*



*Diagramm 2: Ruhedurchmesser nach einer Stunde und Durchmesser nach 5 minütiger Einwaschphase von hyperkaliämen extraluminalen Puffer angereichert mit 20mM Kalium.*

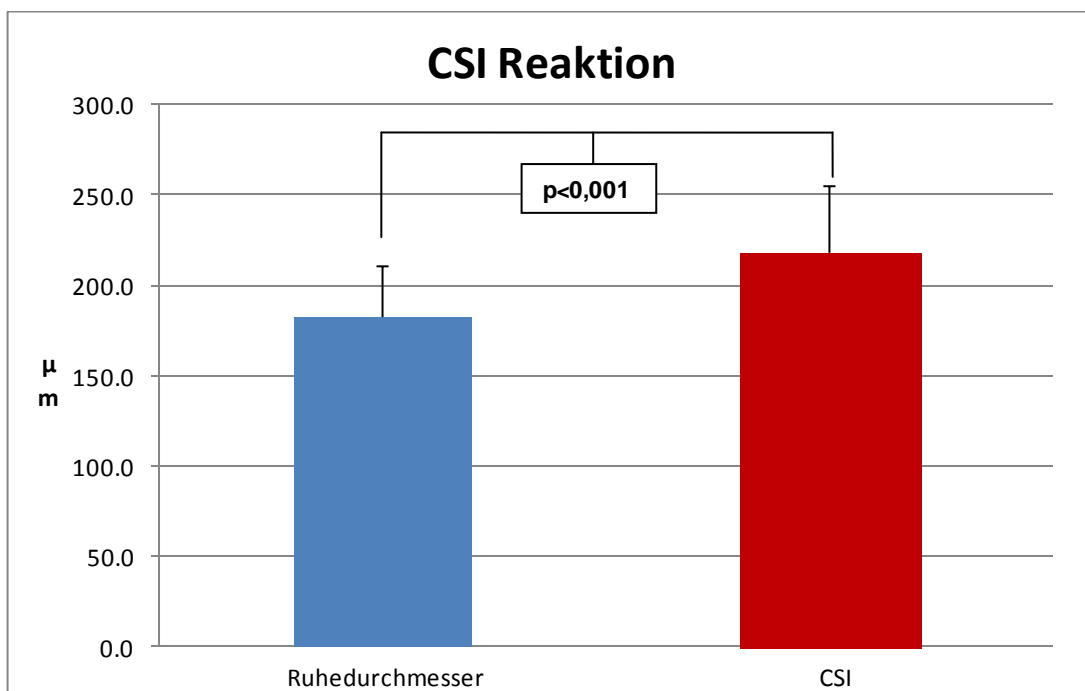
Nachdem die 20mmol Kalium haltige Lösung ausgewaschen war, wurde bei allen Versuchen die Reaktion auf den CSI Puffer getestet. In der folgenden Auflistung finden sich nur jeweils die Kontrollreaktion zu Beginn des jeweiligen Versuches. Die jeweiligen Versuchsprotokolle können dem Abschnitt „Material und Methoden“ entnommen werden. Es zeigte sich eine signifikante Dilatation als Reaktion auf den CSI Puffer ( $p < 0,001$ ):

**n = 46**

**Ruhedurchmesser:** 182.6  $\mu\text{m}$  +/- 28.1  $\mu\text{m}$

**CSI :** 218.2  $\mu\text{m}$  +/- 36.9  $\mu\text{m}$

**Signifikanz:**  $p < 0.001$



*Diagramm 3: Ruhedurchmesser nach 10 minütiger Auswaschphase gegenüber dem Gefäßdurchmesser nach 10 minütiger Einwaschphase des CSI Puffers.*

## 4.2. Reihe 1: Repetitive Zeitkontrolle

n = 8

	1.Reaktion	2.Reaktion	3.Reaktion
Ruhtonus in $\mu\text{m}$	177.1 +/- 17.4	180.4 +/- 9.7	179.6 +/- 18.8
CSI in $\mu\text{m}$	206.2 +/- 29.7	203.7 +/- 40.2	208.6 +/- 34.1

In Reihe 1 zeigte sich, dass die Vasodilation als Reaktion auf den CSI Puffer zeitlich konstant blieb und es keinen signifikanten Unterschied der Gefäßdurchmesser zwischen den Reaktionen gab ( $p > 0,05$ ).

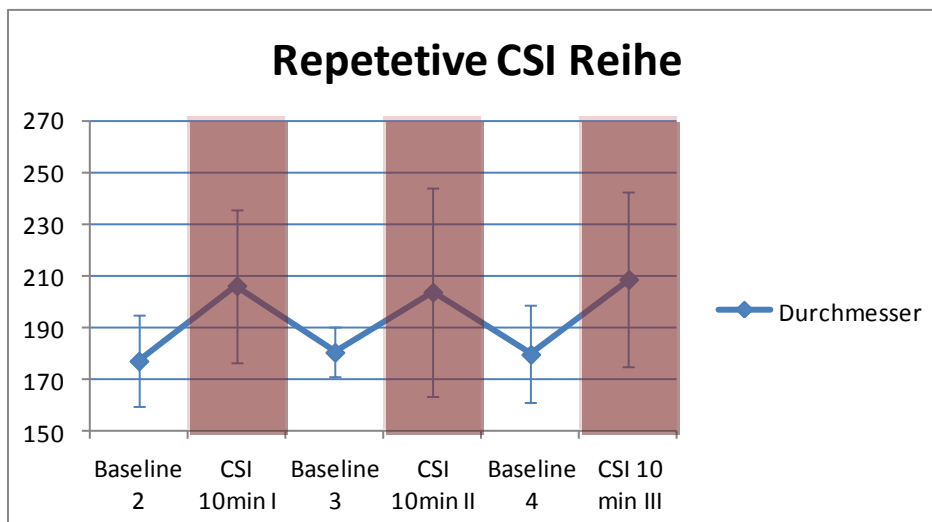


Diagramm 4: Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der repetitiven CSI Applikation. Rot hinterlegt sind die jeweiligen 10minütigen Einwaschphasen des CSI Puffers. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den gemessenen Gefäßdurchmessern zwischen den einzelnen aufeinanderfolgenden Reaktionen ( $p > 0,5$ ). Die Reaktion ist somit zeitlich konstant.

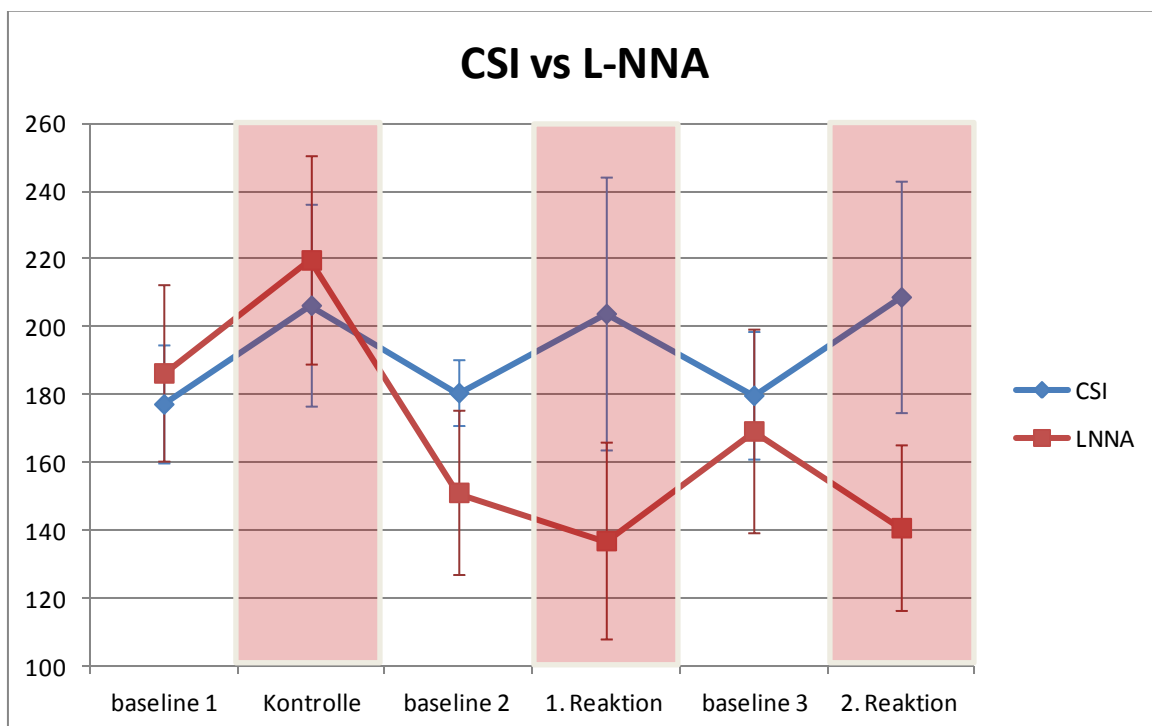


### 4.3. Reihe 2: Blockade mit L-NNA

n = 7

	Kontrolle	L-NNA(1.)	L-NNA(2.)	L-NNA(3.)
<b>Ruhetonus</b>	186.2 +/-	151.0 +/-	169.1 +/-	172.9 +/-
<b>In <math>\mu\text{m}</math></b>	26.0	24.2	30.0	21.0
<b>CSI</b>	219.5 +/-	136.8 +/-	140.6 +/-	o.Messung
<b>In <math>\mu\text{m}</math></b>	30.7	29.0	24.4	

In Reihe 2 zeigte sich, dass unter unspezifischer NOS-Blockade mit L-NNA der Ruhedurchmesser initial signifikant ( $p > 0,05$ ) abgenommen hat. Im Verlauf des Versuchs zeigte sich nur noch eine moderate Verengung im Vergleich zum Ruhezustand. Auf den CSI – Puffer reagierte die Arterie unter L- NNA mit einer Vasokonstriktion, anstatt einer Dilation. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den resultierenden Gefäßdurchmessern als Reaktion auf den CSI Puffer mit und ohne L- NNA Blockade ( $p < 0,05$ ). Im zeitlichen Verlauf blieb die Reaktion konstant. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und der 2. Reaktion.



Das Diagramm 5 zeigt die Reihe 1 (CSI Verlaufskontrollen) gegen die Reihe 2 (Kontrolle ohne L-NNA, der weitere Versuch unter ständiger L-NNA Präsenz). Im Diagramm rot hinterlegt sind die Phasen in denen der CSI Puffer eingewaschen wurde. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gefäßdurchmessern bei CSI Gabe zwischen der CSI Verlaufsversuchsreihe und der L-NNA Verlaufsreihe.

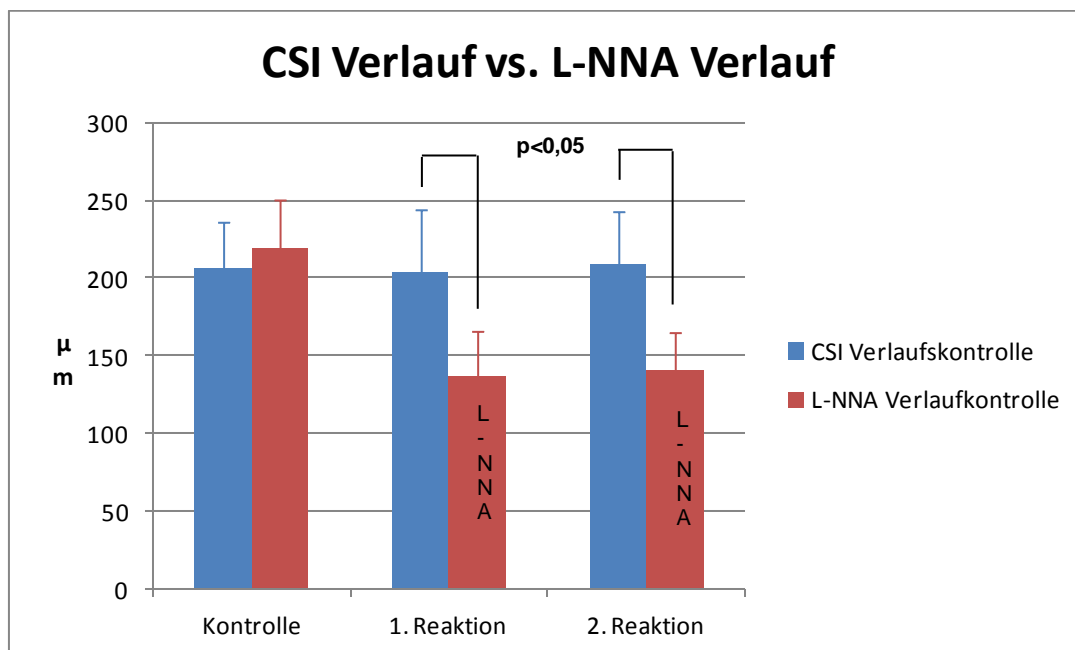


Diagramm 7: In diesem Säulendiagramm sind direkt nebeneinander gezeigt die Gefäßdurchmesser der CSI Reaktion der Reihe 1 (blau) und der Reihe 2 (rot). Die Kontrollreaktion verlief ohne die Zugabe von L-NNA. Die 1. Reaktion und die 2. Reaktion, welche zeitlich nach der 1. Reaktion stattfand, wurde L-NNA hinzugegeben. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der CSI Verlaufskontrolle und der L-NNA Verlaufskontrolle bezüglich des resultierenden Gefäßdurchmessers nach Gabe des CSI Puffers.

Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und der 2. Reaktion ( $p > 0,05$ ). Somit ist der Einfluss des L-NNA auf den Gefäßdurchmesser nach CSI Puffer Applikation signifikant und zeitlich stabil.

#### 4.4. Kontrolle der endothelialen Integrität: Acetylcholin – Test

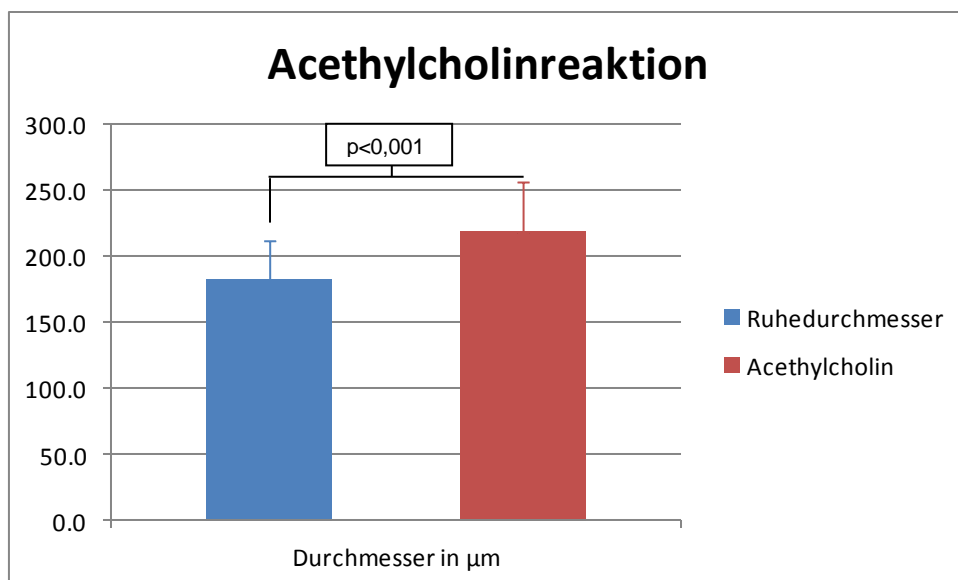
Um die endotheliale Funktionalität zu prüfen, wurde ein mit Acetylcholin versetzter extraluminärer Puffer 10 Minuten lang eingespült. Hier zeigte sich eine signifikante Vasodilatation ( $p > 0,001$ ). Die Reaktion auf Acetylcholin wurde ab Reihe 3 als Kontrollreaktion neben der Kalium- und der CSI- Reaktion verwendet. Bei Arterien welche eine Vasodilatation unter Acetylcholin zeigten, wurde das Endothel zum Zeitpunkt der Messung als intakt gewertet. Im Umkehrschluss zeigten Arterien nach erfolgreicher funktioneller Deaktivierung des Endothels durch Luftapplikation keine Reaktion mehr auf Acetylcholin.

**n = 31**

**Ruhedurchmesser in  $\mu\text{m}$ :** 181.9 +/- 31.6

**Durchmesser nach Acetylcholin in  $\mu\text{m}$ :** 218.9 +/- 40.8

**Signifikanz:**  **$p < 0.001$**



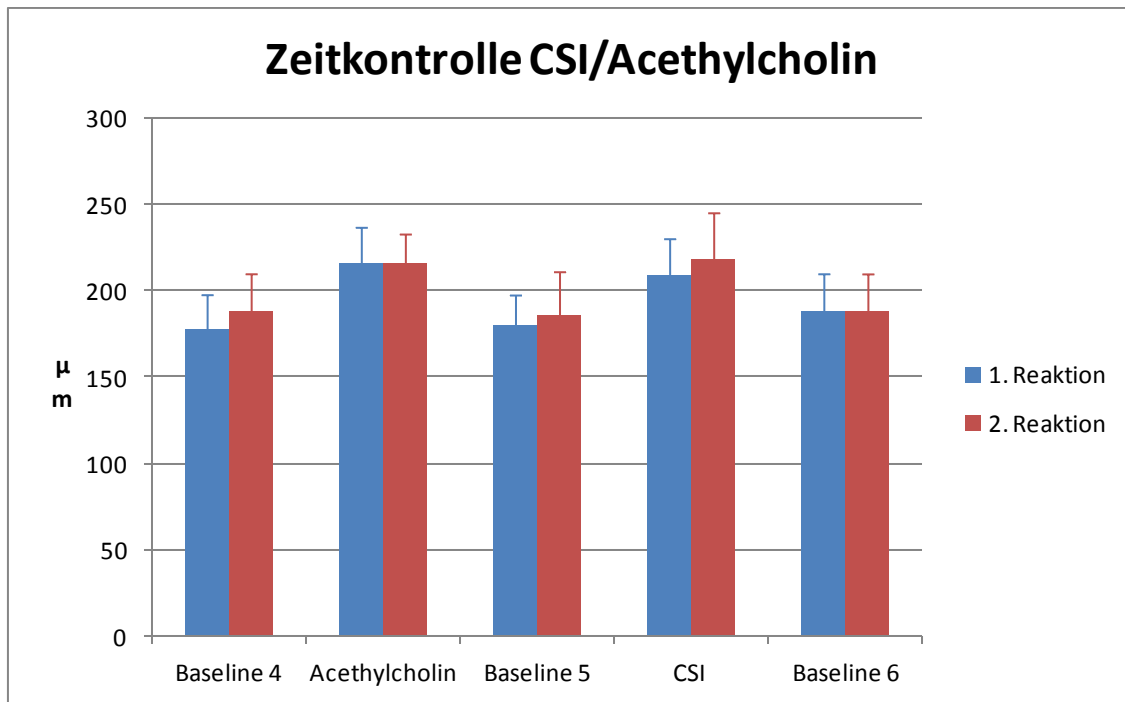
*Das Diagramm 6 zeigt die Summe aller Acetylcholintestreaktionen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied gegenüber dem Ruhetonus ( $p < 0,001$ ).*

#### 4.5. Reihe 3: repetitive CSI und Acethylcholin – Reaktion

n = 4

	1. Reaktion	2. Reaktion
<b>Ruhtonus</b> <b>In <math>\mu\text{m}</math></b>	177.9 +/- 19.9	187.9 +/- 22.0
<b>Acethyl- Cholin</b> <b>In <math>\mu\text{m}</math></b>	216.1 +/- 20.7	216.1 +/- 16.8
<b>Ruhtonus</b> <b>In <math>\mu\text{m}</math></b>	179.6 +/- 18.0	186.2 +/- 24.9
<b>CSI</b> <b>In <math>\mu\text{m}</math></b>	209.5 +/- 20.7	217.8 +/- 27.4

In Reihe 3 zeigte sich, dass die Vasodilationen auf CSI und Acethylcholin im Wechsel zeitig konstant waren und sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Reaktionen im Verlauf zeigte ( $p > 0,05$ ).



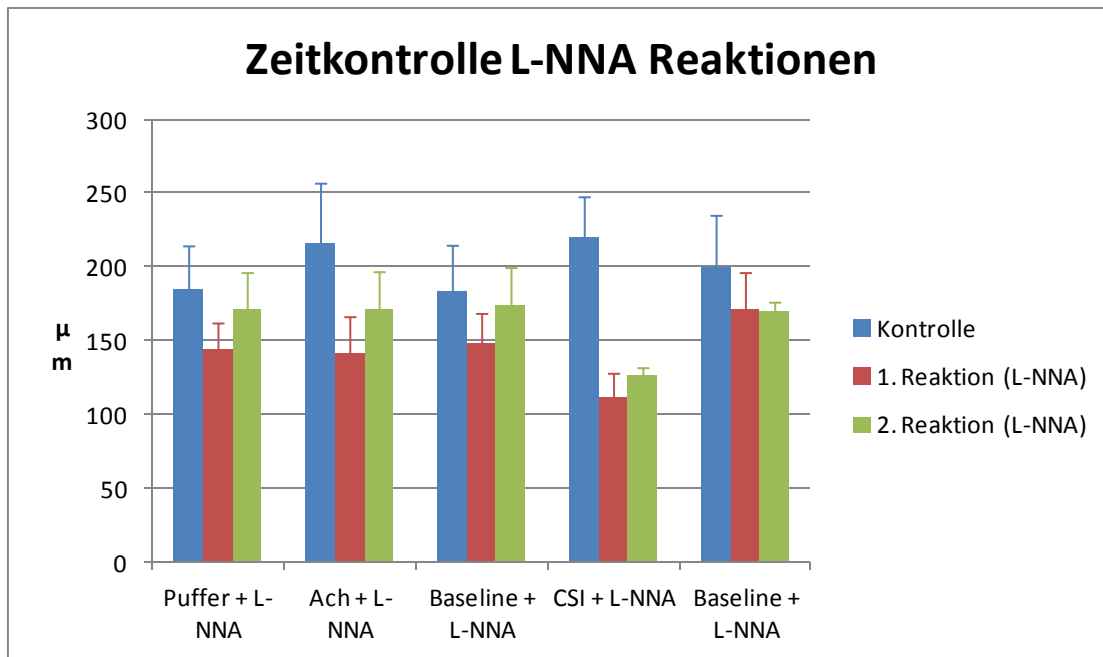
*In Diagramm 7 sind die zeitlich aufeinanderfolgenden Reaktionen 1. und 2. nebeneinander dargestellt. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,5$ ) zwischen den jeweiligen Durchmessern, sowohl beim Ruhetonus, als auch nach Applikation des Acethylcholins und des CSI Puffers. Somit sind die Gefäßreaktionen auf die oben genannten Substanzen zeitlich konstant und beeinflussen sich nicht signifikant gegenseitig.*

#### 4.5. Reihe 4: repetitive Ach und CSI Reihe unter L-NNA – Blockade

n = 4

	Kontrolle	L-NNA (1.Reaktion)	L-NNA (2.Reaktion)
<b>Ruhetonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	184.5 +/- 29.9	144.6 +/- 17.5	171.2 +/- 25.1
<b>Acethyl- cholin in <math>\mu\text{m}</math></b>	216.1 +/- 40.8	141.3 +/- 25.1	171.2 +/- 25.7
<b>Ruhetonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	182.9 +/- 31.9	148.0 +/- 20.6	174.6 +/- 25.1
<b>CSI in <math>\mu\text{m}</math></b>	219.5 +/- 28.2	111.4 +/- 16.6	126.4 +/- 5.4

In Reihe 4 zeigte sich nach den Kontrollversuchen eine Aufhebung der Vasodilation auf Acethylcholin unter L-NNA Blockade und wie schon in Reihe 2 eine signifikante Vasokonstriktion unter CSI und L-NNA Blockade. Diese Beobachtung war auch in dem 2. Reaktionszyklus zu sehen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den zeitlich aufeinander folgenden 1. und 2. Acethylcholin und CSI Reaktionen unter L-NNA Blockade ( $p > 0,05$ ), bei erhöhten Gefäßdurchmessern im Versuchsverlauf. Somit kann von einer zeitlichen Konstanz ausgegangen werden.



*Diagramm 8: Dargestellt sind die Gefäßdurchmesser während den aufeinanderfolgenden Reaktionen. Begonnen wurde mit einem Kontrollzyklus (hier blau dargestellt) bestehend aus einer Acetylcholintestreaktion und einer CSI Reaktion, zwischen den jeweiligen Reaktionen fand eine 10 minütige Auswaschphase statt. Die Ruhedurchmesser (baseline) wurden jeweils am Ende der Auswaschphase gemessen. Nach dem Kontrollzyklus wurde L-NNA zu allen Agenzien beigefügt und war ab diesem Zeitpunkt an allen Reaktionen beteiligt. Die gezeigte 1. Reaktion (hier rot) und die 2. Reaktion (hier grün) fanden zeitlich nacheinander statt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zeitlich aufeinanderfolgend gemessenen Gefäßdurchmessern des 1. Reaktionszyklus im Vergleich zum 2. Reaktionszyklus in allen angeführten Messzeitpunkten ( $p > 0,05$ ).*

#### 4.6. Luftversuche

n= 23

	<b>Kontrolle</b>	<b>Luft</b>
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	186.0 +/- 31.5	227.6 +/- 44.6
<b>Kalium in <math>\mu\text{m}</math></b>	251.0 +/- 45.8	258.5 +/- 49.4
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	182.2 +/- 31.8	202.1 +/- 40.9
<b>Acethyl- Cholin in <math>\mu\text{m}</math></b>	218.9 +/- 40.7	202.9 +/- 41.6
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	183.9 +/- 33.7	202.9 +/- 41.1
<b>CSI in <math>\mu\text{m}</math></b>	223.3 +/- 44.5	169.1 +/- 42.3
<b>Ruhtonus In <math>\mu\text{m}</math></b>	188.8 +/- 32.1	199.6 +/- 56.1

In den Reihen 5 – 8 wurde die Reaktion auf Kalium, Acethylcholin und CSI vor und nach Zerstörung des Endothels mittels Luftapplikation beobachtet. Es zeigte sich insgesamt eine Zunahme des Ruhedurchmessers nach mechanischer Manipulation durch intraluminal applizierte Luft. Die Reaktivität auf 20mmol Kalium blieb erhalten. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gefäßdurchmessern vor und nach Zerstörung des Endothels bei der Kaliumtestreaktion ( $p>0,05$ ). Auf



Acetylcholin reagierte das funktionell zerstörte Endothel nicht mehr mit einer signifikanten Vasodilation wie vor der Luftapplikation. Auf den CSI – Puffer reagiert die Arterie anstatt mit einer Vasodilation nun mit einer Vasokonstriktion. Der Unterschied zwischen den Gefäßdurchmessern bei der CSI Reaktionen vor und nach Luftapplikation ist signifikant ( $p < 0,05$ ).

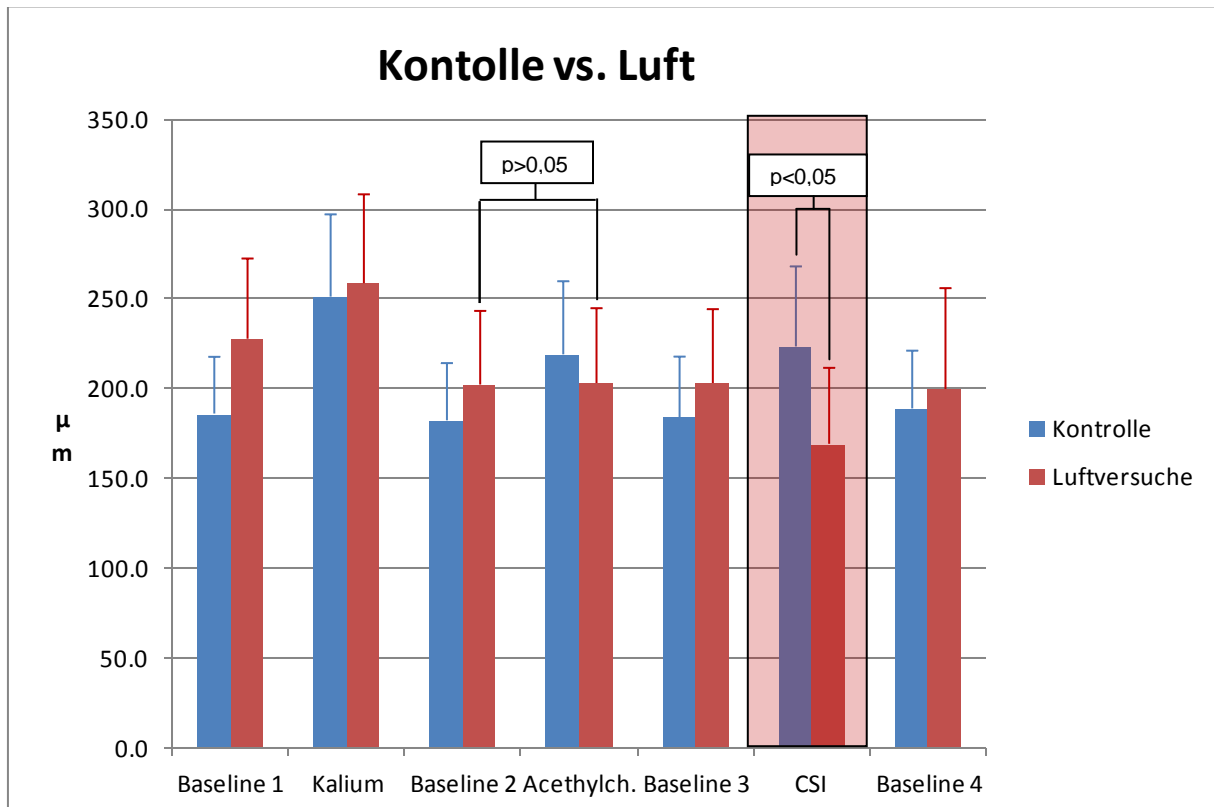


Diagramm 8: Gezeigt sind die Gefäßdurchmesser des Kontrollreaktionszyklus neben den Durchmessern nach Luftapplikation. Rot hinterlegt ist die Reaktion auf den CSI Puffer.

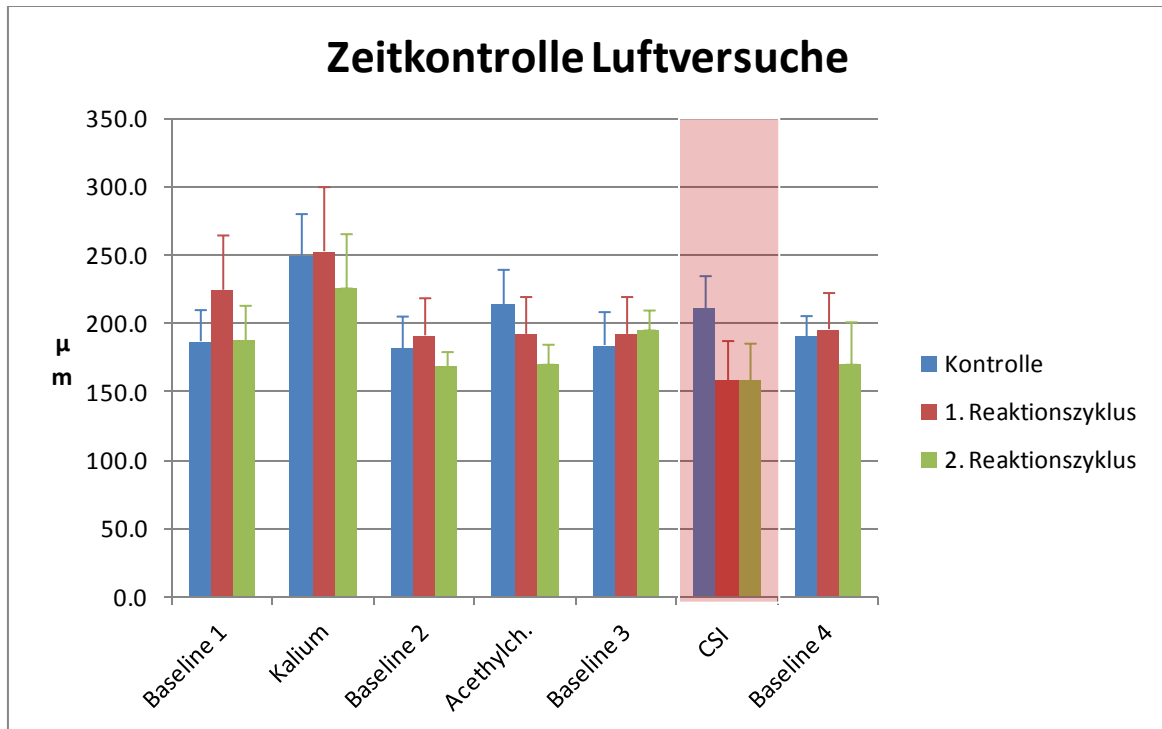
#### 4.7. Reihe 5: Luft Versuch- Zeitkontrolle

n = 12

	Kontrolle	Luft (1. Zyklus)	Luft (2. Zyklus)
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	186.9 +/- 22.7	224.5 +/- 39.7	188.1+/-24.7 (n= 7)
<b>Kalium in <math>\mu\text{m}</math></b>	249.4+/- 30.4	252.7+/- 46.9	226.4+/-38.8 (n=5)
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	181.3+/- 23.6	191.2+/- 27.1	168.7+/- 10.3 (n=3)
<b>Acethyl- Cholin in <math>\mu\text{m}</math></b>	213.4+/- 25.7	192.2+/- 27.0	170.7 +/- -13.6 (n= 3)
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	184.1+/- 24.1	192.2+/- 27.0	170.7+/-13.6 (n = 3)
<b>CSI in <math>\mu\text{m}</math></b>	210.7+/-23.7	158.5+/-28.5	158.7+/- 30.0 (n= 7)
<b>Ruhtonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	190.1+/-15.2	195.7+/- 26.4	188.1+/- -24.7

In Reihe 5 zeigte sich, dass die Messungen zeitlich konstant waren. Ein zweiter Reaktionszyklus wurde komplett (Kalium/Acethylcholin und CSI) in 3 Arterien durchgeführt. In 5 Arterien wurde lediglich eine zweite Kaliumkontrollreaktion nach Luftapplikation und eine zweite CSI Reaktion durchgeführt. In 7 Arterien wurde nur eine zweite CSI Reaktion durchgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gefäßdurchmesser zwischen dem 1. und 2. Reaktionszyklus bei der Gefäßreaktion auf den CSI Puffer nach funktioneller Deaktivierung des Endothels

( $p > 0,05$ ). Es zeigte sich kein Hinweis auf eine Erholung des Endothels im Sinne einer regelhaften Vasodilation auf Acethylcholin im Verlauf ( $n=3$ ).



*Diagramm 9:* Nebeneinander dargestellt sind der Kontrollreaktionszyklus, (blau) bestehend aus einer Kaliumtestreaktion, einer Acethylcholinreaktion und einer CSI Reaktion (rot hinterlegt), mit dazwischen jeweils 10 minütiger Auswaschphase, der 1. Reaktionszyklus (rot) nach funktioneller Zerstörung des Endothels, nach demselben Protokoll wie der Kontrollzyklus und ein 2. Reaktionszyklus (grün). Es zeigte sich in der Zeitkontrolle zwischen den Durchmessern des 1. Reaktionszyklus und des 2. Zyklus kein signifikanter Unterschied in den Gefäßdurchmessern zu den jeweiligen Messpunkten ( $p > 0,05$ ). Somit ist von einer zeitlichen Konstanz der Inaktivierung des Endothels durch Luftapplikation auszugehen.

#### 4.8.1 Reihe 6-8: Nimodipin – Versuche

n = 11

n=2

n=2

n= 7

	Kontrolle	Luft	Nimodipin 0,1 mM	Nimodipin 0,01 mM	Nimodipin 0,001 mM
<b>Ruhetonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	183.2 +/- 40.2	214.0+/- 50.8	299.3 +/- 9.4	289.3 +/- 4.7	263.2 +/- 62.6
<b>Acethyl- cholin in <math>\mu\text{m}</math></b>	224.9 +/- 53.3	214.6 +/- 52.2	292.6 +/- 0.0	286.0 +/- 0.0	262.2 +/- 62.6
<b>Ruhetonus in <math>\mu\text{m}</math></b>	183.8 +/- 43.1	214.6 +/- 51.3	292.6 +/- 0.0	286.0 +/- 0.0	261.3 +/- 61.6
<b>CSI in <math>\mu\text{m}</math></b>	237.0 +/- 57.8	180.8 +/- 52.4	299.3 +/- 9.4	286.0 +/- 0.0	281.2 +/- 63.4

In den Reihen 6-8 wurde nach den Kontrollversuchen mit Kalium, Acethylcholin und CSI das Endothel wie schon in Reihe 5 mittels Luftapplikation funktionell zerstört. Zur Kontrolle erfolgte wiederum eine Testung auf Kalium, Acethylcholin und CSI. Hier zeigten sich dieselben Beobachtungen wie in Reihe 5 (Zusammenfassung der Luft-Versuche siehe oben). Im Anschluss wurde dem System der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Nimodipin in 3 verschiedenen Konzentrationen beigemischt:

In den Konzentrationen 0,1 mM und 0,01 mM zeigte sich eine maximale Vasodilation, sowohl in Verbindung mit dem extraluminalen Puffer, als auch mit Acethylcholin und dem CSI-Puffer. Um die Wirkung des Nimodipins besser beurteilen zu können, wurde daher entschieden eine noch niedrigere Konzentration zu untersuchen.

In der Konzentration 0,001 mM zeigte sich eine moderatere Vasodilation des Ruhetonus im Vergleich zu den höheren Dosierungen. Weiterhin stellte sich eine

aufgehobene Reaktion der Arterie auf Acethylcholin dar. Die Vasokonstriktion auf den CSI-Puffer konnte wieder in eine Vasodilation überführt werden. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Reaktionen auf CSI nach Luftapplikation und der CSI Reaktion in Verbindung mit Nimodipin.

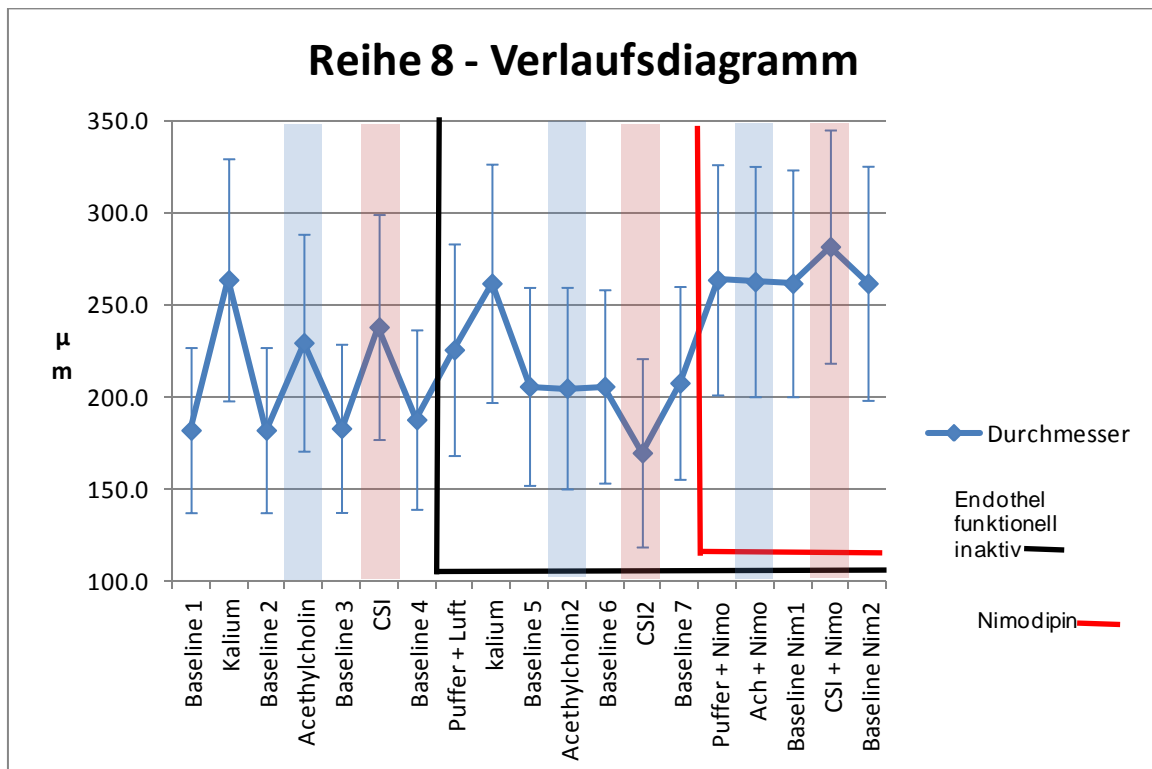


Diagramm 9 : Versuchsablauf der Nimodipin Versuch der Reihe 8 (n=7).

Blau hinterlegt ist die Reaktion auf Acethylcholin.

Rot hinterlegt ist die Reaktion auf CSI.

Der schwarze Balken stellt die Endothelzerstörung mittels Luftapplikation dar. Ab dem Zeitpunkt „Baseline 4“ ist von einer funktionellen Inaktivierung auszugehen.

Der rote Balken stellt die Zugabe des Nimodipin in das System dar. Ab dem Zeitpunkt „Puffer + Nimo“ waren die Calcium Kanäle durch das Nimodipin blockiert.

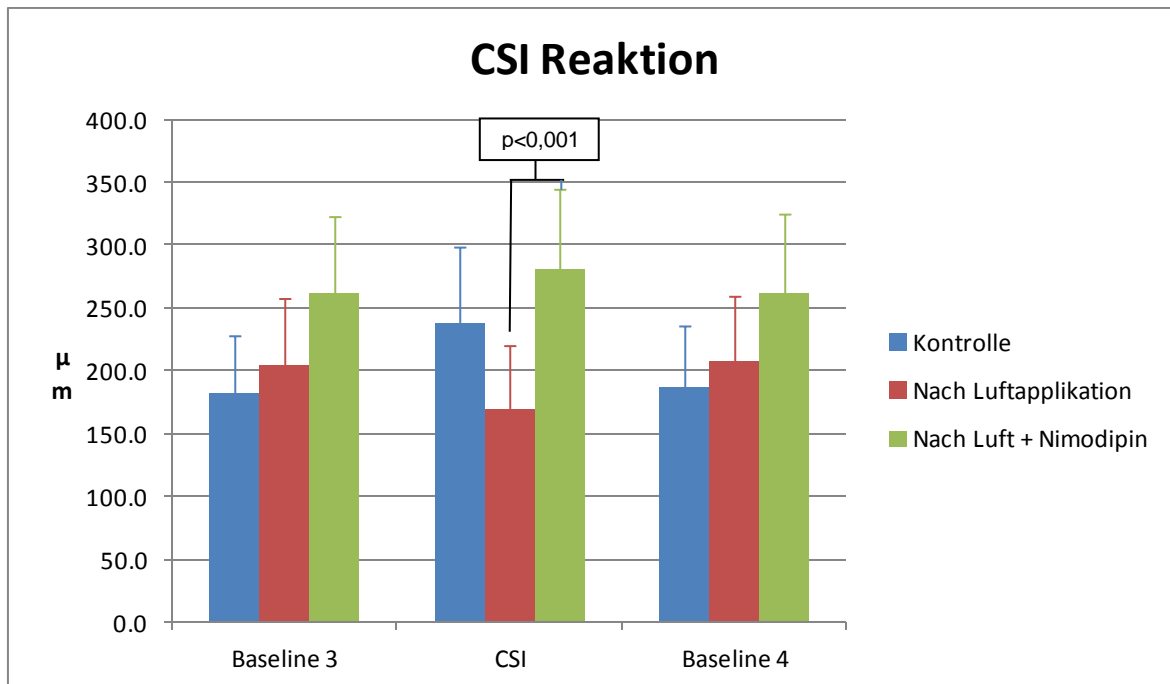
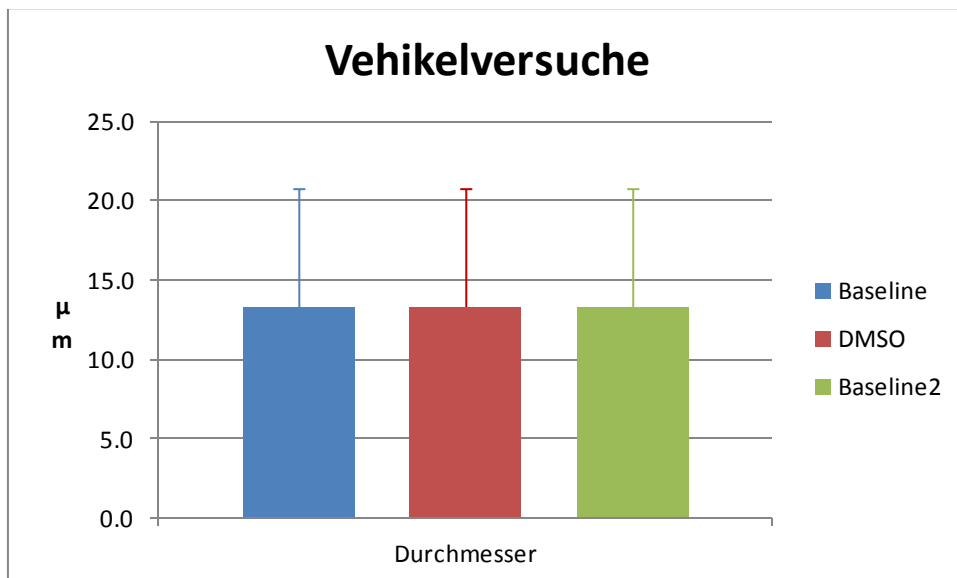


Diagramm 10: Nebeneinander dargestellt ist jeweils der Ruhedurchmesser (Baseline 3), der Gefäßdurchmesser nach 10 minütiger Einwaschphase des CSI Puffers und der Ruhedurchmesser (Baseline 4) nach 10 minütiger Auswaschphase. Das blaue Diagramm zeigt die Kontrollreaktion, rot nach funktioneller Deaktivierung des Endothels nach Luftapplikation und grün nach Luftapplikation und unter Wirkung des Nimodipins. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gefäßdurchmessern der CSI Reaktion unter inaktiviertem Endothel vor und nach Nimodipin Gabe ( $p < 0,001$ ).

#### 4.8.2 Reihe 6-8: Vehikel – Versuche

n=2	<b>Luft</b>
<b>Baseline in <math>\mu\text{m}</math></b>	13.3
<b>DMSO 0,1% in <math>\mu\text{m}</math></b>	13.3
<b>Baseline 2 in <math>\mu\text{m}</math></b>	13.3

Nach Luftapplikation und dem durchgeführten Reaktionszyklus wie oben beschrieben wurden vor der Zugabe des 0,001 mM Nimodipin in das System zwei Vehikelversuche durchgeführt. Es zeigte sich keine Reaktion auf das DMSO 0,1%.



## 5. Diskussion

### 5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte folgendes gezeigt werden:

1. Die Vasodilation auf eine CSD ist zeitlich konstant über die Versuchsdauer und zeigt keine Abschwächung der Reaktion bei einer repetitiven Reihe (Reihe 1).
2. Unter unspezifischer NO-Synthase Blockade mittels N-omega-nitro-L-arginine (L-NNA) zeigt das Gefäß statt einer Vasodilation eine CSI typische konstante Vasokonstriktion als Reaktion auf eine CSD (Reihe 2).
3. Nach funktioneller Zerstörung des Endothels mittels Luft zeigt sich eine konstante Vasokonstriktion im Sinne einer CSI nach artifizieller CSD (Reihe 5). Somit ist das Endothel für eine physiologische Gefäßantwort auf CSD von Bedeutung.
4. Nimodipin führt zu einer endothelunabhängigen Vasodilation. Nach Applikation des Calcium-Kanalblockers konnte die CSI aufgehoben und wieder in eine Hyperämie überführt werden. (Reihe 6-8).



## 5.2. Kritik am gewählten Modell

Die Zerstörung des Endothels wurde mittels Luftapplikation durchgeführt. Dabei wurden 5ml Luft über 10min appliziert. Eine gleichzeitige intraluminale Druckmessung wurde dabei nicht durchgeführt. Die Zerstörung des Endothels wurde lediglich funktionell durch die fehlende Reaktion auf Acetylcholin verifiziert. Morphologisch oder histochemisch wurde das zerstörte Endothel nicht nachgewiesen.

Die als CSI – Puffer in den jeweiligen Versuchsreihen applizierte Lösung enthält als zwei wesentliche Bestandteile einen niedrigen pH- Wert von 6,9 und einen erhöhten Kaliumwert von 50mM. Der Versuchsaufbau mittels MOPS-Pufferlösung ist frei von Bikarbonat und somit findet sich in dem verwendeten Puffersystem ein unphysiologisch niedriger  $p\text{CO}_2$ . Dies ist einer der wesentlichen Unterschiede zwischen der verwendeten MOPS-Pufferlösung und des Bikarbonatpuffersystems. Bei der physiologischen Gefäßreaktion *in vivo* auf Azidose partizipieren jedoch auch Lösungsprodukte des Bikarbonat-Puffersystems in Form des  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Diese könnten einen eigenen Einfluss auf die Vasomotorik haben. In einer Arbeit von 1977 konnte aber gezeigt werden, dass eine mögliche Gefäßinteraktion des Bikarbonat-Puffersystems über eine Änderung des pH-Werts vermittelt wird und eine Änderung des  $p\text{CO}_2$  alleine zu keiner signifikanten Reaktion führt (Kontos et al. 1977). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Versuchsaufbau mit bikarbonatfreien Puffersystemen eine Beobachtung der physiologischen Gefäßreaktion erlaubt.

## 5.3. Vasodilatoren aus dem Endothel als potentielle Schutzmechanismen vor einer CSI

Die oben dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihen legen nahe, dass es einen oder mehrere Mechanismen oder Agenzien innerhalb des Endothels geben muss, welche das Gefäß vor einer Vasokonstriktion im Rahmen einer CSI schützen. Das Fehlen eines oder mehrerer dieser Substanzen könnte dann zu der inversen Gefäßantwort nach Applikation des CSI-Puffers beitragen.

Lange Zeit galt das Endothel als simple Auskleidung der Gefäßinnenseite. Durch die Entwicklung von Bioassays und weiterer Methoden konnte in den 70er Jahren dem Endothel auch eine endokrine Bedeutung zugeordnet werden. Neben dem *Cyclooxygenase pathway* (Moncada und Vane 1978) wurde auch der *NO-Synthase pathway* (Palmer et al. 1987) früh bei der intensiveren Erforschung der möglichen vasoreaktiven Potenz des Endothels identifiziert. Im weiteren Verlauf konnte der Überbegriff „*endothelium derived hyperpolarizing factor*“ (EDHF) nach COX und NOS Blockade als eigenständiger von den beiden oben genannten Signalwegen unabhängiger Mechanismus oder Molekül beschrieben werden (Furchgott 1999). Im Laufe der Zeit konnten weitere eigenständige Substanzen identifiziert werden. So sind vor allem der *Cytochrom P450 Monooxygenase pathway*, sowie die Gasmetabolite H<sub>2</sub>S und CO Gegenstand der gegenwärtigen Forschung. Alle diese Agenzien führen zu einer endothelabhängigen Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur.

Die genaue Interaktion zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur ist noch unklar. Die Beteiligung von *Gap junctions* und eine Erhöhung des Kaliums im Interzellulärraum werden als Vermittlungsmechanismus diskutiert (Feletou und Vanhoutte 2006). Im Folgenden soll auf die einzelnen Metabolite näher eingegangen und ihre potentielle Bedeutung für die Reaktion auf die CSI beschrieben werden.

### **5.3.1. NO**

Vor allem die Identifizierung des NO als „*endothel derived relaxing factor*“ in den 80er Jahren sorgte für ein gesteigertes Interesse am Endothel (Palmer et al. 1987). Damals wurde dieser Mechanismus im Zusammenhang mit der endothelabhängigen Vasodilation auf Acetylcholin entdeckt (Furchgott 1999). NO führt hauptsächlich über den cGMP *pathway* zu einer Aktivierung von Kaliumkanälen. Doch auch cGMP unabhängige Reaktionen werden NO zugeschrieben (Nagpure und Bian 2016). Das NO hat bei der vorliegenden Reaktion hauptsächlich eine Rolle als Modulator. Als die beiden Hauptkomponenten des CSI-Puffers, wie im 2. Kapitel der Arbeit erwähnt, fungieren ein azidotischer pH-Wert von ca. 6,9 und ein hyperkalämischer Wert von ca. 50mM. Bei der Gefäßreaktion auf eine isolierte Azidose konnte von Lindauer et al. gezeigt werden, dass nach NO-Synthaseblockade die Gabe eines NO-Donors die

Vasodilation auf Azidose wiederherstellt. Die permissive Rolle einer basalen NO-Konzentration konnte dadurch bei der Azidosereaktion bewiesen werden (Lindauer et al. 2001). Die Bedeutung des basalen NO Levels könnte zum einen durch die Stabilität des NO bei niedrigen pH-Werten erklärt werden (Ignarro 1989), zum anderen könnte die *NO-Synthase* durch Azidose aktiviert werden und so zu vermehrter NO Produktion führen (Wang et al. 1992). Auch bei der Reaktion der MCA auf pathophysiologische Kaliumwerte über 30mM dient NO als Modulator. So zeigt sich unter NOS-Blockade zuerst eine aufgehobene Vasodilation, ab einer Kaliumkonzentration von 40mM sogar eine Vasokonstriktion. Nach Gabe eines NO-Donors konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden. Dadurch gilt die permissive Rolle des NO bei der Reaktion auf pathophysiologische Hyperkaliämie über 30mM als bewiesen. Die physiologische Reaktion auf Kaliumkonzentrationen bis zu 20mM verläuft im Gegensatz dazu größtenteils NO unabhängig (Schuh-Hofer et al. 2001). Auch in anderen *in vitro* Modellen bestätigten sich diese Beobachtungen (Golding et al. 2001a). Als mögliche Quellen der *NO-Synthase* kommt zum einen die *endotheliale NO-Synthase (eNOS)*, zum anderen die *neuronale NO-Synthase (nNOS)* in Frage. Hier unterscheiden sich die Ergebnisse verschiedener Arbeiten in Bezug auf die beiden oben erwähnten Reaktionen. Während die Azidosereaktion in größeren Gefäßabschnitten hauptsächlich durch die *nNOS* beeinflusst werden könnte (Lindauer et al. 2001), zeigt sich in anderen Studien bei weiter distal gelegenen Abschnitten eine Endothelabhängigkeit in der Vasodilation auf Azidose (Horiuchi et al. 2002). Die Reaktion auf pathophysiologische Kaliumwerte über 40mM hängt hauptsächlich von der *eNOS* ab und ist somit endothelabhängig (Golding et al. 2001a). Die Funktion der beiden *NO-Synthase* Isoformen geht über dies hinaus. So konnte gezeigt werden, dass die *nNOS* auch für die Vasodilation der MCA auf elektrische Stimulation von Bedeutung ist (Ignacio et al. 1997).

In dieser Arbeit zeigte sich eine Vasokonstriktion bei funktioneller Deaktivierung der *endothelialen NOS* nach Luftapplikation als Reaktion auf den CSI-Puffer. Dabei ist davon auszugehen, dass die *nNOS* nach intraluminaler Luftapplikation noch intakt war. Somit scheint bei der Gefäßantwort auf die kombinierte hyperkalämische Azidose (CSI-Puffer) das Endothel eine wichtige Rolle zu spielen. Ob es die *eNOS* alleine ist, welche hier von Bedeutung ist, kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Eine isolierte *nNOS*-Blockade unter gleichen Versuchsbedingungen könnte hier mehr Klarheit schaffen. Ein möglicher Ansatz wäre die Denervierung spezifischer

Arterienabschnitte durch Resektion der perivaskulären Nerven, welche hauptsächlich die *nNOS* zur Verfügung stellen (Lindauer et al. 2001).

Welche Rolle NO bei der mikrovaskulären Dysfunktion nach SAB hat, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt einige Hinweise darauf, dass eine verminderte Bioverfügbarkeit des NO bei der Entwicklung der CSI von Bedeutung ist. So konnte ein rascher Abfall der Konzentrationen von NO und der *eNOS* Aktivität nach SAB gefunden werden (Sehba et al. 2000).

Außerdem konnten bei Auftreten von Vasospasmen nach SAB erhöhte Werte des endogenen *eNOS* Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) gemessen werden (Jung et al. 2004). Auch ein vermindertes cGMP, welches hauptsächlich die Wirkung des NO vermittelt, konnte in diesem Zusammenhang gefunden werden (Nishizawa et al. 1995).

Funktionell konnte in neueren Arbeiten die verminderte Gefäßreaktivität nach SAB gezeigt werden. Bei Hypoventilation induzierter oder exogen verursachter Hyperkapnie wird die Gefäßreaktion physiologisch über die *endotheliale* und *neuronale NOS* vermittelt (Iadecola et al. 1994a). In einer klinischen Studie konnte ein direkter positiver Zusammenhang zwischen kontrollierter Hyperkapnie und verbesserten zerebralen Blutfluss und Oxygenierung des Gehirnparenchyms bei SAB-Patienten gezeigt werden (Westermaier et al. 2014). Dies würde die Vermutung einer verminderten NO Bioverfügbarkeit nach SAB und die damit verbundene funktionelle Einschränkung bekräftigen. Aggraviert könnte dies durch die Bindung des NO an freigesprochenes Hämoglobin werden. Auch therapeutisch wurde sowohl experimentell als auch klinisch der Einsatz verschiedener NO-Donoren versucht. Es gibt Versuche zur NO-Donorenapplikation in die *arteria carotis* des Affen nach artifizierlicher SAB (Pluta et al. 1997), sowie intracavysternaler Applikation beim Kaninchen und der Ratte (Gabikian et al. 2002). In beiden Studien zeigte sich ein verbesserter zerebraler Blutfluss. Auch konnte der radiologisch gesicherte Vasospasmus durch die Applikation von NO-Donoren durchbrochen werden. Das neurologische *outcome* wurde dabei nicht bestimmt. Ein besonderes Augenmerk ist bei der Gabe dieser Substanzen auf eine potentielle systemische Hypotension und Verschlechterung des zerebralen Perfusionsdrucks zu legen. Beim Menschen zeigten Versuche zur intraventrikulären Applikation des NO-Donors Natriumnitroprussid zum Teil vielversprechende Ergebnisse. Erste Ergebnisse lieferten *Thomas und Mitarbeiter* 1999 bei diesem Therapieansatz bei drei Patienten

mit angiographisch gesicherten Vasospasmen nach initialer SAB und deutlichem neurologischen Defizit (*Glasgow Coma Scale* von 7) und neu aufgetretener Hemiplegie. Nach intraventrikulärer Natriumnitroprussidgabe besserte sich das neurologische Defizit bei allen drei Patienten deutlich ohne signifikante systemische Nebenwirkungen auf die Vitalparameter (Thomas und Rosenwasser 1999). In einer klinisch prospektiven Studie mit Vergleichskollektiv wurde bei 10 Patienten mit therapierefraktärem verzögerten neurologischen Defizit nach SAB und angiologisch gesichertem Vasospasmus 4mg/ml intraventrikulär Natriumnitroprussid appliziert. Auch in dieser Studie zeigte sich ein signifikant besseres klinisches *outcome* zum Vergleichskollektiv mit jedoch systemischen Nebenwirkungen wie Erbrechen und ausgeprägte Hypotension (Agrawal et al. 2009). Die zum Teil ausgeprägten Nebenwirkungen führten zu weiteren Studien mit neueren NO-Donoren wie Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ). In einer Studie am Primaten konnte durch die intravenöse Applikation von 300  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  Natriumnitrit ein Vasospasmus aufgehoben und erhöhte NO Konzentrationen im Liquor erzielt werden (Fathi et al. 2011). *Pluta et al.* konnten in einer klinischen Studie am gesunden Patientenkollektiv die Sicherheit einer  $\text{NaNO}_2$  Infusionstherapie über 48 Stunden ohne relevanten systemische Nebenwirkungen bis zu einer Toxizitätsgrenze von 267  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  belegen (Pluta et al. 2011). Auch die Erhöhung der Phosphorylierung der eNOS durch Erythropoetin (EPO) zeigt gute Ergebnisse (Santhanam, Anantha Vijay R et al. 2005). Die Steigerung der NO-Konzentration nach SAB zur Vermeidung der CSI könnte vielversprechende Ergebnisse liefern.

### 5.3.2. Prostaglandin I<sub>2</sub>

Prostaglandin wurde als erste aktive Substanz dem Endothel zugeordnet. Dies gelang bei der detaillierten Betrachtung der Effekte des Aspirins und anderer NSAR auf den menschlichen Körper (Moncada und Vane 1978). So wird die endothelabhängige Vasodilation als physiologische Antwort auf neurohumorale oder mechanische Stimulation, wie etwa Scherstress durch vermehrten Blutfluss, hauptsächlich durch NO und/oder Prostacyclin vermittelt (Feletou und Vanhoutte 2009). Die Bedeutung des Prostacyclins ist bei der neurohumoralen Antwort jedoch minimal. Es spielt vielmehr eine wichtige Rolle als Kompensator bei verminderter NO Verfügbarkeit. So zeigen sich erhöhte Prostacyclinkonzentrationen bei eNOS *knockout* Mäusen und bei kardiovaskulär vorgeschädigten Patienten (Feletou und Vanhoutte 2009).

Über das Enzym *Cyclooxygenase* (COX) wird Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>), Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und eine Reihe verschiedener Prostaglandine aus Arachidonsäure in den Endothelzellen gebildet. Prostaglandine und Thromboxan A<sub>2</sub> wirken am Gefäß vasokonstringierend, während Prostacyclin ein starker Vasodilatator ist (Kolias et al. 2009).

Die Wirkung des Prostacyclins könnte über eine Aktivierung der *Adenylatcyclase* und dessen Produkt cAMP vermittelt werden (Prostacyclin Faraci). Über einen IP<sub>3</sub>-Rezeptor führt Prostacyclin dann zur Öffnung verschiedener Klassen von Kaliumkanälen und somit zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle (Furchgott 1983). Auch wirkt es stark antithrombotisch (Feletou und Vanhoutte 2006). IP<sub>3</sub> *knockout* Mäuse zeigen verstärkte Plättchenaktivität, neigen zu Thrombosen und Intimahyperplasie und sind anfälliger für Ischämie (Feletou und Vanhoutte 2009).

Furchgott *et al.* konnten bereits 1980 zeigen, dass andere Substanzen die Funktion des Prostacyclins übernehmen könnten. So blieb nach COX-Blockade mittels Indomethacin die Vasodilation auf Acetylcholin erhalten (Furchgott und Zawadzki 1980). Später konnte diese Beobachtung durch die Wirkung des NO erklärt werden (Palmer et al. 1987).

In einem *in vitro* Versuch zeigte der COX-Hemmer Indomethacin keinen Effekt auf die Antwort des Gefäßes auf Azidose (Horiuchi et al. 2002). Die von Horiuchi *et al.* verwendete Methode kommt der von uns in dieser Arbeit angewandten am nächsten.

Welche Bedeutung Prostacyclin *in vitro* bei der Reaktion auf Hyperkaliämie hat, ist noch unklar.

Die Rolle des Prostacyclins bei der CSD ist noch nicht abschließend geklärt. Eine positive Wirkung auf den zerebralen Blutfluss konnte experimentell bewiesen werden. So zeigten sich nach CSD eine langanhaltend erhöhte Konzentrationen des Enzyms COX-2 (Faraci und Heistad 1998). In einer klinischen Studie von Rasmussen *et al.* zeigte sich kein Einfluss des exogen zugeführten Prostacyclins auf den zerebralen Blutfluss nach SAB. Eine Verminderung der radiologisch nachgewiesenen Vasospasmen und des Auftretens von DIND konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden (Rasmussen *et al.* 2015).

### 5.3.3 EDHF

Neben den beiden oben beschriebenen Signalwegen der NOS und der COX verdichteten sich Ende der 1980er Jahre die Hinweise, dass es noch mindestens einen zusätzlichen vasoaktiven Mechanismus zur Interaktion zwischen dem Endothel und der glatten Gefäßmuskulatur geben muss (Taylor und Weston 1988). Dieser Mechanismus wurde „*endothelium-derived hyperpolarizing factor*“ EDHF genannt. Dieser Terminus beruft sich auf die Funktionsweise dieses bis heute noch nicht abschließend erforschten vasodilatatorischen Prozesses.

Im Allgemeinen erfolgt bei der EDHF abhängigen Gefäßantwort eine endothelabhängige und vom NOS und COX Signalweg unabhängige Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur (Feletou und Vanhoutte 1988). Eine wichtige Rolle scheinen hierbei vor allem calciumabhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) zu spielen. Durch die Hyperpolarisation an der Membran der glatten Gefäßmuskulatur sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle. Damit sinkt die Calciumkonzentration im Zytoplasma, was letzten Endes zu einer Vasodilation führt. Experimentell konnte die vasodilatatorische Wirkung des EDHF nach Blockade der NOS mit  $N_{\omega}$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochlorid (L-NAME) und der COX via Indomethacin durch die Applikation der beiden spezifischen Blocker der calciumabhängigen Kaliumkanäle Charybdotoxin und Apamin aufgehoben werden (Doughty *et al.* 1999).

Die Identität und die Bedeutung des EDHF scheinen für die einzelnen Organsysteme von unterschiedlicher Bedeutung zu sein. So wurde für das cerebrovaskuläre System die Bedeutung des EDHF als vasodilatatorischer Prozess sowohl mittels Einsatz von NOS-Blockern (You et al. 1999b) als auch an eNOS-knockout Mäusen (Faraci et al. 2004) demonstriert. Ebenso scheint die Wirkungsweise in peripheren Gefäßen im Vergleich zu den zerebralen Gefäßen unterschiedlich zu sein. Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine basale NO Konzentration die vasodilatatorische Wirkung des EDHF an den Koronargefäßen nach Bradykinin-Gabe inhibiert (Nishikawa et al. 2000). Bei zerebralen Gefäßen scheint dies nicht der Fall zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die EDHF vermittelte Vasodilatation auf intraluminale ATP Applikation unter NOS und COX Blockade nicht durch die Gabe eines NO Donors abgeschwächt wird (Schildmeyer und Bryan, Robert M Jr 2002).

Die Bedeutung des EDHF scheint auch innerhalb des cerebrovaskulären Systems zu variieren. So verschiebt sich der Beitrag an der Vasodilatation nach ATP Applikation zu Gunsten des EDHF und NO verliert vermehrt an Bedeutung je distaler und kleiner die Gefäßabgänge sind (You et al. 1999a). Mit diesen Erkenntnissen kann davon ausgegangen werden, dass der EDHF einen wichtigen Teil zur physiologischen Regulation des zerebralen Blutflusses beiträgt.

An der ischämisch geschädigten und anschließend reperfundierten *Arteria cerebri media* der Ratte konnte eine verstärkte Vasodilatation auf Uridintriphosphat (UTP), demonstriert werden (Marrelli et al. 1999). Diese wird vom EDHF vermittelt, im Vergleich zu einer abgeschwächten Reaktion auf ATP, welche hauptsächlich am zentralen Gefäßhauptstamm durch NO vermittelt wird.

Ein ähnliches Ergebnis konnte 24 Stunden nach artifizieller traumatischer Hirnverletzung an anschließend isolierten *Arteriae cerebri mediae* der Ratte gezeigt werden. Hier zeigte sich ein erhaltene Vasodilatation nach ATP Gabe unter NOS und COX Blockade. Gefäße, die bereits eine Stunde nach dem Trauma untersucht wurden, zeigten dies nicht. Auch hier wurde postuliert, dass der EDHF 24 Stunden nach dem Trauma eine wichtige Rolle zum Erhalt des zerebralen Blutflusses spielt (Golding et al. 2001b).

Die Studienergebnisse lassen eine Hochregulation des EDHF und eine gesteigerte Bedeutung bei pathologischen Verhältnissen vermuten. Welche Rolle der EDHF bei der CSI spielt, ist noch nicht ausreichend untersucht.



### 5.3.3. EETs

Epoxyeicosatriensäure (EETs) sind Arachidonsäuremetabolite. EETs werden durch Enzyme aus der Cytochrom P450 Gruppe gebildet. Einige davon werden vor allem im Endothel exprimiert. EETs als mögliche molekulare Identität des EDHF werden neben vasodilatatorischer auch antiinflammatorische und fibrinolytische Wirkungsweisen zugeschrieben. Die Produktion und Freisetzung aus dem Endothel wird vor allem durch Bradykinin, Acetylcholin, Scherstress und Dehnung der Gefäßwand angeregt (Feletou und Vanhoutte 2006). Gezeigt werden konnte dies experimentell mit Rinder- und Schweinecoronararterien. Vor allem 14,15-EET scheint hier Teil des EDHF zu sein (Campbell und Fleming 2010). Wobei die Identität des EDHF, wie bereits beschrieben, für jedes Organsystem wahrscheinlich variabel ist und somit nur unzureichend Rückschlüsse von der oben genannten Studie an den Koronargefäßen auf die zerebralen Gefäße getroffen werden können.

Die im Endothel synthetisierten EETs gelangen möglicherweise per Diffusion an die Basalmembran der glatten Gefäßmuskulatur. Die Öffnung von calciumabhängigen Kaliumkanälen erfolgt dann hauptsächlich G-Protein gekoppelt. Ob an der glatten Gefäßmuskulatur ein spezifischer Rezeptor für EETs exprimiert wird, ist noch Gegenstand der Forschung. Die Tatsache, dass durch EET Analoga, zum Beispiel 4,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoid Säure (14,15-EEZE) und 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoid-methylsulfonylimid (14,15-EEZE-mSI), die Wirkung von EETs antagonisiert werden kann, lässt die Existenz eines solchen Rezeptors vermuten (Gauthier et al. 2005).

In anderen Studien konnte eine mögliche Signalübertragung der endothelial synthetisierten 11,12-EETs auf die glatte Gefäßmuskulatur durch Vanilloidrezeptoren (TRPV4) an der Membran der glatten Gefäßmuskulatur gezeigt werden (Earley et al. 2005). Die EETs könnten hier über den Calciumaktivierungskomplex (TRPV4-ryanodinrezeptor-BK<sub>Ca</sub>) zum Calciumeinstrom in die glatte Gefäßmuskelzelle führen und über Ryanodinrezeptoren an sarkoplasmatischen Retikulum zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen. Letzten Endes führen diese über calciumabhängige Kaliumkanäle zum Ausstrom von K<sup>+</sup>-Kationen, was eine Hyperpolarisation der Zellmembran bewirken würde (Earley et al. 2005).

Auch wäre es möglich, dass EETs über einen autokrinen Mechanismus zum Calciumeinstrom in die Endothelzelle führen und es über verschiedenen calciumabhängige Kaliumkanäle zu einer Hyperpolarisation der Endothelzelle kommt (Campbell und Fleming 2010). Die Kommunikation mit der glatten Gefäßmuskelzelle könnte dann entweder über *gap junctions* oder über einem Kaliumausstrom aus der Endothelzelle in den Interzellulärraum erfolgen.

Beide Optionen führen letztendlich zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle und somit zur Vasodilation. Durch die Hydrolase *sEH* werden EETs zu Dihydroxyeicosatriensäure metabolisiert.

Im Gehirn werden EETs vor allem durch die Enzyme *CYP2C* und *CYP2J* in Astrozyten (Hamilton et al. 2010) und dem Endothel gebildet (Iliff et al. 2010). Hier haben EETs eine bedeutende Rolle für den zerebralen Blutfluss und die neurovaskulären Kopplung, nicht nur im intakten zerebralen Gewebe, sondern auch im ischämischen. Erhöhte EETs Level nach einem Schlaganfall durch enzymatische Hemmung des Abbaus durch *sEH* zeigten im Mausmodell eine verbesserte Durchblutungssituation (Zhang et al. 2007).

In klinischen Studien konnte eine höhere 14,15- EET Konzentration im Liquor bei SAB Patienten im Vergleich zum gesunden Kollektiv gefunden werden. Bei Auftreten von DCI war die Konzentration signifikant höher. Bei *Epoxid Hydrolase (sEH) knockout* Mäusen mit erhöhten 14,15 – EET konnte ein protektiver Effekt gegenüber CSI gefunden werden (Siler et al. 2015).

*N-methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)hexanamide* (MS-PPOH), welches die CYP Epoxygenase inhibiert und die *de novo* Synthese von EETs verhindert, zeigt keinen Effekt auf die Azidosereaktion der kleinen Gefäße (Horiuchi et al. 2002). Auch bei der Reaktion des zerebralen Blutflusses auf orale Trigemiusstimulation zeigt sich kein Effekt. Der Einsatz des EETs Analogon 14,15- EEZE führt jedoch zu einem reduzierten Blutfluss. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Reservoir für EETs vorhanden sein könnte. Andere Studien bekräftigen diese Annahme (Iliff et al. 2009).

Die endgültige Rolle von EETs in der Kontrolle des Vasotonus ist nicht abschließend geklärt. So könnte dieser *pathway* als Reserve bei gestörter NOS und COX dienen. Jedoch wäre auch möglich, dass sich die Wirkung der EETs bei gestörter eNOS durch die Bildung von Superoxiden erklärt. Erschwert wird die Forschung vor allem

durch den Einsatz unselektiver Pharmaka, deren Wirkung sich nur schwer bestimmten Strukturen zuordnen lässt (Iliff et al. 2009).

Welche Bedeutung den EETs bei der Entstehung der CSI zukommt, ist noch Gegenstand der Forschung. Bei weiterführenden Untersuchungen unserer Forschungsgruppe mit demselben Ansatz wie dem in dieser Arbeit verwendeten zeigte sich nach Blockade des Enzyms *Cytochrom P450* mit MS-PPOH [ $5 \times 10^{-6}$  M] nach Applikation des CSI Puffers eine Vasokonstriktion. Dies lässt vermuten, dass EETs bei der Pathogenese der CSI eine Rolle spielen. Die Vasokonstriktion konnte nach Zugabe von Nimodipin [ $10^{-7}$  M] wieder in eine Vasodilation überführt werden (Lindauer et al., bisher nicht publiziert).

#### **5.3.4. Hydrogen Sulfid (H<sub>2</sub>S)**

Das hochtoxische Gas H<sub>2</sub>S konnte in kleinen Mengen in vielen Gewebearten nachgewiesen werden (Hosoki et al. 1997). Unter anderem wird H<sub>2</sub>S im kardiovaskulärem System, der Leber, der Niere und dem Gehirn eine Rolle in sowohl physiologischen, als auch in pathologischen Reaktionen zugeschrieben (Kimura 2011). Gebildet wird es aus L-cystein durch die Enzyme *cystathion-beta-synthase* (CBS), *cystathion-gamma-lyase* (CSE) und *3-mercaptopyruvat-sulfurtransferase* (3MST) (Cui et al. 2015). CBS scheint hauptsächlich im ZNS für die Bildung von H<sub>2</sub>S verantwortlich zu sein (Wang et al. 2014), das CSE dagegen im kardiovaskulären System. CSE-knockout Mäuse zeigen einen deutlichen Hypertonus, was eine Rolle bei der Blutdruckregulation vermuten lässt (Yang et al. 2008). Insgesamt ist die H<sub>2</sub>S Konzentration im ZNS höher als im restlichen Körper. Dafür verantwortlich ist das von Astrozyten bei neuronaler Erregung gebildete CBS (Wang et al. 2014). Die Erforschung der von H<sub>2</sub>S erzielten Effekte basiert hauptsächlich auf der Gabe von H<sub>2</sub>S-Donoren wie NaHS und Na<sub>2</sub>S (Jimenez 2010). Bereits 1996 wurde dem Gas eine mögliche Rolle als Neuromodulator an NMDA-Kanälen bei der Langzeitpotentierung im Hippocampus zugeordnet (Abe und Kimura 1996). Das kleine Molekül diffundiert frei in die Zellen und interagiert dort mit Ionenkanälen an der Membran, Proteinen, Enzymen und Transkriptionsfaktoren (Nagpure und Bian 2016).

An der glatten Gefäßmuskulatur interagiert H<sub>2</sub>S mit einem spezifischen Cysteinrest eines Kanalproteins der ATP-abhängigen Kaliumkanäle (Zhao et al. 2001). Die

geöffneten Kaliumkanäle sorgen für eine Hyperpolarisation der Plasmamembran. Dies reduziert die Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Calciumkanälen und führt letztendlich zu einer Vasodilation (Zhao und Wang 2002). Die vasodilatorische Wirkung des H<sub>2</sub>S ist dabei abhängig vom extrazellulären Calcium (Zhao und Wang 2002).

Am Endothel könnte H<sub>2</sub>S die Freisetzung vasodilatorisch wirkenden Substanzen wie NO oder andere Teile des EDHF bewirken. Alternativ könnte ein intaktes Endothel H<sub>2</sub>S in der Gefäßwand halten und so seine Wirkung potentieren (Zhao und Wang 2002). Seine Hauptwirkung erzielt H<sub>2</sub>S jedoch direkt an der glatten Gefäßmuskulatur. Eine experimentelle Entfernung des Endothels zeigt eine abgeschwächte Vasodilation nach direkter Stimulation mit H<sub>2</sub>S. Auch die Blockade der NOS mittels L-NAME und des EDHF, wie bereits beschrieben, zeigt eine Abschwächung der Reaktion. Der genaue Interaktionsmechanismus zwischen NO und H<sub>2</sub>S ist noch unklar. So resultiert eine Vorbehandlung des Gefäßes mit H<sub>2</sub>S in einer abgeschwächten Vasodilation auf NO und andererseits verändert die Anwesenheit von NO die Vasodilation auf H<sub>2</sub>S nicht (Zhao und Wang 2002).

Auf neuronaler Ebene wirkt H<sub>2</sub>S anti-oxidant, anti-apoptotisch und anti-inflammatorisch (Wang et al. 2014). Vermittelt werden diese Effekte hauptsächlich durch die Bildung von Gluthation durch Sulfhydratation (Kimura 2013). Außerdem sorgt H<sub>2</sub>S für einen Calcium Einstrom in die Astrozyten (Jimenez 2010).

Die Wirkung von H<sub>2</sub>S zeigte in einer Reihe von Versuchen eine Konzentrationsabhängigkeit. Während bei hohen Konzentrationen von >100 µM die oben erklärten Mechanismen greifen, zeigt sich bei niedrigeren Konzentrationen ein gegensätzliches Bild (Ali et al. 2006).

So führt NaHS in einer Konzentration von 30 µM zu einer starken Vasokonstriktion bei Gefäßen mit intaktem Endothel. Dafür verantwortlich könnte eine Hemmung der eNOS Expression, Verminderung der cAMP Level in der glatten Gefäßmuskulatur und die Produktion von reaktiven Oxiden (ROS) sein (Nagpure und Bian 2016). Somit wirkt H<sub>2</sub>S in niedrigen Dosen indirekt endothelabhängig über eine Inaktivierung der eNOS vasokonstringierend (Kubo et al. 2007). Die genaue Interaktion zwischen NO und H<sub>2</sub>S ist noch nicht abschließend geklärt. Vor allem eine mögliche chemische

Reaktion zu Nitroxyl (HNO) und dessen Bedeutung im vaskulären System bedarf noch weiterer Forschung (Nagpure und Bian 2016). Der hier zitierte Übersichtsartikel von *Nagpure und Kollegen*, sowie die Versuche von *Kubo et al.* beschäftigt sich jedoch hauptsächlich mit der Wirkungsweise des H<sub>2</sub>S im kardiovaskulären System, ob die oben beschriebenen Erkenntnisse auch im Detail so auf das zerebrovaskuläre System anwendbar sind, ist nicht abschließend geklärt.

H<sub>2</sub>S scheint jedoch auch eine wichtige Bedeutung bei der Reaktion auf Subarachnoidalblutung zuzukommen. So zeigte sich eine verminderte Konzentration nach experimenteller SAB im Tiermodell. Diese war nach Gabe des H<sub>2</sub>S-Donors NaHS ausgleichbar. Daran beteiligt scheint vor allem die Expression der beiden Enzyme *CBS* und *3MST* zu sein. Die Wiederherstellung des H<sub>2</sub>S Niveaus wirkte sich positiv auf die frühen Komplikationen der SAB wie die Entstehung eines Hirnödems, Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke und dem Vasospasmus der großen Gefäße aus. H<sub>2</sub>S konnte eine neuroprotektive Wirkung nach SAB zugeordnet werden. Die Reduzierung der Vasospasmus und möglicherweise auch CSI Rate nach SAB könnte durch den anti-apoptotischen Effekt des H<sub>2</sub>S auf die Endothelzellen erklärt werden (Cui et al. 2015).

Bei Versuchen unserer Forschungsgruppe mit demselben Ansatz wie dem in dieser Arbeit verwendeten zeigte sich nach Blockade des Enzyms *CSE* mit DL-Propargylglycine, PAG [10-3M], nach Applikation des CSI Puffers eine erhaltene Vasodilation (Lindauer et al., bisher nicht publiziert). Dies lässt vermuten, dass H<sub>2</sub>S bei der Pathogenese der CSI eine untergeordnete Rolle spielt.

### 5.3.5 CO

Kohlenstoffmonoxid wird bei der Reaktion des Enzyms *Hämoxygenase* mit Hämoglobin neben Eisen und Biliverdin gebildet. Das Enzym existiert in mehreren Isoformen. *HO-2* wird dauerhaft in Neuronen und Endothelzellen exprimiert. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass *HO-2* schnell via TNF- $\alpha$  über eine Redoxreaktion aktiviert wird (Leffler et al. 2011). *HO-1* wird im Sinne einer Stressreaktion bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern gebildet, unter anderem auch bei der Reaktion auf SAB (Koehler und Traystman 2002). Bei *HO-2 knockout* Mäusen zeigte sich jedoch keine Veränderung im physiologischen zerebralen Blutfluss (Koehler und Traystman 2002).

Einige Autoren sind der Meinung, CO könnte mit Hilfe des cGMP *pathway* an der glatten Gefäßmuskulatur wirken (Furchgott und Jothianandan 1991). Es ist dabei ca. ein Hundertstel so wirksam wie NO (Baranano und Snyder 2001). Dies geschieht jedoch wahrscheinlich über eine konzentrationsabhängige Interaktion mit NO. Niedrige Dosierungen von 1.5–5  $\mu\text{mol/L}$  führten in zerebellären Zellkulturen zu einer Suppression der NO induzierten cGMP Bildung. Im Gegensatz dazu führen höhere Dosierungen von bis zu 500  $\mu\text{mol/L}$  zu einer vermehrten Produktion von cGMP (Ingi et al. 1996). Daher scheint es unwahrscheinlich, dass die vasodilatorische Wirkung des CO allein durch den cGMP *path way* vermittelt wird. An zerebralen Arteriolen des Schweines konnte gezeigt werden, dass NO und Prostaglandin bei der Vasodilation auf exogenes CO eine permissive Rolle einnehmen und nicht als Mediatoren der Gefäßreaktion fungieren (Koneru und Leffler 2004). Nach Blockade der COX mittels Indomethacin und der NOS mittels Nitroarginin konnte die Wirkung des CO reversibel inhibiert werden. Die Zugabe der jeweiligen Agonisten Iloprost (Prostaglandin) in der Konzentration 1 $\mu\text{mol/L}$  und Natriumnitroprussid in der Dosis 100  $\text{nmol/L}$ , konnte die ursprüngliche Vasodilation auf CO wiederherstellen. Die Agonisten selbst lösten keine Reaktion am Gefäß aus (Leffler et al. 2001). Somit benötigt CO für seine direkte Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur eine basale cGMP Konzentration. Diese Notwendigkeit zeigte sich jedoch nicht bei älteren Schweinen und Ratten. Somit scheint die Wirkvermittlung des CO alters- und artspezifisch zu sein (Leffler et al. 2011).

Vielmehr scheinen calciumabhängige Kaliumkanäle für die Vasodilation auf exogenem zugeführtem CO verantwortlich zu sein. In verschiedenen Tiermodellen konnte dies

bekräftigt werden. Bei glatten Gefäßmuskelzellen der Schwanzarterie der Ratte konnte via *patch clamp* Technik eine Wirkvermittlung des CO über calciumabhängige K-Kanäle gezeigt werden (Wang et al. 1997). In zerebralen Gefäßen kleiner Schweine konnte nach CO Gabe und Anlage eines zerebralen Fensters im Liquor keine Erhöhung des perivaskulären cGMP festgestellt werden. Außerdem zeigte die Studie, dass die Wirkung des exogen zugeführten CO durch Blockade der calciumabhängigen Kaliumkanäle mittels Tetraethylammoniumchlorid und Iberiotoxin aufgehoben werden kann (Leffler et al. 1999). Eine Beteiligung dieser Kanäle ist somit bei der Wirkvermittlung des CO wahrscheinlich. Auch führen erhöhte Konzentrationen von intrazellulärem Calcium zu gesteigerter CO Produktion (Leffler et al. 2011).

Endogen produziertes CO führt direkt an den zerebralen Gefäßen wie oben beschrieben zu einer Vasodilation. CO ist sehr stabil und fettlöslich. Es wurde bis dato kein Reservoir dafür in den Zellen gefunden. Die Synthese erfolgt *de novo* wie oben beschrieben. Als Gas diffundiert es frei durch die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten. Die Wirkung lässt somit nach Verteilung des Gases nach und muss daher auch nicht metabolisiert werden (Leffler et al. 2011). *HO-2 knockout* Mäuse zeigen nach globaler Ischämie größere ischämische Areale im Vergleich zu *wildtyp* Mäusen. Eine exogene Gabe von *HO-2* verbessert in den *knockout* Mäusen das *outcome* (Baranano und Snyder 2001). Dies lässt eine neuroprotektive und antiapoptotische Wirkung des *HO-2* vermuten. Diese Effekte werden hauptsächlich durch Bilirubin, welches nach kurzer Zeit aus Biliverdin entsteht, vermittelt (Baranano und Snyder 2001). Dafür verantwortlich könnte die hohe Konzentration von *Bilirubinreduktase* im Gehirn sein, welche für die schnelle Umwandlung des Biliverdins zu Bilirubin sorgt. Bilirubin reagiert nach zerebraler Ischämie mit den freigewordenen Radikalen und wird zügig wieder umgewandelt. Es entsteht ein Redoxzyklus, der schnell zum Abbau von Radikalen führt (Baranano und Snyder 2001).

Dieser Redoxzyklus könnte sich aber auch negativ auf die zerebrale Durchblutung nach SAB auswirken und zur Entstehung von vaskulärer Dysfunktion beitragen. So fallen in der oben erwähnten Reaktion auch Oxidationsprodukte an, sogenannte BOXes. Diese führen zu Vasokonstriktion und schädigen die glatte Gefäßmuskulatur. Das nach SAB extravasal auftretende Hämoglobin wird zu Bilirubin umgewandelt.

Die höchsten Bilirubinkonzentrationen zeigen sich nach ca. 3 bis 4 Tagen. Nach ca. 7 bis 11 Tage erreicht die BOX-Konzentration einen Höhepunkt, was auch dem Zeitfenster für das Auftreten von CSI entspricht. Die Menge an BOXes im Liquor verhält sich direkt proportional zu dem Auftreten von Vasospasmen. *In vitro* und *in vivo* Studien lassen eine potenzierende Wirkung bereits eingetretener vaskulärer Dysfunktion vermuten (Clark und Sharp 2006).

Erhöhte CO Level konnten bei neugeborenen Schweinen als Reaktion auf epileptische Anfälle, Hypotension, Hypoxie und erhöhten Glutamatkonzentrationen gefunden werden (Leffler et al. 2011). Während epileptischer Anfälle konnte im Liquor eine 20-fach höhere CO Konzentration, ca. um 1µM, gefunden werden. Auch bei Ratten konnte dies gezeigt werden (Montecot et al. 1998).

Welche Rolle die Produkte der *Hämoxigenase*, CO und Bilirubin, bei der CSI im Detail einnehmen, Bedarf noch weiterer Forschung.

#### **5.4. Ausblick**

Abschließend kann von einer wichtigen Rolle des Endothels bei der Entstehung der CSI ausgegangen werden. Vor allem die verminderte Bioverfügbarkeit der endothelial gebildeten Substanzen NO und der EETs scheinen nach Zerstörung des Endothels von Bedeutung zu sein. Der klinisch verwendete Calciumkanalblocker Nimodipin zeigt auch in dem hier verwendeten *in vitro* Modell eine wirksame Konversion der Vasokonstriktion zu einer Vasodilation und stellt somit die physiologische Reaktion auf eine CSD wieder her. Dies erfolgt ohne Vermittlung des Endothels. Eine zielgerichtete Therapie der Folgen des Endothelschadens wäre hier ein weiterer Therapieansatzpunkt. Auch der potentielle klinische Nutzen verschiedener NO-Donoren erfordert weitere Forschung.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit regen zu weiterer Klärung der teilweise noch unklaren Bedeutung der verschiedenen endothelabhängigen Agenzien an. Vor allem EETs, CO und H<sub>2</sub>S sind noch nicht besonders gut erforscht. Das Modell der isolierten Arterie bietet hierzu eine gute Möglichkeit.



## 6. Abkürzungsverzeichnis

3MST = 3-mercaptopyruvat-sulfurtransferase

ATP = Adenosintriphosphat

ADMA = Asymmetrisches Dimethylarginin

Ach = Acetylcholin

BOX = Bilirubinoxidationsprodukt

Ca<sup>2+</sup> = Calcium

CaCl<sub>2</sub> = Calciumchlorid

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

cGMP = cyclisches Guanylmophosphat

CO = Kohlenstoffmonoxid

COX = Cyclooxygenase

CYP = Cytochrom P

CBS = cystathion-beta-synthase

CSE = cystathion-gamma-lyase

CSD = cortical spreading depolarisation

CSI = cortical spreading ischemia

CSH = cortical spreading hyperämia

COSBID = cooperative study on brain injury and depolarizations

DCI = delayed cerebral ischemia

DMSO = Dimethylsulfoxid

DIND = delayed ischemic neuronal deficit

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

EDHF = endothelium derived hyperpolarisation factor

EPO = Erythropoetin

GTP = Guanyltriphosphat

eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) Synthase

EETs = Epoxyeicosatriensäure

H<sub>2</sub>S = Hydrogensulfid

HO = Hämoxygenase

K<sup>+</sup> = Kalium

KCl = Kaliumchlorid

L-NAME = N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochlorid

L-NNA = N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin

MCA = Medial cerebral arterie (englisch für Arteria cerebri media)

MgSO<sub>4</sub> = Magnesiumsulfat

MOPS = 3-Morpholinopropansulfonsäure Na<sup>+</sup> = Natrium

MS-PPOH = N-methylsulfonyl-6- (2-propargyloxyphenyl) hexanamide

Na<sup>2+</sup> = Natrium

NaCl = Natriumchlorid

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = Natriumdihydrogenphosphat

NaNO<sub>2</sub> = Natriumnitrit

NaOH = Natronlauge

nNOS = neuronale Stickstoffmonoxid (NO) Synthase

NO = Stickstoffmonoxid

Nimo = Nimodipin

NMDA = N-Methyl-D-aspartat

NSAR = Nicht steroidale antirheumatika

PGI<sub>2</sub> = Prostaglandin

SAB = Subarachnoidalblutung

sEH = soluble epoxid Hydrolase

TNF- α = Tumornekrosefaktor

TXA<sub>2</sub> = Thromboxan A<sub>2</sub>

UTP = Uridintriphosphat

ZNS = zentrales Nervensystem

## 7.Literaturverzeichnis

- Abe, K;Kimura, H (1996): The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. In: *J Neurosci* 16 (3), S. 1066–1071.
- Adelstein, R;Sellers, J (1987): Effects of calcium on vascular smooth muscle contraction. In: *Am J Cardiol* 59 (3), S. 4B-10B.
- Agrawal, A,Patir, R,Kato, Y,Chopra, S,Sano, H;Kanno, T (2009): Role of intraventricular sodium nitroprusside in vasospasm secondary to aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a 5-year prospective study with review of the literature. In: *Minim Invasive Neurosurg* 52 (1), S. 5–8.
- Alaraj, A,Charbel, F;Amin-Hanjani, S (2009): Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. In: *Neurol Res* 31 (6), S. 651–659.
- Ali, M,Ping, C,Mok, Y-Y,Ling, L,Whiteman, M,Bhatia, M;Moore, P (2006): Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? In: *Br J Pharmacol* 149 (6), S. 625–634.
- Altura, B,Carella, A;Altura, B (1980): Adverse effects of Tris, HEPES and MOPS buffers on contractile responses of arterial and venous smooth muscle induced by prostaglandins. In: *Prostaglandins Med* 5 (2), S. 123–130.
- Andresen, J,Shafi, N;Bryan, Robert M Jr (2006): Endothelial influences on cerebrovascular tone. In: *J Appl Physiol* (1985) 100 (1), S. 318–327.
- Aristides A. P. Leao: Spreading depression of activity in the cerebral cortex. In: *J. Neurophysiologie* 1944.
- Baranano, D;Snyder, S (2001): Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (20), S. 10996–11002.
- Bederson, J,Connolly, E Sander Jr,Batjer, H,Dacey, R,Dion, J,Diringer, M,Duldner, John E Jr,Harbaugh, R,Patel, A;Rosenwasser, R (2009): Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. In: *Stroke* 40 (3), S. 994–1025.
- Bergstrom, A,Staalso, J,Romner, B;Olsen, N (2014): Impaired endothelial function after aneurysmal subarachnoid haemorrhage correlates with arginine:asymmetric dimethylarginine ratio. In: *Br J Anaesth* 112 (2), S. 311–318.
- Bonita, R,Mendis, S,Truelsen, T,Bogousslavsky, J,Toole, J;Yatsu, F (2004): The global stroke initiative. In: *Lancet Neurol* 3 (7), S. 391–393.
- Brouwers, P,Dippel, D,Vermeulen, M,Lindsay, K,Hasan, D;van Gijn, J (1993): Amount of blood on computed tomography as an independent predictor after aneurysm rupture. In: *Stroke* 24 (6), S. 809–814.
- Bryan, R M Jr,Eichler, M,Swafford, M,Johnson, T,Suresh, M;Childres, W (1996): Stimulation of alpha 2 adrenoceptors dilates the rat middle cerebral artery. In: *Anesthesiology* 85 (1), S. 82–90.
- Budohoski, K,Guilfoyle, M,Helmy, A,Huuskonen, T,Czosnyka, M,Kirollos, R,Menon, D,Pickard, J;Kirkpatrick, P (2014): The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85 (12), S. 1343–1353.

- Campbell, W;Fleming, I (2010): Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. In: *Pflugers Arch* 459 (6), S. 881–895.
- Clark, J;Sharp, F (2006): Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (10), S. 1223–1233.
- Cui, Y,Duan, X,Li, H,Dang, B,Yin, J,Wang, Y,Gao, A,Yu, Z;Chen, G (2015): Hydrogen Sulfide Ameliorates Early Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats. In: *Mol Neurobiol*.
- Dacey, R G Jr;Bassett, J (1987): Cholinergic vasodilation of intracerebral arterioles in rats. In: *Am J Physiol* 253 (5 Pt 2), S. H1253-60.
- Dacey, R G Jr;Duling, B (1982): A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology, and reactivity. In: *Am J Physiol* 243 (4), S. H598-606.
- Davis, M;Hill, M (1999): Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. In: *Physiol Rev* 79 (2), S. 387–423.
- Dietrich, H,Kimura, M;Dacey, R G Jr (1994): N omega-nitro-L-arginine constricts cerebral arterioles without increasing intracellular calcium levels. In: *Am J Physiol* 266 (4 Pt 2), S. H1681-6.
- Doughty, J,Plane, F;Langton, P (1999): Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. In: *Am J Physiol* 276 (3 Pt 2), S. H1107-12.
- Dreier, J,Ebert, N,Priller, J,Megow, D,Lindauer, U,Klee, R,Reuter, U,Imai, Y,Einhaulpl, K,Victorov, I;Dirnagl, U (2000): Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? In: *J Neurosurg* 93 (4), S. 658–666.
- Dreier, J,Korner, K,Ebert, N,Gorner, A,Rubin, I,Back, T,Lindauer, U,Wolf, T,Villringer, A,Einhaulpl, K,Lauritzen, M;Dirnagl, U (1998): Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K<sup>+</sup> is increased in the subarachnoid space. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (9), S. 978–990.
- Dreier, J,Korner, K,Gorner, A,Lindauer, U,Weih, M,Villringer, A;Dirnagl, U (1995): Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 15 (6), S. 914–919.
- Dreier, J,Major, S,Manning, A,Woitzik, J,Drenckhahn, C,Steinbrink, J,Tolias, C,Oliveira-Ferreira, A,Fabricius, M,Hartings, J,Vajkoczy, P,Lauritzen, M,Dirnagl, U,Bohner, G;Strong, A (2009): Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. In: *Brain* 132 (Pt 7), S. 1866–1881.
- Dreier, J,Windmuller, O,Petzold, G,Lindauer, U,Einhaulpl, K;Dirnagl, U (2002): Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats. In: *Neurosurgery* 51 (6), S. 1457-65; discussion 1465-7.
- Duling, B,Gore, R,Dacey, R G Jr;Damon, D (1981): Methods for isolation, cannulation, and in vitro study of single microvessels. In: *Am J Physiol* 241 (1), S. H108-116.
- Earley, S,Heppner, T,Nelson, M;Brayden, J (2005): TRPV4 forms a novel Ca<sup>2+</sup> signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. In: *Circ Res* 97 (12), S. 1270–1279.

Fabricius, M, Akgoren, N; Lauritzen, M (1995): Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. In: *Am J Physiol* 269 (1 Pt 2), S. H23-9.

Faraci, F; Heistad, D (1998): Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. In: *Physiol Rev* 78 (1), S. 53–97.

Faraci, F, Lynch, C; Lamping, K (2004): Responses of cerebral arterioles to ADP: eNOS-dependent and eNOS-independent mechanisms. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (6), S. H2871-6.

Faraci, F; Sobey, C (1998): Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (10), S. 1047–1063.

Fathi, A, Pluta, R, Bakhtian, K, Qi, M; Lonser, R (2011): Reversal of cerebral vasospasm via intravenous sodium nitrite after subarachnoid hemorrhage in primates. In: *J Neurosurg* 115 (6), S. 1213–1220.

Feigin, V, Forouzanfar, M, Krishnamurthi, R, Mensah, G, Connor, M, Bennett, D, Moran, A, Sacco, R, Anderson, L, Truelsen, T, O'Donnell, M, Venketasubramanian, N, Barker-Collo, S, Lawes, Carlene M, Wang, W, Shinohara, Y, Witt, E, Ezzati, M, Naghavi, M; Murray, C (2014): Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. In: *Lancet* 383 (9913), S. 245–254.

Feletou, M; Vanhoutte, P (1988): Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. In: *Br J Pharmacol* 93 (3), S. 515–524.

Feletou, M; Vanhoutte, P (2006): Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (6), S. 1215–1225.

Feletou, M; Vanhoutte, P (2009): EDHF: an update. In: *Clin Sci (Lond)* 117 (4), S. 139–155.

Francis, S, Busch, J, Corbin, J; Sibley, D (2010): cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. In: *Pharmacol Rev* 62 (3), S. 525–563.

Friedrich, V, Flores, R, Muller, A; Sehba, F (2010): Escape of intraluminal platelets into brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage. In: *Neuroscience* 165 (3), S. 968–975.

Furchgott, R (1983): Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. In: *Circ Res* 53 (5), S. 557–573.

Furchgott, R (1999): Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. In: *Biosci Rep* 19 (4), S. 235–251.

Furchgott, R; Jothianandan, D (1991): Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. In: *Blood Vessels* 28 (1-3), S. 52–61.

Furchgott, R; Zawadzki, J (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (5789), S. 373–376.

Gabikian, P, Clatterbuck, R, Eberhart, C, Tyler, B, Tierney, T; Tamargo, R (2002): Prevention of experimental cerebral vasospasm by intracranial delivery of a nitric oxide donor from a controlled-release polymer: toxicity and efficacy studies in rabbits and rats. In: *Stroke* 33 (11), S. 2681–2686.

Gauthier, K, Edwards, E, Falck, J, Reddy, D; Campbell, W (2005): 14,15-epoxyeicosatrienoic acid represents a transferable endothelium-dependent relaxing factor in bovine coronary arteries. In: *Hypertension* 45 (4), S. 666–671.

- Gjedde, A,Hansen, A;Quistorff, B (1981): Blood-brain glucose transfer in spreading depression. In: *J Neurochem* 37 (4), S. 807–812.
- Golding, E,Robertson, C;Bryan, R M Jr (1998): Comparison of the myogenic response in rat cerebral arteries of different calibers. In: *Brain Res* 785 (2), S. 293–298.
- Golding, E,Steenberg, M,Johnson, T;Bryan, R (2001a): Nitric oxide in the potassium-induced response of the rat middle cerebral artery: a possible permissive role. In: *Brain Res* 889 (1-2), S. 98–104.
- Golding, E,You, J,Robertson, C;Bryan, R M Jr (2001b): Potentiated endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations in cerebral arteries following mild head injury. In: *J Neurotrauma* 18 (7), S. 691–697.
- GRAFSTEIN, B (1956): Mechanism of spreading cortical depression. In: *J Neurophysiol* 19 (2), S. 154–171.
- Gwag, B,Canzoniero, L,Sensi, S,Demaro, J,Koh, J,Goldberg, M,Jacquin, M;Choi, D (1999): Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. In: *Neuroscience* 90 (4), S. 1339–1348.
- Halpem, W;Kelley, M (1991): In vitro methodology for resistance arteries. In: *Blood Vessels* 28 (1-3), S. 245–251.
- Hamilton, N,Attwell, D;Hall, C (2010): Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. In: *Front Neuroenergetics* 2.
- Hayashi, S;Hester, R (1987): Endothelium-dependent relaxations in rabbit aorta are depressed in artificial buffered solutions. In: *J Pharmacol Exp Ther* 242 (2), S. 523–530.
- Hijdra, A,van Gijn, J,Stefanko, S,Van Dongen, K J,Vermeulen, M;van Crevel, H (1986): Delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: clinicoanatomic correlations. In: *Neurology* 36 (3), S. 329–333.
- Horiuchi, T,Dietrich, H,Hongo, K,Goto, T;Dacey, Ralph G Jr (2002): Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis. In: *Stroke* 33 (3), S. 844–849.
- Hosoki, R,Matsuki, N;Kimura, H (1997): The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. In: *Biochem Biophys Res Commun* 237 (3), S. 527–531.
- Iadecola, C (2010): The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. In: *Acta Neuropathol* 120 (3), S. 287–296.
- Iadecola, C,Pelligrino, D,Moskowitz, M;Lassen, N (1994a): Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 14 (2), S. 175–192.
- Iadecola, C,Zhang, F;Xu, X (1994b): SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. In: *Am J Physiol* 267 (1 Pt 2), S. R228-35.
- Ignacio, C,Curling, P,Childres, W;Bryan, R M Jr (1997): Nitric oxide-synthesizing perivascular nerves in the rat middle cerebral artery. In: *Am J Physiol* 273 (2 Pt 2), S. R661-8.
- Ignarro, L (1989): Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. In: *FASEB J* 3 (1), S. 31–36.

- Iliff, J, Jia, J, Nelson, J, Goyagi, T, Klaus, J; Alkayed, N (2010): Epoxyeicosanoid signaling in CNS function and disease. In: *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91 (3-4), S. 68–84.
- Iliff, J, Wang, R, Zeldin, D; Alkayed, N (2009): Epoxyeicosanoids as mediators of neurogenic vasodilation in cerebral vessels. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (5), S. H1352–63.
- Ingall, T, Asplund, K, Mahonen, M; Bonita, R (2000): A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. In: *Stroke* 31 (5), S. 1054–1061.
- Ingi, T, Cheng, J; Ronnett, G (1996): Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. In: *Neuron* 16 (4), S. 835–842.
- Jakubowski, J, Bell, B, Symon, L, Zawirski, M; Francis, D (1982): A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional cerebral blood flow, autoregulation carbon dioxide reactivity, and central conduction time. In: *Stroke* 13 (5), S. 601–611.
- Jimenez, M (2010): Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the enteric nervous system. In: *Neurogastroenterol Motil* 22 (11), S. 1149–1153.
- Johnson, T, Marrelli, S, Steenberg, M, Childres, W; Bryan, R M Jr (1998): Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery. In: *Am J Physiol* 274 (2 Pt 2), S. R541-7.
- Johnston, S, Mendis, S; Mathers, C (2009): Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. In: *Lancet Neurol* 8 (4), S. 345–354.
- Jung, C, Luliano, B, Harvey-White, J, Espey, M, Oldfield, E; Pluta, R (2004): Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. In: *J Neurosurg* 101 (5), S. 836–842.
- Kamm, K; Stull, J (1985): The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25, S. 593–620.
- Karaki, H, Suzuki, T; Urakawa, N (1981): Artificial buffers do not inhibit contractile responses in the smooth muscle of rat portal vein and guinea pig taenia coli. In: *Jpn J Pharmacol* 31 (6), S. 979–983.
- Kassell, N, Sasaki, T, Colohan, A; Nazar, G (1985): Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: *Stroke* 16 (4), S. 562–572.
- Kassell, N, Torner, J, Haley, E C Jr, Jane, J, Adams, H; Kongable, G (1990): The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. In: *J Neurosurg* 73 (1), S. 18–36.
- Kimura, H (2011): Hydrogen sulfide: its production, release and functions. In: *Amino Acids* 41 (1), S. 113–121.
- Kimura, H (2013): Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. In: *Neurochem Int* 63 (5), S. 492–497.
- Knot, H; Nelson, M (1998a): Regulation of arterial diameter and wall Ca<sup>2+</sup> in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. In: *J Physiol* 508 (Pt 1), S. 199–209.
- Knot, H; Nelson, M (1998b): Regulation of arterial diameter and wall Ca<sup>2+</sup> in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. In: *J Physiol* 508 (Pt 1), S. 199–209.



- Koehler, R;Traystman, R (2002): Cerebrovascular effects of carbon monoxide. In: *Antioxid Redox Signal* 4 (2), S. 279–290.
- Kolias, A,Sen, J;Belli, A (2009): Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. In: *J Neurosci Res* 87 (1), S. 1–11.
- Koneru, P;Leffler, C (2004): Role of cGMP in carbon monoxide-induced cerebral vasodilation in piglets. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (1), S. H304-9.
- Kontos, H,Raper, A;Patterson, J (1977): Analysis of vasoactivity of local pH, PCO<sub>2</sub> and bicarbonate on pial vessels. In: *Stroke* 8 (3), S. 358–360.
- Kraig, R;Nicholson, C (1978): Extracellular ionic variations during spreading depression. In: *Neuroscience* 3 (11), S. 1045–1059.
- Kubo, S,Doe, I,Kurokawa, Y,Nishikawa, H;Kawabata, A (2007): Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. In: *Toxicology* 232 (1-2), S. 138–146.
- Kunkler, P,Hulse, R,Schmitt, M,Nicholson, C;Kraig, R (2005): Optical current source density analysis in hippocampal organotypic culture shows that spreading depression occurs with uniquely reversing currents. In: *J Neurosci* 25 (15), S. 3952–3961.
- Lauritzen, M (1984): Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO<sub>2</sub> response. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 4 (4), S. 546–554.
- Leffler, C,Nasjletti, A,Johnson, R;Fedinec, A (2001): Contributions of prostacyclin and nitric oxide to carbon monoxide-induced cerebrovascular dilation in piglets. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (4), S. H1490-5.
- Leffler, C,Nasjletti, A,Yu, C,Johnson, R,Fedinec, A;Walker, N (1999): Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. In: *Am J Physiol* 276 (5 Pt 2), S. H1641-6.
- Leffler, C,Parfenova, H;Jaggard, J (2011): Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301 (1), S. H1-H11.
- Lindauer, U,Kunz, A,Schuh-Hofer, S,Vogt, J,Dreier, J;Dirnagl, U (2001): Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (3), S. H1353-63.
- Lindauer, U,Megow, D,Matsuda, H;Dirnagl, U (1999): Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. In: *Am J Physiol* 277 (2 Pt 2), S. H799-811.
- Macdonald, R (2008): Clazosentan: an endothelin receptor antagonist for treatment of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. In: *Expert Opin Investig Drugs* 17 (11), S. 1761–1767.
- Macdonald, R,Pluta, R;Zhang, J (2007): Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. In: *Nat Clin Pract Neurol* 3 (5), S. 256–263.
- Marrelli, S,Khorovets, A,Johnson, T,Childres, W;Bryan, R M Jr (1999): P<sub>2</sub> purinoceptor-mediated dilations in the rat middle cerebral artery after ischemia-reperfusion. In: *Am J Physiol* 276 (1 Pt 2), S. H33-41.

Mayevsky, A, Doron, A, Manor, T, Meilin, S, Zarchin, N; Ouaknine, G (1996): Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. In: *Brain Res* 740 (1-2), S. 268–274.

Moncada, S; Vane, J (1978): Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. In: *Pharmacol Rev* 30 (3), S. 293–331.

Montecot, C, Seylaz, J; Pinard, E (1998): Carbon monoxide regulates cerebral blood flow in epileptic seizures but not in hypercapnia. In: *Neuroreport* 9 (10), S. 2341–2346.

Mutch, W; Hansen, A (1984): Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 4 (1), S. 17–27.

Nagpure, B; Bian, J-S (2016): Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. In: *Oxid Med Cell Longev* 2016, S. 6904327.

Naidech, A, Janjua, N, Kreiter, K, Ostapkovich, N, Fitzsimmons, B-F, Parra, A, Commichau, C, Connolly, E; Mayer, S (2005): Predictors and impact of aneurysm rebleeding after subarachnoid hemorrhage. In: *Arch Neurol* 62 (3), S. 410–416.

Nakamura, H, Strong, A, Dohmen, C, Sakowitz, O, Vollmar, S, Sue, M, Kracht, L, Hashemi, P, Bhatia, R, Yoshimine, T, Dreier, J, Dunn, A; Graf, R (2010): Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. In: *Brain* 133 (Pt 7), S. 1994–2006.

Nedergaard, M; Hansen, A (1988): Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. In: *Brain Res* 449 (1-2), S. 395–398.

Nishikawa, Y, Stepp, D; Chilian, W (2000): Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2), S. H459-65.

Nishizawa, S, Yamamoto, S, Yokoyama, T, Ryu, H; Uemura, K (1995): Chronological changes of arterial diameter, cGMP, and protein kinase C in the development of vasospasm. In: *Stroke* 26 (10), S. 1916-20; discussion 1920-1.

O'Donnell, M, Xavier, D, Liu, L, Zhang, H, Chin, S, Rao-Melacini, P, Rangarajan, S, Islam, S, Pais, P, McQueen, M, Mondo, C, Damasceno, A, Lopez-Jaramillo, P, Hankey, G, Dans, A, Yusuf, K, Truelsen, T, Diener, H-C, Sacco, R, Ryglewicz, D, Czlonkowska, A, Weimar, C, Wang, X; Yusuf, S (2010): Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. In: *Lancet* 376 (9735), S. 112–123.

Olesen, J, Larsen, B; Lauritzen, M (1981): Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. In: *Ann Neurol* 9 (4), S. 344–352.

Palmer, R, Ferrige, A; Moncada, S (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. In: *Nature* 327 (6122), S. 524–526.

Paulson, O, Waldemar, G, Schmidt, J; Strandgaard, S (1989): Cerebral circulation under normal and pathologic conditions. In: *Am J Cardiol* 63 (6), S. 2C-5C.

Petzold, G, Einhaupl, K, Dirnagl, U; Dreier, J (2003): Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. In: *Ann Neurol* 54 (5), S. 591–598.

Piilgaard, H;Lauritzen, M (2009): Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (9), S. 1517–1527.

Pluta, R,Oldfield, E,Bakhtian, K,Fathi, A,Smith, R,Devroom, H,Nahavandi, M,Woo, S,Figg, W;Lonser, R (2011): Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers. In: *PLoS One* 6 (1), S. e14504.

Pluta, R,Oldfield, E;Boock, R (1997): Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. In: *J Neurosurg* 87 (5), S. 746–751.

Pobereskin, L (2001): Incidence and outcome of subarachnoid haemorrhage: a retrospective population based study. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70 (3), S. 340–343.

Rasmussen, R,Wetterslev, J,Stavngaard, T,Juhler, M,Skjoth-Rasmussen, J,Grande, P;Olsen, N (2015): Effects of prostacyclin on cerebral blood flow and vasospasm after subarachnoid hemorrhage: randomized, pilot trial. In: *Stroke* 46 (1), S. 37–41.

Santhanam, Anantha Vijay R,Smith, L,Akiyama, M,Rosales, A,Bailey, K;Katusic, Z (2005): Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. In: *Stroke* 36 (12), S. 2731–2737.

Schildmeyer, L;Bryan, Robert M Jr (2002): Effect of NO on EDHF response in rat middle cerebral arteries. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282 (2), S. H734-8.

Schmieder, K,Moller, F,Engelhardt, M,Scholz, M,Schregel, W,Christmann, A;Harders, A (2006): Dynamic cerebral autoregulation in patients with ruptured and unruptured aneurysms after induction of general anesthesia. In: *Zentralbl Neurochir* 67 (2), S. 81–87.

Schuh-Hofer, S,Lobsien, E,Brodowsky, R,Vogt, J,Dreier, J,Klee, R,Dirnagl, U;Lindauer, U (2001): The cerebrovascular response to elevated potassium--role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. In: *Neurosci Lett* 306 (1-2), S. 61–64.

Sehba, F,Schwartz, A,Chereshnev, I;Bederson, J (2000): Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (3), S. 604–611.

Siasios, I,Kapsalaki, E;Fountas, K (2013): Cerebral vasospasm pharmacological treatment: an update. In: *Neurol Res Int* 2013, S. 571328.

Siler, D,Martini, R,Ward, J,Nelson, J,Borkar, R,Zuloaga, K,Liu, J,Fairbanks, S,Raskin, J,Anderson, V,Dogan, A,Wang, R,Alkayed, N;Cetas, J (2015): Protective role of p450 epoxygenic eicosanoids in subarachnoid hemorrhage. In: *Neurocrit Care* 22 (2), S. 306–319.

Smith, M,Auer, R;Siesjo, B (1984): The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. In: *Acta Neuropathol* 64 (4), S. 319–332.

Sramka, M,Brozek, G,Bures, J;Nadvornik, P (1977-1978): Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery. In: *Appl Neurophysiol* 40 (1), S. 48–61.

Sukhotinsky, I,Dilekoz, E,Moskowitz, M;Ayata, C (2008): Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (7), S. 1369–1376.

Takano, T, Tian, G-F, Peng, W, Lou, N, Lovatt, D, Hansen, A, Kasischke, K; Nedergaard, M (2007): Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. In: *Nat Neurosci* 10 (6), S. 754–762.

Takenaka, K, Kassell, N, Foley, P; Lee, K (1993): Oxyhemoglobin-induced cytotoxicity and arachidonic acid release in cultured bovine endothelial cells. In: *Stroke* 24 (6), S. 839-45; discussion 845-6.

Taylor, S; Weston, A (1988): Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. In: *Trends Pharmacol Sci* 9 (8), S. 272–274.

Thomas, J; Rosenwasser, R (1999): Reversal of severe cerebral vasospasm in three patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: initial observations regarding the use of intraventricular sodium nitroprusside in humans. In: *Neurosurgery* 44 (1), S. 48-57; discussion 57-8.

Vogalis, F, Publicover, N, Hume, J; Sanders, K (1991): Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. In: *Am J Physiol* 260 (5 Pt 1), S. C1012-8.

Wahl, M, Lauritzen, M; Schilling, L (1987): Change of cerebrovascular reactivity after cortical spreading depression in cats and rats. In: *Brain Res* 411 (1), S. 72–80.

Wang, J-F, Li, Y, Song, J-N; Pang, H-G (2014): Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. In: *Neurochem Int* 64, S. 37–47.

Wang, Q, Paulson, O; Lassen, N (1992): Effect of nitric oxide blockade by NG-nitro-L-arginine on cerebral blood flow response to changes in carbon dioxide tension. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 12 (6), S. 947–953.

Wang, R, Wu, L; Wang, Z (1997): The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. In: *Pflugers Arch* 434 (3), S. 285–291.

Westermaier, T, Stetter, C, Kunze, E, Willner, N, Holzmeier, J, Kilgenstein, C, Lee, J-Y, Ernestus, R-I, Roewer, N; Muellenbach, R (2014): Controlled transient hypercapnia: a novel approach for the treatment of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage? In: *J Neurosurg* 121 (5), S. 1056–1062.

Windmuller, O, Lindauer, U, Foddis, M, Einhaupl, K, Dimagl, U, Heinemann, U; Dreier, J (2005): Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. In: *Brain* 128 (Pt 9), S. 2042–2051.

Yang, G, Wu, L, Jiang, B, Yang, W, Qi, J, Cao, K, Meng, Q, Mustafa, A, Mu, W, Zhang, S, Snyder, S; Wang, R (2008): H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. In: *Science* 322 (5901), S. 587–590.

You, J, Johnson, T, Marrelli, S; Bryan, R M Jr (1999a): Functional heterogeneity of endothelial P<sub>2</sub> purinoceptors in the cerebrovascular tree of the rat. In: *Am J Physiol* 277 (3 Pt 2), S. H893-900.

You, J, Johnson, T, Marrelli, S, Mombouli, J; Bryan, R M Jr (1999b): P<sub>2u</sub> receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor from cerebrovascular endothelium in rats. In: *Stroke* 30 (5), S. 1125–1133.

Zhang, W, Koemer, I, Noppens, R, Grafe, M, Tsai, H-J, Morisseau, C, Luria, A, Hammock, B, Falck, J; Alkayed, N (2007): Soluble epoxide hydrolase: a novel therapeutic target in stroke. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 27 (12), S. 1931–1940.

Zhao, W; Wang, R (2002): H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2), S. H474-80.

Zhao, W,Zhang, J,Lu, Y;Wang, R (2001): The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. In: *EMBO J* 20 (21), S. 6008–6016.

Zubkov, A,Ogihara, K,Bernanke, D,Parent, A;Zhang, J (2000): Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm. In: *Surg Neurol* 53 (3), S. 260–266.