

**Aus der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus**

**Neuroprotektion in der Frühphase nach Subarachnoidalblutung:  
Untersuchung potenzieller Therapieformen im Tiermodell.**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Jasmin Hartmann  
aus Aachen**

**Würzburg, September 2016**

# **Referentenblatt**

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Westermaier

**Korreferenten:** Prof. Dr. med. Claudia Sommer, Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 19.07.2017

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Thema der Arbeit	2
1.2	Pathophysiologische Grundlagen	6
1.3	Fragestellung	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Allgemeine Versuchsdurchführung	17
2.2	Laser-Doppler Flowmetrie und Hirndruckmessung	18
2.3	Induktion der SAB	19
2.4	Experimentelle Gruppen	20
2.4.1	Natriumnitroprussid	20
2.4.2	Magnesiumsulfat	20
2.4.3	Clazosentan	21
2.5	Quantifizierung der ischämischen Schädigung	21
2.5.1	funktionelle Defizite	21
2.5.1.1	Aktivitätsscore	21
2.5.1.2	Modifizierter Bederson-Score	22
2.6	morphologische Schädigung	23
2.7	Histologie	23
2.8	Immunhistochemie	24
2.9	Statistik	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	Natriumnitroprussid	28
3.1.1	Physiologische Parameter	28
3.1.2	Laser-Doppler Flowmetrie	30
3.1.3	Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung	32
3.1.4	Makroskopisches Ausmaß der Blutung	33
3.1.5	Zelluläre Schädigung im Hippocampus	34
3.2	Magnesiumsulfat	36
3.2.1	Physiologische Parameter	36
3.2.2	Laser-Doppler Flowmetrie	38

3.2.3	Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung .....	40
3.2.4	Makroskopisches Ausmaß der Blutung .....	41
3.2.5	Zelluläre Schädigung im Hippocampus.....	42
<b>3.3</b>	<b>Clazosentan .....</b>	<b>43</b>
3.3.1	Physiologische Parameter .....	43
3.3.2	Laser-Doppler Flowmetrie .....	46
3.3.3	Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung .....	48
3.3.4	Makroskopisches Ausmaß der Blutung .....	50
3.3.5	Zelluläre Schädigung im Hippocampus.....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methodik .....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Fadenmodell der SAB .....	54
4.1.2	Laser-Doppler Flowmetrie (LDF).....	56
4.1.3	Modifizierter Bederson-Score .....	57
4.1.4	morphologische Schädigung.....	57
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.2.1	Natriumnitroprussid .....	59
4.2.2	Magnesiumsulfat .....	64
4.2.3	Clazosentan.....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>

# **1 Einleitung**

# 1.1 Thema der Arbeit

Unter einer Subarachnoidalblutung (SAB) versteht man eine Blutung in den Raum zwischen Arachnoidea und Pia mater. In diesem mit Liquor cerebrospinalis gefüllten Raum befinden sich die großen konduktiven hirnversorgenden Gefäße. Eine SAB bedeutet für die Betroffenen noch immer ein hohes Risiko zu versterben. Die Gesamtmortalität beträgt ungefähr 50 Prozent, wobei ein Teil der Patienten bereits auf dem Weg in die Klinik verstirbt. Aber selbst unter den hospitalisierten Patienten liegt die Mortalität noch bei 25 Prozent. [21, 32, 42, 89, 90] Falls die Blutung überlebt wird, drohen langfristige körperliche und kognitive Defizite.[1, 21, 111, 130]

Zwar sind in den vergangenen Jahren Fortschritte im klinischen Management insbesondere an spezialisierten Zentren erzielt worden, sodass die Letalitätsrate reduziert werden konnte.[1, 47, 89, 90, 132] Auf pathophysiologischer Ebene ist unser Wissen über das konkrete Zusammenspiel der ablaufenden Schädigungsmechanismen und deren jeweiliger Beitrag zur Gesamtpathologie allerdings noch begrenzt, obwohl in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl an experimentellen und klinischen Untersuchungen zu deren Klärung durchgeführt wurde. Die Forschung fokussierte sich dabei allerdings vor allem auf Genese und Therapie des sekundären Vasospasmus, ein Phänomen, das einige Tage nach der SAB auftritt. Typischerweise zwischen Tag 4 und 10 nach der Blutung können bei ungefähr 70 Prozent der Patienten Spasmen der hirnversorgenden Gefäße festgestellt werden. Einige dieser Patienten erleiden in dieser Phase neue neurologische Defizite, bei einigen entwickeln sich sekundäre Hirninfarkte. Diese Komplikationen begründeten intensive Forschungsbemühungen bezüglich der Gefäßspasmen. Insbesondere die Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1) in den Liquorraum wurde als pathogenetisch relevanter Faktor für die Entstehung dieser Spasmen identifiziert.[126] Denn gerade das Patientenkollektiv, das Gefäßspasmen entwickelt, scheint verstärkt ET-1 aus Endothelzellen freizusetzen und Endothelinrezeptoren (ET-Rezeptoren) zu exprimieren: In einer experimentellen Studie, die der Fragestellung nachging, welchen Effekt der Liquor von SAB-Patienten mit Vasospasmus und ohne Vasospasmus im zerebralen Gefäßsystem von Ratten hervorruft, fand sich eine stärkere Vasokonstriktion solcher Gefäße, die mit Liquor von Vasospasmus-Patienten inkubiert worden waren. Für diese Studie war den Tieren zuvor

die Arteria basilaris entnommen worden, sodass es sich hierbei um ein ex vivo Model der SAB handelte. Vor und nach Inkubation des Patientenliquors mit den Arterien wurde die ET-1-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Arbeitsgruppe fand daraufhin eine verstärkte Konzentration an ET-1 im Kulturmedium, wenn die Gefäße mit Liquor von Vasospasmus-Patienten inkubiert worden waren. Ebenso konstatierten die Autoren hier eine deutlichere Kontraktilität bereits bei geringerer Konzentration an ET-1 verglichen mit solchen Gefäßen, die mit Liquor von Patienten ohne Vasospasmus oder Kontrollliquor inkubiert worden waren. Für die konstriktorische Gefäßreaktion war ein intaktes Endothel notwendig.[4]

ET-1, ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, gilt als einer der stärksten heute bekannten Vasokonstriktoren.[158, 159] Die Freisetzung von ET-1 aus Endothelzellen folgt auf verschiedene Reize, beispielsweise Gefäßwandspannung und Ischämie.[83, 135] Auch einige endogene Faktoren wie Thrombin und Angiotensin 2 können die Sekretion stimulieren.[7, 161] Inzwischen ist die ET-1-vermittelte Wirkweise am Endothelin-A-(ET<sub>A</sub>)-Rezeptor glatter Gefäßmuskelzellen, an deren Ende letztlich die Vasokonstriktion steht, relativ genau untersucht. Dieser vasokonstriktorische Effekt kann sowohl Kalzium-(Ca<sup>2+</sup>)-vermittelt als auch Ca<sup>2+</sup>-unabhängig erzielt werden.[48] Auf ein ischämisches Ereignis folgt zunächst die Synthese von ET-1 aus seinen Vorstufen Preproendothelin-1 und Big Endothelin-1. Eine Speicherung des Peptidhormons in Endothelzellen findet nicht statt. Nach der Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors und der konsekutiven Stimulierung der Phospholipase C und nachfolgenden Synthese von Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) werden nun Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Der entstehende Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex initiiert schließlich über die Myosin-Leichte-Kette die Vasokonstriktion.[48, 135] Die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Vasokonstriktion erfolgt über die Synthese von Diacylglycerin (DAG) und der daraus resultierenden Hemmung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase durch Phosphorylierung. Eine solche Blockade kann zudem durch die Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK) erfolgen.[48]

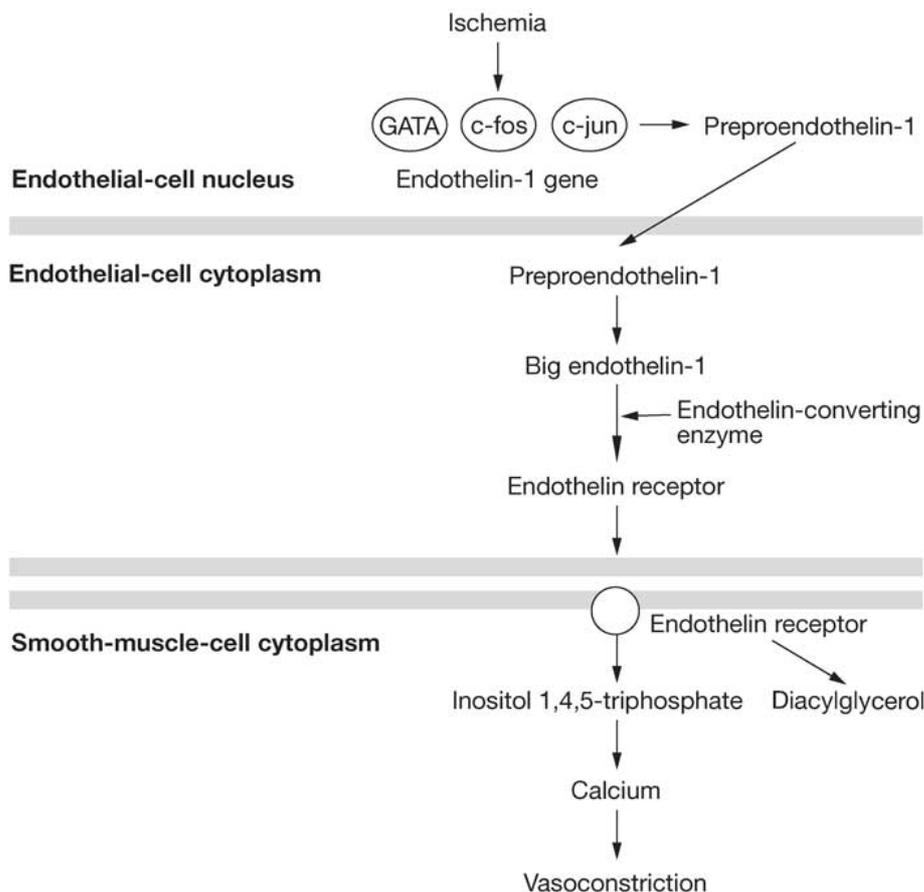


Abbildung 1  
Synthese von ET-1 als Reaktion auf Ischämie (nach Suhardja<sup>1</sup>)[135]

Von ET-1 existieren zwei Isoformen, Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Die Endotheline aktivieren Rezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, von denen bisher zwei Typen mit jeweils unterschiedlicher Affinität zu den drei Isoformen bekannt sind. Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor zeigt eine höhere Affinität zu ET-1 und ET-2 als zu ET-3, während der Endothelin-B-(ET<sub>B</sub>)-Rezeptor von sämtlichen Liganden gleich stark stimuliert wird.[81] Der auf glatten Gefäßmuskelzellen lokalisierte ET<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelt eine Vasokonstriktion, während für den von Endothel- und glatten Muskelzellen exprimierten ET<sub>B</sub>-Rezeptor ein gefäßerweiternder Effekt, den er über die Produktion von NO und Prostacyclin entfaltet, nachgewiesen ist.[48] Ihm wird weiterhin eine Clearance-Funktion für ET-1 aus der Zirkulation zugesprochen.[81] Zusätzlich zu seiner schon länger bekannten vasodilatatorischen Wirkung konnte für den ET<sub>B</sub>-Rezeptor inzwischen auch die Fähigkeit zur Vasokonstriktion gezeigt werden.[20]

<sup>1</sup> Mechanisms of Disease: roles of nitric oxide and endothelin-1 in delayed cerebral vasospasm produced by aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Agustinus Suhardja. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine.2004

In experimentellen Studien fand sich sowohl eine verstärkte Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors als auch des ET<sub>B</sub>-Rezeptors nach SAB, was als Indiz für die pathogenetische Relevanz beider Rezeptoren gedeutet wurde.[4, 51, 59] Inzwischen wurde die Hypothese formuliert, dass nach SAB eine funktionelle Interaktion, ein sogenannter „cross-talk“, zwischen dem ET<sub>A</sub>-Rezeptor und dem ET<sub>B</sub>-Rezeptor stattfinden könnte, der die auf den ET<sub>A</sub>-Rezeptor zurückgeführte Vasokonstriktion verstärken und das bisher nicht zufriedenstellende Outcome nach selektiver ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade teilweise erklären könnte.[4, 107] In einer großen Multicenter-Studie, die die Wirksamkeit eines selektiven ET<sub>A</sub>-Antagonisten in der Behandlung von SAB-Patienten untersuchte, zeigte sich nämlich, dass dieser zwar in der Lage war, effektiv die verzögerten Vasospasmen in den größeren hirnversorgenden Gefäßen zu behandeln, aber nur in geringem Maße die Entwicklung von sekundär auftretenden Infarkten zu verbessern. Das neurologische Outcome nach 3 Monaten konnte in dieser Studie durch Gabe des Medikaments überhaupt nicht verbessert werden.[77-79]

Immer mehr wandte man sich nach diesem und weiteren eher enttäuschen Ergebnissen in der Vasospasmus-Forschung neben den Spätkomplikationen auch der Frühphase nach SAB zu, da bereits die initial und in den ersten Stunden nach SAB einsetzenden Schädigungsprozesse erheblichen Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten nehmen könnten.[24, 123] Insbesondere die Tatsache, dass der initiale neurologische Status der beste Prädiktor für den Verlauf der Erkrankung ist, betont die Relevanz pathophysiologischer Vorgänge in den ersten Stunden nach dem Blutungsereignis. Der Umstand, dass einige der bereits in der Frühphase einsetzenden Ereignisse nicht reversibel sind oder Sekundärmechanismen einleiten, die zu einem sekundären Hirnschaden führen können, betont weiterhin die Dringlichkeit, in der Frühphase therapeutisch zu intervenieren, um einen derartigen Sekundärschaden zu verhindern. Dieses akute Handeln ist in der klinischen Praxis allerdings häufig nicht möglich. Besonders erschwerend kommt hinzu, dass bislang nur wenig Information über die Pathophysiologie in diesem frühen Zeitraum existiert.

## 1.2 Pathophysiologische Grundlagen

Pathophysiologisch betrachtet werden nach einer SAB diverse komplexe Prozesse in Gang gesetzt, die teilweise sofort, teilweise mit einer Latenz von mehreren Tagen auftreten. Es lassen sich daher akute, subakute und chronische Schädigungsmechanismen differenzieren.[18, 75, 123]

Der Austritt von Blut aus einem rupturierten Aneurysma hat zur Folge, dass der intrakranielle Druck (ICP) innerhalb weniger Sekunden drastisch ansteigt, was wiederum den zerebralen Perfusionsdruck (CPP = mittlerer arterieller Blutdruck – ICP) und damit den zerebralen Blutfluss kompromittiert.[8, 9, 18] Diese akute Reduktion des zerebralen Blutflusses verursacht eine temporäre globale Ischämie des Hirngewebes bis hin zum vorübergehenden kompletten zerebralen Zirkulationsstillstand.[100, 149]

Der erhöhte ICP und die eingeschränkte Hirndurchblutung haben zusammen mit einer bereits nach wenigen Sekunden einsetzenden Gefäßkonstriktion und der Aktivierung der Gerinnungskaskade im Bereich des rupturierten Gefäßes bzw. Aneurysmas zur Folge, dass die Blutung unterbunden wird und der ICP sukzessive wieder absinkt.[9, 100, 121, 124] Im Rahmen dieser Vorgänge erreicht auch der CPP innerhalb weniger Minuten wieder ein annähernd dem Ausgangswert entsprechendes Niveau.[9]

Trotz dieser relativ schnellen Normalisierung des ICP und des CPP bleibt eine vollständige Erholung der Hirndurchblutung aus.[35, 46, 65, 98] Klinisch manifestiert sich diese anhaltende zerebrale Minderdurchblutung in einem schlechteren initialen neurologischen Status. Wie oben bereits erwähnt ist dieser der stärkste prognostische Faktor für das langfristige Outcome des Patienten.[21, 39]

Das anhaltende Perfusionsdefizit könnte unter anderem auf einer einsetzenden Vasokonstriktion beruhen.[9, 35, 37, 98, 117, 136, 139] Perlschnurartige Verengungen kleiner Gefäße konnten sowohl im Tierexperiment als auch am Menschen in der Frühphase der SAB nachgewiesen werden.[35, 98, 136, 139] Im Gegensatz zu dem erst einige Tage nach SAB bei ungefähr 70 Prozent der Patienten angiografisch nachweisbaren Vasospasmus größerer Gefäße verengen sich in der Akutphase der SAB wahrscheinlich vornehmlich kleinere Arterien und Arteriolen. Unter physiologischen Bedingungen stellen diese die adäquate Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und

Sauerstoff sicher, indem sie ihr Gefäßkaliber autoregulatorisch verändern.[61, 96] Diese sogenannte zerebrale Autoregulation ist in der akuten Phase der SAB gestört.[66, 108] Als eine Ursache für die akute Vasokonstriktion kommt ein entstehendes Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Substanzen in Betracht. So konnte ein Absinken der NO-Konzentration innerhalb von zehn Minuten nach Einsetzen der Blutung im Tierversuch gezeigt werden. Normwerte wurden erst nach 180 Minuten wieder gemessen.[125] Da NO ein besonders potenter Mediator der Gefäßrelaxation ist, könnte sich die Reduktion seiner Gewebeverfügbarkeit entsprechend stark auf den Gefäßtonus auswirken: in einer Studie mit dem NO-Donor S-nitrosoglutathion konnten Sehba et al. zeigen, dass die Infusion des NO-Donors 15 Minuten nach Auslösen der SAB den zerebralen Blutfluss (CBF) sofort auf über 50 Prozent des Ausgangswertes vor SAB und nach 60 Minuten auf über 80 Prozent an hob, wohingegen die Hirndurchblutung in der Kontrollgruppe ohne die Infusion nach 60 Minuten weniger als 40 Prozent des Ausgangswertes betrug. In derselben Arbeit konnte ein protektiver Einfluss des NO-Donors in der Akutphase der SAB auf die Integrität kleiner Gefäße und deren Permeabilität gezeigt werden.[121] Neben seiner Funktion als gefäßrelaxierender Faktor könnte NO weitere protektive Eigenschaften aufweisen, die im Rahmen der Sekundärschädigung nach einer SAB von Bedeutung sind. So deuten Studien beispielsweise auf eine antithrombotische Wirkung hin.[105, 120, 121]

Die akute NO-Reduktion wird primär auf die Bindung an freigesetztes Hämoglobin, das wegen seiner Häm-Gruppe eine hohe Affinität zu NO aufweist, zurückgeführt. Diese These wird unter anderem durch die Beobachtung untermauert, dass im Tierversuch die NO-Konzentration in den Hirnarealen mit den größten Blutansammlungen besonders stark reduziert ist im Vergleich zu Gebieten mit geringerer Exposition gegenüber Hämoglobin.[119, 121, 125]

Neben der Vasokonstriktion setzt eine Reihe weiterer Prozesse ein, die ebenfalls eine ischämische Schädigung des Gehirns in der Frühphase bewirken können. Dazu zählt die Aktivierung von Thrombozyten mit nachfolgender Bildung von Mikrothromben, die insbesondere in bereits verengten Gefäßen den Blutfluss weiter einschränken.[37, 124] Die aktivierten Thrombozyten setzen zudem vasoaktive Substanzen frei, die die Konstriktion weiterer Gefäße fördern.[35-37, 50, 124]

Neben Vasokonstriktion und Bildung von Mikrothromben im Lumen der Gefäße, können diese auch direkt geschädigt werden, und zwar durch Entzündungsreaktionen und Bildung freier Radikale.[5, 50] Die Bezeichnung „freie Radikale“ wird auf Moleküle oder Atome mit einem ungepaarten Elektron angewandt. Unter den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fasst man von Sauerstoff abstammende freie Radikale zusammen. Es wird vermutet, dass ROS bereits in einem frühen Stadium nach SAB vermehrt gebildet werden und Zellschädigung und -untergang befördern. Denn nach SAB, so die Hypothese, könne das unter physiologischen Bedingungen fein austarierte Gleichgewicht zwischen der Bildung freier Radikale und deren Abbau durch enzymatische und nicht-enzymatische Abwehrsysteme nicht aufrechterhalten werden.[5] Die normalerweise permanent, beispielsweise während der Zellatmung in den Mitochondrien, anfallenden freien Radikale werden unter physiologischen Bedingungen durch zelluläre Schutz- und Reparaturmechanismen unschädlich gemacht. Diese Schutzsysteme werden allgemein unter dem Begriff der „Antioxidantien“ zusammengefasst, wobei hier sämtliche Mechanismen subsumiert werden, die einen durch oxidativen Stress verursachten Zellschaden verhindern oder reversibel machen können. Besondere Bedeutung unter diesen protektiven Substanzen kommt aufgrund ihrer Effektivität verschiedenen Enzymkomplexen wie den Superoxiddismutasen, Katalasen und Glutathionperoxidasen zu. Bekannt ist auch die antioxidative Wirkung von Ascorbinsäure und Vitamin E. Nach einer SAB wird die Kapazität dieser protektiv wirksamen Systeme scheinbar überlastet.

Das zellschädigende Potential freier Radikale liegt in ihrer Fähigkeit, mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu reagieren, wobei insbesondere die Lipidperoxidation, die funktionelle Modifikation von Proteinen und das Induzieren von Strangbrüchen in DNA schädigend auf die Zelle wirken. Auf diese Weise können ROS den apoptotischen Zelltod verursachen.[155]

Gerade Neuronen sind gegenüber oxidativem Stress besonders vulnerable Zellen. Diese Anfälligkeit gegenüber oxidativen Prozessen geht einerseits auf die relativ gering ausgeprägte neuronale Ausstattung mit antioxidativ wirksamen Schutzsystemen zurück, andererseits erklärt sie sich durch die den Neuronen eigene Funktion der Neurotransmission. Denn diese ist maßgeblich von der Fluidität und Integrität neuronaler Membranen abhängig. Ein zentrales Kennzeichen neuronaler Membranen ist

schließlich der im Vergleich zu anderen Zelltypen besonders hohe Anteil an Lipiden. Werden diese durch ROS modifiziert, kann eine uneingeschränkte Neurotransmission nicht mehr stattfinden.[11]

Nach einer SAB könnten durch das vermehrte Anfallen an ROS auf Gefäßebene mehrere denkbare Effekte eintreten. So könnte durch einen ROS-vermittelten Endothelschaden die Integrität der Blut-Hirn-Schranke verletzt werden, was die Gefahr der Entwicklung eines vasogenen Hirnödems in sich birgt. Zusätzlich könnten durch Membranschädigung nach Lipidperoxidation vasoaktive Substanzen freigesetzt werden, die wiederum ein ohnehin bestehendes Ungleichgewicht zwischen gefäßerweiternden und -verengenden Faktoren nach SAB zugunsten der Letzteren verstärken könnten.[5, 134] Es existieren unterschiedliche Erklärungsmodelle, wieso nach SAB verstärkt oxidativer Stress auftreten könnte. Ein Ansatz ist die bereits genannte Inflammation nach SAB, da ROS auch von Leukozyten, v.a. neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, generiert werden. So entstehen beispielsweise bei der unter „oxidativem Burst“ bekannten Reaktion, katalysiert durch die NADPH-Oxidase, Superoxidanionen in hoher Konzentration.[155] Auch das durch Hämolyse anfallende Hämoglobin könnte hier von Bedeutung sein. Denn das freigesetzte Eisen in seiner zweiwertigen Form katalysiert die Bildung von ROS, ein als „Fenton-Reaktion“ bekannter Mechanismus.[63] Auch geschädigte Mitochondrien sind bereits als Quelle eines gesteigerten ROS-Anfalls nach SAB genannt worden. Bestimmte Faktoren wie eine mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung oder ein unphysiologisch hohes Glutamatlevel sollen den Prozess der mitochondrialen ROS-Produktion nach ischämischen Ereignissen zusätzlich stimulieren können.[14, 82, 128] Eine weitere These besagt, dass nicht nur eine verstärkte Bildung von ROS stattfindet, sondern gleichzeitig die zellulären Schutzmechanismen zur Eliminierung der ROS ineffizient werden.[5, 14, 57, 80]

Die Problematik der ROS-Produktion nach SAB legt die Evaluierung einer Antioxidantiengabe als mögliche Therapiemaßnahme nahe. Dass dies ein aussichtsreicher Ansatz sein könnte, legt eine kürzlich veröffentlichte tierexperimentelle Studie mit dem antioxidativ wirksamen Carotinoid Astaxanthin nahe. Im Rahmen dieser Studie wurde das Injektionsmodell der SAB angewandt, wobei die Forschergruppe sowohl Ratten autologes Blut in die Optikuszisterne als auch Kaninchen autologes Blut in die Cisterna magna injizierten. Um den Einfluss der Substanz auf die Integrität der

Blut-Hirn-Schranke darstellen zu können, wurde den Tieren 24 und 72 Stunden nach SAB ein Farbstoff injiziert und dessen Passage über die Blut-Hirn-Schranke mittels Spektrofotometer analysiert. Zur Beurteilung des Hirnödems bedienten die Autoren sich einer Formel, die das Trockengewicht des Gehirns in Relation zum direkt nach Entnahme gewogenen Wert setzte.

Die Gabe dieses Carotinoids 30 Minuten nach Auslösung einer SAB führte zu einer signifikanten Verbesserung des Outcomes der Tiere, gemessen am Auftreten von kortikalem Neuronenuntergang, Hirnödem und Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Der molekulare Wirkmechanismus ist allerdings unklar. Ebenso ist unbekannt, ob das verbesserte Outcome tatsächlich allein auf antioxidativen Eigenschaften der Substanz beruhte.[160]

Zytotoxisch kann sich nach SAB zudem eine intrazelluläre Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auswirken.[27, 56] Zellen halten ihre zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter physiologischen Bedingungen auf einem verglichen mit dem extrazellulären Level sehr geringen Niveau. Beträgt die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration normalerweise circa 1-2 mmol, so liegt der entsprechende Wert für die frei im Zytosol befindlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nur zwischen 10-100 nmol, sodass zwischen zytosolischem und extrazellulärem Milieu ein immenser  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient herrscht. Dieser Gradient über die Zellmembranen wird unter physiologischen Bedingungen von verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystemen gewährleistet. Dazu zählen die in der Zellmembran lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher sowie spannungsabhängige und Ligand-regulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien sequestriert.

Unter ischämischen Bedingungen, bei denen die Zelle einen Energiemangel erleidet, kann diese die normale  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, d.h. die geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol, nicht aufrechterhalten. Das Resultat einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zellen ist der nekrotische oder apoptotische Zelltod, zunächst in selektiv vulnerablen Hirnregionen. Zu den besonders gefährdeten Neuronen zählen beispielsweise die cerebellären Purkinjezellen sowie Neurone der Schichten 3, 5, 6 im Neokortex und vor allem der CA1-Region des Hippocampus.[19] Die Ischämie-induzierte zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation basiert auf unterschiedlichen Prozessen.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können einerseits aus dem ER sowie über spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

Austauscher in das Zytosol der Zellen gelangen. Beispielsweise ließ sich in einer experimentellen Studie an kultivierten humanen Astrozyten eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER nachweisen, die nach Inkubation der Zellen mit blutigem Liquor cerebrospinalis einsetzte. Dieser Liquor stammte von Patienten, die eine intraventrikuläre Blutung erlitten hatten. Die resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Astrozyten führte, vermittelt durch die Mitochondrien, zum nekrotischen Zelltod. Diese Studie weist auf die Bedeutung des ER als Quelle der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung nach intrazerebralen Blutungsereignissen hin.[56]

Besondere Bedeutung für eine mögliche zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung kommt daneben einem weiteren Mechanismus zu, nämlich der Depolarisation neuronaler Membranen mit Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, beispielsweise Glutamat. Diese Depolarisation der Zellmembranen resultiert aus dem entstehenden Ionenungleichgewicht, das sich aufgrund des ischämisch bedingten Substratmangels der in der Zellmembran lokalisierten Ionttransporter entwickelt. Daneben werden sogenannte „Spreading Depolarizations“ (SD), ein Phänomen, das den zeitweiligen Verlust des Ionengleichgewichts über die Zellmembranen beschreibt, als möglicher Mechanismus der Depolarisation von Zellmembranen nach SAB diskutiert.[30, 113] SD können als sich aus eigenem Antrieb fortpflanzende Wellen kortikaler Depolarisation verstanden werden und resultieren in einer transienten neuronalen Funktionsstörung.[94] Dabei handelt es sich nicht um einen auf geschädigtes Hirngewebe limitierten Prozess. SD lassen sich elektrophysiologisch ebenso in gesundem Gewebe nachweisen. Der wesentliche Unterschied liegt in der zeitlichen Dauer der SD: während diese normalerweise kurzfristig wieder sistieren, können sie in ischämischem Gewebe deutlich länger detektiert werden.[30] Nach zerebraler Ischämie besteht die Problematik der SD in der eingeschränkten Fähigkeit des Gehirns, den aus den SD erwachsenden vermehrten Energiebedarf zu decken. Eine gesteigerte Bereitstellung von Substraten wäre aber notwendig, um das aus den Fugen geratene Ionengleichgewicht über die Zellmembranen wiederherstellen zu können. So besteht in ischämisch vorgeschädigten Hirnregionen die Gefahr einer zusätzlichen Zellschädigung durch SD.[30]

Die bereits oben angesprochene verstärkte Freisetzung von Glutamat und seine nachfolgende Akkumulation im synaptischen Spalt sowie die Aktivierung metabotroper

und ionotroper Glutamatrezeptoren hat wiederum potenziell neurotoxische Effekte, ein Phänomen, das als Exzitotoxizität beschrieben wird.[22] Die Aufnahme sowie das Recyclen von Neurotransmittern zählen zu den besonders energieaufwendigen Prozessen, sodass Neurone diese bei Substratmangel nicht suffizient leisten können. Die Hypothese, dass eine anhaltende Stimulation von Glutamatrezeptoren den neuronalen Zelluntergang fördert, wurde bei verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems gestellt. Zu nennen sind hier sowohl neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer und die HIV-Enzephalopathie als auch akute Ereignisse, insbesondere der Schlaganfall.[22, 27, 73] Eine zentrale Bedeutung soll dem N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) zukommen. Nach Aktivierung dieses ionotropen Rezeptors bei Stimulation durch seinen Liganden und gleichzeitige Membrandepolarisation wird der Rezeptor permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Aber auch Kainat- und  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptor) könnten bei konstanter Aktivierung zytotoxisch wirken, indem sie einen unphysiologisch hohen Ioneneinstrom in Neuronen vermitteln.

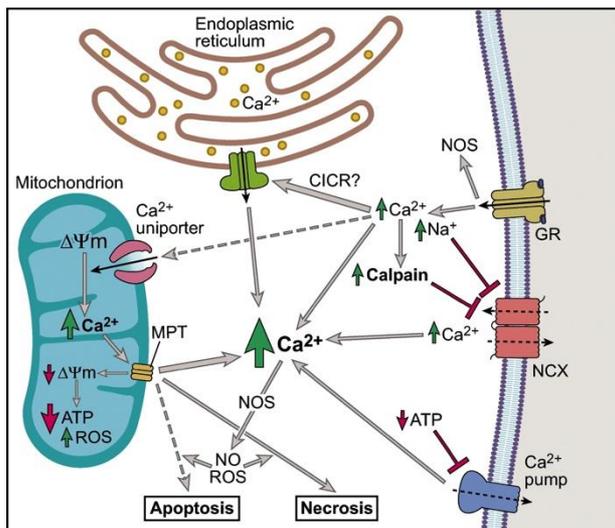


Abbildung 2 Exzitotoxische Schädigung von Neuronen<sup>2</sup>

Die Bindung von Glutamat an seinen Rezeptor (GR) bewirkt den Einstrom von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Natrium ( $\text{Na}^{+}$ ) in die Zelle. Infolgedessen werden diverse zytotoxische Mechanismen in Gang gesetzt, die letztlich den apoptotischen oder nekrotischen Zelltod befördern. (nach Dong et al. Mechanisms of Disease. Vol. 1:405-434. Feb.2006)

Ein rapider und massiver Anstieg intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kann sich über verschiedene Mechanismen schädigend auf die Zelle auswirken und letztlich den Zelltod induzieren. Eine besondere Rolle beim  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Zellschaden nehmen

<sup>2</sup> Calcium in cell injury and death. Dong et. al. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. Vol.1:405-434. Feb. 2006

die Mitochondrien ein, die neben dem ER zentral an der Regulation der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligt sind. Auch sie sind unter physiologischen Bedingungen eine Art Puffersystem.[62, 93] Wesentlich im Hinblick auf einen möglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten apoptotischen oder nekrotischen Zelltod ist allerdings die den Mitochondrien inhärente Funktion der Regulation des Zelltods.[88] Es ist inzwischen bekannt, dass eine Dysregulation der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase auf verschiedene Weise einen ersten Schritt hierfür darstellen kann. Ein Mechanismus, über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den über Mitochondrien vermittelten Zelltod eingreifen können sollen, ist die Öffnung der sogenannten Permeabilitäts-Transitions-pore der Mitochondrien (MPT), was in der Konsequenz eine verstärkte Durchlässigkeit der Membran für Moleküle mit einer Größe  $\leq 1,5$  kDa bedeutet. Eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, insbesondere in Kombination mit ROS, soll die Formation und permanente Öffnung dieser Pore stimulieren können.[27, 71, 82] Als an der Formation der MPT beteiligte Strukturen konnten der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC), Cyclophilin D und einige andere Proteine identifiziert werden. Zudem ist bekannt, dass die MPT zwar eine von der inneren mitochondrialen Membran ausgehende Struktur darstellt, die äußere mitochondriale Membran allerdings an der Regulation der Öffnung beteiligt sein kann und sich Kontaktstellen finden lassen. Die anhaltende Öffnung dieser Pore hat gravierende Folgen: die Voraussetzung für die oxidative Phosphorylierung ist die Integrität der inneren mitochondrialen Membran als Basis eines Protonengradienten, der die treibende Kraft der ATP-Synthese darstellt. Die MPT bewirkt, dass Protonen aus der mitochondrialen Matrix entweichen können und so das mitochondriale Membranpotential sowie der pH-Gradient über die Membran nicht aufrechterhalten werden können. Da keine selektive Permeabilität geschaffen wird, sondern Moleküle bis zu einer Größe von  $\leq 1,5$  kDa über die Membran gelangen können, wird zudem vermutet, dass aufgrund eines entstehenden osmotischen Ungleichgewichts die mitochondriale Matrix schwellen und daraufhin die äußere mitochondriale Membran ebenfalls permeabel werden könnte. Dies könnte beispielsweise die Freisetzung des proapoptischen Proteins Cytochrom c ermöglichen.[12, 27, 44, 93] Im Zytosol befindliches Cytochrom c kann einen Komplex mit einem Apaf-1 (apoptosis-activating factor-1) genannten Protein bilden. Aus diesem Zusammenschluss geht das sogenannte „Apoptosom“ hervor, ein die Procaspase-9 bindendes und aktivierendes Gebilde, dem

somit eine Schlüsselfunktion innerhalb der zur Apoptose führenden Signaltransduktion zukommt.[14, 110] Caspasen sind Cysteinproteasen, deren Aktivierung die Endstrecke des programmierten Zelltods markiert. Initiatorcaspasen wie die Caspase-9 werden von Effektorcaspasen wie Caspase-3 unterschieden. Diese sind wesentlich für die Degradierung diverser zellulärer Strukturen.[67] Die aktivierte Caspase-9 stimuliert wiederum Caspase-3, für die mehrere Studien eine zentrale Rolle insbesondere für den apoptotischen Zelltod nach zerebraler Ischämie gezeigt haben .[87, 106]

Die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kann sich zudem über eine enzymatische Aktivierung zellschädigend auswirken. Zu nennen sind hier insbesondere Phospholipasen, Endonukleasen und Calpaine. So existieren einige Isoformen unter den Phospholipasen, die direkt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert werden. In der Folge setzt die Hydrolyse von in zellulären Membranen befindlichen Phospholipiden ein, was die zelluläre Integrität massiv beeinträchtigt. Das entstehende osmotische Ungleichgewicht kann eine Zellschwellung und damit einen Funktionsverlust der Zelle nach sich ziehen. Der zellschädigende Effekt wird durch die Akkumulation der Phospholipidabbauprodukte verstärkt. Diese können sich beispielsweise in Membranen einlagern und so deren Fluidität und Stabilität weiter beeinträchtigen. Zudem können freie Fettsäuren als Signaltransduktoren wirken und auf diese Weise zellschädigende Prozesse vorantreiben.[11, 63]

Auch die Stimulation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Endonukleasen wurde bereits als möglicher Mechanismus für den  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Zellschaden genannt. Der konkrete Beitrag, den eine Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Endonukleasen zur Gesamtpathologie beiträgt, ist allerdings nicht bekannt. Calpaine, eine Gruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierter Cystein-Endopeptidasen, haben mehrere potentiell schädigende Funktionen inne. Im Gefüge der zur Apoptose führenden Kette sollen Calpaine das im Zytosol lokalisierte Protein BID (Bcl-2 interacting domain) aktivieren, das wiederum in der äußeren Mitochondrienmembran weitere proapoptischen Proteine wie Bak, Bax und Bad stimuliert. Diese könnten daraufhin Kanäle in der mitochondrialen Membran formen und so proapoptischen Faktoren wie Cytochrom c den Austritt in das Zytosol ermöglichen[14, 101] Daneben wird vermutet, dass Calpaine als Stimulatoren bestimmter Procaspasen fungieren können.[86] Weitere Zielstrukturen der Calpaine sind zudem am Aufbau des Zytoskeletts beteiligte Proteine wie Spektrin.[142]

Insgesamt betrachtet bewirkt die Pathophysiologie in der Akutphase der SAB eine ischämische Schädigung neuronaler und vaskulärer Strukturen, die deren Zelltod bewirken und für den Patienten je nach Ausmaß langfristig kognitive oder körperliche Einschränkungen bedeuten kann.[130]

## 1.3 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche therapeutische Beeinflussbarkeit des Perfusionsdefizits in der akuten Phase nach SAB untersucht. Hierzu wurde an einem etablierten Tiermodell innerhalb eines Zeitraums von 15 bis 180 Minuten nach Auslösen der Blutung entweder der Endothelin-1-Rezeptorantagonist Clozontan in unterschiedlicher Dosis, der NO-Donor Natriumnitroprussid oder der Kalziumantagonist Magnesiumsulfat verabreicht und jeweils mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Neben der Beeinflussbarkeit der akuten Minderperfusion durch die genannten Stoffe wurde untersucht, ob sich eine eventuelle Verbesserung der Durchblutung in dieser Phase in einem besseren klinischen Outcome manifestiert. Dazu wurde der neurologische Zustand der Tiere 24 Stunden nach Blutung anhand eines Scores eingeschätzt.

Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die Gabe eines oder mehrerer dieser Stoffe eine neuroprotektive Wirkung zeigt. Um diese Frage zu beantworten wurden die Gehirne der Versuchstiere entnommen und histologisch in definierten Hirnarealen auf vitale und geschädigte Neurone hin untersucht.

## **2 Material und Methoden**

## 2.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die Versuche erfolgten im Rahmen eines von der Regierung von Unterfranken genehmigten Tierversuchsantrags (AZ 55.2-2531.01-16/10).

Für sämtliche Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 270-460 Gramm (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einem Behälter mit 4 Vol% Isofluran (Isofluran CP 1ml/ml, CP Pharma, Burgdorf, Deutschland).

Anschließend wurden die Versuchstiere orotracheal intubiert. Als Tubus wurde ein 16G-Venenverweilkatheter verwendet, der unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines OP-Mikroskops (Zeiss Contraves, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) eingeführt wurde. Nach der Intubation wurden die Ratten mit einem Kleintierrespirator (Animal Respirator 4600, Rhema Labortechnik, Hofheim/Ts., Deutschland) druckkontrolliert mit einer Frequenz von etwa 100 Atemzügen pro Minute mechanisch beatmet. Die Narkose wurde während der weiteren chirurgischen Präparationsphase mit 2,5 Vol% Isofluran aufrechterhalten.

Um die Hirntemperatur zu ermitteln, wurde ein Temperatursensor (Sonderanfertigung, Fa. Thermocoax, Stapelfeld, Deutschland) an der Schädelbasis unterhalb des M. temporalis platziert.[16] Über eine Feedback-kontrollierte Wärmelampe wurde die Hirntemperatur während des gesamten Versuchs bei 37°C konstant gehalten.

Zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks diente ein Katheter in der Schwanzarterie der Ratten. Um diesen einbringen zu können, erfolgte zunächst eine mediane Inzision des Schwanzes. Die Schwanzarterie wurde unter mikroskopischer Sicht freipräpariert und proximal temporär mit einem Clip versorgt und daraufhin inzidiert. Über diese Inzision wurde ein Polyethylenkatheter mit einem Innendurchmesser von 0,58 mm (Fa. A. Hartenstein, Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland) in die Arterie eingeführt und mittels einer Ligatur fixiert. Anschließend wurde der temporäre Clip entfernt. Die kontinuierliche Blutdruckmessung erfolgte über einen Überwachungsmonitor (Hellige Servomed, Fa. Hellige, Freiburg im Breisgau, Deutschland).

Der Katheter ermöglichte zusätzlich zur Blutdruckmessung die Entnahme von arteriellen Blutproben zur Analyse des arteriellen pH-Werts sowie des arteriellen

Sauerstoff- ( $\text{PaO}_2$ ) und Kohlendioxidpartialdrucks ( $\text{PaCO}_2$ ). Die erste Bestimmung von arteriellen Blutgasen erfolgte unmittelbar nach Anlage des arteriellen Katheters (Blutgasanalysegerät RapidLab 248, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland). Anschließend wurde je nach Ergebnis der Blutgasanalyse die Beatmungseinstellung ggf. modifiziert. Die Zielwerte waren ein pH-Wert von 7,36 - 7,44, ein  $\text{PaCO}_2$  von 36 – 44 mm und ein  $\text{PaO}_2$  von 80 – 120 mmHg. Eine weitere Blutgasanalyse wurde unmittelbar vor Auslösen der SAB durchgeführt. Falls die oben genannten Zielwerte nicht erfüllt waren, wurden die Beatmungsparameter erneut adaptiert und vor Auslösen der SAB eine erneute Blutgaskontrolle durchgeführt. Nach SAB erfolgten Blutgasanalysen in 60-minütigen Abständen mit bedarfsweiser weiterer Modifizierung der kontrollierten Beatmung.

## **2.2 Laser-Doppler Flowmetrie und Hirndruckmessung**

Zur Messung und Aufzeichnung der Hirndurchblutung wurde das Tier in Bauchlage gedreht und zunächst über einen medianen Schnitt die Schädelkalotte freigelegt, sodass dann jeweils einen Millimeter dorsal und fünf Millimeter lateral des Bregmas auf beiden Seiten Bohrlöcher angelegt werden konnten. Bei der Präparation dieser Löcher wurde darauf geachtet, dass die Dura mater keinen Schaden nahm. Um den Hirndruck im Verlauf des Versuchs zu ermitteln, wurde ein separates rechts frontales Bohrloch drei Millimeter lateral und einen halben Millimeter rostral des Bregmas angelegt. Bei der Anlage des Bohrlochs wurde die Dura mater punktuell eröffnet. Nach Anlage der Bohrlöcher wurden die Tiere wieder in Rückenlage gedreht und im stereotaktischen Rahmen mit stumpfen, atraumatischen Ohrfixierungen („non-perforating earbars“) zum Schutz der Trommelfelle fixiert. In die beiden hinteren Bohrlöcher wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators bilateral Laser-Doppler-Sonden (Sonde P5b, Moor Instruments, Axminster, UK) eingesetzt. Über einen Laser-Doppler-Monitor (MBF3D Laser-Doppler Flowmeter, Moor Instruments, Axminster, UK) wurde nun der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) bilateral von 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach Auslösen der SAB im Versorgungsgebiet der A. cerebri media kontinuierlich gemessen und

aufgezeichnet (Frequenz: 2 Hz). Als ipsilateraler Laser-Doppler Flow (LDF) galt dabei der über der rechten Hemisphere abgeleitete zerebrale Blutfluss, da hier die Gefäßperforation durchgeführt wurde.

Nach der Fixierung des Tieres im stereotaktischen Rahmen wurde mit einem weiteren stereotaktischen Mikromanipulator eine intraparenchymale Hirndrucksonde (Typ Camino, Integra Life Sciences, Plainsboro, NJ, USA) platziert, über die der Hirndruck kontinuierlich aufgezeichnet werden konnte.

Die ermittelten Messwerte (arterieller Mitteldruck, Hirndruck, Laser-Doppler-Flow) wurden online auf einen Apple PowerMac G3 Rechner übertragen und mit der LabView Software (Version 3.0, Fa. National Instruments, München, Deutschland) aufgezeichnet und ausgewertet.

## **2.3 Induktion der SAB**

Zur Auslösung der SAB wurde das Fadenmodell bei Ratten angewandt, das 1995 erstmalig beschrieben wurde.[8, 144] Zunächst wurden die A. carotis communis, die zervikale Carotisbifurkation, die A. carotis interna und die A. carotis externa freipräpariert. Dazu erfolgte eine rechts paramediane Längsinzision am Hals und im Anschluss daran ein Auseinanderspreizen des Platysmas. Die Speicheldrüse wurde nun nach lateral mobilisiert und die Mm. sternocleidomastoideus, digastricus und sternohyoideus mittels Hakensperrer beiseite gehalten. Die A. carotis externa wurde an ihrem distalen Ende mit einem 7-0 Vicryl-Faden (7-0 Vicryl, Ethicon/Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) ligiert. A. carotis communis und A. carotis interna wurden temporär mit einem Clip verschlossen. Ungefähr sechs Millimeter distal der Karotisgabel wurde nun die A. carotis externa inzidiert. Über diesen Schnitt wurde ein monofiler Kunststoffaden (3-0 Prolene, Ethicon/Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) in das Lumen der Arterie eingebracht und mit Hilfe einer weiteren 7-0 Vicryl Gefäßligatur gesichert. Daraufhin wurde die A. carotis externa distal der Inzision abgeschnitten und mit dem inserierten Faden nach kaudal geklappt. Die temporären Clips auf der A. carotis communis und der A. carotis interna wurden daraufhin wieder entfernt und der Faden über die A. carotis interna nach intrakraniell vorgeschoben. Anhand eines Abfalls des Laser-Doppler-Flusses auf der entsprechenden Seite konnte

die korrekte Lage des Fadens in der A. carotis interna vor dem Abgang der A. cerebri media verifiziert werden. Durch ein weiteres Verschieben des Fadens wurde dann eine SAB im Bereich der intrakraniellen Carotisbifurkation bzw. der proximalen der A. cerebri anterior ausgelöst. Diese konnte durch den Anstieg des Hirndrucks sowie einen beidseitigen Abfall der Hirndurchblutung objektiviert werden. Nach erfolgter SAB wurde der Faden wieder zurückgezogen, um eine rasche vollständige Perfusion der A. carotis interna zu gewährleisten.

Im Anschluss an die Auslösung der SAB wurde zur Infusion der jeweils verabreichten Lösung ein zentraler Venenkatheter angelegt. Dazu wurde lateral der Speicheldrüse die Vena jugularis externa freipräpariert. Die Vene wurde nun distal vollständig ligiert, während sie weiter proximal mit einem Faden unterminiert wurde, der als Ligatur vorgelegt wurde, um anschließend den eingelegten Katheter zu fixieren. Knapp unterhalb dieses Fadens wurde ein temporärer Clip gesetzt. Anschließend wurde die Vene angeschnitten, und ein Polyethylen-Katheter mit einem Innendurchmesser von 0,28 mm (Fa. A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland) eingeführt und die Ligatur zugezogen.

## **2.4 Experimentelle Gruppen**

### **2.4.1 Natriumnitroprussid**

10 Versuchstiere erhielten Natriumnitroprussid (UCB Pharma, Monheim, Deutschland). Das Natriumnitroprussid befand sich in Lösung mit 5 % Glukose. Diese Lösung enthielt pro Milliliter 60 µg Natriumnitroprussid. Die Gabe wurde mit 0,2 µg/kg/min der Lösung begonnen und in fünfminütigen Abständen auf eine Erhaltungsdosis von 1,0 µg/kg/min gesteigert. Als Vergleichsgruppe dienten 10 Kontrolltiere, denen über den gleichen Zeitraum eine 5% Glukoselösung in entsprechender Menge infundiert wurde.

### **2.4.2 Magnesiumsulfat**

12 Versuchstiere erhielten Magnesiumsulfat in einer Anfangsdosis von 1mmol/kg über 15 Minuten zur Aufsättigung des Serumspiegels, gefolgt von einer Dauerinfusion von 0,5 mmol/kg/min zur Aufrechterhaltung des Serumspiegels.[147] Als Lösungsmittel für

Magnesiumsulfat diente isotone Ringerlösung. Zehn Tiere dienten als Kontrolltiere. Diesen wurde über den gleichen Zeitraum isotone Ringerlösung in entsprechender Menge über den zentralen Venenkatheter infundiert.

### **2.4.3 Clazosentan**

Insgesamt 23 Versuchstiere erhielten den Endothelin-1-Rezeptorantagonisten Clazosentan. Die Tiere wurden in randomisierter Form einer von drei Gruppen zugeteilt, denen unterschiedliche Dosierungen verabreicht wurden:

*Clazosentan 0,1 $\mu$ g (n=8)*

*Clazosentan 1,0 $\mu$ g (n=8)*

*Clazosentan 10,0 $\mu$ g (n=7)*

11 Tiere dienten als Kontrollgruppe. Diesen Tieren wurde über den gleichen Zeitraum die gleiche Menge des Lösungsmittels (isotone Ringerlösung) infundiert.

## **2.5 Quantifizierung der ischämischen Schädigung**

### **2.5.1 funktionelle Defizite**

Die Einschätzung des klinischen Outcomes der Tiere erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auf Basis zweier Scores. Anhand eines Aktivitätsscores wurde zunächst der allgemeine klinische Zustand der Tiere bewertet. In Anschluss wurden die Tiere mit Hilfe des modifizierten Bederson-Scores auf eventuelle neurologische Defizite hin untersucht. Die Bewertung erfolgte durch einen Untersucher durchgeführt, der bezüglich der Versuchsgruppe verblindet war.

#### **2.5.1.1 Aktivitätsscore**

Um eine Aussage über den klinischen Zustand der Versuchstiere 24 Stunden nach der SAB treffen zu können, wurde deren Aktivität anhand einer einfachen fünfstufigen Skala bewertet. An Tiere, die eine normale Spontanaktivität zeigten, wurden vier

Punkte vergeben. Für eine nur leicht reduzierte Spontanaktivität erhielten sie drei Punkte. Tiere, die keine Spontanaktivität zeigten, sich aber bei Manipulation zu Aktivität bewegen ließen, bekamen zwei Punkte. Falls die Tiere auch auf verschiedene Reize, inklusive Schmerzreize, hin nicht reagierten, wurde ein Punkt vergeben. Tote Tiere erhielten keinen Punkt.

<b>Aktivität</b>	<b>Punkte</b>
Normale Spontanaktivität	4
Leicht reduzierte Spontanaktivität	3
Aktivität auf Manipulation	2
Keine Aktivität	1
Tod	0

Tabelle 1 Aktivitätsscore

## **2.5.1.2 Modifizierter Bederson-Score**

Zusätzlich wurde 24 Stunden nach der Blutung untersucht, ob die Tiere ein neurologisches Defizit aufwiesen. Dazu wurde je nach Verhaltensmuster eine bestimmte Anzahl an Punkten vergeben. Der hierzu verwendete Test basierte auf einer 1986 von Bederson et al. entworfenen Methode, die 1999 von Schmid-Elsaesser zu einem sechsstufigen Score weiterentwickelt wurde. [10, 115]

Tiere, die keine Spontanaktivität zeigten, erhielten keinen Punkt. Ein Tier, das im Kreis lief, wenn man es sich spontan bewegen ließ, erhielt einen Punkt. Tiere, die hingegen gerade liefen, wurden am Schwanz gehalten. An solche Tiere, die daraufhin im Kreis liefen, wurden zwei Punkte vergeben. Auf Tiere, die weiterhin gerade liefen, wurde seitlicher Druck ausgeübt („lateral push“). Bei verminderter Resistenz erhielten sie drei Punkte. Tiere, die dem Druck standhielten, wurden am Schwanz hochgehalten. Bei Beugung der kontralateralen Vorderpfote erhielten sie vier Punkte. Die volle Punktzahl von fünf Punkten erreichten Tiere, die stattdessen beide Vorderpfoten streckten, also keine Fokalneurologie aufwiesen. Festzuhalten ist also, dass es sich bei diesem Testverfahren um ein aufeinander aufbauendes Punktesystem handelt.

<b>Aktion</b>	<b>Punkte</b>
Streckt beide Vorderpfoten	5
Beugt kontralaterale Vorderpfote	4
Verminderte Resistance (lat. Push)	3
Circling bei Halten am Schwanz	2
Spontanes Circling	1
Keine Aktivität	0

Tabelle 2 modifizierter Bederson-Score

## 2.6 morphologische Schädigung

24 Stunden nach der SAB wurden die Tiere nach vorheriger Narkose mit Isofluran getötet. Dazu wurde den Tieren 50mg Natriumpentothal verabreicht. Zur Perfusionsfixierung der Hirne wurde den Tieren dann 4Vol% Paraformaldehyd transkardial injiziert.

Nach Entnahme der Gehirne wurde die makroskopisch sichtbare Blutung anhand einer Skala beurteilt, die sich an der klinisch gebräuchlichen Einteilung nach Fisher orientierte.[33]



Abbildung 3 Grad 0 (links) und 3 (rechts) in Analogie zum klinisch gebräuchlichen Fisher-Score

## 2.7 Histologie

Danach wurden die Hirne in einer aufsteigenden Alkohollösung über mehrere Stunden hinweg dehydriert, um im nächsten Schritt in Paraffin eingebettet werden zu können.

Nach dieser Vorbereitung konnten 4 µm dicke Schnitte in einem Abstand von 400 µm angefertigt und die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt werden.

Die histologische Auswertung dieser Schnitte orientierte sich an einem Hirnatlas der Autoren Paxinos und Watson. [Paxinos, G, Watson, C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press 2004] Anhand des Atlas wurden drei Präparate der CA1-Region im Hippocampus (Bregma -3,24, -4,92, -6,129) zur Analyse, die durch einen verblindeten Auswerter erfolgte, ausgewählt. Dazu wurde unter 40-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung die Zahl vitaler und geschädigter Neurone pro Gesichtsfeld (0,2 mal 0,3mm) ermittelt. Als vital galten dabei Neurone, die basophiles Zytoplasma und intakte Nuclei zeigten. Geschädigte Neurone wiesen hingegen eosinophiles Zytoplasma und pyknotische Nuclei auf.[131]

## 2.8 Immunhistochemie

Neben der H&E-Färbung als morphologische Nachweismethode apoptotischer Zellen im Hippocampus wurde zur spezifischeren Detektion des apoptotischen Zelluntergangs als weitere Technik die Immunhistochemie angewandt. Die hierbei verwendete Färbung richtete sich gegen aktivierte Caspase-3 als Zielantigen.

Die für diese immunhistochemische Färbung notwendigen Schritte richteten sich nach folgendem Protokoll:

### **1. Entparaffinieren der Schnitte**

*Xylol 1×5 min*

*Ethanol 100% 2×5min*

*Ethanol 50% 2×5min*

*Wasser 2×5min*

### **2. Schnitte in Citrat-Puffer geben**

*3× in der Mikrowelle aufkochen*

*Im Puffer abkühlen lassen*

### **3. 2×10 min in PBS waschen**

### **4. Blockierung der Schnitte mit 10% Horse-Serum in PBS mit 0,2% Triton X**

*4800µl PBS*

*500µl Horse-Serum (10%)*

100µl Triton X

1h bei Raumtemperatur in die feuchte Kammer geben

**5. Lösung abkippen**

**6. Antikörper auftragen (entsprechende Verdünnung mit PBS/Horse-Serum/Triton X herstellen)**

Bezeichnung des Primärantikörpers: Cleaved Caspase-3 Antikörper Asp175 (Cell Signalling Technology, Cambridge, UK), Verdünnung 1:300

4800µl PBS

100µl Horse-Serum (2%)

100µl Triton X

Inkubation über Nacht im Kühlschrank

**7. Antikörper abkippen**

**8. 2×10 min in PBS waschen**

**9. 2. Antikörper in entsprechender Verdünnung auftragen**

Ansatz: 990µl PBS + 15µl Horse-Serum + 2. Antikörper

Bezeichnung des Sekundärantikörpers: Cy3 Konjugat goat and rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Suffolk, UK)

1h in der feuchten Kammer inkubieren

**10. 2×10min mit PBS waschen**

**11. mit Mowiol und Dabi eindeckeln**

Die Fluoreszenz der Zellen wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 3000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) visualisiert. Die Bilder wurden unter 40-facher Vergrößerung mit Hilfe der zum Mikroskopiesystem gehörenden Software (Leica Application Suite 4.5) eingescannt. Anschließend wurden nicht fluoreszierende und fluoreszierende Zellen im CA1-Feld des Hippocampus ausgezählt.

## 2.9 Statistik

Bei den drei Versuchsreihen handelt es sich um getrennte Versuchsreihen mit jeweils einer eigenen Kontrollgruppe. Für die Versuche mit Natriumnitroprussid und Magnesiumsulfat wurden deshalb zur statistischen Auswertung Vergleiche zwischen

zwei Gruppen durchgeführt. Für parametrische Daten kam ein t-Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Für nicht parametrische Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei den Versuchen mit Clazosentan wurden drei Therapiegruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen. Für parametrische Daten wurde eine Varianzanalyse (one-way ANOVA) verwendet, gefolgt von einer post-hoc Analyse mit einem Dunnett's Test. Für nicht parametrische Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet, gefolgt von einer post-hoc Analyse mit einem Dunn's Test. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

# **3 Ergebnisse**

# 3.1 Natriumnitroprussid

## 3.1.1 Physiologische Parameter

Die Tiere der Nitroprussid-Gruppe wiesen einen tendenziell niedrigeren mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) ab Beginn der Nitroprussid-Infusion auf. Dieser Unterschied war 90 Minuten nach SAB signifikant. Für die Tiere der Nitroprussid-Gruppe wurde 15 Minuten nach SAB ein Minimalwert von  $63,10 \pm 23,67$  mmHg aufgezeichnet. Die Kontrolle zeigte nach 15 Minuten den niedrigsten Wert. Dieser betrug  $77,80 \pm 20,70$  mmHg. Nach einer Stunde wurde für die mit Nitroprussid behandelten Tiere ein Wert von  $66,10 \pm 8,48$  mmHg ermittelt. Der Messwert der Kontrollgruppe betrug  $78,40 \pm 20,51$  mmHg. 90 Minuten nach Auslösen der SAB wurde für die Nitroprussid-Gruppe ein Wert von  $68,40 \pm 13,75$  mmHg aufgezeichnet, während die Kontrollgruppe einen Wert von  $83,60 \pm 16,04$  aufwies. Der Unterschied war zu diesem Zeitpunkt signifikant. Am Ende des Versuchs wurde für die Nitroprussid-Gruppe ein Wert von  $80,30 \pm 17,83$  mmHg gemessen, verglichen mit  $81,10 \pm 14,08$  mmHg in der Kontrollgruppe.

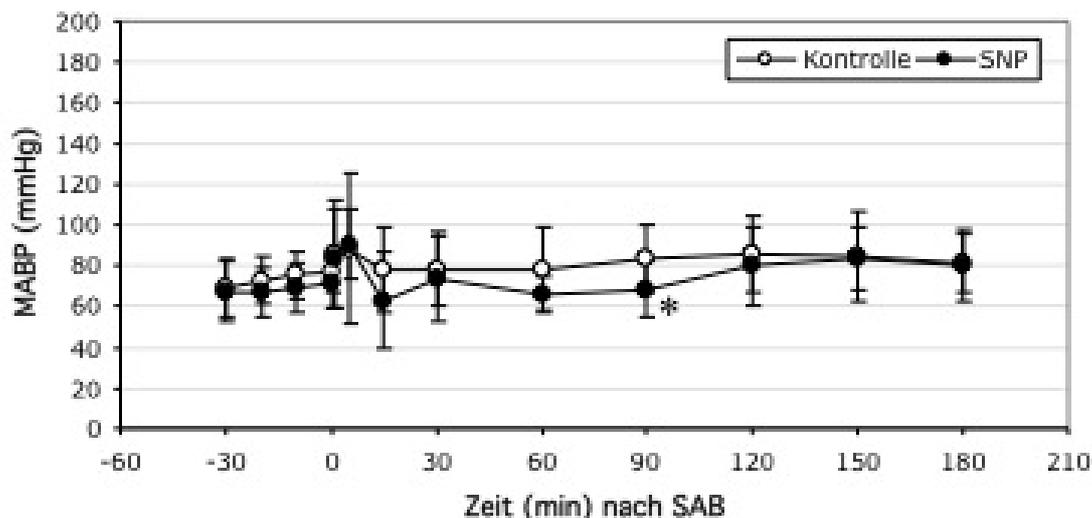


Abbildung 4 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP): Dynamische Veränderungen des MABP der Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) Das Signifikanzniveau wurde 90 Minuten nach SAB erreicht (\*  $p < 0,05$ ).

Nach Induktion der Blutung stieg der Hirndruck (ICP) bei den mit Nitroprussid behandelten Tieren innerhalb der ersten Minute auf einen Wert von  $74,40 \pm 29,12$  mmHg. Die Kontrolltiere zeigten einen Wert von  $74,70 \pm 33,40$  mmHg. Nach 60 Minuten wurde ein Wert von  $24,50 \pm 8,78$  mmHg für die Nitroprussid-Gruppe und von  $28,80 \pm 23,57$  mmHg für die Kontrolltiere ermittelt. Am Ende des Versuchs wiesen die mit Nitroprussid behandelten Tiere einen Messwert von  $23,35 \pm 10,26$  mmHg auf. Der Messwert der Kontrollgruppe betrug  $17,80 \pm 11,43$  mmHg. Das Signifikanzniveau wurde zu keinem Zeitpunkt erreicht.

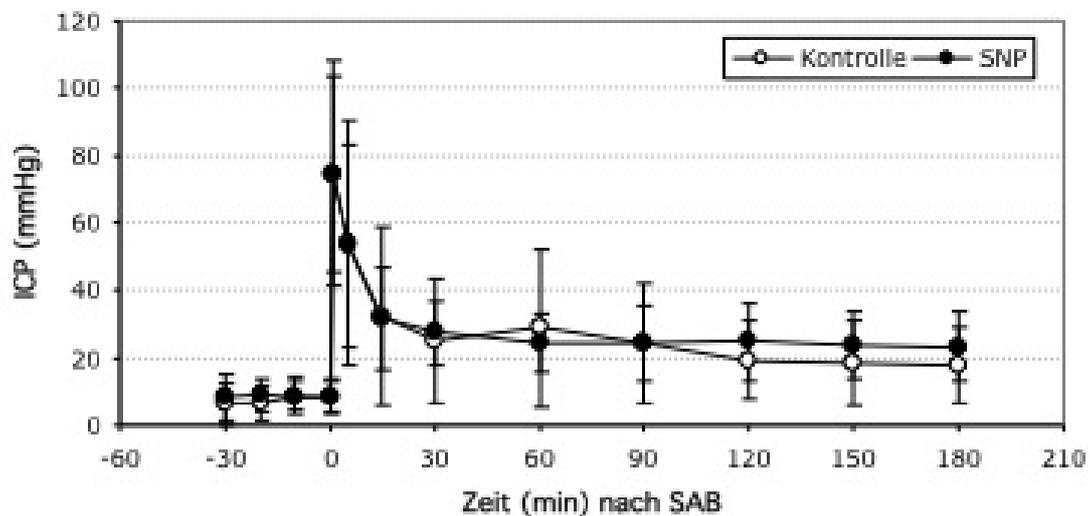


Abbildung 5 Intrakranieller Druck (ICP): Dynamische Veränderungen des ICP der Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand zu keinem Zeitpunkt (\*  $p < 0,05$ ).

Der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) fiel eine Minute nach Induktion der SAB in der mit Nitroprussid behandelten Gruppe auf  $8,90 \pm 12,77$  mmHg ab. Die Kontrolltiere wiesen einen Wert von  $11,20 \pm 15,95$  mmHg auf. Nach einer Stunde wurde für die mit Nitroprussid behandelte Gruppe ein Wert von  $41,60 \pm 11,92$  mmHg ermittelt. Der Messwert der Kontrolle betrug  $49,60 \pm 24,17$  mmHg. Am Ende des Versuchs wurde ein Wert von  $56,95 \pm 18,73$  mmHg für die Nitroprussid-Gruppe und von  $63,30 \pm 21,31$  mmHg für die Kontrolle aufgezeichnet. Der Unterschied war zum Zeitpunkt 90 Minuten nach SAB signifikant.

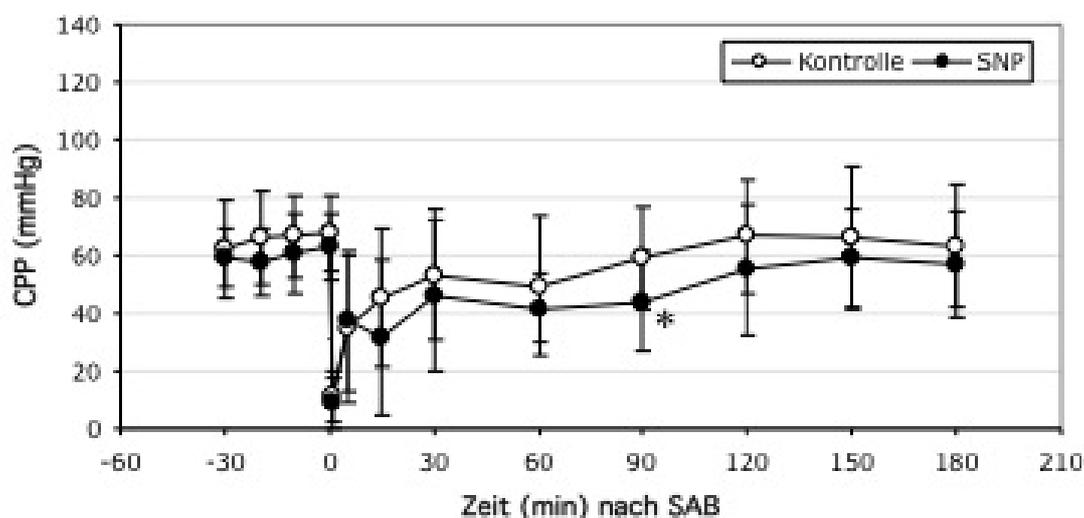


Abbildung 6 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP): Dynamische Veränderungen des CPP der Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD). Das Signifikanzniveau wurde 90 Minuten nach SAB erreicht (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 Laser-Doppler Flowmetrie

Der ipsilaterale lokale zerebrale Blutfluss (LCBF), gemessen per Laser-Doppler Flowmetrie, zeigte bei den Versuchstieren der Nitroprussid-Gruppe einen ausgeprägten Abfall direkt nach Einsetzen der SAB. Fünf Minuten nach Auslösen der SAB wies diese Gruppe einen Mittelwert von  $10,71 \pm 5,25$  Prozent des Ausgangswerts auf. Hierbei handelte es sich um den Minimalwert. Für die Kontrolle wurde ein Minimalwertwert von  $14,93 \pm 20,31$  Prozent eine Minute nach Auslösen der Blutung aufgezeichnet. Eine Stunde nach Induktion der SAB hatte sich der Wert bei den Tieren der mit Nitroprussid behandelten Gruppe auf  $49,56 \pm 27,94$  erholt und bei den Kontrolltieren auf  $44,58 \pm 24,88$ . Nach 180 Minuten wies die Nitroprussid-Gruppe einen Wert von  $121,70 \pm 94,62$  auf. Für die Kontrolle wurde zu diesem Zeitpunkt ein Wert von  $52,16 \pm 32,50$  aufgezeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergaben sich nach 150 und 180 Minuten.

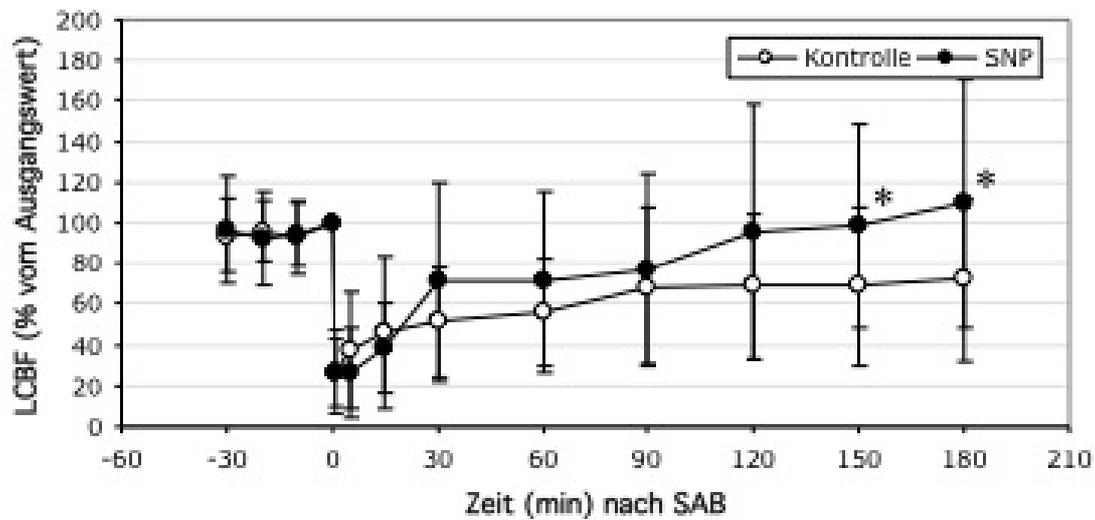


Abbildung 7 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF): Dynamische Veränderungen des ipsilateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB der Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

Der kontralaterale LCBF fiel in der Nitroprussid-Gruppe nach fünf Minuten auf einen Wert von  $26,21 \pm 21,64$  ab. Für die Kontrolle wurde eine Reduktion auf  $23,27 \pm 18,5$  eine Minute nach SAB registriert. Nach 60 Minuten wurde für die Nitroprussid-Gruppe ein Wert von  $71,17 \pm 44,33$  ermittelt. Die Kontrolle wies einen Messwert von  $47,82 \pm 21,27$  auf. Am Ende des Versuchs wurde eine Regeneration des LCBF innerhalb der Nitroprussid-Gruppe auf einen Wert von  $109,52 \pm 61,35$  beobachtet, während für die Kontrollgruppe ein Messwert von  $65,44 \pm 32,37$  aufgezeichnet wurde. Signifikante Unterschiede zeigten die nach 120, 150 und 180 Minuten gemessenen Werte.

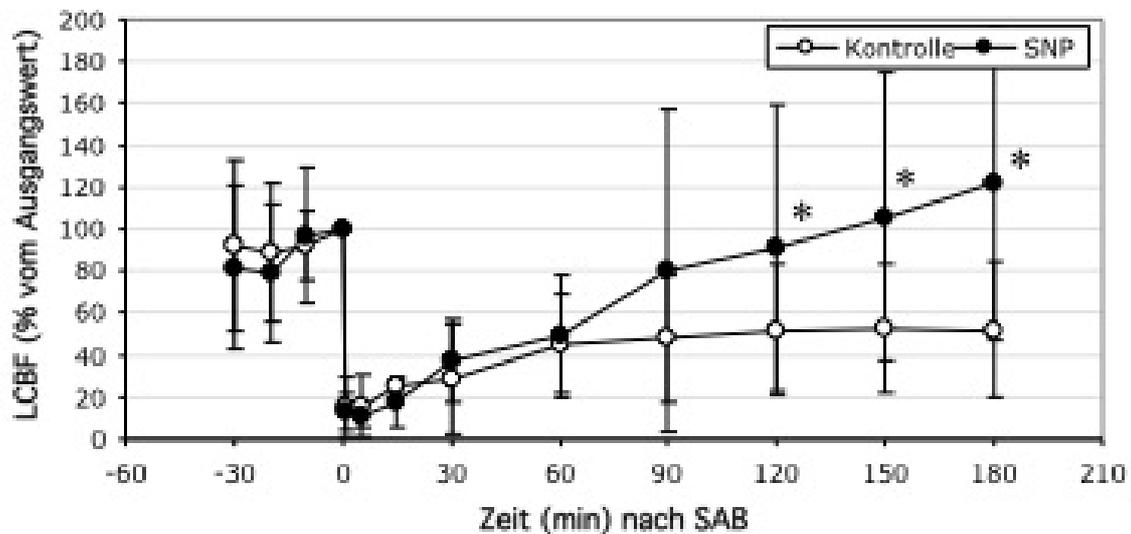


Abbildung 8 Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF): Dynamische Veränderungen des kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB der Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD (\*  $p < 0,05$ ))

### 3.1.3 Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung

Die analog zum Aktivitätsscore ermittelten Werte waren nicht signifikant. Der Median der Nitroprussid-Gruppe beträgt 3,5. Für die Kontrolle ergibt sich ein Wert von 3. Das erste Quartil der mit Nitroprussid behandelten Tiere ist 2,25, das der Kontrolle 1,5. Die Werte für das dritte Quartil sind 4 in der Nitroprussid-Gruppe bzw. 3,75 in der Kontrollgruppe.

Die auf Basis des modifizierten Bederson-Scores erhobenen Daten waren nicht signifikant. Der Median der Nitroprussid-Gruppe beträgt 5, derjenige der Kontrolle 4. Die Werte für das erste und dritte Quartil sind 3,5 bzw. 5 in der Nitroprussid-Gruppe und 3,25 bzw. 4,75 in der Kontrollgruppe.

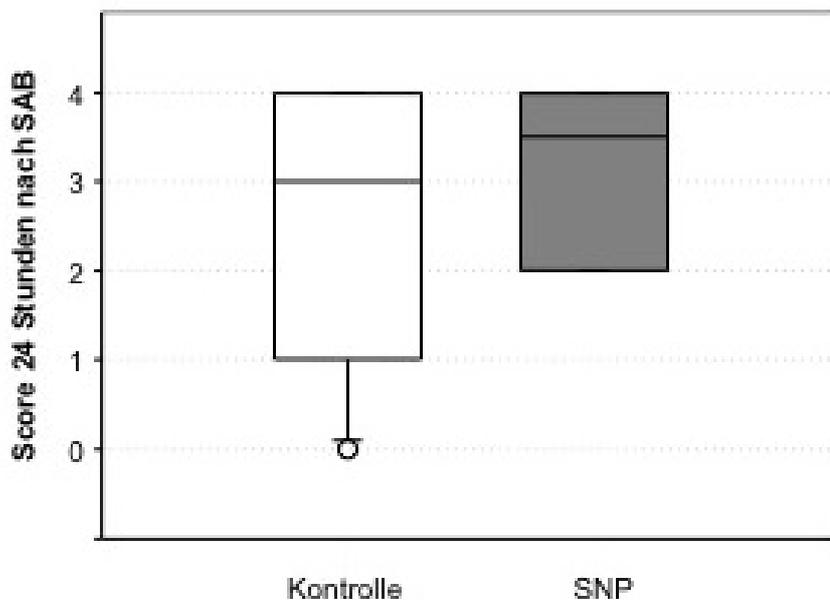


Abbildung 9 Aktivitätsscore: Klinisches Outcome der mit Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle 24 Stunden nach SAB, basierend auf dem Aktivitätsscore. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht (\*  $p < 0,05$ ).

#### *Gewichtsentwicklung*

Die Tiere der Nitroprussid-Gruppe wogen vor Beginn des Versuchs durchschnittlich  $339,17 \pm 58,53$  Gramm, nach Beendigung der Monitoringphase waren es  $326,50 \pm 60,82$  Gramm. Relativ zum vor der SAB gemessenen Gewicht betrug das Gewicht dieser Tiere also  $96,11 \pm 2,12$  Prozent. Die Kontrolltiere wogen vor Beginn des Versuchs  $369,17 \pm 54,80$  Gramm, hinterher waren es  $349,00 \pm 56,76$  Gramm. Der relative Wert für diese Gruppe beträgt  $94,42 \pm 3,18$  Prozent.

### **3.1.4 Makroskopisches Ausmaß der Blutung**

In der Beurteilung der makroskopisch sichtbaren Blutungsdimension ergab sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Der Medianwert beträgt für beide Gruppen 2,5. Ebenfalls gleiche Werte ergeben sich für das erste und dritte Quartil. Diese betragen jeweils 2 bzw. 3.

### 3.1.5 Zelluläre Schädigung im Hippocampus

In der histologischen Untersuchung der Hippocampus-Schnitte wurde innerhalb der Nitroprussid-Gruppe ein relativer Anteil von durchschnittlich  $10,5 \pm 5,2$  Prozent geschädigter Zellen gezählt.

Die Versuchstiere der Kontrollgruppe wiesen einen signifikant höheren Anteil pyknotischer Zellen in der untersuchten Hippocampusregion auf. Der Wert lag hier bei durchschnittlich  $14,2 \pm 7,4$  Prozent verletzter Zellen.

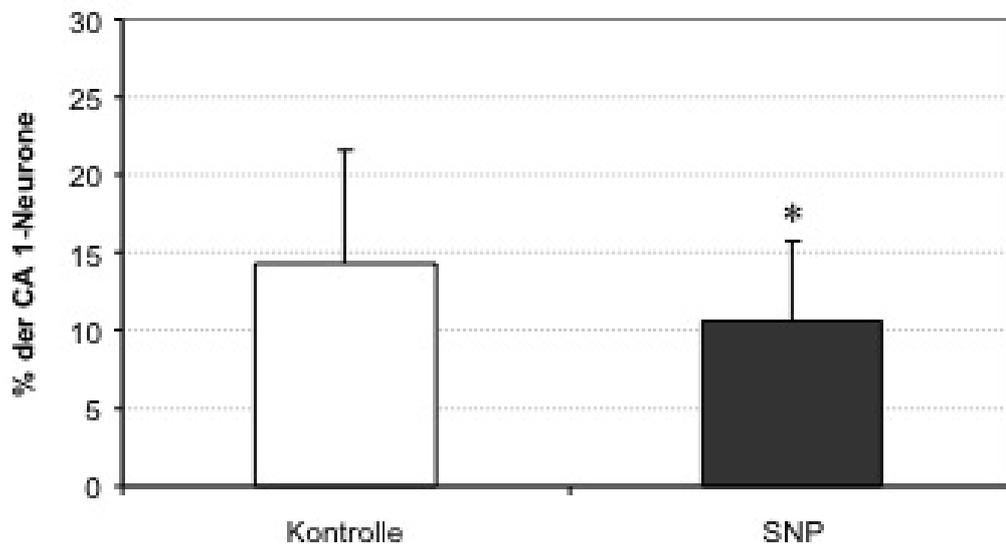


Abbildung 10 Histologischer Schaden (CA1-Feld): Prozentualer Anteil der mittels H&E-Färbung nachgewiesenen geschädigten Zellen im CA1-Feld des Hippocampus der mit Nitroprussid (SNP) behandelten Tiere verglichen mit der Kontrolle. In der SNP-Gruppe zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil geschädigter Zellen. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes MW ± SD) (\*  $p < 0,05$ ).

#### *Caspase-3-Färbung*

Die immunhistochemische Färbung erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Kontrolltiere wiesen  $12,7 \pm 3,1\%$  Caspase-3-positive Zellen auf. Bei den mit Nitroprussid behandelten Tieren ließen sich  $7,7 \pm 1,1\%$  mittels dieser Methode darstellen.

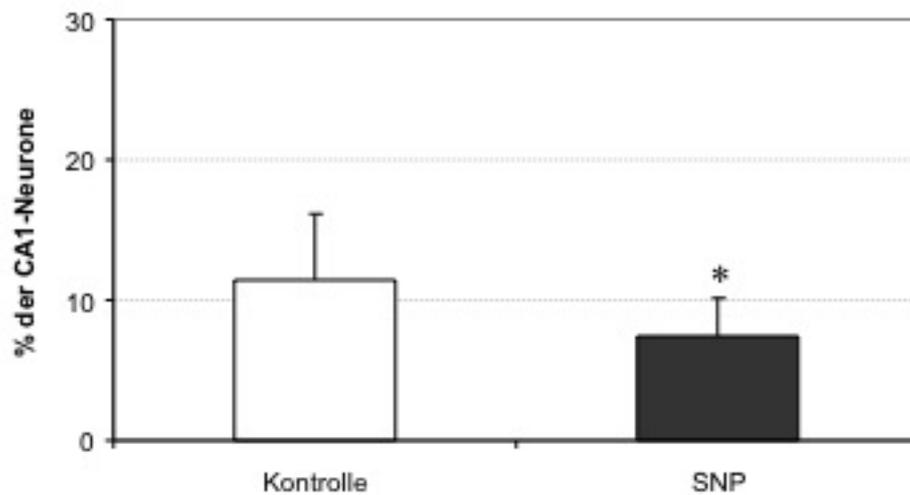


Abbildung 11 Caspase-3 positive CA1-Zellen: Prozentualer Anteil der neuronalen Zellschädigung im CA1-Feld des Hippocampus ermittelt anhand der Caspase-3-Färbung der Nitroprussid-Gruppe (SNP) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

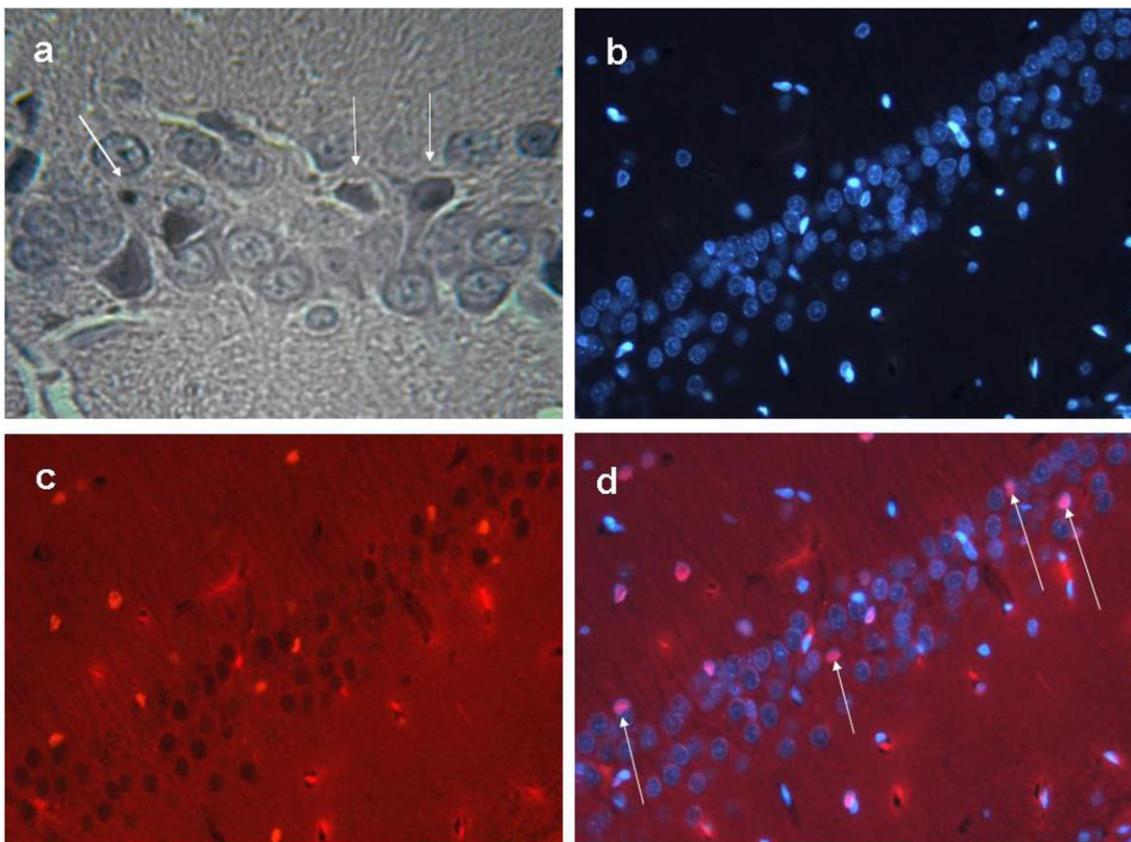


Abbildung 12 Exemplarische Darstellung immunhistochemisch gefärbter CA-1-Schnitte a-d: a Die weißen Pfeile zeigen auf Zellen mit Kernpyknose (links) und Karyolyse (rechts); b 4',6-Diamidin-2-phenyl (DAP)-Färbung; c Caspase-3-Färbung; d Verbindung von DAP- und Caspase-3-Färbung. Die weißen Pfeile zeigen auf Caspase-3 positive Zellen im CA-1-Feld des Hippocampus.

## 3.2 Magnesiumsulfat

### 3.2.1 Physiologische Parameter

Der mittlere arterielle Blutdruck (MABP) zeigte zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Die Tiere der Magnesiumgruppe wiesen nach 30 Minuten einen Minimalwert von  $71,08 \pm 21,94$  mmHg auf. Für die Kontrolltiere wurde nach 15 Minuten ein Minimalwert von  $64,40 \pm 16,40$  mmHg aufgezeichnet. Nach einer Stunde wurde bei den Versuchstieren der Magnesiumgruppe ein Messwert von  $72,42 \pm 18,48$  mmHg und bei der Kontrolle von  $67,40 \pm 16,14$  registriert. Am Ende der Messphase wurde bei den Magnesiumtieren ein Wert von  $84,42 \pm 16,48$  mmHg und bei den Kontrolltieren von  $76,60 \pm 18,45$  aufgezeichnet.

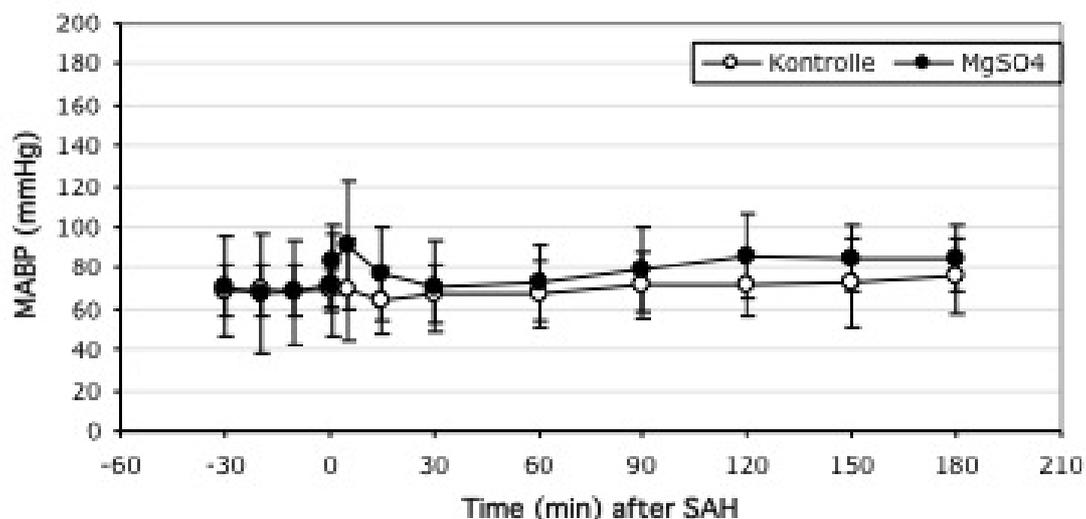


Abbildung 13 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP): Dynamische Veränderungen des MABP der Magnesium-Gruppe ( $MgSO_4$ ) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

Die Hirndruckwerte zeigten zwischen der Magnesium- und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Unmittelbar vor Auslösen der SAB wurde in der Magnesium-Gruppe ein Mittelwert von  $7,08 \pm 4,12$  mmHg und in der Kontrollgruppe von  $9,20 \pm 5,20$  mmHg aufgezeichnet. In beiden Gruppen wurde der typische Peak eine Minute nach Auslösen der Blutung festgestellt. Dieser betrug bei den Versuchstieren der Magnesium-Gruppe durchschnittlich  $61,67 \pm 17,77$  mmHg verglichen mit  $62,60 \pm$

29,62 mmHg in der Kontrollgruppe. Der Hirndruck innerhalb der beiden Versuchsgruppen entwickelte sich auch im weiteren Verlauf annähernd parallel.

Nach 60 Minuten wiesen die Tiere der Magnesium-Gruppe einen Messwert von  $21,75 \pm 15,14$  mmHg auf. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein fast identischer Abfall des initialen Peaks auf nun  $20,50 \pm 10,51$  mmHg. Nach 180 Minuten wurde in beiden Gruppen ein davon nicht wesentlich variierender Hirndruckwert von durchschnittlich  $20,08 \pm 16,17$  mmHg in der Magnesium-Gruppe und  $20,50 \pm 11,73$  mmHg bei den Kontrolltieren gemessen.

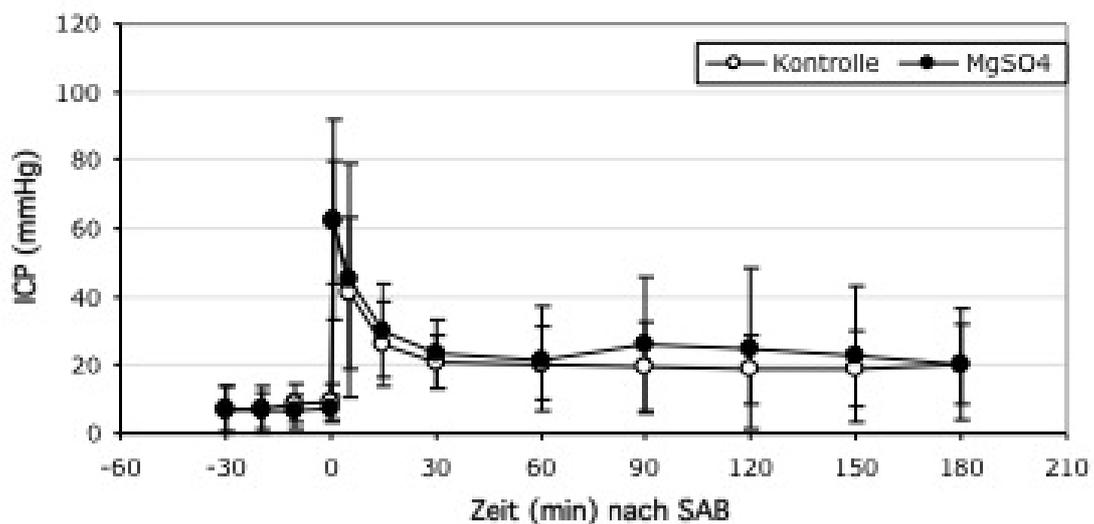


Abbildung 14 Intrakranieller Druck (ICP): Dynamische Veränderungen des ICP der Magnesium-Gruppe ( $MgSO_4$ ) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

Bei der Messung des zerebralen Perfusionsdrucks (CPP) ergaben sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Der CPP sank innerhalb der Magnesium-Gruppe in der ersten Minute nach der Blutung auf einen Minimalwert von  $22,17 \pm 16,01$  mmHg. Bei den Kontrolltieren wurde zu diesem Zeitpunkt ein Abfall auf  $10,60 \pm 13,73$  mmHg festgestellt. Nach 60 Minuten wurde in der Magnesium-Gruppe ein Wert von  $50,67 \pm 22,33$  mmHg und bei den Kontrolltieren  $46,90 \pm 13,92$  mmHg gemessen. Am Ende des Versuchs hatte sich der CPP der mit Magnesium behandelten Tiere auf einen Wert von  $64,33 \pm 21,12$  mmHg erholt und war bei den Kontrolltieren auf  $56,10 \pm 20,18$  mmHg gestiegen.

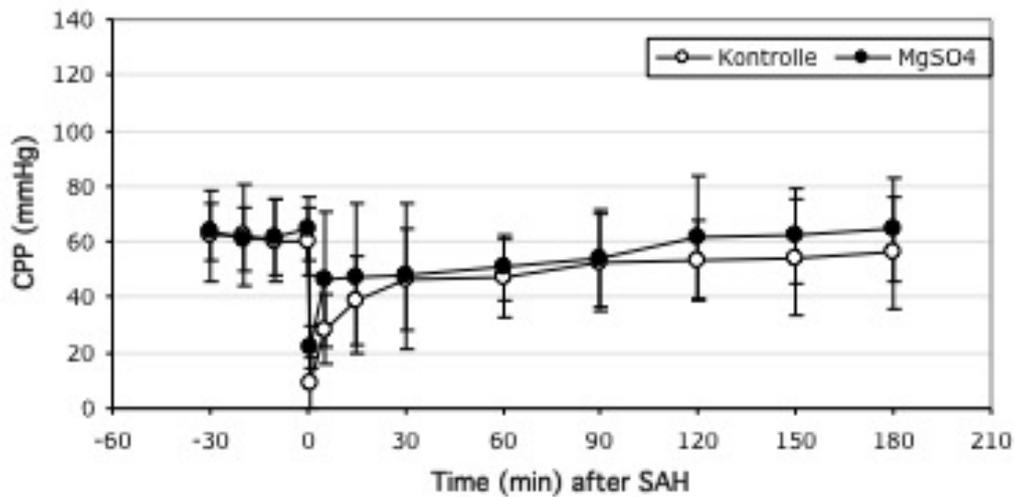


Abbildung 15 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP): Dynamische Veränderungen des CPP der Magnesium-Gruppe (MgSO<sub>4</sub>) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW ± SD) (\* p < 0,05).

### 3.2.2 Laser-Doppler Flowmetrie

Die Aufzeichnung des lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) erbrachte zwischen den Versuchstieren der Magnesium- und der Kontrolltiere keine signifikanten Unterschiede. Fünf Minuten nach Auslösen der SAB fiel der LCBF bei den Tieren der Magnesium-Gruppe auf einen Minimalwert von  $22,31 \pm 30,56$  Prozent vom Ausgangswert ab. Bei den Kontrolltieren wurde der niedrigste Wert bereits nach einer Minute gemessen und betrug  $20,45 \pm 24,06$  Prozent. 60 Minuten nach Blutung hatte sich der LCBF bei den mit Magnesium behandelten Tieren auf einen Wert von  $65,08 \pm 53,05$  erholt. Bei den Kontrolltieren wurde zum selben Zeitpunkt ein Wert von  $54,25 \pm 29,28$  registriert. Nach 180 Minuten wurde in der Kontrollgruppe ein Wert von  $82,33 \pm 66,81$  ermittelt und in der Magnesium-Gruppe von  $77,82 \pm 63,31$ .

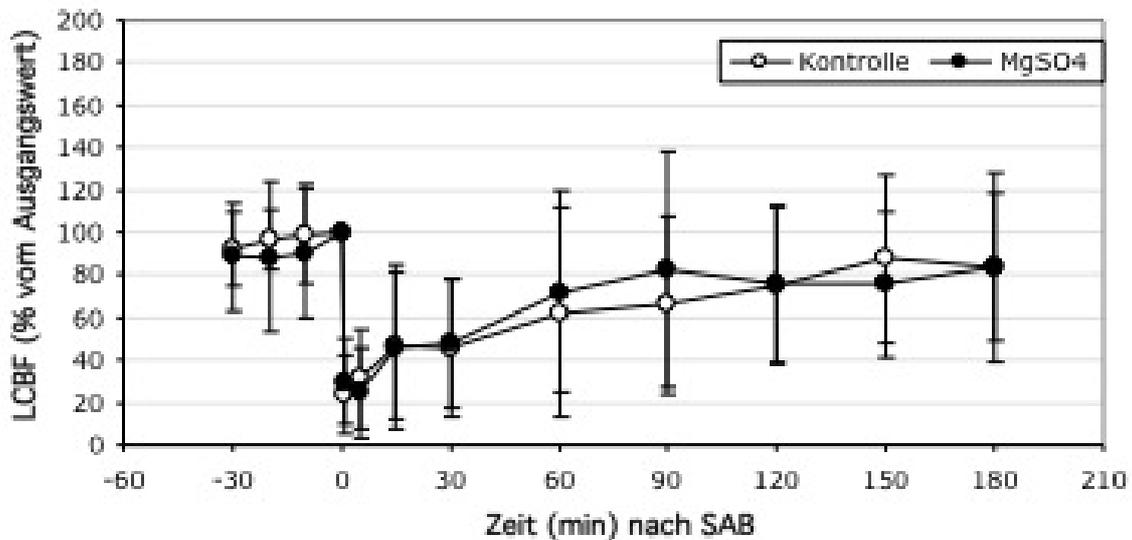


Abbildung 16 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF): Dynamische Veränderungen des ipsilateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB der Magnesium-Gruppe (MgSO<sub>4</sub>) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW ± SD) (\* p < 0,05).

In der kontralateralen Hemisphäre zeigte sich zwischen der Kontrollgruppe und den mit Magnesium behandelten Tieren ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Fünf Minuten nach Induktion der Blutung reduzierte sich der LCBF bei den Tieren der Magnesiumgruppe auf einen Minimalwertwert von  $24,56 \pm 29,75$ .  $24,01 \pm 18,50$  war der Minimalwert in der Kontrollgruppe, der eine Minute nach Auslösen der SAB aufgezeichnet wurde. 60 Minuten nach der SAB wurde bei den mit Magnesium behandelten Versuchstieren ein Wert von  $72,26 \pm 47,44$  gemessen und bei den Kontrolltieren entsprechend von  $62,34 \pm 49,72$ . Der LCBF beider Gruppen erholte sich daraufhin weiter, sodass die Messwerte nach 180 Minuten  $83,22 \pm 44,53$  in der Magnesium-Gruppe und  $83,87 \pm 34,77$  in der Kontrollgruppe betragen.

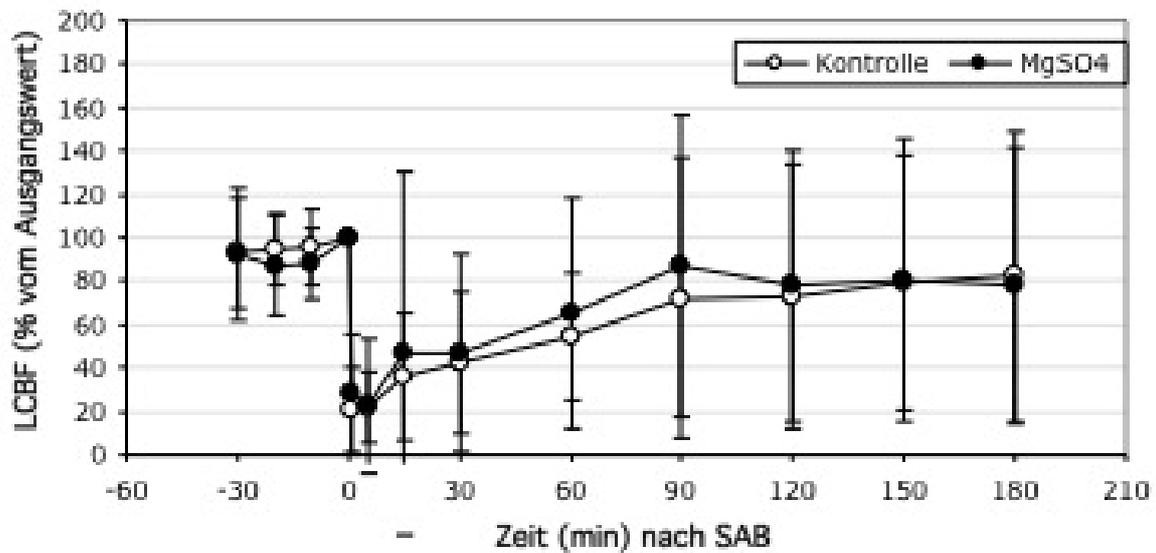


Abbildung 17 Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF): Dynamische Veränderungen des kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB der Magnesium-Gruppe (MgSO<sub>4</sub>) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW ± SD) (\* p < 0,05).

### 3.2.3 Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung

Tiere der Kontrollgruppe unterschieden sich in ihrer Aktivität nicht signifikant von denen der Magnesium-Gruppe. Der Median der Kontrolle betrug 2,5 das erste Quartil 1 und das dritte Quartil 3. Der Median der Magnesium-Gruppe war 3, das erste Quartil 0 und das dritte Quartil 4.

Ebenso ergab sich beim modifizierten Bederson-Score keine Signifikanz. Die Medianwerte betragen für die Tiere der Kontrollgruppe 3,5 und für diejenigen der Magnesiumgruppe 3. Das erste Quartil der Kontrolle war 0,75, das dritte 5. Das erste Quartil der Magnesiumgruppe betrug 0, das dritte Quartil 5.

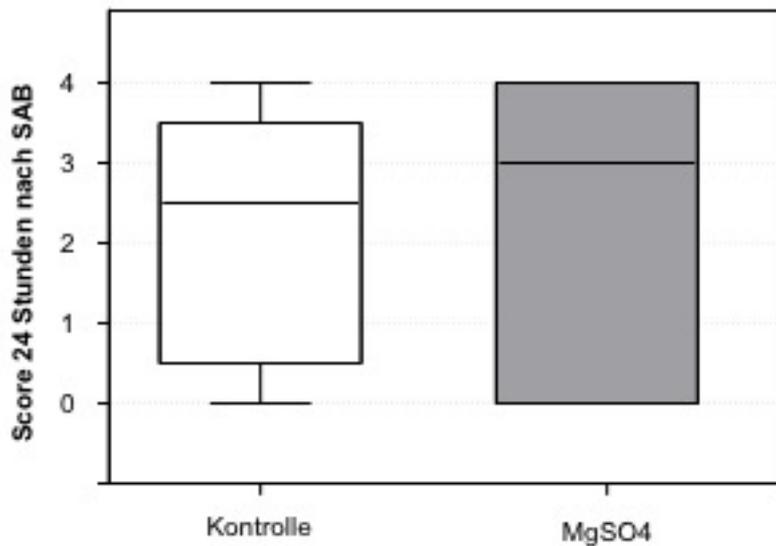


Abbildung 18 Aktivitätsscore: Klinisches Outcome der mit Magnesium-Gruppe (MgSO<sub>4</sub>) verglichen mit der Kontrolle 24 Stunden nach SAB, basierend auf dem Aktivitätsscore. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht (\* p < 0,05).

Die Entwicklung des Gewichts zeigte zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Das durchschnittliche Gewicht der mit Magnesium behandelten Tiere betrug vor Beginn des Versuchs  $361,42 \pm 49,13$  Gramm. Das nach Ende der Aufzeichnungsphase gemessene Gewicht war  $341,33 \pm 48,98$ , sodass die Tiere dieser Gruppe  $94,42 \pm 3,72$  Prozent ihres vorherigen Gewichts wogen. Die Kontrolltiere wogen vor SAB  $344,20 \pm 54,47$  Gramm, hinterher waren es  $320,10 \pm 58,98$  Gramm. Diese Tiere wogen also durchschnittlich  $92,73 \pm 3,87$  Prozent ihres ursprünglichen Gewichts.

### 3.2.4 Makroskopisches Ausmaß der Blutung

Die makroskopische Klassifizierung der SAB in Anlehnung an die Fisher-Skala erbrachte zwischen der Kontroll- und der Magnesium-Gruppe keinen signifikanten Unterschied. Der Median der Magnesiumgruppe war 3, der Median der Kontrolltiere 2,5. Das erste Quartil der Magnesiumgruppe betrug 3, das der Kontrolle 2. Das dritte Quartil der mit Magnesium behandelten Tiere war 3, ebenso das der Kontrolltiere.

### 3.2.5 Zelluläre Schädigung im Hippocampus

Die histologische Analyse ergab bei den Tieren der Kontrollgruppe einen relativen Anteil pyknotischer Zellen von  $14,22 \pm 4,29$  Prozent. Im Vergleich dazu wurde bei den mit Magnesium behandelten Tieren ein signifikant geringerer zellulärer Schaden ermittelt. Hier wurden  $10,22 \pm 3,42$  Prozent pyknotische Zellen innerhalb der untersuchten Hippocampusstrukturen vorgefunden.

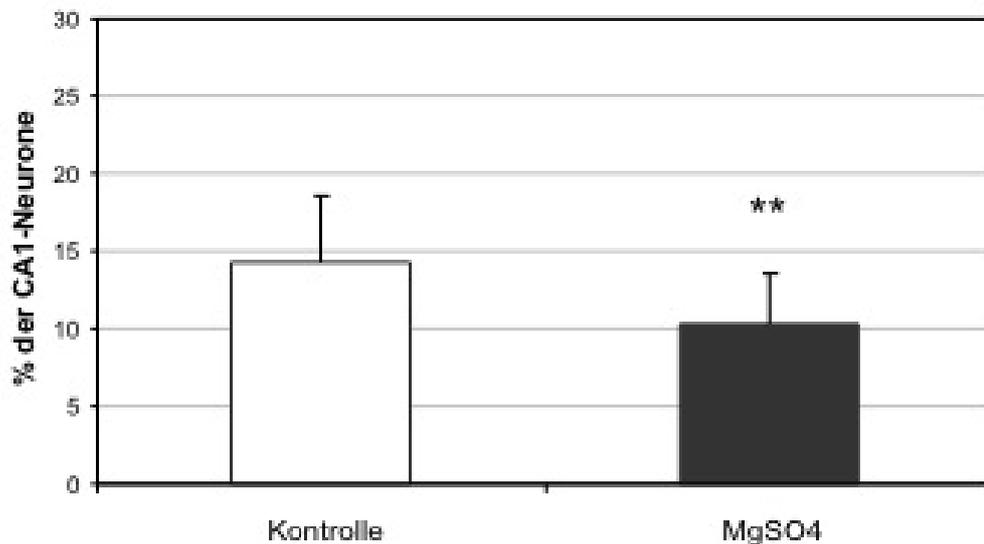


Abbildung 19 Histologischer Schaden (CA1-Feld): Prozentualer Anteil der mittels H&E-Färbung nachgewiesenen geschädigten Zellen im CA1-Feld des Hippocampus der mit Magnesium ( $MgSO_4$ ) behandelten Tiere verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes  $MW \pm SD$ ) (\*  $p < 0,05$ ).

#### *Caspase-3-Färbung*

Die immunhistochemische Färbung ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion der Caspase3-positiven CA1-Neurone in der Magnesiumgruppe. Pro Gesichtsfeld ließen sich  $12,9 \pm 2,8\%$  der Hippocampusneuronen mittels dieser Färbemethode in der Kontrollgruppe nachweisen. In der Magnesiumgruppe waren es  $6,1 \pm 2,6\%$ .

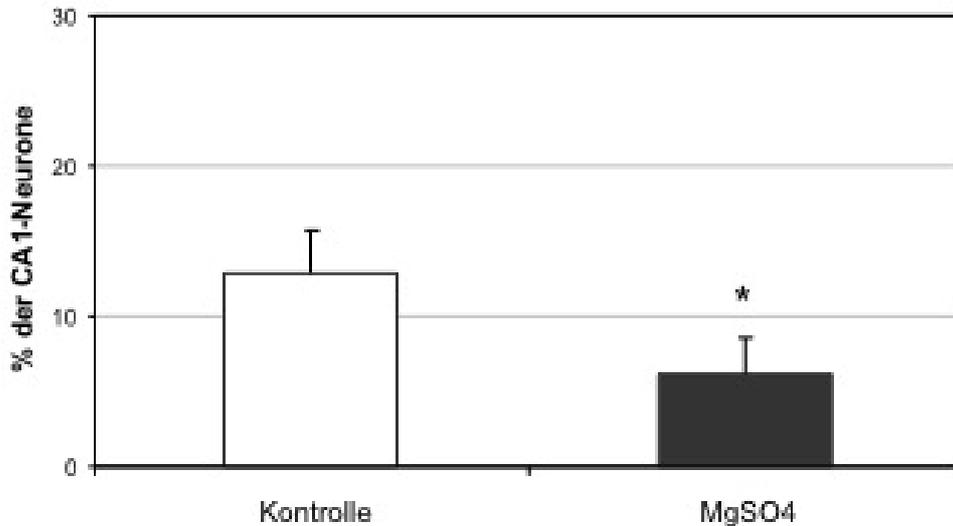


Abbildung 20 Caspase-3 positive CA1-Zellen: Prozentualer Anteil der neuronalen Zellschädigung im CA1-Feld des Hippocampus ermittelt anhand der Caspase-3-Färbung der Magnesium-Gruppe (MgSO<sub>4</sub>) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW ± SD) (\* p < 0,05).

## 3.3 Clazosentan

### 3.3.1 Physiologische Parameter

Die MABP-Werte wiesen über die gesamte Monitoring-Phase hinweg keine signifikanten Unterschiede auf. In der 0,1µg-Gruppe wurde der Minimalwert nach 15 Minuten gemessen und betrug  $52,13 \pm 12,89$  mmHg. Die 1,0µg-Gruppe zeigte nach 150 Minuten einen Minimalwert von  $58,75 \pm 6,73$  mmHg, die 10,0µg-Gruppe nach 5 Minuten von  $58,43 \pm 18,55$  mmHg und die Kontrollgruppe nach 15 Minuten von  $56,44 \pm 12,38$  mmHg. Eine Stunde nach Auslösen der Blutung wurde für die 0,1µg-Gruppe ein Wert von  $56,25 \pm 17,12$  mmHg aufgezeichnet, für die 1,0µg-Gruppe von  $61,88 \pm 6,01$  mmHg, für die 10,0µg-Gruppe von  $62,57 \pm 12,23$  und für die Kontrolltiere von  $56,44 \pm 12,38$  mmHg. Am Ende des Experiments wurde in der 0,1µg-Gruppe schließlich ein Wert von  $59,38 \pm 10,03$  mmHg, in der 1,0µg-Gruppe  $60,13 \pm 5,25$  mmHg und in der 10,0µg-Gruppe  $70,00 \pm 8,14$  mmHg gemessen. Verglichen damit wiesen die Kontrolltiere im Durchschnitt einen Wert von  $69,00 \pm 20,37$  mmHg nach 180 Minuten auf.

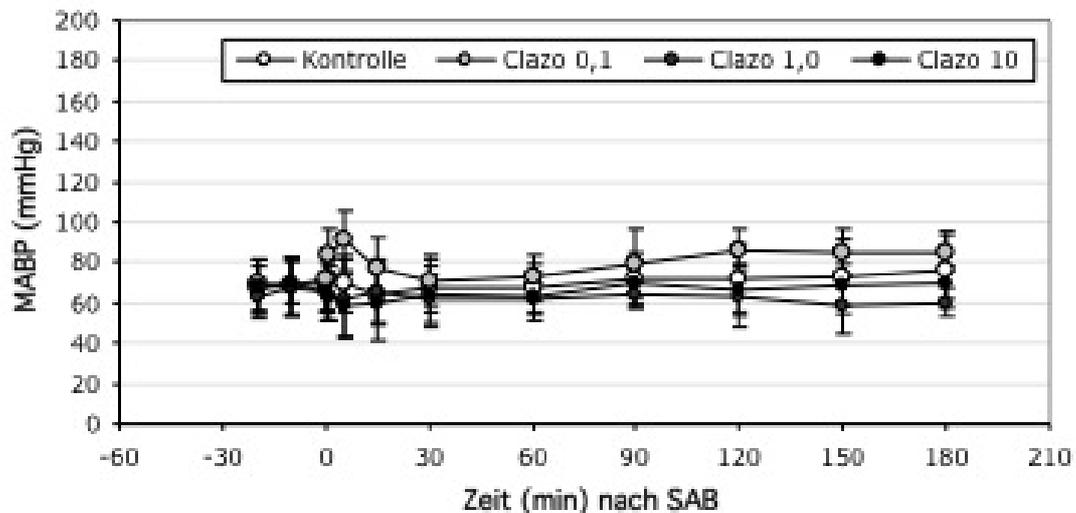


Abbildung 21 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP): Dynamische Veränderungen des MABP der Clozoesentan-Gruppen (Clazo) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\* p < 0,05).

Alle 4 Gruppen zeigten einen deutlichen Anstieg des Hirndrucks nach Auslösen der SAB. Signifikante Unterschiede fanden sich im Verlauf der gesamten Monitoring-Phase nicht. Der maximal aufgezeichnete Wert fand sich in allen 4 Gruppen eine Minute nach Induktion der SAB. Er betrug bei den Tieren der 0,1 $\mu$ g-Gruppe  $43,50 \pm 21,51$  mmHg, bei den Tieren der 1,0 $\mu$ g-Gruppe  $46,25 \pm 13,90$  mmHg, bei den Tieren der 10,0 $\mu$ g-Gruppe  $41,14 \pm 10,42$  mmHg und bei den Kontrolltieren  $43,80 \pm 13,55$  mmHg. Nach 60 Minuten wurde ein Wert von  $11,50 \pm 10,27$  mmHg für die 0,1 $\mu$ g-Gruppe aufgezeichnet. In der 1,0 $\mu$ g-Gruppe waren es  $19,00 \pm 5,37$  mmHg, in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe  $10,14 \pm 11,51$  mmHg und in der Kontrolle  $18,70 \pm 7,10$  mmHg. Am Ende der Monitoringphase wurde für die 0,1 $\mu$ g-Gruppe ein Wert von  $15,63 \pm 10,23$  mmHg ermittelt. Für die 1,0 $\mu$ g-Gruppe wurden  $19,00 \pm 9,75$  mmHg, für die 10,0 $\mu$ g-Gruppe  $14,57 \pm 6,50$  mmHg und für die Kontrolle  $18,70 \pm 7,10$  aufgezeichnet.

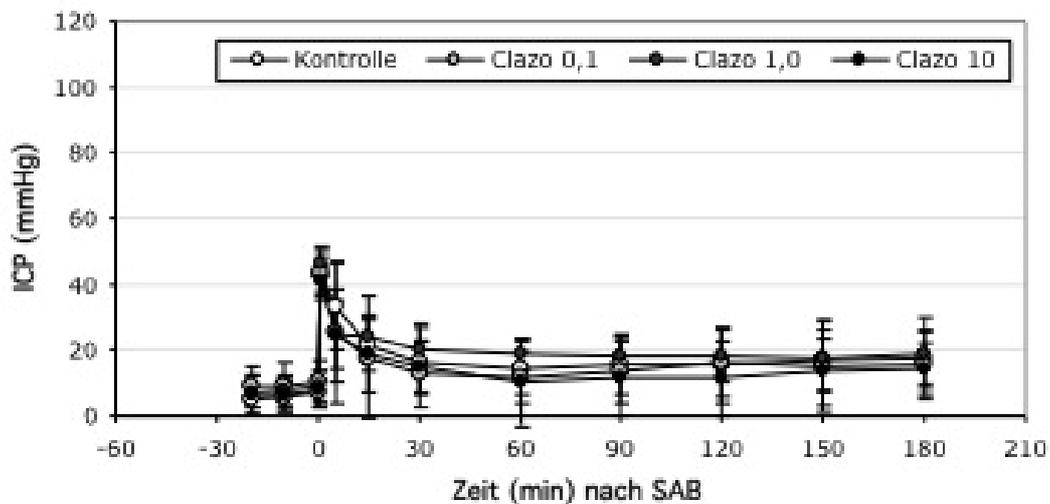


Abbildung 22 Intrakranieller Druck (ICP): Dynamische Veränderungen des ICP der Clazosentan-Gruppen verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD)(\*  $p < 0,05$ ).

Ebenso zeigte die Entwicklung des CPP keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die aufgezeichneten Minimalwerte waren  $17,38 \pm 10,54$  mmHg in der  $0,1\mu\text{g}$ -Gruppe,  $16,38 \pm 18,02$  mmHg in der  $1,0\mu\text{g}$ -Gruppe,  $23,29 \pm 18,94$  mmHg in der  $10,0\mu\text{g}$ -Gruppe und  $16,80 \pm 13,79$  mmHg in der Kontrollgruppe jeweils nach einer Minute. Eine Stunde nach Induktion der SAB wies die  $0,1\mu\text{g}$ -Gruppe einen Wert von  $44,75 \pm 17,43$  mmHg auf, die  $1,0\mu\text{g}$ -Gruppe von  $42,88 \pm 6,21$  mmHg, die  $10,0\mu\text{g}$ -Gruppe von  $52,43 \pm 13,66$  mmHg und die Kontrollgruppe von  $47,10 \pm 13,35$  mmHg.

Im weiteren Verlauf des Versuchs stiegen die genannten Werte des CPP in sämtlichen Gruppen sukzessive an und betrugen schließlich nach 180 Minuten in der  $0,1\mu\text{g}$ -Gruppe  $43,75 \pm 5,57$  mmHg, in der  $1,0\mu\text{g}$ -Gruppe  $41,13 \pm 13,65$  mmHg und in der  $10,0\mu\text{g}$ -Gruppe  $55,43 \pm 8,22$  mmHg. Verglichen damit hatte sich der CPP der Kontrolle auf einen Wert von  $50,10 \pm 15,95$  mmHg erholt.

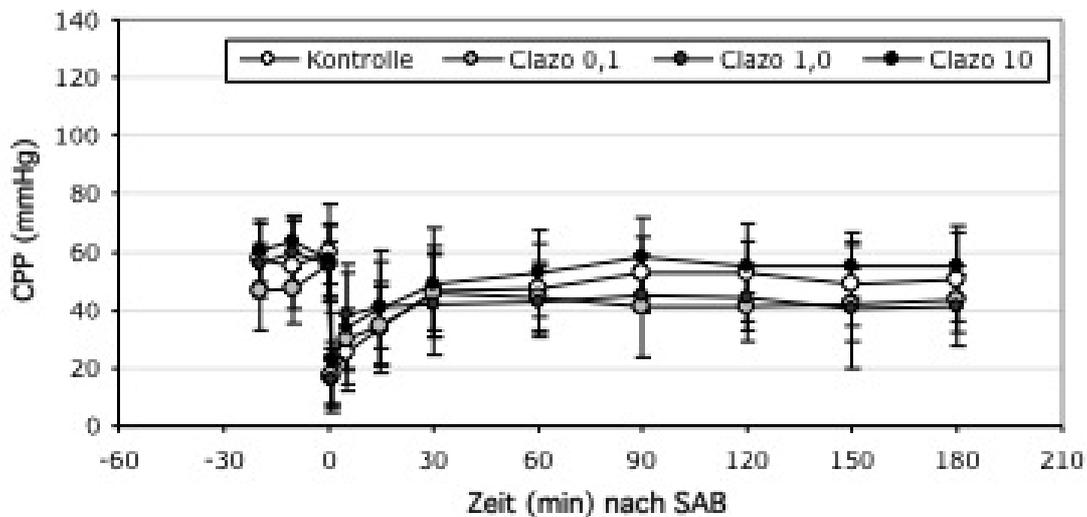


Abbildung 23 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP): Dynamische Veränderungen des CPP der Clazosentan-Gruppen (Clazo) verglichen mit der Kontrolle 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD). (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Laser-Doppler Flowmetrie

Die registrierten Minimalwerte sämtlicher Gruppen wurden jeweils eine Minute nach Auslösen der SAB aufgezeichnet. Die 0,1 $\mu$ g-Gruppe wies zu diesem Zeitpunkt einen Abfall der zerebralen Perfusion auf  $28,58 \pm 20,52$  Prozent relativ zum Ausgangswert auf. In der 1,0 $\mu$ g-Gruppe waren es  $27,44 \pm 14,89$  und in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe  $29,50 \pm 11,08$ . Die Kontrolle wies einen Wert von  $22,88 \pm 23,14$  auf. Im Verlauf von einer Stunde hatte sich die Hirndurchblutung innerhalb der 0,1 $\mu$ g-Gruppe auf  $54,99 \pm 39,30$  erholt. Bei den Tieren der 1,0 $\mu$ g-Gruppe wurde ein Mittelwert von  $56,51 \pm 29,48$  gemessen und in der 10 $\mu$ g-Gruppe entsprechend ein Wert von  $52,00 \pm 24,31$ . Die Kontrolle zeigte einen Wert von  $41,16 \pm 30,29$  zu diesem Zeitpunkt. Nach 180 Minuten wurde in der 0,1 $\mu$ g-Gruppe ein Wert von  $83,05 \pm 45,63$  gemessen, in der 1,0 $\mu$ g-Gruppe von  $78,15 \pm 45,015$  und in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe von  $97,35 \pm 48,88$ . Die Kontrolltiere wiesen einen Mittelwert von  $61,40 \pm 37,69$  auf.

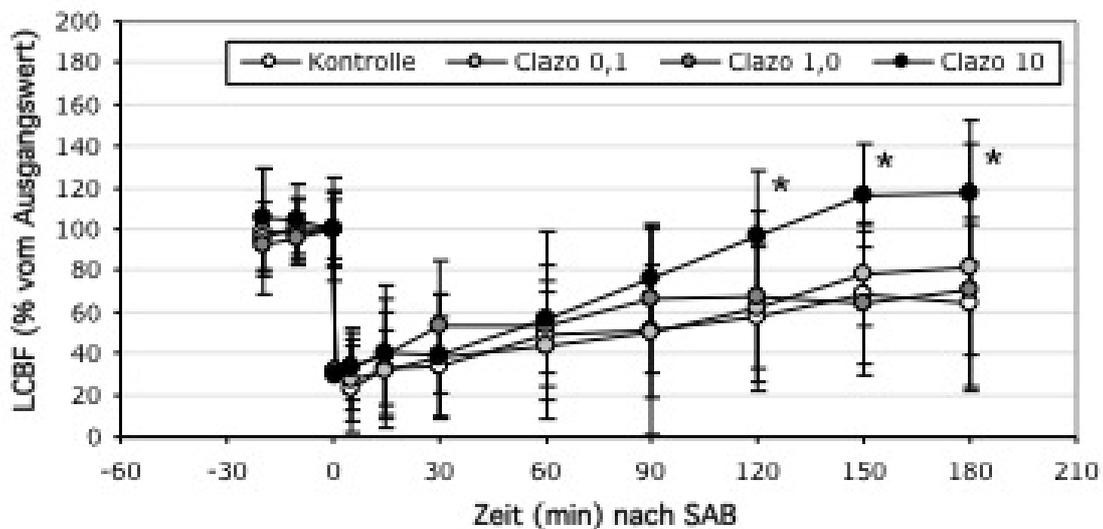


Abbildung 24 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF): Dynamische Veränderungen des ipsilateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB der Clazosentan-Gruppen verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

Die Minimalwerte auf der Gegenseite betragen für die 0,1 $\mu$ g-Gruppe 26,89  $\pm$  27,79 nach 5 Minuten, für die 1,0 $\mu$ g-Gruppe 31,09  $\pm$  16,19 nach einer Minute, für die 10,0 $\mu$ g-Gruppe 29,79  $\pm$  19,15 nach einer Minute und für die Kontrolltiere 22,55  $\pm$  18,29 nach 5 Minuten. Innerhalb einer Stunde waren diese Werte auf 43,41  $\pm$  31,84 in der 0,1 $\mu$ g-Gruppe, 53,63  $\pm$  35,92 in der 1,0 $\mu$ g-Gruppe und 56,52  $\pm$  26,15 in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe angestiegen. Die Hirndurchblutung erholte sich bei den Kontrolltieren durchschnittlich auf 49,02  $\pm$  49,59. 180 Minuten nach Auslösung der SAB wurde eine weitere Erholung der zerebralen Hirndurchblutung bei sämtlichen Tieren verzeichnet. Es wurde ein Anstieg der Werte auf 81,59  $\pm$  55,30 in der 0,1 $\mu$ g-Gruppe, 70,75  $\pm$  36,24 in der 1,0 $\mu$ g-Gruppe und 117,60  $\pm$  41,20 in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe gemessen. Im Vergleich dazu wiesen die Kontrolltiere einen Wert von 64,49  $\pm$  34,98 auf.

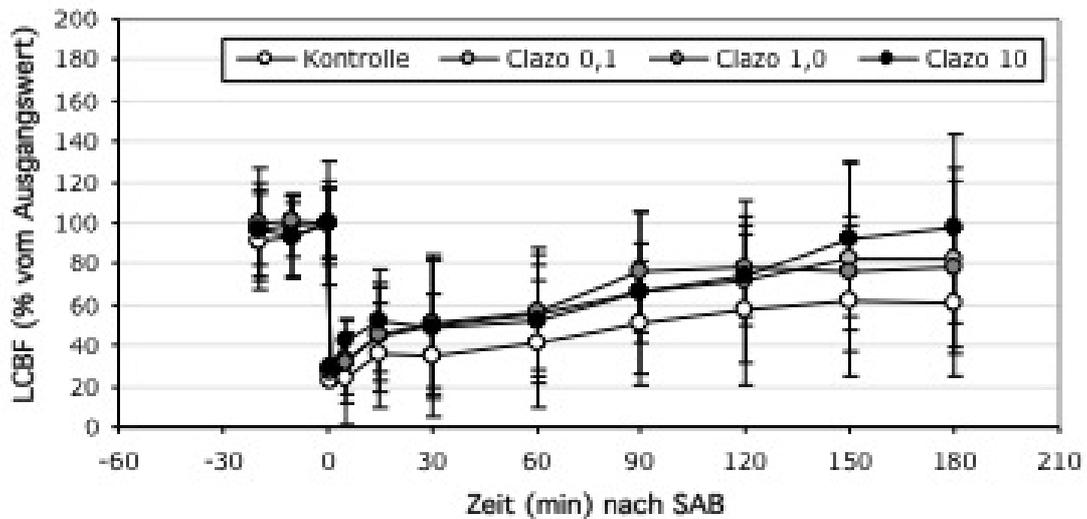


Abbildung 25 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF): Dynamische Veränderungen des kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) 30 Minuten vor bis 180 Minuten nach SAB der Clazosentan-Gruppen verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.3.3 Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung

Die 24 Stunden später ermittelte Aktivität analog zum vorgestellten Aktivitätsscore erreichte zwischen den einzelnen Gruppen nicht das Signifikanzniveau. Die Medianwerte betragen 2 für die Kontrolle, 3 für die 0,1 $\mu$ g-Gruppe, ebenfalls 3 für die 1,0 $\mu$ g-Gruppe und 4 für die 10,0 $\mu$ g-Gruppe. Das erste Quartil der Kontrollgruppe ist 0,25. Das erste Quartil der 0,1 $\mu$ g-Gruppe liegt bei 2,75, das der 1,0 $\mu$ g-Gruppe bei 1,75 und das der 10,0 $\mu$ g-Gruppe bei 3. Die Werte des dritten Quartils sind 3 für die Kontrollgruppe, 4 für die 0,1 $\mu$ g-Gruppe, 3,25 für die 1,0 $\mu$ g-Gruppe und 4 für die 10,0 $\mu$ g-Gruppe.

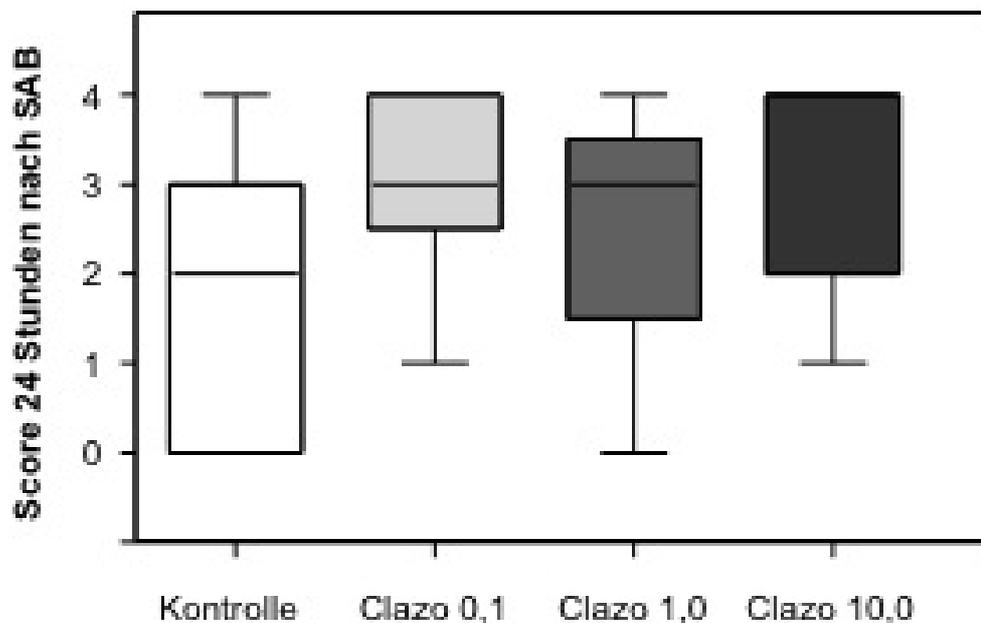


Abbildung 26 Aktivitätsscore: Klinisches Outcome der mit Clazosentan (Clazo) behandelten Tiere verglichen mit der Kontrolle 24 Stunden nach SAB, basierend auf dem Aktivitätsscore. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht (\*  $p < 0,05$ ).

Bei der Auswertung des modifizierten Bederson-Scores ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die Medianwerte betragen 3 in der Kontrolle, 3,5 in der 0,1 $\mu$ g-Gruppe, 4,5 in der 1,0 $\mu$ g-Gruppe und 4 in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe. Die Werte des ersten Quartils sind 0 in der Kontrolle, 2 in der 0,1 $\mu$ g-Gruppe, 2,25 in der 1,0 $\mu$ g-Gruppe und 2,5 in der 10,0 $\mu$ g-Gruppe. Entsprechend betragen die Werte des dritten Quartils 4,75 in der Kontrolle und 5 in sämtlichen mit Clazosentan behandelten Gruppen.

#### *Gewichtsentwicklung*

Die Entwicklung des Gewichts weist zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Kontrolltiere wogen durchschnittlich  $335,00 \pm 41,02$  Gramm vor und  $303,40 \pm 43,74$  Gramm nach dem Experiment. Das am Tag nach der SAB ermittelte Gewicht betrug also  $90,37 \pm 3,33$  Prozent des vor der SAB gemessenen Werts. Die Tiere der 0,1 $\mu$ g-Gruppe wogen vorher  $365,43 \pm 43,72$  Gramm und nachher  $335,14 \pm 45,52$  Gramm. Der relative Wert betrug  $91,63 \pm 4,11$  Prozent.

Für die Tiere der 1,0 $\mu$ g-Gruppe wurde vorher ein Gewicht von  $336,57 \pm 36,90$  Gramm und am Tag danach von  $315,14 \pm 32,04$  Gramm ermittelt. Der relative Wert betrug

93,72 ± 1,96 Prozent. Die Tiere der 10,0µg-Gruppe wogen vor der SAB 418,50 ± 38,30 Gramm. Der zweite Wert betrug 394,00 ± 37,52 Gramm. Der relative Wert betrug 94,13 ± 1,72 Prozent.

### **3.3.4 Makroskopisches Ausmaß der Blutung**

Die Auswertung des Blutungsscores ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der Median der Kontrolle liegt bei 2, der Median der 0,1µg-Gruppe sowie der 1,0µg-Gruppe liegt bei 3 und derjenige der 10,0µg-Gruppe bei 2. Das erste Quartil beträgt in sämtlichen Gruppen 2. Das dritte Quartil ist in sämtlichen Gruppen 3.

### **3.3.5 Zelluläre Schädigung im Hippocampus**

Die histologische Untersuchung des zellulären Schadens im Hippocampus erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und sämtlichen mit Clazosentan behandelten Gruppen (One-way ANOVA, Dunnett's test for multiple comparisons).

Die Tiere, die Clazosentan in einer Dosis von 10,0 µg erhalten hatten, wiesen im Vergleich zu den beiden anderen Therapiegruppen und der Kontrolle den geringsten Anteil an pyknotischen Zellen in der untersuchten CA1-Region des Hippocampus auf. Durchschnittlich wurde bei den Tieren in der 10,0µg-Gruppe ein Anteil von 7,27 ± 3,18 Prozent geschädigter Zellen gezählt. Verglichen mit diesem Wert fand sich in der Kontrollgruppe ein relativer Anteil von 15,40 ± 4,66 Prozent pyknotischer Zellen. Bei Tieren, die Clazosentan in einer Dosis von 0,1 µg erhalten hatten, wurde durchschnittlich ein zellulärer Schaden von 8,49 ± 3,35 Prozent in der untersuchten Region gefunden. Die Tiere in der 1,0µg-Gruppe wiesen einen Anteil von 11,84 ± 4,49 Prozent auf.

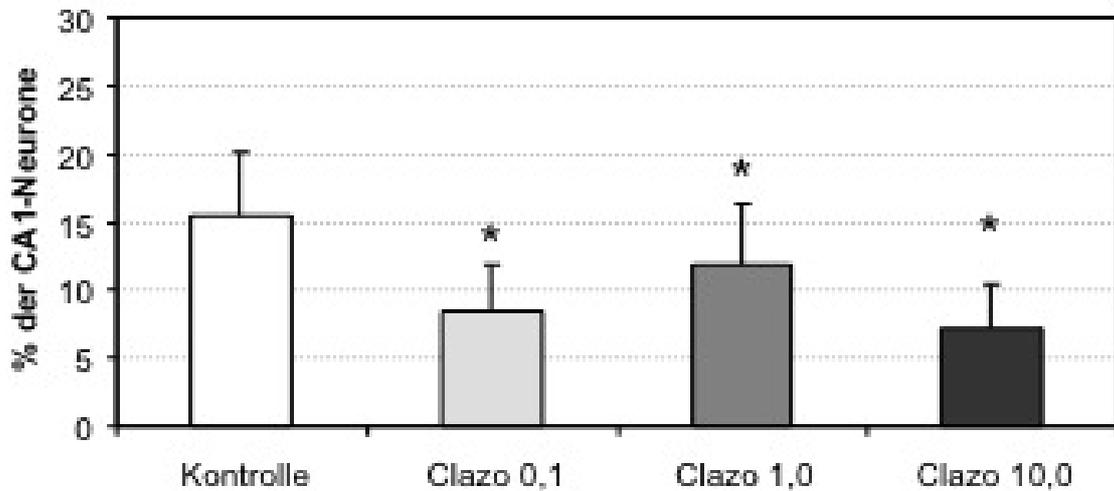


Abbildung 27 Histologischer Schaden (CA1-Feld): Prozentualer Anteil der mittels H&E-Färbung nachgewiesenen geschädigten Zellen im CA1-Feld des Hippocampus der mit Clazosentan (Clazo) behandelten Tiere verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes MW ± SD) (\* p < 0,05).

Die Immunfluoreszenz der CA1-Region des Hippocampus erbrachte ebenfalls eine signifikante Reduktion in den Gruppen, die mit Clazosentan behandelt wurden.

Der relative Wert betrug für die 0,1µg-Gruppe  $4,61 \pm 0,4$  Prozent. Dies war von allen Gruppen der niedrigste Wert. Bei Tieren der 10,0µg-Gruppe fand sich ein Anteil von  $5,55 \pm 4,26$  Prozent apoptotischer Zellen. In der Gruppe, die Clazosentan in einer Dosierung von 1,0 µg bekommen hatte, fand sich ein Anteil von  $5,89 \pm 2,32$  Prozent an apoptotischen Zellen. Verglichen damit wurde mit dieser Färbemethode bei der Kontrolle ein entsprechender Wert von  $10,32 \pm 5,75$  Prozent gefunden.

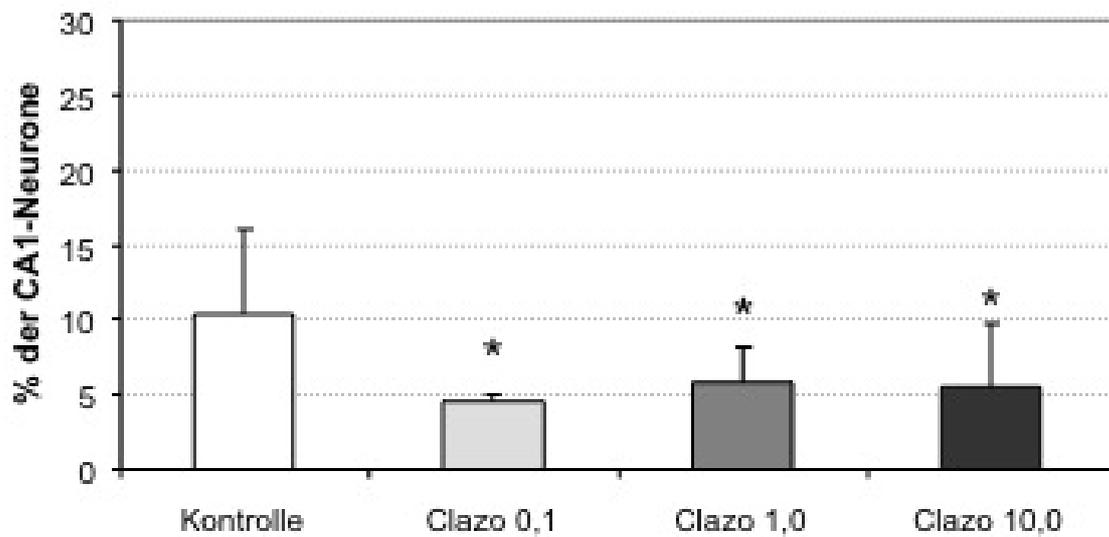


Abbildung 28 Caspase-3 positive CA1-Zellen: Prozentualer Anteil der neuronalen Zellschädigung im CA1-Feld des Hippocampus ermittelt anhand der Caspase-3-Färbung der Clazosentan-Gruppen (Clazo) verglichen mit der Kontrolle. Bei den Werten handelt es sich um Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW  $\pm$  SD) (\*  $p < 0,05$ ).

## **4 Diskussion**

## **4.1 Diskussion der Methodik**

### **4.1.1 Fadenmodell der SAB**

Die Induktion der SAB erfolgte nach dem Prinzip des Fadenmodells, das 1995 erstmalig beschrieben wurde.[8, 144] Diese Methode zur Auslösung einer SAB im Tiermodell beruht auf einer Gefäßperforation mittels eines Fadens an der intrakraniellen Teilungsstelle der Arteria carotis interna. Verglichen mit den ebenfalls gebräuchlichen Injektionsmodellen, bei denen autologes Blut in die Opticuszisterne oder die Cisterna magna injiziert wird, oder Punktionsmodellen, bei denen ein intrakranielles Gefäß anpunktiert wird, bietet dieses Modell einige Vorteile.[6, 55, 129] Die Stärke der gewählten Verfahrensweise liegt in der relativ exakten Simulation der physiologischen Vorgänge bei einer Aneurysmaruptur und der Art und Weise, wie das Blut über eine Perforationsstelle in den Subarachnoidalraum gelangt. Die daraus resultierenden Effekte wie der abrupte Anstieg des ICP und der Abfall des CPP, die eine kurzzeitige globale Ischämie nach sich ziehen, können anhand des Fadenmodells nachgestellt werden. Insbesondere für die Untersuchung der akuten Phase nach SAB mit ihren mechanischen und physiologischen Aspekten ist das Fadenmodell also die bisher valideste zur Verfügung stehende Variante. Die anderen genannten Methoden dienen vornehmlich der Erforschung des verzögerten Vasospasmus. Insbesondere haben sie den Nachteil einer Kraniotomie, was bedeutet, dass vor allem eine intrakranielle Druckerhöhung und ein damit verbundener Abfall des CPP nicht in dem Maß stattfindet, wie es bei intaktem, nicht geöffneten Schädelknochen der Fall ist. Für die Bearbeitung von Fragestellungen, die die Akutphase der SAB, den daraus resultierenden Sekundärschaden und dessen Behandlungsmöglichkeiten betreffen, sind diese Methoden deshalb nur bedingt geeignet. Bei Anwendung des Fadenmodells kann eine Kraniotomie hingegen umgangen werden, sodass das Risiko einer Schädigung intrakranieller Strukturen vor Auslösung der Blutung vermieden wird. Ein intakter Schädel ermöglicht zudem eine deutlich genauere Rekonstruktion der Pathophysiologie nach SAB. Die Exaktheit der Darstellung akut einsetzender pathophysiologischer

Mechanismen nach SAB ist von besonderer Bedeutung für die Entwicklung und Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten.

Ein Nachteil des Fadenmodells hingegen liegt in seiner Schwierigkeit, das Ausmaß der Blutung zu kontrollieren und zu standardisieren.[102] Verglichen mit den Injektionsmodellen ist die induzierte Blutung häufig deutlich ausgeprägter, was sich klinisch in einem massiveren Anstieg des ICP und einem deutlicheren Abfall des CPP und des zerebralen Blutflusses äußert.[69, 102] Diese Beobachtung könnte die relativ hohe Mortalitätsrate von bis zu 50% erklären, die von einigen Forschergruppen berichtet wird.[8, 69, 102] Dieser häufig angeführte Kritikpunkt könnte sich allerdings als nicht ausreichend differenziert erweisen. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich nämlich, dass eine hohe Mortalität einer zu kurzen postoperativen Beatmungs- und Aufwachphase geschuldet sein könnte.[150] Denn Studien, die eine besonders hohe Mortalitätsrate aufweisen, zeichnen sich häufig durch eine relativ kurze Monitoringphase nach Induktion der SAB aus.[8, 9, 69, 102] Möglicherweise ist dies der Tatsache geschuldet, dass sowohl der ICP als auch die zerebrale Durchblutung erst langsam wieder ein Niveau erreichen, das basale Schutzreflexe wie den eigenen Atemantrieb sicher gewährleisten kann. Je länger die Tiere nach dem Blutungsereignis narkotisiert bleiben, desto geringer könnte also die Mortalitätsrate unter ihnen sein.[150] Diese Beobachtung lässt sich erklären, wenn man bedenkt, welchen immensen physiologischen Schaden eine SAB hervorruft. Je länger physiologische Parameter der Tiere unter anästhesiologischer Kontrolle überwacht und reguliert werden, desto wahrscheinlicher ist es, dass sich wesentliche Schutzreflexe der Tiere wie beispielsweise ein ausreichender Atemantrieb wiedereinstellen. Ein zu hoher ICP bei Erwachen der Tiere kann das Einsetzen solcher Schutzreflexe verhindern, was sich wiederum in einer relativ hohen Mortalitätsrate manifestieren könnte. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass bei einer deutlich längeren Überwachungsphase von 360 Minuten nach Induktion der SAB auch bei Anwendung des Fadenmodells eine wesentlich geringere Mortalitätsrate erzielt werden konnte.[150] In derselben Studie wurde zudem der Einfluss der Fadenstärke auf die Mortalitätsrate untersucht. Wesentlich ist die Feststellung der Autoren, dass selbst mit einem 3-0 Nylonfaden, also der üblicherweise verwendeten Stärke mit in anderen Studien hoher Mortalitätsrate, eine vergleichbare Rate nicht überlebender Tiere nicht reproduzierbar war.[150]

Zusammenfassend kann man also feststellen, dass die Mortalitätsrate im Fadenmodell anscheinend abhängig von mehreren Faktoren ist, nämlich einerseits von der verwendeten Fadenstärke und damit der ausgelösten Blutungsintensität, insbesondere aber auch von der Regenerationsphase, die den Tieren nach Induktion der SAB unter anästhesiologischer Überwachung zuteil wird.[118, 150]

Abschließend sollte noch bedacht werden, dass ein Vorteil einer stark ausgeprägten Blutung mit den resultierenden mechanischen und physiologischen Konsequenzen in der erleichterten Erforschung pathophysiologischer Mechanismen nach SAB und deren Beziehung zueinander liegt.

## **4.1.2 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF)**

Die LDF dient der kontinuierlichen Aufzeichnung relativer Flussgeschwindigkeiten über einem definierten Areal. Diese auf dem Doppler-Effekt basierende Messmethode wurde 1977 von Stern et al. detailliert dargelegt.[133] Ausgesandtes Laserlicht wird von Gewebe und Flüssigkeiten absorbiert und reflektiert. Trifft das Laserlicht dabei auf sich bewegende Erythrozyten, wird es mit veränderter Frequenz reflektiert. Unbewegliche Substanzen rufen hingegen keine Frequenzänderung hervor. So können Änderungen des regionalen zerebralen Blutflusses kontinuierlich und unmittelbar exakt erfasst werden.[25] Neben dieser präzisen zeitlichen Auflösung und der Möglichkeit einer kontinuierlichen Analyse relativer Flussgeschwindigkeiten liegt ein weiterer Vorteil dieses Prinzips in seiner Nichtinvasivität.[25] Eine absolute Messung der Flussgeschwindigkeit des regionalen zerebralen Blutflusses gelingt hingegen nicht mit ausreichender Genauigkeit. Hier können kleine Variationen in der Sondenplatzierung bereits deutliche Abweichungen der Messwerte produzieren.[25] Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit eine bilaterale Messung des regionalen zerebralen Blutflusses durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich bei Schwankungen um unilaterale, fokalischemische Ereignisse handeln könnte. Mit dieser bilateralen Messung sind beide Hemisphären abgedeckt, so dass durch diese Messmethode eine verlässliche Aussage über globale Veränderungen der Hirndurchblutung getroffen werden kann.[49]

### **4.1.3 Modifizierter Bederson-Score**

24 Stunden nach SAB wurde die Spontanaktivität der Tiere bewertet, um eine Vergleichsmöglichkeit zwischen den Versuchsgruppen im Hinblick auf das funktionelle Outcome zu schaffen. Da anhand der Spontanaktivität einer Ratte nach SAB allerdings keine sichere Aussage über das neurologische Outcome getroffen werden kann, wurde zusätzlich eine Evaluierung neurologischer Defizite mittels eines sechsstufigen Scores vorgenommen. Die Untersuchung ermöglichte eine validere Einschätzung des neurologischen Status der Tiere 24 Stunden nach SAB. So konnte das klinische Outcome insgesamt breiter erfasst und zusätzlich das Ergebnis der Tiere hinsichtlich einer möglichen Neuroprotektion bewertet werden.[23] Der dabei angewandte Score orientierte sich an einer 1986 von Bederson et al. eingeführten Methode zur genaueren Untersuchung potenzieller neurologischer Ausfälle bei Ratten nach zerebraler Ischämie. Dieser gut reproduzierbare Test weist eine hohe Spezifität bei moderater Sensitivität auf. Anhand des Scores können motorische Defizite aufgedeckt und eine zuverlässige Aussage über den Ort der Läsion getroffen werden.[10] Da in den ersten 24 Stunden nach einer SAB eher globale als fokale Durchblutungsstörungen zu erwarten sind, ist der Hemiparese-Score auch als zusätzliche Bestätigung der histologischen Auswertung zu betrachten. Bei Auftreten einer ausgeprägten Hemiparese und eines damit korrelierenden Infarkts kann darauf geschlossen werden, dass nach der Gefäßperforation ein thrombotischer Verschluss des Gefäßes aufgetreten ist. Das entsprechende Tier müsste dann aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Das Auftreten einer Hemiparese ohne Hinweise für eine Infarzierung hingegen spricht für eine funktionell relevante Minderdurchblutung im Sinne eines frühen Vasospasmus, der der hauptsächliche pathophysiologische Zielmechanismus für die neuroprotektiven Maßnahmen im Rahmen dieses Projekts ist.

### **4.1.4 morphologische Schädigung**

Um die Versuchsgruppen hinsichtlich eines neuroprotektiven Effekts exakter diskriminieren zu können, wurde neben der Bewertung des klinischen Outcomes die morphologische Schädigung eines definierten Areals im Hippocampus quantifiziert. Es

erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) der Gewebeschnitte und zusätzlich die immunhistochemische Analyse mittels Caspase-3-Färbung. Kognitive Einschränkungen nach SAB, die das funktionelle Outcome schmälern und die Lebensqualität der Patienten gravierend mindern können, sind relativ häufige Folgen der Erkrankung.[1] Der Hippocampus ist eine für höhere kognitive Funktionen besonders wichtige Region des Gehirns.[127] Auch bei Ratten konnten nach SAB Einschränkungen der Lernfähigkeit nachgewiesen werden, die insbesondere das räumliche Lernen betreffen.[52] Für diese kognitive Leistung ist der Hippocampus von besonderer Wichtigkeit. Eine Begutachtung hippocampaler Neurone scheint daher sinnvoll. Hippocampusneurone, insbesondere im CA1-Feld, zeichnen sich zudem durch eine besonders große Vulnerabilität gegenüber Ischämie bzw. Hypoxie aus und schlagen vergleichsweise schnell den Apoptoseweg ein.

Die vorgenommene Analyse des neuronalen Zelltods in dieser Arbeit stützt sich auf die Kombination aus klassischer H&E-Färbung und zusätzlicher Detektion aktivierter Caspase-3. Für die histologische Untersuchung von Gewebeschnitten auf apoptotische Zellen nach H&E-Färbung sind Kriterien definiert, die zwar eine sensitive Auswertung gewährleisten.[58] Die Auswertung ist allerdings recht untersucherabhängig.[29, 131] Aus diesem Grund erfolgte die Auszählung der unversehrten und geschädigten Neuronen ohne Kenntnis der Versuchsgruppe durch einen verblindeten Untersucher. Der zusätzliche Einsatz weiterer Methoden zur Quantifizierung apoptotischer Zellen kann eine validere Aussage über den Zellschaden gewährleisten. Der Nachweis aktivierter Caspase-3 zählt zu diesen weiteren geeigneten Techniken zur Quantifizierung des apoptotischen Zelltods.[131] Aktivierte Caspase-3 findet sich nicht in nekrotischen, sondern ausschließlich in apoptotischen Zellen und gilt als sicherer Marker für diese Art des Zelltods.[3, 157] Ein Nachweis gelingt auch zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine DNA-Fragmentierung eingetreten ist.[131]

Ein wichtiger Punkt im Hinblick auf den durch die SAB hervorgerufenen zerebralen Zelltod ist die Tatsache, dass nekrotische und apoptotische Zelltodmechanismen zwar früh einsetzen, der zelluläre Schaden in seinem gesamten Ausmaß aber erst Tage später vollständig ausgeprägt und damit nachweisbar ist.[23] Ein weiterer wesentlicher Aspekt, der bei der Quantifizierung des nach SAB entstandenen Zelltods bedacht werden sollte, ist die Beobachtung, dass der zelluläre Schaden nicht in sämtlichen

Hirnregionen zum gleichen Zeitpunkt offensichtlich wird.[38, 40] So konnten Friedrich et al. aktivierte Caspase-3 in einer experimentellen Studie an Ratten bereits innerhalb von 10 Minuten nach Auslösen einer SAB in kortikalen und einigen subkortikalen Regionen detektieren, nicht jedoch im Hippocampus. Hier war dieser Apoptosemarker erst deutlich später, nämlich 24 Stunden nach SAB, nachweisbar.[38] Zudem gilt es, für unterschiedliche Zelltypen verschiedene Latenzzeiten bei der Beurteilung des jeweiligen Zellschadens zu beachten, um eine präzise Aussage formulieren zu können.[23, 38, 40]

Im Hippocampus ist es 24 Stunden nach SAB zwar möglich, einen neuronalen Zelluntergang mittels morphologischer und immunhistochemischer Techniken nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt ist der durch die Blutung hervorgerufene neuronale Zelltod allerdings nicht in seinem gesamten Ausmaß festzustellen.[103] Diese Beobachtung trifft insbesondere auf die hippocampale CA1-Region zu, welche im Rahmen dieser Arbeit für die histologische Auswertung des zellulären Schadens gewählt wurde.[60, 91] Um den neuronalen Hippocampusschaden in seiner Gesamtheit zu detektieren, bedarf es einiger Tage, was im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen konnte, da ein Überleben der Versuchstiere über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden nach SAB im Rahmen des Tierversuchsantrags nicht genehmigt worden war.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Natriumnitroprussid**

Die Pathophysiologie der SAB ist im Wesentlichen charakterisiert durch drei Formen der Ischämie, die im Verlauf der Erkrankung überschneidend auftreten können.[15, 123] Dabei unterscheidet sich die erste dieser drei Formen, die globale Ischämie, von den anderen darin, dass sie einer Therapie normalerweise nicht zugänglich ist. Dieser Umstand ist einerseits dem frühen Zeitpunkt geschuldet, zu dem dieser Perfusionsstillstand einsetzt und andererseits der kurzen Zeitspanne, in der die zerebrale Perfusion vollständig sistiert. Es muss allerdings angemerkt werden, dass nicht sämtliche Patienten einen kompletten Zirkulationsstillstand erleiden, sondern auch dieses frühe Ereignis eine Bandbreite aufweist, die individuelle Ausprägungen in Form

variabler Stärke zeigt. Hingegen sind sowohl die auf die initiale globale Ischämie folgende zerebrale Minderperfusion unterschiedlicher Ausprägung als auch eine erst Tage später bei einigen Patienten einsetzende ischämische Phase, die traditionell dem sekundären Vasospasmus zugeschrieben wurde, potentiell behandelbar. Die genannten drei Formen zerebraler Perfusionsstörungen lassen sich allerdings nicht nur anhand ihres zeitlichen Auftretens differenzieren, sondern auch hinsichtlich der ihnen zugrundeliegenden Pathophysiologie. Wesentlich für den Abfall oder sogar vollständigen Stillstand der zerebralen Perfusion direkt im Gefolge der Aneurysmaruptur ist ein deutlicher Anstieg des ICP mit Werten ähnlich dem mittleren arteriellen Blutdruck.[43] Kennzeichnend für diese Phase nach SAB ist deshalb ein bedeutender Abfall des CPP. Dieser ist abhängig von zwei Variablen, nämlich dem mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) und dem Hirndruck (ICP) ( $CPP = MABP - ICP$ ). Zu einer Regeneration der zerebralen Durchblutung kommt es bei sinkenden ICP-Werten, ein nur Sekunden bis Minuten andauernder Prozess.[123, 146] Doch obwohl sich sowohl der ICP als auch der CPP nach einigen Minuten kontinuierlich ihren Ausgangswerten annähern, bleibt die Hirndurchblutung eingeschränkt.[148] Da also keine parallele Entwicklung der Parameter ICP und CPP einerseits und der Hirndurchblutung andererseits festgestellt werden kann, muss die im Verlauf der Erkrankung weiterhin gestörte zerebrale Perfusion anderweitig verursacht sein. Bederson et al. waren es 1995, die experimentell in dem von ihnen neu eingeführten Fadenmodell der SAB diese Beobachtung machten und mit der Hypothese verknüpften, eine früh einsetzende Vasokonstriktion kleiner Gefäße könne wesentlich die anhaltende zerebrale Minderperfusion verursachen.[8] Diese These wurde seitdem in weiteren Arbeiten verschiedener Gruppen untermauert.[9, 35, 98, 136, 139, 148] Auch klinisch konnte bei SAB-Patienten während der operativen Aneurysmaversorgung die Beobachtung gemacht werden, dass kleine Arterien und Arteriolen früh im Verlauf der Erkrankung Vasospasmen aufweisen.[139] Diese Mikrovasospasmen zeichneten sich laut Uhl et al. dadurch aus, dass sie - im Gegensatz zum späten Vasospasmus größerer Gefäßstämme - weder angiographisch noch mittels transkranieller Dopplersonographie dargestellt werden konnten. Tierexperimentell fanden Friedrich et al. in einer Studie an Mäusen ein mit dieser Beobachtung kongruentes Bild vor. Sie zeigten, dass im Rahmen der anhaltenden zerebralen Minderperfusion zunächst die Konstriktion von Arteriolen

steht. Diese Vasokonstriktion bewirkt ihrerseits die Bildung von Mikrothromben, die den ischämischen Prozess weiter verstärken. Die Arbeitsgruppe machte in dieser Studie zudem die Beobachtung, dass die gezeigte Vasokonstriktion dort entstand, wo die Gefäße direkt mit Blut in Kontakt kamen. Auf Basis dieser Beobachtung wurde die Hypothese formuliert, dass Hämoglobin eine Rolle in der Pathogenese der Mikrovasospasmen spielen könne. Eine Ursache hierfür könne die Bindung und damit das Abfangen von NO in der Frühphase nach SAB sein.[35] Die klinische Relevanz der persistierenden zerebralen Durchblutungsstörung wurde kürzlich von Frontera et al. anhand einer prospektiven MRT-Studie verdeutlicht: Die Autoren berichten einen Zusammenhang zwischen der anhaltenden Minderperfusion und dem Outcome der Patienten. Eine früh einsetzende Ischämie war in dieser Studie ein Prädiktor für Tod oder spätere Behinderung im Alltag.[39] Es sind also keinesfalls nur die drohenden Spätkomplikationen Tage nach dem eigentlichen Ereignis, die das klinische Outcome des Patienten nachhaltig negativ beeinflussen können. Tatsächlich ereignet sich bereits in der akuten Phase nach SAB eine Vielzahl an pathophysiologischen Prozessen, die eine ischämische Schädigung des Hirngewebes hervorrufen kann. Diese bereits in der Frühphase einsetzenden Schädigungsmechanismen könnten zudem die bei einem Teil des Patientenkollektivs auftretenden Spätkomplikationen teilweise mitbedingen. Ob es sich nämlich hierbei um ein isoliertes Ereignis handelt, ist nicht geklärt.[15] Typischerweise ereignen sich sekundäre ischämische Komplikationen in der Spätphase der Erkrankung mit einer Latenz von 5 bis 14 Tagen nach der Blutung und betreffen 30 bis 40 Prozent der Patienten.[15, 104] Man hat diese späte Ischämie des Gehirns lange Zeit ausschließlich dem in den gleichen Zeitraum fallenden sekundären Vasospasmus größerer Gefäße zugeschrieben. Dieser ist allerdings bei deutlich mehr Patienten, nämlich ungefähr 70 Prozent, angiografisch nachweisbar.[15, 75] Da weitere Unklarheiten hinsichtlich des Auftretens eines arteriellen Vasospasmus und einer tatsächlichen Ischämie und Infarzierung von Hirngewebe bestehen, geht man inzwischen davon aus, dass zusätzliche pathophysiologische Mechanismen für eine spät auftretende Ischämie mit klinischer Verschlechterung des Patienten in Frage kommen müssen und es sich somit um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Wesentlich für die Entwicklung des Vasospasmus sollen Blutabbauprodukte im Subarachnoidalraum sein, die ihrerseits diverse Reaktionen, beispielsweise Entzündung oder Bildung freier

Radikale, induzieren sollen. Weiterhin nicht geklärt ist die Frage, welche zusätzlichen Faktoren bei der Genese einer ischämischen Infarzierung von Hirngewebe zum Tragen kommen. Diskutiert werden unter anderem Thrombenbildung, zusätzliche Spasmen kleiner Gefäße, Inflammation, freie Radikale, Cortical Spreading Depressions und eine gestörte Autoregulation des zerebralen Gefäßsystems.[15, 75] Aus klinischer Sicht ist zudem von besonderer Bedeutung, dass mit einer erfolgreichen Behandlung des sekundären Vasospasmus in den Gefäßstämmen der hirnversorgenden Gefäße bisher keine Verbesserung des Outcomes der betroffenen Patienten erzielt werden konnte.[31] Natriumnitroprussid zählt zu den NO-Donatoren. NO bewirkt über einen cGMP-abhängigen Weg eine Gefäßdilatation.[137] Intrazerebral wird NO von Synthasen im Gefäßendothel (eNOS) und in Neuronen (nNOS) produziert.[34, 95] Zusätzlich kann in Makrophagen und Gliazellen NO generiert werden.[41, 97] Die hierfür notwendige Synthase iNOS (inducible NOS) wird im Unterschied zu eNOS und nNOS erst auf bestimmte Reize hin exprimiert, beispielsweise in entzündetem Milieu. Vor allem das über eNOS produzierte NO spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der zerebralen Mikrozirkulation, und zwar besonders im Rahmen der Autoregulation.[41] Darüber hinaus beeinflusst es auch die Thrombozytenaggregation, wobei es als Thrombozyten-Inhibitor fungiert.[53, 70, 85, 138] Das in Neuronen gebildete NO soll als ein Faktor bei verstärkter Neuronenaktivität einen Anstieg des regionalen Blutflusses mitbewirken, was als Neurovascular Coupling bezeichnet wird.[41] Experimentell konnte gezeigt werden, dass die NO-Konzentration bereits frühzeitig nach Einsetzen einer SAB deutlich abnimmt und für mehrere Stunden reduziert bleibt.[125] Zudem sinkt der NO-Spiegel anscheinend besonders stark in solchen Hirnregionen, in denen vermehrt freies Hämoglobin auftritt. [35, 125] Dass ein NO-Mangel an der akuten Vasokonstriktion und damit der Minderperfusion von Hirngewebe zumindest teilweise Anteil haben könnte, zeigt weiterhin eine tierexperimentelle Studie an männlichen Sprague-Dawley Ratten von Sehba et al., in der die Gruppe einen protektiven Effekt eines NO-Donators auf die zerebrale Gefäßstruktur und -integrität und damit auf die Hirnperfusion nach Induktion einer SAB nachweist.[122] Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zur Neuroprotektion nach SAB durch Reduktion des anhaltenden Perfusionsdefizits der Akutphase legen nahe, dass ein NO-Mangel wesentlich an der zerebralen Minderperfusion beteiligt sein könnte. Denn in dieser experimentellen Untersuchung zeigte sich nach Gabe des NO-

Donators Natriumnitroprussid ein signifikanter Anstieg der zerebralen Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese positive Auswirkung des NO-Donators auf die zerebrale Perfusion ist umso bemerkenswerter, da der CPP im Vergleich zur Kontrollgruppe nach SAB deutlich vermindert war. Eine Erholung des CPP war in der mit Natriumnitroprussid behandelten Therapiegruppe geringer ausgeprägt als in der Kontrolle. Diese eingeschränkte Erholung des CPP wurde einerseits durch den ebenfalls reduzierten mittleren arteriellen Blutdruck (MABP), welcher der blutdrucksenkenden Wirkung von Natriumnitroprussid geschuldet ist, verursacht. Hinzu kommt ein in der Therapiegruppe leicht erhöhter und auf den durchblutungsfördernden Effekt der Substanz zurückzuführender ICP, sodass sich hier die Monro-Kellie-Doktrin realisiert. Denn laut dieser Hypothese bleibt die Summe aus Hirngewebe, Liquor und Blutvolumen bei intaktem Schädel konstant. Eine Zu- oder Abnahme einer dieser Komponenten muss also eine entsprechende Veränderung wenigstens einer der anderen Variablen nach sich ziehen. Tritt hingegen keine adäquate Reaktion ein, wirkt sich dies entsprechend auf den ICP aus.[84] Die signifikant bessere zerebrale Durchblutung über den aufgezeichneten Zeitraum von 180 Minuten äußerte sich klinisch in einem knapp besseren neurologischen Outcome, wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Das verbesserte neurologische Ergebnis der Tiere in der Natriumnitroprussid-Gruppe ließ sich sowohl histologisch in der H&E-Färbung als auch mittels Caspase-3-Färbung durch eine Reduktion des hippocampalen Schadens untermauern. Ob diese im Tierexperiment erzielte Zytoprotektion mit geringfügig vorhandener Auswirkung auf das klinische Outcome auch bei Menschen erreicht werden kann, sollte also geprüft werden. Hier ist vor allem auch das Zeitfenster zu bedenken, in dem die Gabe eines NO-Donators potenziell günstige Effekte erzielen kann. Die Infusion wurde in diesem Experiment 15 Minuten nach Induktion der SAB begonnen und für 3 Stunden fortgeführt. Je früher einer zerebralen Minderperfusion entgegengewirkt werden kann, desto besser sollte das Outcome des Patienten sein. Dies zeigt sich in den eher enttäuschenden Ergebnissen zur selektiven Therapie der zerebralen Minderperfusion in der Spätphase eindrucklich. Zudem ist bei Gabe eines NO-Donators zu bedenken, dass der vasodilatorische Faktor NO wahrscheinlich gerade in der Frühphase nach SAB reduziert ist.[119, 125] Eine verzögerte Gabe könnte sich also als wesentlich ineffektiver erweisen. Weiterhin ist nach einer geeigneten Kombinationstherapie zu

forschen. Denn die selektive Gabe eines NO-Donors kann nicht den Schaden sämtlicher in der Frühphase der SAB ablaufenden pathogenetischen Prozesse wirksam behandeln. Hier müssen verschiedene Schlüsselereignisse, die letztlich das Perfusionsdefizit bedingen, bedacht und möglichst effektiv behandelt werden. Bei der Wahl eines potenziellen Kombinationspartners für Natriumnitroprussid ist an seine blutdrucksenkende Wirkung zu denken. Substanzen, die ebenfalls eine blutdrucksenkende Eigenschaft haben und diese unerwünschte Wirkung weiter verstärken, sollten möglichst vermieden werden.

Zusammenfassend lässt sich also konstatieren, dass der klinische Einsatz von NO-Donatoren bei SAB-Patienten aus unterschiedlichen Gründen sinnvoll erscheint. Ein Aspekt ist der in dieser Arbeit gefundene positive Effekt auf das frühe Perfusionsdefizit. Hinzu kommt eine hier beobachtete neuroprotektive Wirkung der Substanz. Unabhängig davon zeichnen sich NO-Donatoren durch zwei Eigenschaften aus, die bei der symptomatischen Therapie von SAB-Patienten genutzt werden können. Dabei handelt es sich zum einen um den blutdrucksenden Effekt dieser Substanzklasse. Dieser erscheint - bedenkt man den häufig massiv erhöhten Blutdruck dieser Patienten unmittelbar nach der SAB - grundsätzlich hilfreich. Schließlich birgt ein deutlich erhöhter Blutdruck das Risiko in sich, eine erneute Blutung zu induzieren. Zum anderen wird für NO-Donatoren eine kardioprotektive Wirkung postuliert[13, 54], ein Umstand, der insbesondere bei SAB-Patienten positiv ins Gewicht fällt, da bei einem Teil der Erkrankten unterschiedliche Funktionsstörungen des Herzens beobachtet werden.[112, 141] Das Potential von NO-Donatoren für den klinischen Einsatz ist also aus unterschiedlichen Blickwinkeln heraus nicht zu unterschätzen.

## **4.2.2 Magnesiumsulfat**

Bei Magnesium handelt es sich um eine Substanz, der in der Forschung an zerebrovaskulären Erkrankungen als mögliches Therapeutikum einiges Potenzial zugeschrieben wurde. Die Hoffnung, Magnesium könne sich als wirksames Instrument zur Bekämpfung ischämischer Zustände erweisen, fußt auf dem breiten Wirkspektrum dieser Substanz. Wesentlich ist hier einerseits die vasodilatorische Komponente, die durch Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle an glatten Muskelzellen erzielt

wird.[2, 140, 152] Dieser dilatorische Effekt soll beispielsweise die bei einigen SAB-Patienten auftretenden Gefäßspasmen der Spätphase abschwächen können.[153] Zudem wirkt Magnesium hemmend auf die Thrombozytenaggregation.[26, 109, 140, 152] Neben diesem Ansatz zur Verbesserung der zerebralen Durchblutung ist Magnesium auch als potenziell neuroprotektives Agens für die Forschung von Interesse. Denn Magnesium hemmt nicht nur Kalziumkanäle an glatten Gefäßmuskelzellen, sondern ebenso neuronale prä- und postsynaptische Kalziumkanäle. So kann es einem Kalziumeinstrom in die Neuronen und einer vermehrten Sekretion exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat entgegenwirken.[17, 72, 140, 152] Beides hätte potenziell neurotoxische Auswirkungen.[22, 27, 68] Daneben wirkt es als Regulator des NMDA-Rezeptors, an dem es einer Überstimulierung durch Glutamat und damit einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle entgegenwirkt.[92] So kann Magnesium einer drohenden Exzitotoxizität im ischämischen Milieu vorbeugen.[99, 140] Neben seiner vielfältigen Wirkweise zeichnet sich Magnesium auch durch sein Sicherheitsprofil aus, das durch langjährigen klinischen Einsatz, beispielsweise in der Kardiologie oder der Geburtshilfe, empirisch belegt ist. An Nebenwirkungen treten bei unphysiologisch hoher Serumkonzentration Bradykardie und Hypotonie auf.[152] Die Gefahr einer solchen Akkumulation besteht insbesondere bei Menschen mit Niereninsuffizienz, da Magnesium fast ausschließlich über die Nieren ausgeschieden wird.

Zusammenfassend lässt sich also konstatieren, dass die Forschung an Magnesium als Baustein in der Therapie ischämischer Erkrankungen des Gehirns auf diversen Interaktionen der Substanz sowohl auf neuronaler als auch auf vaskulärer Ebene fußt.

Als Substanz, die beispielsweise nach ischämischem Schlaganfall oder SAB neuroprotektive Wirkung entfalten und sich auf diese Weise günstig auf das Outcome der Patienten auswirken soll, sollte sie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Erkrankung verabreicht werden. Ob sich die Einnahme von Magnesiumsulfat innerhalb eines Zeitfensters von zwei Stunden nach Symptombeginn bei Schlaganfallpatienten günstig auf deren Outcome auswirkt, wurde kürzlich in einer groß angelegten Multicenter-Studie untersucht. Die These der Autoren lautete vorab, dass Patienten, bei denen zu diesem frühen Zeitpunkt eine Magnesiumtherapie initiiert wurde, im Vergleich zur Placebogruppe ein verbessertes klinisches Outcome zeigen würden. Diese Vermutung bestätigte sich allerdings nicht. Die 857 Patienten innerhalb des

Magnesiumarms wiesen nach 90 Tagen kein signifikant besseres Outcome auf. Dieses enttäuschende Ergebnis sei möglicherweise auf eine trotz der frühen Gabe verzögerte Anreicherung im ischämischen Gebiet zurückzuführen, gaben die Autoren zu bedenken. Denn die Passage der Blut-Hirn-Schranke erfolge nur zeitverzögert. Zudem sei Magnesium als alleiniges potenziell neuroprotektiv wirksames Therapeutikum möglicherweise nicht effektiv genug. Weitere Wege der Neuroprotektion müssten beschritten werden.[114] Ein ähnlich enttäuschendes Ergebnis erbrachte eine Phase-3-Studie zur Verbesserung des klinischen Outcomes nach SAB durch Gabe von Magnesiumsulfat. Von insgesamt 1204 Patienten mit aneurysmatischer SAB erhielten 606 Patienten Magnesiumsulfat in einer täglichen Dosierung von 64 mmol, 597 Patienten ein Placebopräparat. Die Gabe begann bei Klinikaufnahme, spätestens aber am vierten Tag nach der Blutung. Auch hier fanden die Autoren der Studie kein verbessertes Outcome der Patienten im Magnesiumarm verglichen mit der Placebogruppe.[28] Eine ähnlich konzipierte Phase-3-Studie mit einer allerdings deutlich geringeren Anzahl an Teilnehmern erbrachte das gleiche Ergebnis.[156]

Auch die eigenen Ergebnisse legen nahe, dass eine alleinige Gabe von Magnesiumsulfat nicht ausreichend ist, um das nach SAB bestehende zerebrale Perfusionsdefizit wesentlich zu beeinflussen. In dieser Arbeit konnte hinsichtlich der anhaltenden Minderperfusion in der Frühphase der SAB kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und denen im Magnesiumarm festgestellt werden. Die selektive Gabe von Magnesiumsulfat scheint die der Vasokonstriktion zugrunde liegenden Prozesse nicht maßgeblich beeinflussen zu können. Auch der hemmende Einfluss auf die Thrombozytenaggregation scheint sich nicht erheblich im Sinne einer verminderten Thrombenbildung in konstringierten Gefäßen zu manifestieren. Dies könnte, hypothetisch betrachtet, einer Aggravation ischämischer Zustände in minderperfundierte Hirnregionen entgegenwirken. Grundsätzlich scheint eine Kombinationstherapie bestehend aus Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten bei einer so komplexen Pathophysiologie wie sie der SAB zugrunde liegt am sinnvollsten. Magnesiumsulfat hier jegliches Potenzial als Kombinationspartner abzuspüren scheint aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in der Forschung verfrüht. Gerade die zusätzliche Gabe von Nimodipin aber, ebenfalls ein Kalziumantagonist, scheint daher eine nicht ratsame Kombination. In beiden vorbezeichneten klinischen

Phase-3-Studien zum Outcome nach SAB bei Gabe von Magnesiumsulfat erhielten die Patienten allerdings zusätzlich Nimodipin. Einen additiven Effekt dieser Therapie sollte man nicht erwarten, handelt es sich doch schließlich sowohl bei Magnesiumsulfat als auch bei Nimodipin um Kalziumantagonisten.[151] Aus pharmakologischer Sicht erfolgsversprechender erscheint da eine Substanz mit nicht identischem Angriffspunkt, was gleichzeitig das Risiko von Nebenwirkungen minimieren würde. Obwohl also umfangreiche klinische Studien mit enttäuschendem Ergebnis zur Effektivität einer Magnesiumsulfat-Gabe bei ischämischen Erkrankungen des ZNS, beispielsweise SAB und Schlaganfall, existieren, ist die Studienlage zu diesem Thema nicht eindeutig. Ebenso sind Arbeiten publiziert worden, die einen antiischämischen und neuroprotektiven Effekt einer Magnesiumtherapie bei SAB zeigen.[147, 153] In einer klinischen Studie mit der Fragestellung, ob eine prophylaktische Gabe von Magnesium bei SAB-Patienten geeignet ist, verzögert auftretenden Ischämien und Infarkten vorzubeugen, fand sich ein signifikant geringeres Auftreten sowohl an sekundären Vasospasmen als auch an Infarkten. Die Arbeitsgruppe konstatierte eine erhöhte Ischämietoleranz bei Patienten der Verumgruppe, die sich allerdings nicht signifikant auf das klinische Outcome oder die Mortalität nach 6 Monaten auswirkte.[153] Die bisher unternommenen klinischen und experimentellen Untersuchungen zur Magnesiumtherapie bei SAB behandeln allerdings im Wesentlichen die Auswirkungen einer solchen Gabe auf den sekundären Vasospasmus. Der Einfluss einer frühen Magnesiumgabe auf die akut ablaufenden Schädigungsmechanismen, insbesondere auf die der Minderperfusion und neuronalen Schädigung zugrundeliegenden Prozesse, ist hingegen nicht hinlänglich geklärt. Relevant für eine solche Erforschung der potentiell neuroprotektiven Wirkung von Magnesiumsulfat bei früher Infusion der Substanz ist insbesondere auch die gewählte Dosierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde den 12 Tieren des Magnesiumarms 15 Minuten nach Auslösung der SAB zur Aufsättigung des Serumspiegels 1 mmol/kg über einen Zeitraum von 15 Minuten intravenös verabreicht, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von 0,5 mmol/kg/min über den gesamten weiteren Versuchsverlauf hinweg. Diese Dosis wurde gewählt, um eine möglichst hohe Serumkonzentration zu gewährleisten, die gleichzeitig ein möglichst geringes Risiko in sich birgt, Schwankungen und insbesondere ein Absinken des Blutdrucks zu bewirken. Denn Auswirkungen dieser Art auf den Blutdruck hätten das Ergebnis des Experiments

massiv beeinflussen können. Dies zeigt eine intravenöse Dosisvergleichsstudie, die sich der Frage widmete, welche Dosis Magnesiumsulfat am effektivsten den neuronalen Schaden bei transienter zerebraler Ischämie reduzieren kann.[154] Bei dieser tierexperimentellen Studie wurden Ratten in vier Gruppen randomisiert, wovon es sich bei einer dieser Gruppe um die Kontrolle handelte. Dem Fadenokklusionsmodell entsprechend wurde den Tieren im Rahmen dieser Studie über einen Zeitraum von 90 Minuten die A. cerebri media verschlossen und die Wirkung unterschiedlicher Serumspiegel von Magnesiumsulfat auf das neurologische Outcome getestet. Als Fazit ihrer Studie stellten die Autoren fest, dass ein Serumspiegel zwischen 2,0 und 3,0 mmol/l das beste Ergebnis erzielte. Eine optimale Dosierung müsse so austariert werden, dass eine kontinuierliche und stabile Serumkonzentration bestehe, die dabei nicht ein zu hohes Niveau erreiche, das dann wiederum die Effektivität der Therapie durch Schwankungen oder Absinken des Blutdrucks beeinträchtigen oder sogar ins Negative verkehren könne. Dosislimitierend sei also ein aus Serumspiegeln oberhalb von 3 mmol/l resultierender schwankender arterieller Blutdruck, der das Infarktvolumen seinerseits sogar vergrößern könne.[154]

Die in der eigenen Arbeit erzielten Ergebnisse zum neuroprotektiven Potential einer Magnesiumgabe in der Frühphase nach SAB weisen auf eine möglicherweise gegebene Wirksamkeit dieses Ansatzes hin. In der histologischen Auswertung fanden sich bei den mit Magnesium behandelten Tieren signifikant weniger geschädigte Neurone in der untersuchten CA1-Region im Hippocampus als bei den Tieren der Kontrollgruppe. In diesem Zusammenhang muss allerdings auf die geringe Fallzahl von 12 Tieren im Magnesiumarm verwiesen werden, die mit einer Kontrolle von 10 Tieren verglichen wurden. Diese geringe Anzahl an Tieren schränkt die Aussagekraft dieser tierexperimentellen Studie ein, Auf Basis der so erhobenen Daten lässt sich ein neuroprotektiver Effekt von Magnesiumsulfat jedoch vermuten. Die Konsequenz ist, dass die hier suggerierte Neuroprotektion der gewählten Therapie mit einer deutlich höheren Fallzahl erneut geprüft werden müsste, um eine valide Aussage treffen zu können. Da keine die Perfusion optimierende Wirkung von Magnesiumsulfat festgestellt werden konnte, drängt sich die Frage nach den der potentiellen Neuroprotektion zugrundeliegenden Mechanismen umso mehr auf. Hinzu kommt, dass die mit Magnesiumsulfat behandelten Tiere bei der Testung des klinischen Outcomes

nicht signifikant besser abschnitten als die Kontrolltiere. Wie bereits oben dargelegt, weist Magnesium einen Kalziumantagonismus auf, der auf vielfältige Weise in Prozesse eingreifen kann, die sich potentiell schädigend auf Neurone auswirken können, sodass man -unter der Prämisse, dass tatsächlich ein neuroprotektiver Effekt besteht- ein Zusammenwirken dieser Mechanismen als denkbar betrachten könnte. Schließlich wirkt sich ein postischämisch auftretender Überschuss an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen toxisch auf Zellen, konkret auch Neuronen aus, was bereits in der Einleitung besprochen wurde. Hypothetisch könnte der gefundene neuroprotektive Effekt also beispielsweise auch durch einen im Vergleich zur Kontrolle reduzierten postischämischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Neuronen erklärt werden. Ebenso ist hier an den antiglutamatergen Effekt von Magnesium zu denken, den die Substanz als Regulator am NMDA-Rezeptor entfaltet. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass diese Arbeit einen neuroprotektiven Effekt von Magnesiumsulfat bei früher Gabe zwar nahelegt, diese Beobachtung aber auf Basis einer größer angelegten Studie überprüft werden müsste. Ebenso müsste –ließe sich dieses Ergebnis bestätigen- der konkrete Wirkmechanismus der Substanz, der in der frühen Phase nach SAB zu diesem Resultat geführt hat, weiter erforscht werden.

Ein verbessertes klinisches Outcome bei SAB-Patienten nach Magnesiumtherapie konnte bisher weder in klinischen Studien noch in dieser experimentellen Arbeit gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnte die oben angesprochene verspätete Anreicherung von Magnesium im ischämischen Milieu sein. Je größer die Zeitverzögerung desto geringer die potenziell erzielbare Wirkung auf Minderperfusion und neuronale Schädigung, eine Beobachtung, die Fragen nach der Praktikabilität einer Magnesiumtherapie aufwirft. Denn häufig gelangen sowohl SAB- als auch Schlaganfallpatienten erst verspätet in die Klinik. Die zu der Thematik des optimalen Therapiebeginns existierende Literatur legt indes nahe, dass eine präischämische Gabe – wenn möglich - im Hinblick auf die Neuroprotektion favorisiert werden sollte.[152, 153] Weiterhin muss bedacht werden, dass ein einziger therapeutischer Ansatz bei komplexen pathophysiologischen Abläufen nicht ausreichend sein kann, um effektiv auf sämtlichen Ebenen die Schädigungsmechanismen zu unterbinden oder abzuschwächen. Selbst eine Substanz wie Magnesium, der diverse neuroprotektive und antiischämische Wirkweisen zugesprochen werden, kann dies nicht leisten. Das klinische Outcome der Patienten ist offensichtlich von zu vielen Variablen abhängig, insbesondere vom neurologischen

Aufnahmestatus und der Intensität der frühen Ischämie,[39] sodass eine Kombinationstherapie auch aus diesem Blickwinkel heraus sinnvoll erscheint.

Zusammenfassend lässt sich auf Basis der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konstatieren, dass eine Magnesiumtherapie in der Frühphase der experimentellen SAB zwar einen zellprotektiven Effekt in selektiv vulnerablen Arealen des Hippocampus zeigen konnte, dass dieser aber offensichtlich zu gering ist um das neurologische Outcome günstig zu beeinflussen. Zudem wurde hier keine Verbesserung der zerebralen Minderperfusion im Magnesiumarm im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt.

### 4.2.3 Clazosentan

Clazosentan zählt zu den Endothelinantagonisten. Ihre Wirkweise entfaltet die Substanz über eine selektive ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockade.[78, 143] Dieser Rezeptor vermittelt, wie bereits in der Einleitung dargestellt, den stark vasokonstriktorischen Effekt von ET-1.[48] Auf diesem Mechanismus soll die sowohl experimentell als auch klinisch gezeigte spasmolytische Wirkung von Clazosentan basieren.[79, 143] Das Nebenwirkungsspektrum von Clazosentan umfasst als wesentliche unter einer Therapie auftretende Komplikationen Pneumonie, Lungenödem und Hypotonie.[76]

Es wurden in der Vergangenheit bereits klinische Studien zur Evaluierung der Wirksamkeit von Clazosentan im Hinblick auf seinen antiischämischen und damit potenziell günstigen Effekt auf Parameter wie Mortalität, Morbidität und klinisches Outcome unternommen. „Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1)“[79], eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie, wurde konzipiert, um das therapeutische Potenzial von Clazosentan bei der Behandlung des sekundären Vasospasmus zu untersuchen. Hierzu wurden drei unterschiedliche Dosierungen von Clazosentan getestet, nämlich 1,0 mg/h, 5,0 mg/h und 15,0 mg/h intravenös. Das für diese Studie selektierte Patientenkollektiv setzte sich aus SAB-Patienten zusammen, deren Blutung zuvor bereits mittels Coiling oder Clipping behandelt worden war. Je nach Randomisierung erhielten diese Patienten intravenös entweder ein Plazebopräparat oder eine der drei Dosierungen von Clazosentan für jeweils 14 Tage nach SAB. Die Infusion erfolgte dabei spätestens 56 Stunden nach Einsetzen der Blutung. Als primären

Endpunkt definierten die Studienautoren einen angiographisch sichtbaren Vasospasmus. Zusätzlich wurde als wichtigster sekundärer Endpunkt der gemischte Endpunkt Morbidität/Mortalität 6 Wochen nach SAB festgelegt. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Clazosentan-Infusion in sämtlichen verwendeten Dosierungen eine statistisch signifikante Reduktion von Häufigkeit und Schweregrad eines angiographisch darstellbaren Vasospasmus erzielte. Die Wirkstärke korrelierte hierbei mit der Höhe der Dosis: die Maximaldosis von 15, 0 mg/h zeigte auch den stärksten spasmolytischen Effekt. Was die Morbidität und die Mortalität der mit Clazosentan behandelten Patienten anbelangte, konnte das Signifikanzniveau allerdings nicht erreicht werden. Lediglich ein Trend zum reduzierten Auftreten von Morbidität und Mortalität wurde festgestellt. Dieses leicht bessere Ergebnis in der Clazosentan-Gruppe wurde von den Autoren vornehmlich auf ein reduziertes Auftreten Vasospasmus-assoziiierter Infarkte zurückgeführt. Das klinische Outcome, eingeschätzt anhand der Glasgow Outcome Score extended (GOSE), zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Zusammenfassend schlossen die Autoren aus dieser Studie, dass ET-1 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des sekundären Vasospasmus zukommen müsse. Basierend auf CONSCIOUS-1 wurden daher zwei Nachfolgestudien entwickelt, um konkreter zu untersuchen, welchen Effekt eine Clazosentan-Gabe auf die Vasospasmus-assoziierte Morbidität und Mortalität und das klinische Outcome von Patienten mit aneurysmatischer SAB hat. Diese CONSCIOUS-2 (Randomised trial of Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing surgical clipping)[77] und CONSCIOUS-3 (Randomized trial of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing endovascular coiling)[78] getauften Studien untersuchten nun den Einfluss von Clazosentan auf die Vasospasmus-assoziierte Morbidität und Mortalität sowie das klinische Outcome von Patienten mit aneurysmatischer SAB. Patienten, deren Blutung mittels Clipping behandelt worden war, wurden dabei getrennt von solchen, die sich einem Coiling unterzogen hatten, betrachtet. Im Rahmen der CONSCIOUS-2-Studie erhielten die geclippten Patienten je nach Randomisierung entweder ein Placebopräparat oder Clazosentan in einer Dosis von 5,0 mg/h intravenös. In der grundsätzlich ähnlich aufgebauten CONSCIOUS-3-Studie bekamen die gecoilten Patienten entweder ein

Plazoboppräparat oder Clazosentan in einer Dosis von 5,0 mg/h oder 15,0 mg/h intravenös für 14 Tage nach SAB. Mit Clazosentan in einer Dosis von 5,0 mg/h konnte weder in CONSCIOUS-2 noch in CONSCIOUS-3 eine signifikante Reduktion der Vasospasmus-assoziierten Morbidität und Mortalität sowie des klinischen Outcomes erzielt werden. Die in CONSCIOUS-3 zusätzlich untersuchte Dosis von 15,0 mg/h wirkte sich hingegen statistisch signifikant auf den primären Endpunkt Morbidität/Mortalität 6 Wochen nach SAB aus. Trotz dieses Ergebnisses war das nach 12 Wochen anhand des GOSE untersuchte klinische Outcome dieser Subgruppe nicht signifikant besser als das der übrigen Patienten. Ursachen für dieses daher enttäuschende Ergebnis vermuteten die Autoren der Studie in einer sich möglicherweise ungünstig auswirkenden Interaktion zwischen Clazosentan und dem Kalziumantagonisten Nimodipin, der standardmäßig verabreicht wurde und wie Clazosentan mit Hypotonie assoziiert ist. Zudem bemängeln die Autoren eine zu geringe Patientenzahl und eine damit eingeschränkte statistische Aussagekraft der CONSCIOUS-3-Studie, was dazu geführt haben könnte, dass die potentiell gegebene günstige Wirkung der Substanz in einer Dosierung von 15 mg/h auf das klinische Outcome nicht wiedergespiegelt würde. Einen weiteren Erklärungsansatz stellt der bisher mangelhaft erforschte Effekt der Substanz auf zusätzliche zentral an der Pathogenese und dem klinischen Outcome beteiligten Prozessen dar. Ob und in welchem Ausmaß eine Clazosentan-Gabe die weiteren diversen Schädigungsmechanismen beeinflussen kann, ist fraglich.[78]

Auch der bereits in der Einleitung angesprochene Cross-Talk zwischen dem ET<sub>A</sub>- und dem ET<sub>B</sub>-Rezeptor wird als ein sich negativ auf die Wirkung des selektiven ET<sub>A</sub>-Blockers Clazosentan auswirkendes Moment diskutiert.[4, 45, 107] Die kombinierte Gabe von ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptorblockern könnte sich, zumindest bei einem noch weiter zu spezifizierenden Patientenkollektiv, als effektivere Variante erweisen als die reine ET<sub>A</sub>-Blockade.[4] Es ist die Hypothese aufgestellt worden, dass eine Subgruppe von Patienten mit besonders stark ausgeprägtem Vasospasmus nach SAB beide Rezeptortypen exprimiert, die dann im Zusammenspiel den vasokonstriktorisches Effekt von ET-1 vermitteln könnten.[4, 45] Diese These bleibt allerdings noch intensiv zu untersuchen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Clazosentan zwar in den besprochenen klinischen sowie in diversen experimentellen Studien eine signifikante Reduktion sekundärer Vasospasmen bedingt hat, aber weder klinisch noch experimentell eine Verbesserung des klinischen Outcomes gezeigt werden konnte, wie Metaanalysen belegen.[64, 145] Obwohl also die Auswirkungen der Substanz auf den große zerebrale Gefäße betreffenden sekundären Vasospasmus bereits eingehend erforscht sind und sich hier durchgehend ein spasmolytischer Effekt erwiesen hat, ist die Wirkung von Clazosentan auf die Mikrozirkulation sowie die bereits in der Akutphase beginnende Minderperfusion bisher nicht in gleicher Intensität untersucht worden. Genannt werden kann allerdings eine tierexperimentelle Studie an Ratten von Schubert et al.[116], in der die Wirkung einer prophylaktischen Clazosentan-Infusion auf die zerebrale Minderperfusion der Frühphase nach SAB untersucht wurde. In dieser Studie konnte der akut auftretenden Perfusionsstörung durch Clazosentan-Gabe erfolgreich vorgebeugt werden. Im Vergleich zur Kontrolle konnte durch eine initiale Bolusgabe von 1,0 mg/kg Körpergewicht 30 Minuten vor Induktion der Blutung sowie eine Erhaltungsdosis von 1,0 mg/kg Körpergewicht/h die akute Vasokonstriktion signifikant reduziert werden. Dieser Effekt manifestierte sich in der Erholung des zerebralen Blutflusses nach SAB. Während die Tiere der Kontrollgruppe noch eine Stunde nach Induktion der SAB eine im Vergleich zum Ausgangswert eingeschränkte zerebrale Durchblutung aufwiesen, war der zerebrale Blutfluss bei den mit Clazosentan behandelten Tieren bereits nach wenigen Minuten wieder auf dem Ausgangsniveau angelangt. Auf Basis dieser Ergebnisse äußerten die Studienautoren die Hypothese, dass ET-1 bereits in der Frühphase nach SAB in die Pathophysiologie der zerebralen Minderperfusion involviert ist und nicht erst zeitverzögert Anteil am sekundären Vasospasmus trägt. Das Zeitfenster, in dem nach SAB eine ET-1-Sekretion stattfindet, bleibt allerdings noch deutlich genauer zu spezifizieren. Zudem muss der Einfluss dieses potenten Vasokonstriktors auf die komplexe Pathophysiologie insbesondere in der Frühphase konkretisiert werden, um therapeutische Konsequenzen ableiten zu können.

Der in der eigenen Arbeit beobachtete Einfluss von Clazosentan auf das früh nach SAB auftretende Perfusionsdefizit ähnelt den bereits von Schubert et al.[116] erzielten Ergebnissen zur Wirkung von Clazosentan auf die frühe Minderperfusion. Sowohl bei

der eigenen Arbeit als auch bei der von Schubert et al. publizierten Studie handelt es sich um experimentelle Arbeiten, die am Tiermodell durchgeführt wurden. Während in der eigenen Arbeit allerdings das Fadenmodell angewandt wurde, lösten Schubert et al. die SAB nach dem Injektionsmodell aus. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Arbeiten in dem Zeitpunkt der Clazosentan-Infusion: in der vorliegenden Arbeit wurde Clazosentan 15 Minuten nach Auslösung der Blutung injiziert, bei Schubert et al. bereits 30 Minuten vor Einsetzen der SAB. Relevant ist ebenso die Tatsache, dass in der eigenen Arbeit drei unterschiedliche Dosierungen untersucht wurden, nämlich 0,1 µg, 1,0 µg und 10 µg. Schubert et al. konnten mit einem initialen Bolus von 1,0 mg/kg Körpergewicht und einer Erhaltungsdosis von 1,0 mg/kg Körpergewicht/h einen statistisch signifikanten Anstieg der zerebralen Perfusion erzielen. In der eigenen Arbeit wurde beobachtet, dass die verwendete Höchstdosis von 10,0 µg Clazosentan verglichen mit der Kontrolle das Ausmaß der zerebralen Minderperfusion besonders deutlich, allerdings nicht signifikant, reduzierte. Zwar lassen auch die beiden weiteren verwendeten Dosierungen von 0,1 µg und 1,0 µg Clazosentan einen Trend zur verbesserten Hirndurchblutung nach SAB erkennen. Das Signifikanzniveau konnte allerdings nicht erreicht werden. Der Schluss, den die in dieser Arbeit erhobenen Daten also nahelegen, ist, dass eine Gabe des ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten Clazosentan die zerebrale Perfusion in der frühen Phase nach SAB grundsätzlich positiv beeinflussen kann. Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass die Anzahl an Tieren sowohl in den mit Clazosentan behandelten Gruppen als auch in der Kontrollgruppe offensichtlich zu gering war, um diesen Trend statistisch zu untermauern. Der Vergleich der eigenen Arbeit mit der von Schubert et al. publizierten Studie weist zudem auf die Wichtigkeit hin, weiterführende Untersuchungen zu Zeitraum und Dosierung der Clazosentan-Gabe zu unternehmen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zudem darauf hin, dass eine weitere Erforschung von Wirkintensität und –wirkweise der Substanz Clazosentan in der frühen Phase nach SAB ein lohnenswerter Ansatz sein könnte, um ein breiteres Spektrum an Therapiemöglichkeiten für SAB-Patienten zur Verfügung zu haben. Relevant bei der Reflexion der eigenen Ergebnisse ist auch, dass die Kontrolltiere bei der Evaluierung des klinischen Outcomes schlechter abschnitten als die mit Clazosentan behandelten Tiere. Das Signifikanzniveau wurde allerdings wiederum nicht erreicht. Dieses Ergebnis

legt nahe, dass eine in der Frühphase nach SAB begonnene Therapie, die der frühen Minderperfusion effektiv entgegenwirken kann, tatsächlich ein verbessertes klinisches Outcome mit sich bringen kann. Eine erst deutlich später im Verlauf der Erkrankung begonnene Therapie des zerebralen Perfusionsdefizits könnte hingegen nicht mehr geeignet sein, die Patienten entsprechend vor den bereits angesprochenen Spätfolgen und -komplikationen zu schützen. Auch die zur potenziell neuroprotektiven Wirkung von Clazosentan erhobenen Daten deuten auf einen Nutzen der Substanz für die Behandlung von SAB-Patienten in der Frühphase hin. In der H&E-Färbung zeigte sich nämlich, dass eine Clazosentan-Gabe in sämtlichen gewählten Dosierungen ein signifikant besseres Ergebnis hinsichtlich des neuronalen Schadens erbrachte als dies in der Kontrolle beobachtet wurde. Die Diskrepanz zwischen der nur geringen, und nur in der Hochdosisgruppe signifikanten Erhöhung der Hirndurchblutung und der durch Clazosentan bewirkten Zellprotektion in allen Therapiegruppen kann letztlich durch diese Studie nicht endgültig geklärt werden. Die geringe Tierzahl in dieser Serie ist sicherlich kritisch zu diskutieren, eine Erhöhung der Tierzahl würde die Unterschiede zur Kontrollgruppe möglicherweise nivellieren. Allerdings ist der neuronale Schaden in dieser Kontrollgruppe vergleichbar mit den Kontrollgruppen der anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kontrollgruppen und auch mit den Kontrollgruppen anderer Versuchsprojekte der Arbeitsgruppe. Eine primär zellprotektive Eigenschaft, vergleichbar etwa mit Magnesiumsulfat, welches den neuronalen Calciumeinstrom über NMDA-Rezeptoren hemmen kann, ist bei Clazosentan nicht zu vermuten. Die Rezeptorbestückung ist relativ gut untersucht. Hierbei handelt es sich um vaskuläre Rezeptoren. Allerdings wäre möglich, dass die komplette durchblutungssteigernde Wirkung des Endothelin-Antagonisten nicht bereits unmittelbar nach Beginn der Infusion eintritt, sondern erst in einer späteren Phase. Auch in der Hochdosisgruppe zeigt sich erst nach 120 Minuten eine Verbesserung der Hirndurchblutung, die dann im Vergleich zur Kontrollgruppe weiter zunimmt (Abbildung 23), so dass eine Verlängerung der Monitoringzeit vielleicht auch in den anderen beiden Therapiegruppen einen noch deutlicheren Unterschied hätte zeigen können. Noch weitere, nachhaltigere Wirkungen von Endothelin-Antagonisten sind denkbar, die neuroprotektiv wirken könnten, aber keinen durchblutungsfördernden Effekt in der Frühphase zeigen. Hier ist insbesondere an die kapilläre bzw. mikrovaskuläre

Permeabilität zu denken und den interstitiellen Wasseraustritt, die durch eine Überexpression von Endothelin-1 gefördert werden. [74]

Falls sich die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse anhand größerer Fallzahlen reproduzieren ließen, könnte man zudem weitere Studien ansetzen, die sich mit der Frage eines geeigneten Kombinationspartners für Clazosentan in der Frühphase nach SAB befassen. Hier böte sich beispielsweise der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersuchte NO-Donator Natriumnitroprussid an, dessen Effekt auf Perfusion und Neuroprotektion weiter oben diskutiert wird.

Zusammenfassend lässt sich also auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Daten feststellen, dass eine bereits in der akuten Phase nach der Blutung begonnene Clazosentan-Gabe geeignet sein könnte, dem zerebralen Perfusionsdefizit entgegenzuwirken und sich dabei in einer merklichen Verbesserung des klinischen Outcomes zu manifestieren. Dieser positive Einfluss auf die zerebrale Perfusion spiegelte sich in dieser Arbeit in einer neuroprotektiven Wirkung wider. Die Konsequenz wäre eine klinische Erprobung der Substanz im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes, um eine wirksame Therapie der SAB in der Frühphase etablieren zu können.

# **5 Zusammenfassung**

Ausgehend von der Hypothese, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen aus pathophysiologischen Überlegungen dem in der Frühphase nach SAB auftretenden Perfusionsdefizit entgegenwirken und neuroprotektive Wirkung entfalten können, hat diese Arbeit das Ziel verfolgt, konkrete Therapieansätze zu entwickeln, die für die Behandlung der frühen Durchblutungsstörung nach einer SAB geeignet sein könnten. Ebenso sollte das neuroprotektive Potenzial dieser Substanzen, bei denen es sich um klinisch bereits getestete Medikamente handelt, evaluiert werden. Hierzu wurden drei Versuchsreihen unternommen, die folgende Ergebnisse erbrachten:

Die Gabe des NO-Donators Natriumnitroprussid erwies sich als die zerebrale Perfusion in der Frühphase nach SAB signifikant steigend. Damit einhergehend zeigte sich eine signifikante Reduktion der neuronalen Schädigung im Hippocampus. Insgesamt legt diese Arbeit also das therapeutische Potential dieser Substanz für die Frühphase nach SAB nahe.

Für Magnesium konnte im Rahmen dieser Arbeit kein perfusionssteigernder Effekt festgestellt werden. Die hier erhobenen Daten weisen allerdings auf ein mögliches neuroprotektives Potential dieser Substanz hin, sodass weitere Studien größeren Umfangs angestrebt werden sollten, um eine neuroprotektive Wirkung verifizieren zu können.

Von dem  $ET_A$ -Antagonisten Clazosentan wurden drei Dosierungen auf ihr neuroprotektives und perfusionssteigerndes Potential hin getestet. Hinsichtlich des perfusionssteigernden Effektes erwies sich die Maximaldosis zwar als deutlich überlegen, verfehlte jedoch zu den Zeitpunkten 120, 150 und 180 Minuten nach SAB knapp das Signifikanzniveau. Ein neuroprotektives Potential kann auf Grundlage einer knappen Signifikanz in der H&E-Färbung vermutet, aber nicht sicher konstatiert, werden.

Das Ziel dieses größer angelegten Projekts ist die Entwicklung einer Kombinationstherapie aus unterschiedlichen Methoden und Medikamenten. Basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen kommen von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen insbesondere der NO-Donator Natriumnitroprussid, aber auch der  $ET_A$ -Antagonist Clazosentan in Frage. Als mögliche Kombinationspartner könnten Prostazyklin-Agonisten oder Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt werden.

Daneben sind die Anwendung einer moderaten Hypothermie sowie die Gabe hyperonkotischer Lösungen therapeutische Ansätze, die im weiteren Verlauf dieses Projekts untersucht werden.

# 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Synthese von ET-1 als Reaktion auf Ischämie (nach Suhardja)[135] .....	4
Abbildung 2 Exzitotoxische Schädigung von Neuronen .....	12
Abbildung 3 Beispielhafter Vergleich makroskopischer Blutungsausmaße .....	23
Abbildung 4 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) Kontrolle vs. Nitroprussid .....	28
Abbildung 5 Intrakranieller Druck (ICP) Kontrolle vs. Nitroprussid.....	29
Abbildung 6 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) Kontrolle vs. Nitroprussid .....	30
Abbildung 7 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF) ipsilateral Kontrolle vs. Nitroprussid .....	31
Abbildung 8 Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) kontralateral Kontrolle vs. Nitroprussid.....	32
Abbildung 9 Aktivitätsscore Kontrolle vs. Nitroprussid .....	33
Abbildung 10 Histologischer Schaden (CA1-Feld) Kontrolle vs. Nitroprussid .....	34
Abbildung 11 Caspase-3 positive CA1-Zellen Kontrolle vs. Nitroprussid .....	35
Abbildung 12 Exemplarische Darstellung immunhistochemisch gefärbter CA-1-Schnitte.....	35
Abbildung 13 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) Kontrolle vs. Magnesium .....	36
Abbildung 14 Intrakranieller Druck (ICP) Kontrolle vs. Magnesium .....	37
Abbildung 15 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) Kontrolle vs. Magnesium .....	38
Abbildung 16 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF) ipsilateral Kontrolle vs. Magnesium .....	39
Abbildung 17 Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) kontralateral Kontrolle vs. Magnesium.....	40
Abbildung 18 Aktivitätsscore Kontrolle vs. Magnesium .....	41
Abbildung 19 Histologischer Schaden (CA1-Feld) Kontrolle vs. Magnesium .....	42
Abbildung 20 Caspase-3 positive CA1-Zellen Kontrolle vs. Magnesium .....	43
Abbildung 21 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) Kontrolle vs. Clazosentan .....	44
Abbildung 22 Intrakranieller Druck (ICP) Kontrolle vs. Clazosentan .....	45
Abbildung 23 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) Kontrolle vs. Clazosentan .....	46
Abbildung 24 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF) ipsilateral Kontrolle vs. Clazosentan.....	47
Abbildung 25 Laser-Doppler Flowmetrie (LDF) kontralateral Kontrolle vs. Clazosentan .....	48
Abbildung 26 Aktivitätsscore Kontrolle vs. Clazosentan .....	49
Abbildung 27 Histologischer Schaden (CA1-Feld) Kontrolle vs. Clazosentan .....	51
Abbildung 28 Caspase-3 positive CA1-Zellen Kontrolle vs. Clazosentan .....	52

# 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Aktivitätsscore .....	22
Tabelle 2 modifizierter Bederson-Score.....	23

# 8 Literaturverzeichnis

- [1] Al-Khindi T, Macdonald R L and Schweizer T A 2010 Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage *Stroke; a journal of cerebral circulation* **41** e519-36
- [2] Altura B M, Altura B T, Carella A, Gebrewold A, Murakawa T and Nishio A 1987 Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup> interaction in contractility of vascular smooth muscle: Mg<sup>2+</sup> versus organic calcium channel blockers on myogenic tone and agonist-induced responsiveness of blood vessels *Canadian journal of physiology and pharmacology* **65** 729-45
- [3] Armstrong R C, Aja T J, Hoang K D, Gaur S, Bai X, Alnemri E S, Litwack G, Karanewsky D S, Fritz L C and Tomaselli K J 1997 Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17** 553-62
- [4] Assenzio B, Martin E L, Stankevicius E, Civiletti F, Fontanella M, Boccaletti R, Bernardino M, Mazzeo A, Ducati A, Simonsen U and Mascia L 2015 Cerebrospinal fluid from patients with subarachnoid haemorrhage and vasospasm enhances endothelin contraction in rat cerebral arteries *PloS one* **10** e0116456
- [5] Ayer R E and Zhang J H 2008 Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm *Acta neurochirurgica. Supplement* **104** 33-41
- [6] Barry K J, Gogjian M A and Stein B M 1979 Small animal model for investigation of subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm *Stroke; a journal of cerebral circulation* **10** 538-41
- [7] Barton M, Shaw S, d'Uscio L V, Moreau P and Luscher T F 1997 Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation *Biochemical and biophysical research communications* **238** 861-5
- [8] Bederson J B, Germano I M and Guarino L 1995 Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat *Stroke; a journal of cerebral circulation* **26** 1086-91; discussion 91-2
- [9] Bederson J B, Levy A L, Ding W H, Kahn R, DiPerna C A, Jenkins A L, 3rd and Vallabhajosyula P 1998 Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **42** 352-60; discussion 60-2
- [10] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, Nishimura M C, Davis R L and Bartkowski H 1986 Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination *Stroke; a journal of cerebral circulation* **17** 472-6
- [11] Behl C, Ziegler, C 2014 *Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease: Springer Briefs in Molecular Medicine*

- [12] Bernardi P 2013 The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in physiology* **4** 95
- [13] Borutaite V, Morkuniene R, Arandarcikaite O, Jekabsone A, Barauskaite J and Brown G C 2009 Nitric oxide protects the heart from ischemia-induced apoptosis and mitochondrial damage via protein kinase G mediated blockage of permeability transition and cytochrome c release *Journal of biomedical science* **16** 70
- [14] Broughton B R, Reutens D C and Sobey C G 2009 Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia *Stroke; a journal of cerebral circulation* **40** e331-9
- [15] Budohoski K P, Guilfoyle M, Helmy A, Huuskonen T, Czosnyka M, Kirollos R, Menon D K, Pickard J D and Kirkpatrick P J 2014 The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **85** 1343-53
- [16] Busto R, Dietrich W D, Globus M Y, Valdes I, Scheinberg P and Ginsberg M D 1987 Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **7** 729-38
- [17] Chang J J, Mack W J, Saver J L and Sanossian N 2014 Magnesium: potential roles in neurovascular disease *Frontiers in neurology* **5** 52
- [18] Chen S, Feng H, Sherchan P, Klebe D, Zhao G, Sun X, Zhang J, Tang J and Zhang J H 2014 Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage *Progress in neurobiology* **115** 64-91
- [19] Choi D W 1990 Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10** 2493-501
- [20] Clozel M, Gray G A, Breu V, Loffler B M and Osterwalder R 1992 The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo *Biochemical and biophysical research communications* **186** 867-73
- [21] Connolly E S, Jr., Rabinstein A A, Carhuapoma J R, Derdeyn C P, Dion J, Higashida R T, Hoh B L, Kirkness C J, Naidech A M, Ogilvy C S, Patel A B, Thompson B G and Vespa P 2012 Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association *Stroke; a journal of cerebral circulation* **43** 1711-37
- [22] Connolly N M and Prehn J H 2015 The metabolic response to excitotoxicity - lessons from single-cell imaging *Journal of bioenergetics and biomembranes* **47** 75-88
- [23] Corbett D and Nurse S 1998 The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia *Progress in neurobiology* **54** 531-48
- [24] Cossu G, Messerer M, Oddo M and Daniel R T 2014 To look beyond vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage *BioMed research international* **2014** 628597
- [25] Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M and Pulsinelli W 1989 Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **9** 589-96
- [26] Dong J F, Cruz M A, Aboulfatova K, Martin C, Choi H, Bergeron A L, Martini S R, Kroll M H and Kent T A 2008 Magnesium maintains endothelial integrity, up-regulates proteolysis of ultra-large von Willebrand factor, and reduces platelet aggregation under flow conditions *Thrombosis and haemostasis* **99** 586-93
- [27] Dong Z, Saikumar P, Weinberg J M and Venkatachalam M A 2006 Calcium in cell injury and death *Annual review of pathology* **1** 405-34

- [28] Dorhout Mees S M, Algra A, Vandertop W P, van Kooten F, Kuijsten H A, Boiten J, van Oostenbrugge R J, Al-Shahi Salman R, Lavados P M, Rinkel G J and van den Bergh W M 2012 Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): a randomised placebo-controlled trial *Lancet* **380** 44-9
- [29] Drachenberg C B, Ioffe O B and Papadimitriou J C 1997 Progressive increase of apoptosis in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma: comparison between in situ end-labeling of fragmented DNA and detection by routine hematoxylin-eosin staining *Archives of pathology & laboratory medicine* **121** 54-8
- [30] Dreier J P, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann T N, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings J A, Sakowitz O W, Seemann J H, Thieme A, Lauritzen M and Strong A J 2006 Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations *Brain : a journal of neurology* **129** 3224-37
- [31] Etmnan N, Vergouwen M D, Ildigwe D and Macdonald R L 2011 Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31** 1443-51
- [32] Feigin V L, Lawes C M, Bennett D A, Barker-Collo S L and Parag V 2009 Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review *The Lancet. Neurology* **8** 355-69
- [33] Fisher C M, Kistler J P and Davis J M 1980 Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning *Neurosurgery* **6** 1-9
- [34] Forstermann U and Sessa W C 2012 Nitric oxide synthases: regulation and function *European heart journal* **33** 829-37, 37a-37d
- [35] Friedrich B, Muller F, Feiler S, Scholler K and Plesnila N 2012 Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **32** 447-55
- [36] Friedrich V, Flores R, Muller A and Sehba F A 2010 Escape of intraluminal platelets into brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage *Neuroscience* **165** 968-75
- [37] Friedrich V, Flores R, Muller A and Sehba F A 2010 Luminal platelet aggregates in functional deficits in parenchymal vessels after subarachnoid hemorrhage *Brain research* **1354** 179-87
- [38] Friedrich V, Flores R and Sehba F A 2012 Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage *Neuroscience letters* **512** 6-11
- [39] Frontera J A, Ahmed W, Zach V, Jovine M, Tanenbaum L, Sehba F, Patel A, Bederson J B and Gordon E 2015 Acute ischaemia after subarachnoid haemorrhage, relationship with early brain injury and impact on outcome: a prospective quantitative MRI study *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **86** 71-8
- [40] Garcia J H, Liu K F and Ho K L 1995 Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex *Stroke; a journal of cerebral circulation* **26** 636-42; discussion 43
- [41] Garry P S, Ezra M, Rowland M J, Westbrook J and Pattinson K T 2015 The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside *Experimental neurology* **263** 235-43

- [42] Gonzalez-Perez A, Gaist D, Wallander M A, McFeat G and Garcia-Rodriguez L A 2013 Mortality after hemorrhagic stroke: data from general practice (The Health Improvement Network) *Neurology* **81** 559-65
- [43] Grote E and Hassler W 1988 The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **22** 654-61
- [44] Halestrap A P 2006 Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die *Biochemical Society transactions* **34** 232-7
- [45] Hansen-Schwartz J 2004 Receptor changes in cerebral arteries after subarachnoid haemorrhage *Acta neurologica Scandinavica* **109** 33-44
- [46] Honda M, Sase S, Yokota K, Ichibayashi R, Yoshihara K, Sakata Y, Masuda H, Uekusa H, Seiki Y and Kishi T 2012 Early cerebral circulatory disturbance in patients suffering subarachnoid hemorrhage prior to the delayed cerebral vasospasm stage: xenon computed tomography and perfusion computed tomography study *Neurologia medico-chirurgica* **52** 488-94
- [47] Hop J W, Rinkel G J, Algra A and van Gijn J 1997 Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review *Stroke; a journal of cerebral circulation* **28** 660-4
- [48] Horinouchi T, Terada K, Higashi T and Miwa S 2013 Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms *Journal of pharmacological sciences* **123** 85-101
- [49] Hungerhuber E, Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N and Schmid-Elsaesser R 2006 Simultaneous bilateral laser Doppler fluxmetry and electrophysiological recording during middle cerebral artery occlusion in rats *Journal of neuroscience methods* **154** 109-15
- [50] Ishikawa M, Kusaka G, Yamaguchi N, Sekizuka E, Nakadate H, Minamitani H, Shinoda S and Watanabe E 2009 Platelet and leukocyte adhesion in the microvasculature at the cerebral surface immediately after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **64** 546-53; discussion 53-4
- [51] Itoh S, Sasaki T, Asai A and Kuchino Y 1994 Prevention of delayed vasospasm by an endothelin ETA receptor antagonist, BQ-123: change of ETA receptor mRNA expression in a canine subarachnoid hemorrhage model *Journal of neurosurgery* **81** 759-64
- [52] Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A and Macdonald R L 2010 Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats *Neuroscience* **169** 1805-14
- [53] Jin R C and Loscalzo J 2010 Vascular Nitric Oxide: Formation and Function *Journal of blood medicine* **2010** 147-62
- [54] Jones S P and Bolli R 2006 The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection *Journal of molecular and cellular cardiology* **40** 16-23
- [55] Kader A, Krauss W E, Onesti S T, Elliott J P and Solomon R A 1990 Chronic cerebral blood flow changes following experimental subarachnoid hemorrhage in rats *Stroke; a journal of cerebral circulation* **21** 577-81
- [56] Kasseckert S A, Shahzad T, Miqdad M, Stein M, Abdallah Y, Scharbrodt W and Oertel M 2013 The mechanisms of energy crisis in human astrocytes after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **72** 468-74; discussion 74
- [57] Kaynar M Y, Tanriverdi T, Kemerdere R, Atukeren P and Gumustas K 2005 Cerebrospinal fluid superoxide dismutase and serum malondialdehyde levels in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: preliminary results *Neurological research* **27** 562-7
- [58] Kerr J F, Wyllie A H and Currie A R 1972 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics *British journal of cancer* **26** 239-57

- [59] Kikkawa Y, Matsuo S, Kameda K, Hirano M, Nakamizo A, Sasaki T and Hirano K 2012 Mechanisms underlying potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitization after subarachnoid hemorrhage *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **32** 341-52
- [60] Kirino T 1982 Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia *Brain research* **239** 57-69
- [61] Kontos H A, Wei E P, Navari R M, Levasseur J E, Rosenblum W I and Patterson J L, Jr. 1978 Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension *The American journal of physiology* **234** H371-83
- [62] Krieger C and Duchen M R 2002 Mitochondria, Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease *European journal of pharmacology* **447** 177-88
- [63] Kumar V, Abbas, A, Fausto, N, Aster, J 2010 *Pathologic Basis of Disease* vol 8: Saunders Elsevier)
- [64] Laban K G, Vergouwen M D, Dijkhuizen R M, Sena E S, Macleod M R, Rinkel G J and van der Worp H B 2015 Effect of endothelin receptor antagonists on clinically relevant outcomes after experimental subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*
- [65] Lagares A, Cicuendez M, Ramos A, Salvador E, Alen J F, Kaen A, Jimenez-Roldan L and Millan J M 2012 Acute perfusion changes after spontaneous SAH: a perfusion CT study *Acta neurochirurgica* **154** 405-11; discussion 11-2
- [66] Lang E W, Diehl R R and Mehdorn H M 2001 Cerebral autoregulation testing after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the phase relationship between arterial blood pressure and cerebral blood flow velocity *Critical care medicine* **29** 158-63
- [67] Lavrik I N, Golks A and Krammer P H 2005 Caspases: pharmacological manipulation of cell death *The Journal of clinical investigation* **115** 2665-72
- [68] Lee J M, Zipfel G J and Choi D W 1999 The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms *Nature* **399** A7-14
- [69] Lee J Y, Sagher O, Keep R, Hua Y and Xi G 2009 Comparison of experimental rat models of early brain injury after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **65** 331-43; discussion 43
- [70] Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E and Billiar T R 2013 Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **35** 175-85
- [71] Lemasters J J, Nieminen A L, Qian T, Trost L C, Elmore S P, Nishimura Y, Crowe R A, Cascio W E, Bradham C A, Brenner D A and Herman B 1998 The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy *Biochimica et biophysica acta* **1366** 177-96
- [72] Lin J Y, Chung S Y, Lin M C and Cheng F C 2002 Effects of magnesium sulfate on energy metabolites and glutamate in the cortex during focal cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil monitored by a dual-probe microdialysis technique *Life sciences* **71** 803-11
- [73] Lipton S A and Rosenberg P A 1994 Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders *The New England journal of medicine* **330** 613-22
- [74] Lo A C, Chen A Y, Hung V K, Yaw L P, Fung M K, Ho M C, Tsang M C, Chung S S and Chung S K 2005 Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in

- astrocytic end-feet *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **25** 998-1011
- [75] Macdonald R L 2014 Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage *Nature reviews. Neurology* **10** 44-58
- [76] Macdonald R L, Higashida R T, Keller E, Mayer S A, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, Marr A, Roux S and Kassell N 2011 Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2) *The Lancet. Neurology* **10** 618-25
- [77] Macdonald R L, Higashida R T, Keller E, Mayer S A, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, Marr A, Roux S and Kassell N 2013 Randomised trial of clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing surgical clipping (CONSCIOUS-2) *Acta neurochirurgica. Supplement* **115** 27-31
- [78] Macdonald R L, Higashida R T, Keller E, Mayer S A, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, Nowbakht P, Roux S and Kassell N 2012 Randomized trial of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing endovascular coiling *Stroke; a journal of cerebral circulation* **43** 1463-9
- [79] Macdonald R L, Kassell N F, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, Frey A, Roux S and Pasqualin A 2008 Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial *Stroke; a journal of cerebral circulation* **39** 3015-21
- [80] Marzatico F, Gaetani P, Cafe C, Spanu G and Rodriguez y Baena R 1993 Antioxidant enzymatic activities after experimental subarachnoid hemorrhage in rats *Acta neurologica Scandinavica* **87** 62-6
- [81] Mazzuca M Q and Khalil R A 2012 Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease *Biochemical pharmacology* **84** 147-62
- [82] Mergenthaler P, Dirnagl U and Meisel A 2004 Pathophysiology of stroke: lessons from animal models *Metabolic brain disease* **19** 151-67
- [83] Milner P, Bodin P, Loesch A and Burnstock G 1990 Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow *Biochemical and biophysical research communications* **170** 649-56
- [84] Mokri B 2001 The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion *Neurology* **56** 1746-8
- [85] Moore C, Sanz-Rosa D and Emerson M 2011 Distinct role and location of the endothelial isoform of nitric oxide synthase in regulating platelet aggregation in males and females in vivo *European journal of pharmacology* **651** 152-8
- [86] Nakagawa T and Yuan J 2000 Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis *The Journal of cell biology* **150** 887-94
- [87] Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli K J, Yuan J and Moskowitz M A 1998 Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18** 3659-68
- [88] Newmeyer D D and Ferguson-Miller S 2003 Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death *Cell* **112** 481-90
- [89] Nieuwkamp D J, Setz L E, Algra A, Linn F H, de Rooij N K and Rinkel G J 2009 Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis *The Lancet. Neurology* **8** 635-42

- [90] Nieuwkamp D J, Vaartjes I, Algra A, Bots M L and Rinkel G J 2013 Age- and gender-specific time trend in risk of death of patients admitted with aneurysmal subarachnoid hemorrhage in the Netherlands *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* **8 Suppl A100** 90-4
- [91] Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, Kominami E and Uchiyama Y 1995 Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15** 1001-11
- [92] Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A and Prochiantz A 1984 Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones *Nature* **307** 462-5
- [93] Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P 2003 Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link *Nature reviews. Molecular cell biology* **4** 552-65
- [94] Ostergaard L, Dreier J P, Hadjikhani N, Jespersen S N, Dirnagl U and Dalkara T 2015 Neurovascular coupling during cortical spreading depolarization and -depression *Stroke; a journal of cerebral circulation* **46** 1392-401
- [95] Palmer R M, Ashton D S and Moncada S 1988 Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine *Nature* **333** 664-6
- [96] Paulson O B, Strandgaard S and Edvinsson L 1990 Cerebral autoregulation *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* **2** 161-92
- [97] Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C and Kleinert H 2010 Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **23** 75-93
- [98] Pennings F A, Bouma G J and Ince C 2004 Direct observation of the human cerebral microcirculation during aneurysm surgery reveals increased arteriolar contractility *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35** 1284-8
- [99] Peruche B and Kriegelstein J 1993 Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia--an overview *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **17** 21-70
- [100] Plesnila N 2013 Pathophysiological Role of Global Cerebral Ischemia following Subarachnoid Hemorrhage: The Current Experimental Evidence *Stroke research and treatment* **2013** 651958
- [101] Plesnila N, Zinkel S, Amin-Hanjani S, Qiu J, Korsmeyer S J and Moskowitz M A 2002 Function of BID -- a molecule of the bcl-2 family -- in ischemic cell death in the brain *European surgical research. Europaische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* **34** 37-41
- [102] Prunell G F, Mathiesen T, Diemer N H and Svendgaard N A 2003 Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models *Neurosurgery* **52** 165-75; discussion 75-6
- [103] Prunell G F, Svendgaard N A, Alkass K and Mathiesen T 2005 Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain *Journal of neurosurgery* **102** 1046-54
- [104] Rabinstein A A, Friedman J A, Weigand S D, McClelland R L, Fulgham J R, Manno E M, Atkinson J L and Wijdicks E F 2004 Predictors of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35** 1862-6
- [105] Radomski M W, Rees D D, Dutra A and Moncada S 1992 S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo *British journal of pharmacology* **107** 745-9

- [106] Rami A, Sims J, Botez G and Winckler J 2003 Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia *Neurochemistry international* **43** 79-87
- [107] Rapoport R M and Zuccarello M 2011 Endothelin(A)-endothelin(B) receptor cross-talk and endothelin receptor binding *The Journal of pharmacy and pharmacology* **63** 1373-7
- [108] Ratsep T and Asser T 2001 Cerebral hemodynamic impairment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as evaluated using transcranial doppler ultrasonography: relationship to delayed cerebral ischemia and clinical outcome *Journal of neurosurgery* **95** 393-401
- [109] Ravn H B, Kristensen S D, Vissinger H and Husted S E 1996 Magnesium inhibits human platelets *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* **7** 241-4
- [110] Riedl S J and Salvesen G S 2007 The apoptosome: signalling platform of cell death *Nature reviews. Molecular cell biology* **8** 405-13
- [111] Rinkel G J and Algra A 2011 Long-term outcomes of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage *The Lancet. Neurology* **10** 349-56
- [112] Salem R, Vallee F, Depret F, Callebert J, Maurice J P, Marty P, Mateo J, Madadaki C, Houdart E, Bresson D, Froelich S, Stapf C, Payen D and Mebazaa A 2014 Subarachnoid hemorrhage induces an early and reversible cardiac injury associated with catecholamine release: one-week follow-up study *Critical care (London, England)* **18** 558
- [113] Sanchez-Porrás R, Zheng Z, Santos E, Scholl M, Unterberg A W and Sakowitz O W 2013 The role of spreading depolarization in subarachnoid hemorrhage *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **20** 1121-7
- [114] Saver J L, Starkman S, Eckstein M, Stratton S J, Pratt F D, Hamilton S, Conwit R, Liebeskind D S, Sung G, Kramer I, Moreau G, Goldweber R and Sanossian N 2015 Prehospital use of magnesium sulfate as neuroprotection in acute stroke *The New England journal of medicine* **372** 528-36
- [115] Schmid-Elsaesser R, Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A and Reulen H J 1999 Combination drug therapy and mild hypothermia: a promising treatment strategy for reversible, focal cerebral ischemia *Stroke; a journal of cerebral circulation* **30** 1891-9
- [116] Schubert G A, Schilling L and Thome C 2008 Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, prevents early hypoperfusion during the acute phase of massive experimental subarachnoid hemorrhage: a laser Doppler flowmetry study in rats *Journal of neurosurgery* **109** 1134-40
- [117] Schubert G A, Seiz M, Hegewald A A, Manville J and Thome C 2009 Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study *Journal of neurotrauma* **26** 2225-31
- [118] Schwartz A Y, Masago A, Sehba F A and Bederson J B 2000 Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model *Journal of neuroscience methods* **96** 161-7
- [119] Schwartz A Y, Sehba F A and Bederson J B 2000 Decreased nitric oxide availability contributes to acute cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **47** 208-14; discussion 14-5
- [120] Sehba F A and Bederson J B 2011 Nitric oxide in early brain injury after subarachnoid hemorrhage *Acta neurochirurgica. Supplement* **110** 99-103

- [121] Sehba F A, Ding W H, Chereshev I and Bederson J B 1999 Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage *Stroke; a journal of cerebral circulation* **30** 1955-61
- [122] Sehba F A, Friedrich V, Jr., Makonnen G and Bederson J B 2007 Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor *Journal of neurosurgery* **106** 321-9
- [123] Sehba F A, Hou J, Pluta R M and Zhang J H 2012 The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage *Progress in neurobiology* **97** 14-37
- [124] Sehba F A, Mostafa G, Friedrich V, Jr. and Bederson J B 2005 Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage *Journal of neurosurgery* **102** 1094-100
- [125] Sehba F A, Schwartz A Y, Chereshev I and Bederson J B 2000 Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **20** 604-11
- [126] Seifert V, Loffler B M, Zimmermann M, Roux S and Stolke D 1995 Endothelin concentrations in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Correlation with cerebral vasospasm, delayed ischemic neurological deficits, and volume of hematoma *Journal of neurosurgery* **82** 55-62
- [127] Shapiro M L and Eichenbaum H 1999 Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons *Hippocampus* **9** 365-84
- [128] Sims N R and Anderson M F 2002 Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke *Neurochemistry international* **40** 511-26
- [129] Solomon R A, Antunes J L, Chen R Y, Bland L and Chien S 1985 Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model *Stroke; a journal of cerebral circulation* **16** 58-64
- [130] Springer M V, Schmidt J M, Wartenberg K E, Frontera J A, Badjatia N and Mayer S A 2009 Predictors of global cognitive impairment 1 year after subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **65** 1043-50; discussion 50-1
- [131] Stadelmann C and Lassmann H 2000 Detection of apoptosis in tissue sections *Cell and tissue research* **301** 19-31
- [132] Stegmayr B, Eriksson M and Asplund K 2004 Declining mortality from subarachnoid hemorrhage: changes in incidence and case fatality from 1985 through 2000 *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35** 2059-63
- [133] Stern M D, Lappe D L, Bowen P D, Chimosky J E, Holloway G A, Jr., Keiser H R and Bowman R L 1977 Continuous measurement of tissue blood flow by laser-Doppler spectroscopy *The American journal of physiology* **232** H441-8
- [134] Sugawara T and Chan P H 2003 Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia *Antioxidants & redox signaling* **5** 597-607
- [135] Suhardja A 2004 Mechanisms of disease: roles of nitric oxide and endothelin-1 in delayed cerebral vasospasm produced by aneurysmal subarachnoid hemorrhage *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* **1** 110-6; quiz 2 p following 6
- [136] Sun B L, Zheng C B, Yang M F, Yuan H, Zhang S M and Wang L X 2009 Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage *Cellular and molecular neurobiology* **29** 235-41
- [137] Tertyshnikova S, Yan X and Fein A 1998 cGMP inhibits IP3-induced Ca<sup>2+</sup> release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases *The Journal of physiology* **512 ( Pt 1)** 89-96

- [138] Trepakova E S, Cohen R A and Bolotina V M 1999 Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase-dependent refilling of Ca<sup>2+</sup> stores *Circulation research* **84** 201-9
- [139] Uhl E, Lehmeberg J, Steiger H J and Messmer K 2003 Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging *Neurosurgery* **52** 1307-15; discussion 15-7
- [140] van den Bergh W M, Dijkhuizen R M and Rinkel G J 2004 Potentials of magnesium treatment in subarachnoid haemorrhage *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* **17** 301-13
- [141] van der Bilt I A, Hasan D, van den Brink R B, Cramer M J, van der Jagt M, van Kooten F, Regtien J G, van den Berg M P, Groen R J, Cate F J, Kamp O, Gotte M J, Horn J, Girbes A R, Vandertop W P, Algra A, Rinkel G J and Wilde A A 2015 Time course and risk factors for myocardial dysfunction after aneurysmal subarachnoid hemorrhage *Neurosurgery* **76** 700-6
- [142] Vanderklish P W and Bahr B A 2000 The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states *International journal of experimental pathology* **81** 323-39
- [143] Vatter H, Zimmermann M, Tesanovic V, Raabe A, Schilling L and Seifert V 2005 Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part I: inhibitory effect on endothelin(A) receptor-mediated contraction *Journal of neurosurgery* **102** 1101-7
- [144] Veelken J A, Laing R J and Jakubowski J 1995 The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats *Stroke; a journal of cerebral circulation* **26** 1279-83; discussion 84
- [145] Vergouwen M D, Algra A and Rinkel G J 2012 Endothelin receptor antagonists for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis update *Stroke; a journal of cerebral circulation* **43** 2671-6
- [146] Voldby B 1988 Pathophysiology of subarachnoid haemorrhage. Experimental and clinical data *Acta neurochirurgica. Supplementum* **45** 1-6
- [147] Westermaier T, Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A and Schmid-Elsaesser R 2003 Neuroprotective efficacy of intra-arterial and intravenous magnesium sulfate in a rat model of transient focal cerebral ischemia *Acta neurochirurgica* **145** 393-9; discussion 9
- [148] Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E and Roosen K 2009 Acute vasoconstriction: decrease and recovery of cerebral blood flow after various intensities of experimental subarachnoid hemorrhage in rats *Journal of neurosurgery* **110** 996-1002
- [149] Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E and Roosen K 2011 The temporal profile of cerebral blood flow and tissue metabolites indicates sustained metabolic depression after experimental subarachnoid hemorrhage in rats *Neurosurgery* **68** 223-9; discussion 9-30
- [150] Westermaier T, Jauss A, Vince G H, Raslan F, Eriskat G, Roosen K 2011 Impact of various extents of experimental subarachnoid hemorrhage induced by the endovascular filament model on mortality and changes of cerebral blood flow *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine* **4** 8-15
- [151] Westermaier T, Stetter C and Ernestus R I 2013 Combination therapy for subarachnoid hemorrhage--is nimodipine the wrong partner? *Journal of critical care* **28** 1101
- [152] Westermaier T, Stetter C, Kunze E, Willner N, Raslan F, Vince G H and Ernestus R I 2013 Magnesium treatment for neuroprotection in ischemic diseases of the brain *Experimental & translational stroke medicine* **5** 6

- [153] Westermaier T, Stetter C, Vince G H, Pham M, Tejon J P, Eriskat J, Kunze E, Matthies C, Ernestus R I, Solymosi L and Roosen K 2010 Prophylactic intravenous magnesium sulfate for treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, clinical study *Critical care medicine* **38** 1284-90
- [154] Westermaier T, Zausinger S, Baethmann A and Schmid-Elsaesser R 2005 Dose finding study of intravenous magnesium sulphate in transient focal cerebral ischemia in rats *Acta neurochirurgica* **147** 525-32; discussion 32
- [155] Winterbourn C C 2008 Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species *Nature chemical biology* **4** 278-86
- [156] Wong G K, Poon W S, Chan M T, Boet R, Gin T, Ng S C and Zee B C 2010 Intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage (IMASH): a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multicenter phase III trial *Stroke; a journal of cerebral circulation* **41** 921-6
- [157] Wyllie A H 2010 "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology *Molecular neurobiology* **42** 4-9
- [158] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K and Masaki T 1988 A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* **6** S188-91
- [159] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T 1988 A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells *Nature* **332** 411-5
- [160] Zhang X S, Zhang X, Zhou M L, Zhou X M, Li N, Li W, Cong Z X, Sun Q, Zhuang Z, Wang C X and Shi J X 2014 Amelioration of oxidative stress and protection against early brain injury by astaxanthin after experimental subarachnoid hemorrhage *Journal of neurosurgery* **121** 42-54
- [161] Zoja C, Orisio S, Perico N, Benigni A, Morigi M, Benatti L, Rambaldi A and Remuzzi G 1991 Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A2 analogue *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **64** 16-20

