

**Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

DISSERTATION

**Untersuchung der Sauerstoffkonzentrationsveränderungen in
der Mikrozirkulation des Hirnkortex von Ratten bei
funktioneller Stimulation mittels Phosphorescence Quenching**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Christoph Leithner

aus Ostfildern-Ruit

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ulrich Dirnagl.....
2. Prof. Dr. Matthias Hoehn.....
3. Prof. Dr. Wolfgang Kuschinsky.....

Datum der Promotion: 14.07.2003.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Kontext	6
1.2. Fragestellung	7
1.3. Moderne bildgebende Verfahren des Gehirns	8
1.3.1. Positronenemissionstomografie (PET)	8
1.3.2. Funktionelle Magnetresonanztomografie (fMRT).....	9
1.3.3. Optical Imaging und Imaging Spectroscopy	11
1.3.4. Der DPF (Differential Pathlength Factor).....	12
1.4. Experimentelle Ansätze: Das Whisker-Barrel-System der Ratte	13
1.5. Neurovaskuläre Kopplung als Grundlage der funktionellen Bildgebung des Gehirns	15
1.5.1. Neurometabolische Kopplung.....	16
1.5.2. Neurovaskuläre Kopplung	16
1.5.2.1. Mediatoren der neurovaskulären Kopplung	17
1.5.2.2. Sauerstoffverbrauch, Blutfluss, Blutvolumen	19
1.5.2.3. CMRO ₂ (Cerebral Metabolic Rate of Oxygen)	20
1.5.2.4. CBF (Cerebral Blood Flow).....	22
1.5.2.5. CBV (Cerebral Blood Volume).....	23
1.5.3. Erklärungsansätze.....	23
1.6. Die initiale Antwort	24
1.6.1. Gibt es einen initialen Abfall der Sauerstoffkonzentration ?	24
1.6.2. Kann man mit Hilfe des "initial Dip" die räumliche Auflösung der fMRT verbessern ?.....	28
1.7. Phosphorescence Quenching	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Grundlagen des Phosphorescence Quenching	31
2.1.1. Begriffsklärungen.....	31
2.1.2. Phosphoreszenz.....	33
2.1.3. Phosphorescence Quenching.....	34
2.1.4. Stern-Volmer-Gleichung	36
2.1.5. pO ₂ -Messung mittels Phosphorescence Quenching	37
2.1.6 Oxy-Phor-R2 (Pd-meso-tetra -(4-Carboxyphenyl)-Porphyrin).....	37

2.1.7. Photosensibilisierung.....	39
2.2. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung.....	41
2.2.1. Liste der verwendeten Materialien.....	41
2.2.2. Präparation der Versuchstiere.....	42
2.2.3. Ziel der Versuche.....	44
2.2.4. Aufbau des Optical Imaging.....	44
2.2.5. Versuchsdurchführung des Optical Imaging.....	45
2.2.6. Aufbau des Phosphorescence Quenching.....	46
2.2.7. Versuchsdurchführung des Phosphorescence Quenching.....	47
2.2.8. Statistische Auswertung.....	48
2.3. Kurze Beschreibung der Computerprogramme.....	49
2.3.1. Programm zur Datenaufnahme: phosphorescence16.vi (LabView).....	49
2.3.2. Programm zur Auswertung: phos_auswert15x.m (MatLab).....	51
3. Ergebnisse.....	56
3.1. Aufbau der Methode und Etablierung der Messung.....	56
3.1.1. Messung vom Kortex ohne Injektion von Oxy-Phor R2.....	56
3.1.2. Messungen in vivo: Tod des Versuchstieres.....	57
3.1.3. temporäre Hypoxie, temporäre Hyperoxie, Vasomotionen.....	59
3.2. Whisker-Stimulation.....	61
3.2.1 Physiologiedaten während der Versuche.....	61
3.2.2. Änderungen der Sauerstoffkonzentration während Single-Whisker-Stimulation.....	62
3.2.3. Änderungen der Sauerstoffkonzentration während Whole-pad-Stimulation.....	63
3.2.4. Statistische Auswertung.....	64
3.4. Computer-Simulation im Dreikompartiment-Modell.....	65
3.4.1. Wie verändert sich das Phosphoreszenz-Signal bei isolierten Veränderungen der Sauerstoffkonzentration in einzelnen Kompartimenten ?.....	66
3.4.2. Alternative zum monoexponentiellen Fit: Der multiexponentielle Fit.....	68
4. Diskussion.....	71
4.1. Messung globaler Veränderungen.....	71
4.2. Probleme in der Interpretation bei monoexponentieller Analyse.....	71
4.3. Messung lokaler Veränderung: Die Blutoxygenierungsantwort auf neuronale Aktivierung.....	72
4.3.1. Die initiale Phase.....	73

4.3.2. Die Hyperoxygenierung	78
4.3.3 Der Undershoot	80
4.4. Möglichkeiten der Verbesserung durch multiexponentielle Analyse	82
4.5. Schlussfolgerungen	83
5. Zusammenfassung	84
6. Verzeichnis der Abkürzungen	87
6. Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

1.1. Kontext

Mit der Entwicklung der Positronenemissionstomografie (PET) und der funktionellen Magnetresonanztomografie (fMRT) sind Neurowissenschaftler in die Lage versetzt worden, nichtinvasiv und in vivo Aufnahmen des gesamten Gehirns mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu erstellen, die die neuronale Aktivität der einzelnen Gehirnregionen abbilden. Diese Möglichkeit der funktionellen Bildgebung des Gehirns hat wesentlich zu unserem heutigen Verständnis der Funktion dieses Organs beigetragen und es ist abzusehen, dass aufgrund der kurzen Zeit, die die Methoden für ihre Entwicklung hatten, die Forschungsmöglichkeiten längst noch nicht ausgereizt sind. Viele physiologische Funktionen des Gehirns wie Kognition, Emotion, Erinnerung, Sprache usw. sind bisher erst in Ansätzen verstanden und die Darstellung der Aktivität von Nervenzellen während der Ausführung dieser Funktionen scheint einer der Schlüssel für deren Verständnis zu sein. Die diesen sehr komplexen Funktionen zugrundeliegenden Substrukturen sind allerdings oft zu klein, um derzeit in den Bildern der PET oder der fMRT detailliert aufgelöst zu werden. Es ist kaum abzusehen, wie viel neue Erkenntnisse über die Funktionsweise des Gehirns eine verbesserte räumliche und zeitliche Auflösung dieser Methoden zu Tage fördern wird.

Eines der bei der Darstellung kleinster Substrukturen der Organisation des Gehirns mittels neuer bildgebender Verfahren entstehenden Probleme ist die Tatsache, dass diese Blutfluss- und Blutoxygenierungsveränderungen, nicht die neuronale Aktivität selbst messen und darstellen. Neuronale Aktivität, Blutfluss und Blutoxygenierung in den aktivierten Arealen sind allerdings aneinander gekoppelt. Ein Phänomen, das als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet wird, und das die Grundlage der modernen funktionellen Bildgebung des Gehirns darstellt. Werden Nervenzellen aktiv, so dilatieren die zuführenden kleinen Arterien und Arteriolen, der Blutfluss in das aktivierte Areal steigt an und durch eine vermehrte Anlieferung von Sauerstoff (bei nicht gleichermaßen steigendem Sauerstoffverbrauch der Nervenzellen) steigt die Konzentration von Sauerstoff im aktivierten Areal, die Konzentration von deoxygeniertem Hämoglobin sinkt. Dieses Absinken der deoxy-Hämoglobin-Konzentration wird z.B. von der fMRT gemessen.

Viele Details der neurovaskulären Kopplung sind allerdings immer noch unverstanden. Da sie die Grundlage für die moderne funktionelle Bildgebung des Gehirns bilden, scheint es wichtig, diese Details zu klären. Eines der in den letzten Jahren am intensivsten diskutierten Details ist dabei die Frage, ob die Neuronen eines aktivierten Gehirnareals unmittelbar nach ihrer Aktivierung und noch vor der vaskulären Antwort, also vor der Dilatation der kleinen Arterien und Arteriolen, mehr Sauerstoff als im Ruhezustand verbrauchen und ob, wäre dies der Fall, dieser früh gesteigerte Sauerstoffverbrauch in den Blutgefäßen zu einem initialen Absinken der Sauerstoffkonzentration führt. Ein solches initiales Absinken der Sauerstoffkonzentration in den Blutgefäßen des aktivierten Areals vor Reaktion der Blutgefäße würde zwangsläufig zu einem Anstieg der Konzentration von deoxygeniertem Hämoglobin führen, es bestünde die Möglichkeit, dies mit Hilfe der fMRT zu messen. Im Gegensatz zu den heutigen Darstellungen der neuronalen Aktivität mittels fMRT, die durch Veränderungen des Blutflusses verursachte Oxygenierungsveränderungen des Blutes messen, könnten dann durch den Sauerstoffverbrauch der Neurone unmittelbar bewirkte Oxygenierungsveränderungen dargestellt werden. Diese wären sowohl räumlich als auch zeitlich enger mit der neuronalen Aktivität selbst korreliert. So erhielte man die Möglichkeit, die räumliche und zeitliche Auflösung der fMRT zu verbessern.

1.2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll folgende Frage untersucht werden:

Wie verändert sich die Konzentration von physikalisch gelöstem Sauerstoff in den Blutgefäßen des somatosensorischen Gehirnareals von Ratten durch somatosensorische Stimulation ?

1.3. Moderne bildgebende Verfahren des Gehirns

Zunächst sollen kurz diejenigen funktionellen bildgebenden Verfahren des Gehirns erläutert werden, deren Grundlage die neurovaskuläre Kopplung bildet. Diese Verfahren nutzen also für die Darstellung der neuronalen Aktivität von Gehirnregionen die durch diese Aktivität verursachten Veränderungen des Blutflusses oder der Blutoxygenierung. Eines der ersten und ein bis heute sehr wichtiges Verfahren ist die Positronenemissionstomografie (PET), Forschungen mit PET Mitte der 80er Jahre (Fox, 1986) bilden einen Ausgangspunkt für die aktuelle Diskussion über die neurovaskuläre Kopplung. Aufgrund überlegener räumlicher und zeitlicher Auflösung gewinnt seit Anfang der 90er Jahre ein weiteres Verfahren immer mehr an Bedeutung: die funktionelle Magnetresonanztomografie (fMRT). Beide Verfahren sind nicht invasiv und für die Anwendung am Menschen geeignet. Für die Grundlagenforschung werden zudem invasive Verfahren, die eine gegenüber der fMRT noch verbesserte räumliche und zeitliche Auflösung bieten, eingesetzt: Das Optical Imaging und die Imaging Spectroscopy.

Neben denjenigen Verfahren, deren Grundlage die neurovaskuläre Kopplung bildet, existieren auch solche, die sich die elektrischen Vorgänge an den Membranen der Nervenzellen während deren Aktivierung direkt zunutze machen. Dazu gehören z.B. die Elektroenzephalografie (EEG) und die Magnetenzephalografie (MEG). Beide Methoden erreichen allerdings, zumindest zum jetzigen Zeitpunkt, nicht die räumliche Auflösung der PET oder der fMRT.

1.3.1. Positronenemissionstomografie (PET)

Die funktionelle Bildgebung des Gehirns mit der Positronenemissionstomografie (PET) beruht auf der Messung radioaktiver Strahlung (Gammastrahlung) durch ringförmig um den Schädel angeordnete Detektoren. Die Strahlung wird emittiert von einem vorher injizierten Radionuklid. Dieses emittiert Positronen (daher der Name PET), die sich beim Auftreffen auf ein Elektron mit diesem in zwei, in genau entgegengesetzter Richtung entweichende Gammaquanten umwandeln. Aufgrund des gleichzeitigen Eintreffens dieser beiden Gammaquanten an gegenüberliegenden Detektoren kann auf den Ort ihres Entstehens geschlossen werden (dieser muss sich also auf gerader Strecke zwischen den beiden

Detektoren befinden). Werden ausreichend viele Strahlen emittiert, so lässt sich ein zweidimensionales Schnittbild des Gehirns erstellen. Da der Ort der Bildung der Gammastrahlen aus Positron und Elektron einige Millimeter vom Ort der Emission des Positrons entfernt liegen kann, ist die räumliche Auflösung der PET technischen Beschränkungen unterworfen. Zur Messung der Gehirnfunktion werden Marker benutzt, deren Konzentration sich im Rahmen der Antwort der Blutgefäße auf neuronale Aktivität in den aktivierten Arealen verändert: Radioaktiv markiertes Wasser, radioaktiv markierter Sauerstoff, radioaktiv markierte Glucose. Die gemessenen Konzentrationen werden dann farbkodiert im zeitlichen Verlauf dargestellt.

1.3.2. Funktionelle Magnetresonanztomografie (fMRT)

Atomkerne mit ungerader Ordnungszahl (also z.B. Wasserstoff) besitzen eine Eigenrotation (Spin), die ein magnetisches Feld erzeugt. Normalerweise sind die magnetischen Felder vieler benachbarter Atome hinsichtlich ihrer Ausrichtung zufällig verteilt, legt man allerdings von außen ein Magnetfeld an, so richten sich die Magnetfelder dieser Atomkerne nach dem von außen angelegten Feld B_0 aus und führen eine Kreiselbewegung um die Feldlinien dieses Feldes aus (Präzessionsbewegung). Die derart ausgerichteten Magnetfelder der Atomkerne absorbieren elektromagnetische Wellen eines Anregungspulses einer bestimmten Frequenz (Larmorfrequenz: die Frequenz der Präzessionsbewegung), dabei richten sie sich in Richtung des magnetischen Feldes dieses Anregungspulses (B_1) aus. Bei der etwas später erfolgenden Rückkehr in den Ausgangszustand (Relaxation), der energetisch günstiger ist, emittieren sie elektromagnetische Wellen gleicher Frequenz (Resonanz) und können so Wechselstrom in einer Spule induzieren, dieser wird gemessen. Enthält das angelegte Magnetfeld einen Gradienten, so hängt die Resonanzfrequenz von der Lage des die Resonanz erzeugenden Moleküls innerhalb des Magnetfeldes ab, umgekehrt kann also aus der Resonanzfrequenz auf den Ort geschlossen werden. Mit Hilfe der Messung von induziertem Wechselstrom einer einzigen Spule können so zweidimensionale Schnittbilder errechnet werden.

Die funktionelle Magnetresonanztomografie benutzt die Tatsache, dass deoxy-Hämoglobin andere magnetische Eigenschaften besitzt als oxy-Hämoglobin: deoxy-Hämoglobin ist paramagnetisch (freies Elektron, d.h. gute Magnetisierbarkeit), oxy-Hämoglobin diamagnetisch (gepaartes Elektron, d.h. schlechte Magnetisierbarkeit). Der

Paramagnetismus, d.h. die gute Magnetisierbarkeit, macht deoxy-Hämoglobin zu einem endogenen Kontrastmittel der MRT. Die Messung der Änderung der deoxy-Hämoglobin-Konzentration kann aufgrund der oben beschriebenen Tatsache, dass die Aktivierung von Neuronen in den Blutgefäßen ihrer Umgebung zum Absinken der deoxy-Hämoglobin-Konzentration führt, zur Darstellung der Gehirnfunktion (der neuronalen Aktivität) verwendet werden. Die so durchgeführte funktionelle Bildgebung wird als BOLD-fMRI bezeichnet: Blood Oxygenation Level Dependent functional Magnetic Resonance Imaging (Ogawa 1990).

Die Tatsache, dass die fMRT nicht die neuronale Aktivität selbst, sondern die daran gekoppelte Blutoxygenierungsantwort (Veränderungen der deoxy-Hämoglobin-Konzentration) misst, führt zu Problemen in der Interpretation insbesondere hochauflösender fMRT-Daten. So ist für diese Interpretation eine genaue Kenntnis der räumlichen und zeitlichen Beziehung zwischen Nervenzellaktivität und Blutflussantwort wichtig. Diese weist einige Charakteristika auf, die die Auflösung der fMRT beschränken:

1. zeitliche Auflösung: Die deoxy-Hämoglobin-Konzentration im aktivierten Gehirnareal beginnt erst (je nach Spezies) nach etwa drei Sekunden abzufallen. Aktivität, die schon vorhanden ist, kann also noch nicht dargestellt werden. Nach Beendigung der neuronalen Aktivität dauert es einige Sekunden bis sich die deoxy-Hämoglobin-Konzentration wieder normalisiert hat (dann wird "Aktivität" gemessen, die nicht mehr vorhanden ist).
2. räumliche Auflösung: Das Areal, in dem der Blutfluss ansteigt (und damit die deoxy-Hämoglobin-Konzentration fällt) scheint wesentlich größer zu sein als das Areal der aktivierten Nervenzellen (der in der fMRT gesehene "Aktivierungsbereich" ist also größer als der tatsächliche Aktivierungsbereich). Die vaskuläre Antwort scheint allerdings in zunehmender Entfernung vom aktivierten Areal kleiner zu werden (Mayhew 1999), die messbaren Veränderungen sind dennoch im Bereich von mehreren Millimetern größer als das Areal der neuronalen Aktivität (Malonek 1996)

1.3.3. Optical Imaging und Imaging Spectroscopy

Eine Steigerung der räumlichen Auflösung in der funktionellen Bildgebung des Gehirns lässt sich mit optischen Verfahren erreichen. Diese greifen zwar auf die gleichen physiologischen Grundlagen zurück (neurovaskuläre Kopplung), und unterliegen somit ähnlichen Restriktionen in der Interpretation, bieten aber (zumindest zur Zeit noch) aufgrund ihrer technischen Gegebenheiten eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung. Eines der besten Verfahren ist das Optical Imaging:

Hierbei wird der Kortex des Gehirns mit Licht einer bestimmten, vorher gewählten Wellenlänge beleuchtet. Das reflektierte Licht erzeugt in einer Videokamera zweidimensionale Bilder der Kortexoberfläche (räumliche Auflösung: ca. 50 Mikrometer, zeitliche Auflösung: mehrere Bilder pro Sekunde). Die Absorptionsspektren von oxy- und deoxy-Hämoglobin unterscheiden sich im Bereich des sichtbaren Lichts, gleichzeitig sind oxy- und deoxy-Hämoglobin die quantitativ wichtigsten in diesem Bereich des Lichts absorbierenden Stoffe im Kortex des Gehirns, deren Konzentrationen sich im Zusammenhang mit der neuronalen Aktivität ändern. So lassen sich mit Optical Imaging Veränderungen in ihrer Konzentration darstellen, folglich Veränderungen der Blutoxygenierung und so Veränderungen der neuronalen Aktivität.

Bei einer Wellenlänge des den Kortex beleuchtenden Lichtes von 605 nm ist etwa die Absorption von oxy-Hämoglobin wesentlich geringer als die von deoxy-Hämoglobin, so dass Veränderungen in der Intensität des reflektierten Lichts, die mit Hilfe der Videokamera gemessen werden, zum größten Teil durch Änderungen der Konzentration von deoxy-Hämoglobin bedingt sind. Messungen der Absorption bei 605nm stellen also eine Annäherung an Messungen der Konzentration von deoxygeniertem Hämoglobin und somit der Blutoxygenierung dar. Diese Messungen sind dennoch vorsichtig zu interpretieren: Ebenso wie eine geringfügige Erhöhung der deoxy-Hb-Konzentration kann auch eine deutliche Erhöhung der oxy-Hb-Konzentration zu einer verstärkten Absorption bei 605 nm führen, diese beiden Prozesse können also nicht ohne weiteres voneinander unterschieden werden.

Um dieses Problem zu lösen und die Veränderungen der Konzentration von oxy-Hb und deoxy-Hb besser unterscheiden zu können, entwickelten Malonek et. al. die Imaging Spectroscopy: Hierbei werden große Bereiche der (bekannten) Absorptionsspektren von oxy- und deoxy-Hämoglobin an gemessene Absorptionsspektren linear angepasst (Malonek 1996). Dabei verliert man die zweite räumliche Dimension des Bildes: Eine einzelne Linie

("Slit-like Cortical Image": Breite ca. 100-200 Mikrometer) des zweidimensionalen Bildes der weiß beleuchteten Kortexoberfläche wird durch ein Gitter in ihre spektralen Anteile zerlegt, so dass man zu jedem Punkt der Linie nicht nur die Intensität des reflektierten Lichts bei einer einzigen Wellenlänge, sondern im gesamten Spektrum messen kann. Das entstehende zweidimensionale Bild zeigt dann die Intensität des reflektierten Lichts, dabei gibt die Abszisse die Wellenlänge und die Ordinate die Lokalisation im Slit an (Spatiospectral Image).

Die Imaging Spectroscopy bietet somit die Möglichkeit, die (relativen) Konzentrationsveränderungen von oxy- und deoxy-Hämoglobin getrennt darzustellen.

1.3.4. Der DPF (Differential Pathlength Factor)

Ein methodisches Problem der Imaging Spectroscopy stellt die Tatsache dar, dass die Eindringtiefe von Licht in den Kortex von seiner Wellenlänge abhängt. Zusätzlich besitzt das Gewebe streuende Eigenschaften. Lichtstrahlen großer Wellenlänge dringen tiefer ins Gewebe ein und werden (durchschnittlich) häufiger gestreut, so dass die Wegstrecke (Pfadlänge), die sie im Gewebe zurücklegen, größer ist als die des Lichts mit niedriger Wellenlänge. Die Konzentrationen von oxy- und deoxy-Hämoglobin werden aber anhand der Absorptionsspektren über einen großen Wellenlängenbereich (der etwa von 500nm bis 600nm reicht) berechnet. Dabei hat etwa das Licht mit 600nm Wellenlänge durchschnittlich einen größeren Weg im Gewebe zurückgelegt als das Licht mit 500nm Wellenlänge.

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$(1) \quad E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Dabei bezeichnet E die Extinktion des Lichts im Medium, ε einen vom Medium abhängigen Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration der lichtabsorbierenden Substanz und d die Schichtdicke des Mediums.

Da nun die Schichtdicke d, also der Weg, den das Licht im Medium zurücklegt (die Pfadlänge) für unterschiedliche Wellenlängen verschieden ist, entstehen Fehler bei der Berechnung der Konzentrationen von oxy- und deoxy-Hämoglobin aus den Absorptionsspektren. Diese Fehler können zu einem Teil vermieden werden durch das

Einführen eines wellenlängenabhängigen Korrekturfaktors: Der sogenannte Differential Pathlength Factor (DPF) (Kohl 2000).

Die durch die Analyse ohne diesen Korrekturfaktor (Constant Pathlength Analysis) entstehenden Fehler können dabei qualitativer Natur sein: In Messungen von Lindauer et al. (Lindauer 2001) zeigten die Daten bei Constant Pathlength Analysis (das Lambert-Beer Gesetz wird unter der Annahme gleicher Schichtdicken (= Pfadlängen) für alle Wellenlängen angewandt) einen initialen Anstieg der deoxy-Hämoglobin-Konzentration bei somatosensorischer Stimulation im aktivierten Areal des Rattengehirns, der bei der Analyse mit Differential Pathlength Korrektur nicht zu sehen war.

1.4. Experimentelle Ansätze: Das Whisker-Barrel-System der Ratte

Für die experimentelle Untersuchung der neurovaskulären Kopplung bieten sich verschiedene Möglichkeiten: Zunächst können in-vitro- und in-vivo-Ansätze unterschieden werden: Dabei bieten die in-vivo Arbeiten den unbestreitbaren Vorteil, dass hierbei ein intaktes Gehirn mit Blutgefäßen eines intakten Kreislaufs zusammenarbeiten kann. Dieser Ansatz wird der Komplexität des Phänomens neurovaskuläre Kopplung in jedem Fall eher gerecht. Verschiedene Spezies und verschiedene Areale des Gehirns werden in der Erforschung der neurovaskulären Kopplung verwendet, mit nichtinvasiven Methoden wird am Menschen gearbeitet, mit invasiven Methoden z.B. an Affen, Katzen und Ratten. Untersucht wird meist der visuelle oder somatosensorische Kortex. Aufgrund der größeren ontogenetischen Nähe sind an Katzen oder Affen erzielte Ergebnisse mit höherer Berechtigung auf den Menschen übertragbar. Dennoch erscheint es plausibel anzunehmen, dass ein so grundlegendes Phänomen wie die Interaktion von Nervenzellen und Blutgefäßen im Gehirn sich im Laufe der Evolution der Säuger nicht grundlegend gewandelt hat.

Für die vorliegende Arbeit wurde als Modell das Whisker-Barrel-System der Ratte gewählt. Die Whisker (Barthaare) dienen der Ratte zur taktilen Orientierung in ihrer unmittelbaren Umgebung. Aufgrund der großen Bedeutung dieser taktilen Orientierung sind die Whisker im somatosensorischen Kortex (SI) überdurchschnittlich stark repräsentiert, d.h. das Areal von Neuronen, die Afferenzen von den taktilen Organen am Ansatz der Barthaare erhalten, ist besonders groß (ca. 20 % des primären somatosensorischen Kortex, etwa 10 mm² der Kortexoberfläche). Die Form der Repräsentation ist eine weitere Besonderheit. Gruppen von Neuronen, die Afferenzen im wesentlichen von einem der Barthaare erhalten sind als

"Barrels" (Fässer) organisiert, die räumlich klar gegen die Barrels anderer Barthaare abgegrenzt sind. Jedes Barrel besitzt für die Blutversorgung seiner Neurone eine oder mehrere eigene penetrierende Arteriolen (Cox 1993). Diese Organisation macht das Whisker-Barrel-System der Ratte zu einem besonders geeigneten System für die optische Untersuchung der neurovaskulären Kopplung: Die klare Abgrenzung und besondere Größe von Neuronengruppen und ihre einfache Zuordnung zu den Sinnesorganen am Ansatz der Barthaare ermöglicht eine einfache und gleichzeitig physiologische (mechanische Auslenkung der Barthaare) Stimulationstechnik mit dennoch ausreichend großer vaskulärer Antwort. Zusätzlich ist der Whisker-Kortex präparatorisch relativ leicht zugänglich. Nachteile des Rattenmodells ist die ontogenetische Entfernung vom Menschen, die in Bezug auf das Gehirn unter anderem in der Tatsache zum Ausdruck kommt, dass das Rattengehirn keine Gyrierung aufweist (sie gehört zu den sogenannten Lisenzephalen). Ein Unterschied im Prinzip der neurovaskulären Kopplung ist unwahrscheinlich, dennoch sollten bei der Interpretation der gewonnenen Daten Speziesunterschiede bedacht werden.

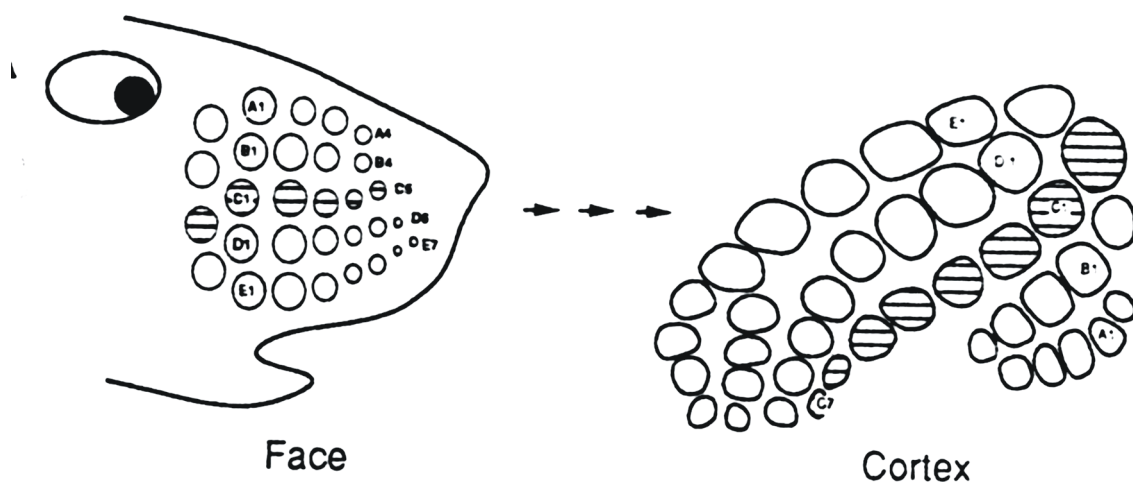


Abb. 1 Whisker-Barrel-System der Ratte (aus Cox 1993)

Die Barthaare der Ratte werden in Reihen (A bis E) geordnet und nummeriert. Jedes Haar entsendet seine Afferenzen zu einer diskreten Neuronengruppe im somatosensorischen Kortex (sogenannte Barrel). Die Barrels weisen im Kortex die gleiche Anordnung auf wie die Barthaare im Gesicht der Ratte.

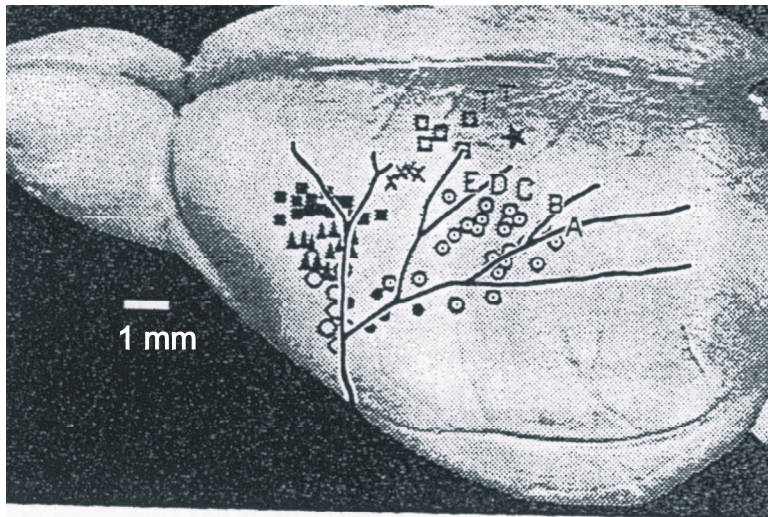


Abb.2 Piale GefäÙe und somatosensorische Gehirnareale der Ratte (aus Cox 1993)

Die Aufzweigungen der A. cerebri media (von unten kommend) sind auf das Foto eines Rattengehirns aufgezeichnet. Die Kreise mit Punkt in der Mitte stellen die Whisker-Barrel dar. Die Reihen der Whisker-Barrel sind mit A bis E bezeichnet (s.o.). Der gesamte Whisker-Barrel-Kortex misst in der Aufsicht etwa 3x4 mm und lässt sich gut anhand der GefäÙarchitektur (Aufzweigungen der A. cerebri media) lokalisieren.

1.5. Neurovaskuläre Kopplung als Grundlage der funktionellen Bildgebung des Gehirns

Bereits im Jahre 1890 beschrieben Roy und Sherrington (Roy 1890) ein Phänomen, das über 100 Jahre später die Grundlage der wichtigsten modernen bildgebenden Verfahren des Gehirns darstellt: die neurovaskuläre Kopplung.

Als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet man die Tatsache, dass Durchblutung und neuronale Aktivität eines Gehirnareals aneinander gekoppelt sind. Erhöht sich die Aktivität der Neurone im versorgten Areal so dilatieren die kleinen Arterien und Arteriolen und der Blutfluss in dieses Areal steigt an. Verringert sich die Aktivität der Neurone, so verringert sich auch der Durchmesser der zuführenden GefäÙe wieder und der Blutfluss in das entsprechende Areal nimmt ab. Folgen der Dilatation der kleinen Arterien und Arteriolen sind ein erhöhter Blutfluss, eine erhöhte Blutoxygenierung in der Mikrozirkulation und ein erhöhtes Blutvolumen, bedingt durch die Compliance der Venen, im Areal der gesteigerten neuronalen Aktivität.

1.5.1. Neurometabolische Kopplung

Mit dem Begriff der neurometabolischen Kopplung werden die Veränderungen des Stoffwechsels der Nervenzellen bezeichnet, die mit einer erhöhten Aktivität der Nervenzelle einhergehen. Erhöhte Aktivität bezeichnet eine gegenüber dem Ruhezustand der Nervenzelle gesteigerte Anzahl von Aktionspotentialen, die pro Zeit an den Membranen der Nervenzelle entlanglaufen und eine dadurch gesteigerte Ausschüttung ihres Neurotransmitters an den Synapsen ihres Axons. Mit der gesteigerten Aktivität der Nervenzellen eines Gehirnareals geht dabei die gesteigerte Aktivität der Astrozyten einher: Diese sind beteiligt am Aufnehmen von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt und deren Umwandlung und anschließende Abgabe an die Neurone. Die Ausschüttung, Aufnahme und Verstoffwechslung der Neurotransmitter verbraucht den größten Teil des im Gehirn durch oxidativen Metabolismus von Glukose erzeugten ATP (Magistretti 1996).

Erhöhte Aktivität von Neuronen und Astrozyten bewirkt folglich einen gesteigerten Energieverbrauch und damit die Notwendigkeit für Nervenzellen und Astrozyten, mehr ATP herzustellen. Im Ruhezustand erzeugt das Gehirn sein ATP fast ausschließlich aerob (der respiratorische Quotient beträgt 1). Ob dies unter gesteigerter neuronaler Aktivität ebenso ist, oder ob ein gewisser Anteil des dann zusätzlich benötigten ATP anaerob hergestellt wird, ist noch unklar (Fox 1986), (Davis 1998).

1.5.2. Neurovaskuläre Kopplung

Gesteigerte neuronale Aktivität führt nicht nur zu Veränderungen im Metabolismus der Neurone, sondern auch zu Veränderungen an den Blutgefäßen der näheren Umgebung. Je nach Spezies beginnen die glatten Muskelzellen in den Wänden der umliegenden Arteriolen und kleinen Arterien bereits in den ersten Sekunden nach der Aktivierung der Neurone, in ihrer Spannung nachzulassen, so dass diese Gefäße dilatieren. Dies bewirkt einen steigenden Blutfluss, eine steigende Blutoxygenierung und ein steigendes Blutvolumen. Diese Veränderungen bilden die Grundlage für funktionelle Bildgebung mit fMRT, PET, Optical Imaging und Imaging Spectroscopy. Zwei Fragen erscheinen für die Grundlagenforschung besonders interessant:

- 1) Welches sind die Mediatoren der neurovaskulären Kopplung, diejenigen Stoffe also, die den Blutgefäßen die Nachricht von den neuronalen Aktivierung überbringen ?

- 2) In welchem exakten zeitlichen und räumlichen Zusammenhang stehen neuronale Aktivität, neuronaler Sauerstoffverbrauch, Veränderung des Blutflusses, der Blutoxygenierung und des Blutvolumens ?

Das Interesse an den Mediatoren der neurovaskulären Kopplung ist dabei ein vielfältiges: Es würde nicht nur bei der Entwicklung von Pharmaka zur Beeinflussung pathologisch gestörter Kopplung nützen, sondern ließe sich ebenso zur Grundlagenforschung der funktionellen Bildgebung verwenden (etwa zur experimentellen Störung der Kopplung usw.). Die genaue Kenntnis der Beziehung zwischen neuronaler Aktivität, Sauerstoffverbrauch der Neurone, Blutfluss, Blutoxygenierung und Blutvolumen würde eine bessere Interpretation der mittels funktioneller Bildgebung gewonnenen Daten ermöglichen.

1.5.2.1. Mediatoren der neurovaskulären Kopplung

Eine Vielzahl von an der Mediation der neurovaskulären Kopplung beteiligten Substanzen und Mechanismen sind identifiziert worden. Dennoch ergibt sich daraus noch kein komplettes Verständnis der Zusammenhänge.

- 1. K^+ :** Mit der Aktivierung der Neurone geht eine erhöhte Frequenz der Aktionspotentiale an ihrer Membran einher. Während eines Aktionspotentials tritt durch das Öffnen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen vermehrt Kalium in den Extrazellulärraum über. Dadurch erhöht sich in Regionen mit erhöhter neuronaler Aktivität innerhalb kurzer Zeit die Konzentration von Kalium im Extrazellulärraum. Gliazellen könnten das Kalium aufnehmen und in der Umgebung von Arteriolen abgeben, die aufgrund der hyperpolarisierenden Wirkung des Kaliums dilatieren würden (Kalium-Siphoning-Hypothese (Paulsen 1987)). Der Anstieg des Kaliums im Extrazellulärraum allein kann das gesamte Ausmaß der Vasodilatation allerdings nicht erklären (Caesar 1999).
- 2. H^+ :** Um die intrazelluläre Kaliumkonzentration aufrecht zu erhalten und die Membran gegen Ende jedes Aktionspotentials wieder zu repolarisieren betreiben die Nervenzellen membranständige Na^+/K^+ -ATPasen. Diese befördern K^+ wieder in die Zelle und Na^+ aus der Zelle heraus. Dabei wird ATP gespalten, das anschließend wieder regeneriert werden muss. Geschieht die Regeneration des ATP durch anaeroben Stoffwechsel (Prichard 1991), so steigt die H^+ -Konzentration (der pH sinkt). H^+ kann eine Dilatation der umgebenden kleinen Arterien und Arteriolen im

Gebiet der neuronalen Aktivierung bewirken, doch deutet vieles darauf hin, dass es nicht den einzigen und wichtigsten Mechanismus der neurovaskulären Kopplung darstellt.

- 3. Adenosin:** Bei gesteigertem Metabolismus der Neurone entsteht neben H^+ auch vermehrt Adenosin (Dephosphorylierung der energiereichen Adenosinphosphate). Adenosin hat ebenfalls eine gefäßerweiternde Wirkung (Rubio 1975).
- 4. NO:** Als besonders potenter Vasodilatator wurde das Stickstoffmonoxid beschrieben, es kann von allen Zellen des Nervensystems produziert werden. Drei Formen der NO-Synthetase sind im Gehirn bekannt: n-NOS (neuronale NO-Synthetase), e-NOS (endotheliale) und i-NOS (induzierbare). Die induzierbare Form der NO-Synthetase wird bei Entzündungsprozessen gebildet (z.B. von Makrophagen, aber auch von Neuronen). Die anderen beiden Formen (n-NOS und e-NOS) existieren unter physiologischen Bedingungen und halten einen basalen NO-Level aufrecht. Eine weitere Quelle von NO könnte ein von Stamler et. al. (Stamler 1997) vorgeschlagener Mechanismus darstellen: NO bindet an oxy-Hämoglobin, nicht aber an deoxy-Hämoglobin, so dass es bei Abfall des pO_2 im Blut freigesetzt wird. Dies könnte, initiale Hypoxie im aktivierten Areal vorausgesetzt, einen Mechanismus für die neurovaskuläre Kopplung darstellen. NO konnte als Mediator der neurovaskulären Kopplung des Kleinhirns identifiziert werden (Akgoeren 1996), im somatosensorischen Kortex spielt es allerdings lediglich die Rolle eines Modulators (Lindauer 1999). Dieser Unterschied zwischen Kleinhirn und somatosensorischem Kortex deutet auch daraufhin, dass Studien von verschiedenen Bereichen des Gehirns nur bedingt miteinander verglichen werden können.
- 5. Neurogene Mechanismen:** Zahlreiche Autoren haben die Rolle von Axonendigungen, die vasoaktive Substanzen (vor allen Dingen Neuropeptide) an Blutgefäßen freisetzen, gezeigt. Dieser neurogene Mechanismus der Kopplung würde eine zeitlich besonders enge Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und Blutfluss ermöglichen.

1.5.2.2. Sauerstoffverbrauch, Blutfluss, Blutvolumen

Da die neurovaskuläre Kopplung die Grundlage für die meisten modernen funktionellen bildgebenden Verfahren des Gehirns darstellt, aber auch aufgrund der Tatsache, dass sie unter pathologischen Bedingungen gestört sein kann, erscheint es besonders wichtig, die zeitliche und räumliche Beziehung zwischen Nervenzellaktivität und Veränderungen des Blutflusses und deren Folgen zu erforschen. Eine besondere Rolle spielt dabei die zeitliche und räumliche Beziehung zwischen Nervenzellaktivität und Konzentration von deoxy-Hämoglobin in den umliegenden Blutgefäßen, da die Messung der deoxy-Hämoglobin-Konzentration die Grundlage der funktionellen MRT darstellt. Die deoxy-Hb-Konzentration wird von drei unterschiedlichen Prozessen beeinflusst:

1. vom Sauerstoffverbrauch der Neurone (und Gliazellen): Steigt der Sauerstoffverbrauch an, so steigt die deoxy-Hämoglobin-Konzentration in den umliegenden Blutgefäßen und umgekehrt.
2. vom Blutfluss: Steigt der Blutfluss an, so wird sauerstoffreiches Blut eingewaschen, sauerstoffarmes Blut wird ausgewaschen, folglich sinkt die deoxy-Hämoglobin-Konzentration
3. den Veränderungen des Blutvolumens: Steigt das Blutvolumen, so steigt auch die Konzentration von deoxy-Hämoglobin in demjenigen betrachteten Volumenelement (Voxel), aus dem das Signal stammt; ist die Steigerung des Blutvolumens allerdings durch einfließendes arterielles Blut (mit sehr geringer deoxy-Hb-Konzentration) verursacht, so dürfte der Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration bei normaler Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes sehr gering ausfallen.

Unter neuronaler Aktivierung erwartet man folglich gegensinnige Einflüsse auf die deoxy-Hämoglobin-Konzentration: Einerseits ist zu erwarten, dass die Neurone aufgrund der verstärkten Aktivität der Na^+/K^+ -ATPasen mehr Energie verbrauchen, daher mehr Sauerstoff benötigen, dies würde die deoxy-Hämoglobin-Konzentration steigern. Ebenso ist davon auszugehen, dass die Astrozyten mehr Energie verbrauchen (sie sind z.B. an der Entfernung der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt beteiligt, ein Prozess, der ATP

verbraucht). Andererseits steigt mit der neuronalen Aktivität der Blutfluss, dies senkt die deoxy-Hämoglobin-Konzentration. Das Blutvolumen steigt leicht an (insbesondere durch die Compliance der Venen, die damit auf den nach der Dilatation der Arteriolen gestiegenen Druck reagieren), dies wiederum erhöht die deoxy-Hämoglobin-Konzentration. Das Verständnis der Veränderungen der deoxy-Hb-Konzentration setzt also die Kenntnis der Veränderungen von $CMRO_2$ (cerebral metabolic rate of oxygen), CBF (cerebral blood flow) und CBV (cerebral blood volume) voraus. Die Zeitverläufe dieser drei Parameter geben die Antwort auf die Frage: Wie addieren sich die gegensinnigen Einflüsse der neuronalen Aktivität auf die deoxy-Hämoglobin-Konzentration der Blutgefäße im aktivierten Areal ?

1.5.2.3. $CMRO_2$ (Cerebral Metabolic Rate of Oxygen)

Eine der ersten Antworten auf diese Frage stammt aus dem Jahr 1986. Damals machten Fox und Raichle eine aufsehenerregende Entdeckung: Sie verglichen den Anstieg des Blutflusses mit dem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs (= $CMRO_2$) während der Aktivierung eines Gehirnareals (somatosensorischer Kortex von Menschen, Messungen mit PET) und fanden ein starkes Missverhältnis zugunsten des Blutflusses. Während dieser um 29% anstieg, schien der Sauerstoffverbrauch unter Aktivierung nahezu konstant zu bleiben (+5%; aber nicht signifikant) (Fox 1986). Mit veränderter Stimulation (visuell anstatt vibrotaktile) ergaben sich 50 % Zunahme von Blutfluss und Glukoseverbrauch gegenüber 5% Zunahme des Sauerstoffverbrauches (Fox 1988). Sie zogen aus ihren Messungen den Schluss, dass während der Aktivierung eines Gehirnareals der zusätzliche Energiebedarf anaerob gedeckt wird und dass die Dilatation der Blutgefäße und damit die Blutflussantwort weder durch ein Absinken der Sauerstoffkonzentration im Blut unmittelbar nach der Aktivierung verursacht sein kann, noch in erster Linie der Versorgung der aktiven Neurone mit mehr Sauerstoff dient. In der Zwischenzeit sind etliche weitere Studien veröffentlicht worden, die sich der Frage nach den Veränderungen der $CMRO_2$ unter neuronaler Aktivierung widmen. Die Ergebnisse (siehe Tab. 1) sind nicht vollständig einheitlich, doch scheint vieles auf einen geringen (im Rahmen von 10-20%) Anstieg der $CMRO_2$ unter neuronaler Aktivierung hinzudeuten.

Spezies	Autor	Methode	Stimulation	Ergebnis
Mensch	Fox 1986	PET	vibrotaktil	Kein signifikanter Anstieg
	Fox 1988	PET	visuell	+ 5 %
	Davis 1998	fMRT	visuell	+13-19%
	Kim 1999	fMRT	visuell	+ 15.6 ± 8.1 %
	Hoge 1999	fMRT	visuell	+ 25 ± 4%
	Fujita 1999	PET	vibrotaktil	Kein Anstieg
	Vafae 1999	PET	visuell 16-50 Hz	Kein Anstieg
	Vafae 1999	PET	visuell 4 Hz	+ 15-20%
	Ohta 1999	PET	vibrotaktil (kurz)	Kein Anstieg
	Chen 2001	NMR-Spectroscopy	visuell	< + 30 %
Ratte	Hyder 1996	NMR-Spectroscopy	Vorderpfote, elektrisch	+ 200 %
	Mandeville 1999	fMRT	Vorderpfote, elektrisch	+ 19 ± 17 %

Tab. 1 Veränderungen der lokalen CMRO₂ bei neuronaler Stimulation

In der Spalte "Ergebnis" ist das Maximum des Anstiegs der CMRO₂ angegeben.

Die meisten Autoren zeigen einen geringen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs von Gehirnarealen unter Stimulation, einige fanden allerdings keinen signifikanten Anstieg.

Die geringe zeitliche Auflösung bei diesen Messungen erlaubt leider keine Aussagen darüber, wie schnell (im zeitlichen Rahmen von Zehntelsekunden) nach der Aktivierung sich die CMRO₂ ändert. Räumlich sollte die Erhöhung der CMRO₂ exakt auf das Areal der aktivierten Neurone beschränkt sein, allerdings ist auch hier die Auflösung aufgrund der Grenzen der verwendeten Techniken beschränkt.

1.5.2.4. CBF (Cerebral Blood Flow)

Für die Messungen des CBF (cerebral blood flow) stehen verschiedenen Methoden zur Verfügung. Die Ergebnisse bei verschiedenen Spezies und Stimulationsarten sind weniger inhomogen als die bei den Messungen der $CMRO_2$ erzielten: Alle Autoren geben einen sehr deutlichen Anstieg des Blutflusses auf neuronale Aktivierung an, alle, die gleichzeitig die $CMRO_2$ berechneten, fanden einen deutlicheren Anstieg des CBF (gemessen als prozentuale Veränderung gegenüber dem Ausgangswert). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird unter anderem eingeschränkt durch die Tatsache, dass einige Methoden eine Narkose erfordern (LDF-Messungen an der Ratte; LDF = Laser doppler flowmetry, d.h. Messungen des Blutflusses mittels eines Lasers unter Ausnutzung des Doppler-Effektes) andere nicht (PET, fMRT beim Menschen).

Spezies	Autor	Methode	Stimulation	Ergebnis
Mensch	Kim 1999	fMRT	Visuell	+ 43.6 ± 9.4%
	Fox 1986, 1988	PET	Taktil / visuell	+ 50%
	Davis 1998	fMRT	Visuell	+ 45%
Ratte	Mandeville 1999	LDF	Vorderpfote, elektrisch	+ 62 ± 16 %
	Lindauer 1993	LDF	Whisker, mechanisch	+ 16.9 ± 2.3%
	Hyder 1999	fMRT	Vorderpfote elektrisch	+34 ± 10%
	Nemoto 1999	LDF	Hinterpfote, elektrisch	+ 26.7± 9.7%
	Ueki 1988	¹⁴ C-Antipyrin Autoradiografie	Vorderpfote, elektrisch	+ 33 %
Katze	Leniger-Follert 1979	¹⁴ C-Antipyrin- Autoradiografie	Vorderpfote, elektrisch	> + 60 %

Tab.2 Veränderungen des lokalen CBF bei neuronaler Stimulation

In der Spalte "Ergebnis" ist jeweils der maximale gemessene Anstieg des Blutflusses unter Stimulation angegeben.

1.5.2.5. CBV (Cerebral Blood Volume)

Auch das CBV (cerebral blood volume) kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden bestimmt werden. Die Messungen zeigen einheitlich einen leichten Anstieg des CBV bei neuronaler Stimulation:

Spezies	Autor	Methode	Stimulation	Ergebnis
Ratte	Mandeville 1999	fMRT	Vorderpfote, elektrisch	+ 17 ± 2 %
	Marota 1999	fMRT	Vorderpfote, elektrisch	+ 10 %
	Mayhew 2001	Imaging Spectroscopy	Whisker, elektrisch	+ 6 %
Mensch	Belliveau 1991	fMRT	Visuell	+ 32 ± 10%

Tab.3 Veränderungen des lokalen CBV bei neuronaler Stimulation

In der Spalte "Ergebnis" ist jeweils der maximale Anstieg des Blutvolumens unter Stimulation angegeben.

1.5.3. Erklärungsansätze

Wie lässt es sich erklären, dass, wie von Fox und Raichle 1986 gemessen und seither mit vielen Methoden bestätigt, der Blutfluss auf neuronale Aktivierung hin sehr stark, der Sauerstoffverbrauch der Neurone hingegen nur geringfügig ansteigt? Zwei wesentliche Erklärungsansätze lassen sich unterscheiden:

- 1) Die Hypothese des anaeroben Metabolismus: Fox und Raichle beobachteten einen dem Blutflussanstieg vergleichbar großen Anstieg des Glukoseverbrauchs. Diese Konstellation ließe folgende Erklärung zu: Unter Aktivierung deckten die Neuronen und Astrozyten einen Teil ihres Energiebedarfs durch anaeroben Metabolismus, der stark erhöhte Blutfluss diene der Anlieferung von Glukose, weniger der von Sauerstoff.

- 2) Die Hypothese der diffusionslimitierten Sauerstoffversorgung: Ein anderer Vorschlag wurde von Buxton entwickelt (Buxton 1997). Er argumentierte, dass mit steigendem Blutfluss die Verweildauer des Blutes in den Kapillaren sinke, und damit auch der Anteil des aus den Kapillaren abgegebenen Sauerstoffs (die sogenannte oxygen extraction fraction (OEF)). Um eine geringe Steigerung der Sauerstoffabgabe ans Gewebe zu erreichen sei daher eine überproportionale Steigerung des Blutflusses notwendig. Eine der wesentlichen Voraussetzungen für dieses "oxygen limitation model" ist die Annahme, dass bereits unter Ruhebedingungen alle Kapillaren im Gehirngewebe perfundiert sind und nicht neue Kapillaren bei erhöhter neuronaler Aktivität öffnen (capillary recruitment), dies scheint auch tatsächlich der Fall zu sein.

1.6. Die initiale Antwort

1.6.1. Gibt es einen initialen Abfall der Sauerstoffkonzentration ?

Aufgrund der guten zeitlichen Auflösung des Optical Imaging und der Imaging Spectroscopy war es mit diesen Methoden möglich, sehr genau die initiale Phase der Blutflussantwort auf Stimulation eines Gehirnareals zu untersuchen. Die von Fox und Raichle beschriebene Hyperoxygenierung nach Stimulation ließ sich leicht nachweisen: Die Intensität des reflektierten Lichts bei 605nm Wellenlänge steigt einige Sekunden nach Stimulationsbeginn stark an aufgrund der sinkenden Absorption durch deoxy-Hämoglobin, das während der Blutflussantwort aus dem Areal "ausgewaschen" wird. Auch in der genaueren spektroskopischen Analyse fand sich ein Abfall der deoxy-Hämoglobin-Konzentration, ebenso ein Anstieg der oxy-Hämoglobin-Konzentration einige Sekunden nach Stimulationsbeginn. Innerhalb der ersten 3 Sekunden ließ sich allerdings ein Anstieg der deoxy-Hämoglobin-Konzentration beobachten (Malonek 1996), den Malonek und Grinvald als Zeichen einer initialen Deoxygenierung des Blutes im aktivierten Gehirnareal interpretierten. Demnach verbrauchten die Neurone unmittelbar nach ihrer Aktivierung mehr Sauerstoff, dadurch steige mit dem Gradienten zwischen Nervenzelle und Blutgefäß auch die Diffusion von Sauerstoff und die Konzentration in den Blutgefäßen (insbesondere also

Kapillaren) sinke, ehe die überschießende Blutflußantwort nach etwa 3 Sekunden zu einer Hyperoxygenierung im aktivierten Areal führe.

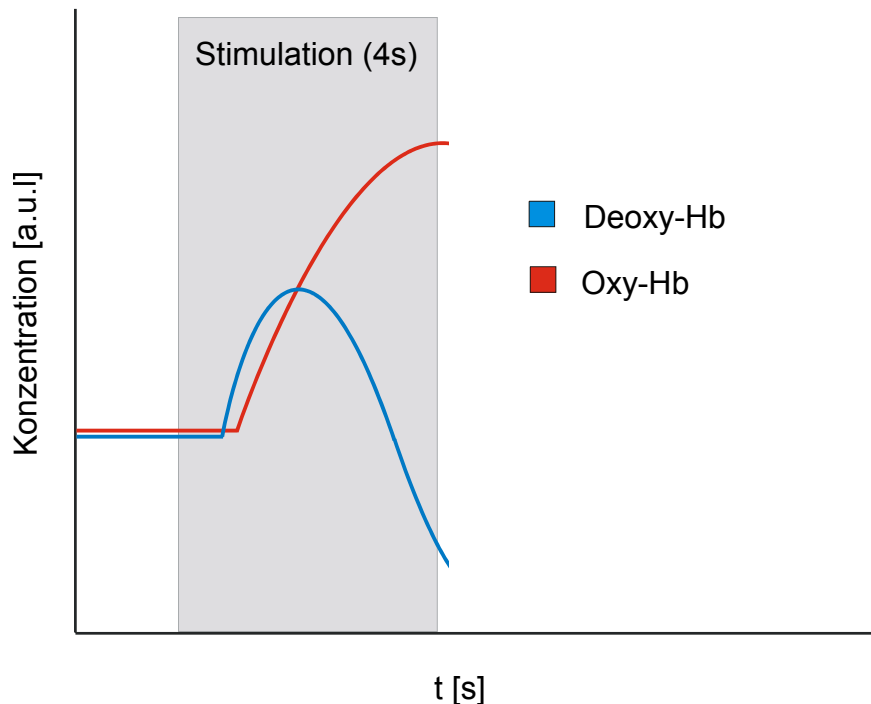


Abb.1 Der "initial dip": initialer Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration

(schematisch nach (Vanzetta 1999)) Kurze Zeit nach Stimulationsbeginn steigt die Konzentration von deoxy-Hämoglobin an ("initial dip") um wenig später unter den Ruhewert abzufallen ("Hyperoxygenierung")

Dieses Phänomen der initialen Hypoxie im aktivierten Areal bezeichneten sie als "initial dip", weil es in der fMRT einen initialen Abfall des BOLD-Signals implizieren würde. Der "initial dip" erwies sich in ihren Messungen als äußerst stabil reproduzierbar, der Anstieg der deoxy-Hämoglobin-Konzentration wurde allerdings nicht von einem Abfall der oxy-Hämoglobin-Konzentration, wie man es bei verstärkter Sauerstoffentnahme aus den Blutgefäßen erwarten sollte, begleitet. Dieser Widerspruch in den Messungen eröffnete zwei Wege in der Interpretation:

- 1) Eine Zunahme der deoxy-Hb-Konzentration bei unveränderter oxy-Hb-Konzentration könnte bedingt sein durch eine Umverteilung von Blutvolumen und Blutfluss. Es bliebe zu klären, wo und wie diese Umverteilung stattfindet, und ob sie eng auf das Gebiet der aktivierten Neurone beschränkt ist. Ohne weiteres könnte man dann den "initial Dip" nicht allein durch $CMRO_2$ -Zunahme erklären.

- 2) Ohne aktive Regulation auf Gefäßebene anzunehmen, könnte lediglich ein methodischer Fehler diesen Widerspruch erklären. Man könnte dann nicht davon ausgehen, dass dieser methodische Fehler lediglich eine falsche Berechnung der oxy-Hb-Konzentration bewirkt, auch die Messung der deoxy-Hb-Konzentration müsste als fehlerhaft angesehen werden.

Eine Fehlerquelle bei der Interpretation der durch Imaging Spectroscopy gewonnenen Daten stellt die Annahme einer konstanten Pfadlänge aller aus dem Kortex emittierten Lichtstrahlen dar (Kohl 2000). Messungen von Lindauer et. al. (Lindauer 2000) zeigten tatsächlich, dass die Berücksichtigung der unterschiedlichen Pfadlängen, die DPF-Korrektur der Analyse (s.o.), qualitative Veränderungen der gemessenen Kurven ergeben kann: Zeigte die durch Analyse mit als konstant angenommenen Pfadlängen ermittelte Kurve einen initialen Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration, so war dieser in einer DPF korrigierten Analyse nicht mehr zu sehen. Eine ähnliche Vorgehensweise von Mayhew et. al. (Mayhew 2000) zeigte allerdings einen initialen deoxy-Hb-Anstieg auch mit DPF-Korrektur. Dennoch kann zumindest davon ausgegangen werden, dass das Ausmaß des Anstieges ohne DPF-Korrektur überschätzt wird.

Die Messung der initialen Blutoxygenierungsantwort wurde seither von vielen Autoren an unterschiedlichen Spezies mit unterschiedlichen Methoden wiederholt. Einerseits kamen optische Verfahren wie Optical Imaging, Imaging Spectroscopy und NIRS (Nah-Infrarot-Spektroskopie) zur Anwendung, andererseits die fMRT. Beide zielten darauf, die Veränderungen der deoxy-Hämoglobin-Konzentration zu messen. Die Ergebnisse sind weitgehend einheitlich, was die an Katzen und Affen erzielten Ergebnisse betrifft. Die Messungen an Ratten allerdings zeigen ein heterogenes Bild: Einige Autoren fanden keine initiale Abnahme der deoxy-Hb-Konzentration, andere (mit ähnlichen Methoden) sahen den "initial dip".

Spezies	Autor	Methode	Stimulationsart	Ergebnis
Katze	Malonek 1996	Imaging Spectroscopy	visuell	Dip (~ 30%, 3s)
	Vanzetta 1999	Phosphorescence Quenching	visuell	Dip (~25%, 2.5s)
	Kim 2000	fMRT	visuell	Dip (~ 22 %, 5s)
Mensch	Fransson 1998	fMRT	visuell	Kein Dip
	Obrig 1996	NIRS		Kein Dip
	Heekeren 1997	NIRS		Kein Dip
	Ernst 1994	fMRT	visuell	Dip (~50%,~1s)
	Menon 1995	fMRT	visuell	Dip (~25%,~2.5s)
	Hu 1997	fMRT		Dip
Affe	Logothetis 1999	fMRT (4.7 T)	Visuell, discrimination task	Dip (~ 25 %, 3s)
Ratte	Marota 1999	fMRT (2T, 4.7T)	Vorderpfote, elektrisch	Kein Dip
	Silva 2000	fMRT (9.4 T)		Kein Dip
	Lindauer 2001	Imaging Spectroscopy	Single Whisker, mechanisch, 2s	Kein Dip
	Nemoto 1999	Spectroscopy	Hinterpfote (elektrisch), 2s	Dip (ca. 5%, 2s)
	Mayhew 2000	Spectroscopy	Vorderpfote, elektrisch, 1s	Dip (10-15%, 2s)

Tab 4. Der "initial dip" (lokale initiale Deoxygenierung bei neuronaler Stimulation)

Die %-Angaben der Spalte "Ergebnis" gibt den Quotienten aus maximaler Deoxygenierung (je nach Methode: max. Abnahme der Sauerstoffkonzentration (Phosphorescence Quenching), max. Zunahme der deoxy-Hb-Konzentration (Spektroskopie), max. Abnahme des BOLD-Signals (fMRT)) und maximaler Hyperoxygenierung (je nach Methode: max. Zunahme der Sauerstoffkonzentration (Phosphorescence Quenching), max. Abnahme der deoxy-Hb-Konzentration (Spektroskopie), max. Zunahme des BOLD-Signals (fMRT)). Die Zeitangabe bezieht sich auf die Länge der initialen Antwort (Zeitpunkt des Kreuzens der Nulllinie nach Stimulationsbeginn).

Auch für die mit fMRT dargestellten initialen Anstiege der deoxy-Hb-Konzentration bieten sich allerdings unterschiedliche Erklärungsansätze:

- 1) Wie von Malonek et. al. postuliert könnte Ursache der gemessenen Veränderungen ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Neurone vor Beginn der Blutflussantwort sein.
- 2) Gjedde et al (Gjedde 1991) haben ein diffusionslimitiertes Modell für die Sauerstoffversorgung des Gehirns vorgeschlagen: Demnach ist bereits in Ruhe der pO_2 in den Mitochondrien der Neurone und Astrozyten nahe Null. Der Sauerstoffgradient zwischen Mitochondrien und Blutgefäßen, der die treibende Kraft für die Diffusion von Sauerstoff ins Gewebe darstellt, könnte folglich nur gesteigert werden, wenn die Sauerstoffkonzentration in den Blutgefäßen zunimmt. Dies wiederum setzt eine Reaktion der Gefäße voraus. Eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Neurone und Astrozyten vor einer Blutflussantwort wäre demnach unmöglich, eine Steigerung des neuronalen Sauerstoffverbrauchs hätte eine erhöhte Sauerstoffkonzentration in den Blutgefäßen zur Voraussetzung. Doch wie kann dann die in der fMRT gezeigte initiale Zunahme der deoxy-Hb-Konzentration erklärt werden ? Eine Möglichkeit bietet Buxton (Buxton 1998) mit dem "balloon model": Demnach führt eine früh einsetzende Blutflussantwort zunächst zu einem steigenden venösen Blutvolumen (der venöse "balloon"). Im von der fMRT erfassten Voxel sammelt sich daher zunächst mehr deoxy-Hämoglobin an, ehe es durch das, weniger deoxy-Hb enthaltende, arterielle Blut ausgewaschen wird und die deoxy-Hb-Konzentration fällt.

1.6.2. Kann man mit Hilfe des "initial Dip" die räumliche Auflösung der fMRT verbessern ?

Eine genaue Erforschung der initialen Antwort der Blutgefäße auf neuronale Aktivität erscheint aus einem einfachen Grund besonders wichtig: Ließe sich ein initialer Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration nachweisen, der auf einem unmittelbaren Anstieg des

Sauerstoffverbrauchs der aktivierten Nervenzellen beruhte, so wäre dieser initiale deoxy-Hb-Anstieg räumlich und zeitlich wesentlich enger mit der Region der aktivierten Neurone korreliert (fast identisch, abgesehen von der Entfernung der Neurone von ihren versorgenden Kapillaren und der Diffusionszeit des Sauerstoffs) als der gegenwärtig in der fMRT gemessene Abfall der deoxy-Hb-Konzentration einige Sekunden später. Dieser scheint um die Größenordnungen von Millimetern über das aktivierte Areal hinauszureichen (Malonek 1996)). Mit Hilfe der fMRT wäre es dann möglich detaillierte Strukturen der neuronalen Organisation im Gehirn aufzulösen ("Cortical Columns" in der Sehrinde z.B. auch von Menschen, "Whisker Barrels" im somatosensorischen Kortex der Ratte etc.). Tatsächlich beschrieben Kim et. al. (Kim 2000) bereits die Darstellung von kortikalen Substrukturen in der Sehrinde mit auf die initiale Phase fokussierter fMRT, die Ergebnisse erscheinen allerdings nicht widerspruchsfrei ((Logothetis 2000), (Grinvald 2000)). So zeigte sich bei dieser Darstellung "neuronale Aktivität" auch in den venösen Sinus. Eine ähnlich genaue Auflösung erreichte die gleiche Arbeitsgruppe (Kim 2001) zudem auch mit der Darstellung des lokalen CBF.

1.7. Phosphorescence Quenching

Die Tatsache, dass der in der Imaging Spectroscopy gemessene Zeitverlauf des oxy-Hb monophasisch, der des deoxy-Hb aber biphasisch ist, und eine Erklärung durch initiale Umverteilung von Blutfluss und/oder Blutvolumen nicht belegt ist, sowie die Abhängigkeit des initialen Verlaufs der deoxy-Hb-Konzentration von der Analysemethode in der Imaging Spectroscopy (Constant Pathlength vs. Differential Pathlength Analysis), machte es notwendig, die Hypothese des initial gesteigerten Sauerstoffverbrauchs durch eine unabhängige Methode zu überprüfen. Vanzetta und Grinvald (Vanzetta 1999) verwendeten hierzu das Phosphorescence Quenching. Dabei wird dem Tier eine phosphoreszierende Substanz in die Blutbahn injiziert, deren Phosphoreszenzverhalten von der Sauerstoffkonzentration der unmittelbaren Umgebung abhängig ist. Die verwendete Substanz bindet an Albumin und verlässt daher den Blutgefäßraum nicht. Anhand von Messungen der (durch kurze Lichtblitze hervorgerufenen) Phosphoreszenz (d.h. Messung der Intensität des Phosphoreszenzlichtes im zeitlichen Verlauf) kann dabei die Sauerstoffkonzentration berechnet werden. Auch mit dieser Methode erhielten Vanzetta und Grinvald (Vanzetta 1999) eine biphasische Kurve: Unmittelbar nach Stimulationsbeginn sank die Sauerstoffkonzentration ab, erreichte ihr Ausgangsniveau nach 2-3 s wieder und

stieg dann stark an. Die Messungen bestätigten nach ihrer Ansicht wiederum das durch die Imaging Spectroscopy gewonnene physiologische Modell: Die Neurone (und Astrozyten) verbrauchten demnach unmittelbar nach Aktivierung mehr Sauerstoff, dieser diffundiere aus den umliegenden Blutgefäßen aufgrund des gestiegenen Gradienten sofort in diese Zellen, die Blutgefäße reagierten noch nicht, und so falle die Sauerstoffkonzentration in den Blutgefäßen (hauptsächlich in den Kapillaren) ab, die deoxy-Hämoglobin-Konzentration steige. Erst durch die Dilatation der kleinen Arterien und Arteriolen werde zusätzlicher Sauerstoff angeliefert. Der Verbrauch der Neurone werde dabei überkompensiert, so dass die Konzentration von Sauerstoff in den Kapillaren und Venulen ansteige, ebenso die Konzentration von oxy-Hb, die Konzentration von deoxy-Hb sinke. Unklar bleibt bei dieser Interpretation weiter der in der Imaging Spectroscopy gemessene (Malonek 1996) frühe Anstieg der oxy-Hb-Konzentration.

2. Material und Methoden

2.1 Grundlagen des Phosphorescence Quenching

2.1.1. Begriffsklärungen

Zunächst sollen die für das Verständnis der physikalischen Grundlagen der hier verwendeten Methode des Phosphorescence Quenching wichtigen physikalischen Begriffe erläutert werden. Die Reihenfolge wurde dabei so gewählt, dass die Erläuterungen der Begriffe aufeinander aufbauen können.

Quantenausbeute: Die Quantenausbeute (Φ) eines photophysikalischen Prozesses ist definiert als Verhältnis aus Anzahl der Umwandlungen (n_u) zur Anzahl der absorbierten Photonen (n_p).

Spin: Jedes Elektron eines Atoms besitzt einen Eigendrehimpuls, der Spin genannt wird. Mit diesem Eigendrehimpuls ist ein magnetisches Moment verbunden.

Spinquantenzahl: Man unterscheidet zwei Arten des Spins (anschaulich: Drehrichtungen des Elektrons), die Elektronen erhalten so die Spinquantenzahl $+1/2$ oder $-1/2$. Die Spinquantenzahlen aller Elektronen addieren sich zur Gesamtspinquantenzahl S , meist ist $S=0$ (gleichviele Elektronen mit $S=+1/2$ und $S=-1/2$), existiert ein ungepaartes Elektron so ist $S=1/2$ (selten, da solche Elemente meist Verbindungen eingehen und die Elektronen anschließend gepaart vorliegen), manchmal liegen zwei Elektronen mehr mit dem Spin $+1/2$ vor als Elektronen mit dem Spin $-1/2$ (z.B. beim O_2), dann ist $S=1$.

Multiplizität: Die Multiplizität M des elektronischen Zustandes eines Moleküls oder Atoms ergibt sich aus $M = 2 \cdot S + 1$ (S ist die Spinquantenzahl).

Singulett-Zustand: Im Singulett-Zustand eines Atoms oder Moleküls ist die totale Elektronenspin-Quantenzahl $S = 0$ (also $M=1$, daher der Name Singulett-Zustand).

Triplet-Zustand: Im Triplet-Zustand eines Atoms oder Moleküls ist die totale Elektronenspin-Quantenzahl $S=1$ (also $M=3$, daher der Name Triplet-Zustand).

Spinauswahlregel: (Multiplizitätsauswahlregel) Diese Regel verbietet Energieübergänge innerhalb eines Atoms oder Moleküls, bei denen sich die totale Elektronenspin-Quantenzahl ändert. Spinverboten sind also Übergänge vom Triplet in den Singulett-Zustand und umgekehrt. Das bedeutet, dass solche Übergänge sehr unwahrscheinlich sind, oder, anders formuliert, dass die Halbwertszeiten dieser Übergänge sehr groß sind.

Internal Conversion: (innere Umwandlung) Als Internal Conversion bezeichnet man die strahlungslose Umwandlung eines elektronischen Zustands eines Moleküls in einen anderen.

Intersystem Crossing: Beim Intersystem Crossing erfolgt ein eigentlich spinverbotener (nach der Spinauswahlregel) Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (also von einem Singulett in einen Triplet-Zustand oder umgekehrt). Dass der Übergang spinverboden ist, bedeutet, dass die Lebensdauer des Ausgangszustandes besonders lang ist.

Jablonski-Diagramm: Das Jablonski-Diagramm stellt die elektronischen Zustände eines Moleküls sowie die Umwandlung dieser Zustände dar.

Intermolekularer Energietransfer: Nähern sich Moleküle oder Atome bis auf einen sehr geringen Abstand aneinander an, so besteht die Möglichkeit, dass die Energie des einen, zuvor (z.B. durch Lichtabsorption) angeregten, Atoms oder Moleküls an das andere abgegeben wird:



D, A: zwei verschiedene Teilchen

$h\nu$: Lichtquant, das vom Teilchen D absorbiert wird

D^* , A^* : angeregter Zustand der Teilchen

Absorption von Licht: Atome und Moleküle sind in der Lage Licht zu absorbieren. Dabei wird das Atom oder Molekül in einen angeregten Zustand versetzt, indem es die mit dem Lichtquant aufgenommene Energie dazu benutzt, einen höheren elektronischen Zustand

einzunehmen. Dieser angeregte Zustand ist instabil, das Teilchen hat nun verschiedene Möglichkeiten, in den Grundzustand zurückzukehren:

1. Die Energie kann in Schwingungsenergie des Teilchens umgewandelt werden (internal conversion (s.o.))
2. Die Energie kann in Form von Strahlung wieder abgegeben werden. Geht das Teilchen dabei von einem angeregten Singulett-Zustand in einen Singulett-Grundzustand oder von einem angeregten Triplett-Zustand in einen Triplett-Grundzustand über, so spricht man von **Fluoreszenz**. Dieser Übergang ist spinerlaubt nach der Spinauswahlregel (die Gesamtspinquantenzahl ändert sich nicht) und hat daher eine sehr kurze Lebensdauer (im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-9} s). Zur **Phosphoreszenz** s.u..
3. Die Energie kann an ein anderes Teilchen abgegeben werden: intermolekularer Energietransfer (s.o.)
4. Die Energie kann für chemische Reaktionen genutzt werden. Man unterscheidet *primäre* und *sekundäre photochemische* Reaktionen: Zu den primären photochemischen Reaktionen zählen: Die Spaltung in *freie Radikale*, die *Dissoziation der Moleküle*, die *Umlagerung*, *Isomerisierung*, die *Abspaltung eines H-Atoms*, die *Dimerisierung* und die Wirkung als *Sensibilisator* (s.u.). Ist das Produkt eines photochemischen Primärprozesses instabil, so folgt ein Sekundärprozess.

2.1.2. Phosphoreszenz

Auch Phosphoreszenz beginnt zunächst damit, dass ein Teilchen (Atom oder Molekül) ein Lichtquant absorbiert. Das Teilchen geht dabei durch Intersystem Crossing (s.o.) vom Singulett- in den Triplett-Zustand über (oder umgekehrt). Auch dann kann es seinen Grundzustand wieder über die Abgabe eines Lichtquants erreichen, man spricht von Phosphoreszenz. Bei der Phosphoreszenz ändert das Teilchen also im Gegensatz zur Fluoreszenz bei der Emission des Lichtquants seine Multiplizität. Da dieser Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität eigentlich nach der Spinauswahlregel verboten ist, ist die Lebensdauer dieses Prozesses wesentlich größer als bei der Fluoreszenz.

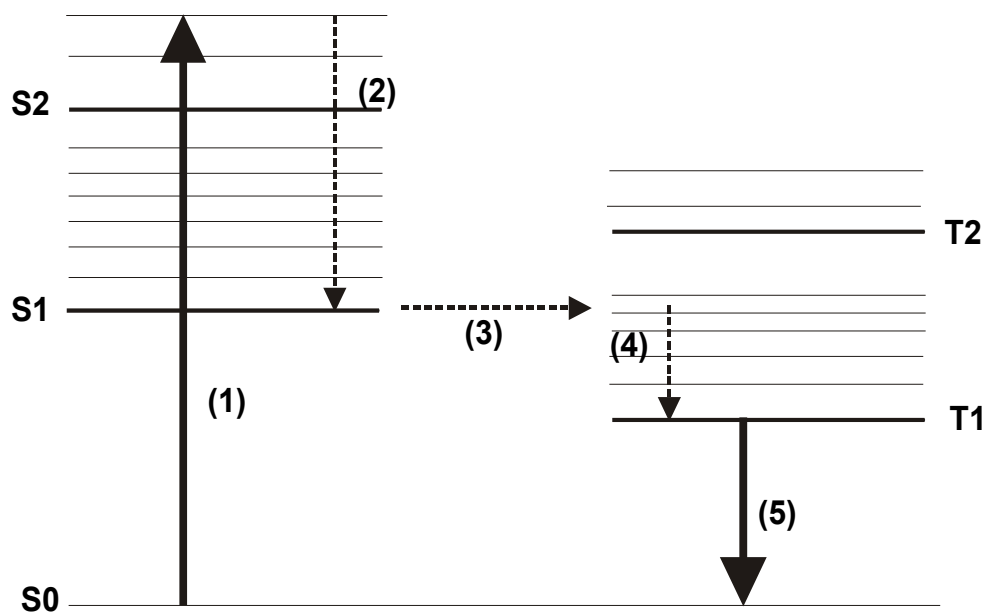


Abb.4 Jablonski-Diagramm der Teilprozesse bei der Phosphoreszenz

Durch Absorption eines Photons (1) geht das absorbierende Molekül vom Singulett-Grundzustand S₀ in einen angeregten Singulett-Zustand über (hier S₂). Durch (2) Internal Conversion (strahlungslos) relaxiert das Molekül in den angeregten Singulett-Zustand S₁. Durch Intersystem Crossing (3) und Internal Conversion (4) geht es in den ersten angeregten Triplett-Zustand T₁ über. Der Übergang von hier aus in den Singulett-Grundzustand S₀ ist eigentlich spinverboten und hat deshalb eine lange Lebensdauer, diesen Übergang (5) bezeichnet man als Phosphoreszenz, hierbei wird ein Lichtquant emittiert.

2.1.3. Phosphorescence Quenching

Manche phosphoreszierenden Substanzen können die mit einem Lichtquant aufgenommene Energie, durch die sie zunächst selbst in den Triplett-Zustand versetzt werden, an andere Moleküle abgeben: Dabei geht das aufnehmende Molekül in einen angeregten Zustand über, das abgebende in den Grundzustand (diesen Prozess bezeichnet man als intermolekularen Energietransfer, s.o.). Dieser intermolekulare Energietransfer ist z.B. möglich zwischen bestimmten Porphyrinen und Sauerstoff: Das durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge in den Triplett-Zustand versetzte Porphyrin gibt die Energie bei einer Kollision mit einem Sauerstoff-Molekül an dieses ab und geht dabei strahlungslos selbst wieder in den Grundzustand über. Der Sauerstoff geht vom Triplett- in den Singulett-Zustand über („intersystem crossing“) und hat nun unterschiedliche Möglichkeiten, die

aufgenommene Energie abzugeben: Internal Conversion, Phosphoreszenz (dies geschieht mit sehr geringer Quantenausbeute) oder chemische Reaktionen (Photosensibilisierung, s.u.).

Für das angeregte Porphyrin gibt es demnach im wesentlichen zwei Möglichkeiten, seine Energie abzugeben:

- 1) Phosphoreszenz

- 2) intermolekularer Energietransfer auf den Sauerstoff. Da bei der Übertragung der Energie auf den Sauerstoff normalerweise kein Licht emittiert wird (es sei denn, der dann angeregte Sauerstoff geht durch Phosphoreszenz in den Grundzustand über, was aber mit sehr geringer Quantenausbeute geschieht), spricht man bei diesem Vorgang von „Phosphorescence Quenching“: Löschung der Phosphoreszenz.

Dabei ändert sich die Lebensdauer der Phosphoreszenz des Porphyrins in Abhängigkeit von der Anzahl der Kollisionen des Sauerstoffs mit dem Porphyrin. Diese Anzahl wiederum ist abhängig von der Konzentration des Sauerstoffs, der Temperatur (je höher die Temperatur desto mehr Kollisionen), im Blut von der Bindung des Porphyrins an Albumin (dort gebunden ist das Porphyrin teilweise vor der Kollision mit Sauerstoff geschützt), also der Albuminkonzentration, der NaCl-Konzentration, dem pH-Wert usw..

Die Lebensdauer der Phosphoreszenz ist nicht abhängig von der Konzentration des Porphyrins . Mit der Konzentration des Porphyrins ändert sich lediglich die Intensität des emittierten Lichts, die Lebensdauer der Emission bleibt konstant. Die genannten Abhängigkeiten werden durch die Stern-Volmer-Gleichung mathematisch beschrieben.

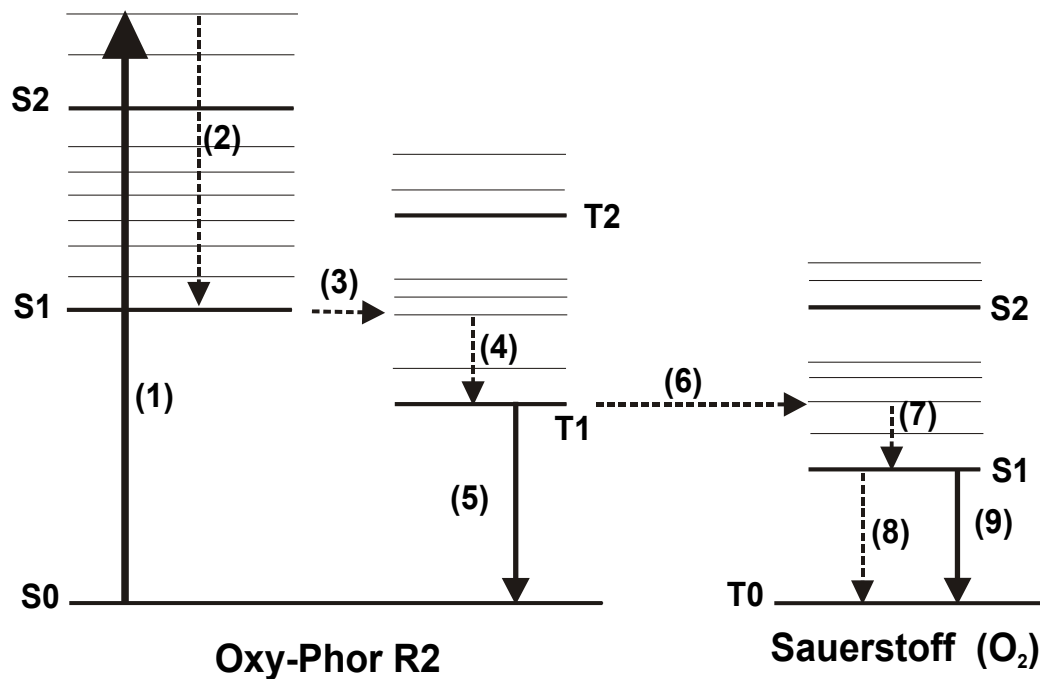


Abb.5 Jablonski-Diagramm der Teilprozesse des Phosphorescence Quenching

Zunächst laufen beim Phosphorescence Quenching die gleichen Prozesse wie bei der Phosphoreszenz ab: Nach Absorption des Photons (1) und Internal Conversion (2 und 4) sowie Intersystem Crossing (3) befindet sich das Molekül (hier der für die Versuche verwendete Farbstoff Oxy-Phor-R2) im angeregten Triplett-Zustand. Von hier aus sind nun zwei Prozesse möglich: Phosphoreszenz des Farbstoffs (5) oder intermolekularer Energietransfer auf den Sauerstoff (6). Sauerstoff hat einen Triplett-Zustand als Grundzustand (zwei ungepaarte Elektronen mit dem Spin $+1/2$, folglich die Gesamtspinquantenzahl $S=1$, damit die Multiplizität $M=3$), geht daher bei diesem Energietransfer, der während einer Kollision der Moleküle stattfindet (und dessen Häufigkeit damit von der Sauerstoffkonzentration abhängt), in einen angeregten Singulett-Zustand über. Von hier aus hat wiederum das angeregte Sauerstoffmolekül mehrere Möglichkeiten: Rückkehr in den Grundzustand (über strahlungsloses Intersystem Crossing (8)), Phosphoreszenz, oder Eingehen einer chemischen Reaktion (Photosensibilisierung, s.u.)

2.1.4. Stern-Volmer-Gleichung

Die Stern-Volmer-Gleichung bietet die Möglichkeit, durch Bestimmung der Lebensdauer der Phosphoreszenz bestimmter Substanzen den Sauerstoffpartialdruck in ihrer unmittelbaren Umgebung zu errechnen. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Lebensdauer bei $pO_2 = 0$ mmHg (T_0) und einer substanzspezifischen Konstanten k_q , die Konzentration der Substanz selbst hingegen muss nicht bekannt sein (sie hat keinen Einfluss auf die pO_2 -Berechnung). Die experimentelle Bestimmung von $T(pO_2)$ wird später

ausführlich beschrieben. T_0 und k_q müssen dazu nicht bestimmt werden, sondern können der Literatur entnommen werden (s.u.):

$$(2) \quad \frac{T_0}{T(pO_2)} = 1 + k_q T_0 pO_2$$

dabei ist

T_0 die Lebensdauer der Phosphoreszenz bei $pO_2=0$

$T(pO_2)$ die Lebensdauer der Phosphoreszenz bei gegebenem pO_2

K_q eine Konstante, die Temperatur, pH, Eigenschaften der phosphoreszierenden Substanz usw. zusammenfasst

pO_2 der gegebene Sauerstoffpartialdruck

2.1.5. pO_2 -Messung mittels Phosphorescence Quenching

Steht eine geeignete Substanz zur Verfügung, für die die Stern-Volmer-Gleichung zutrifft, so bietet die Messung der Lebensdauer der Phosphoreszenz dieser Substanz eine attraktive Möglichkeit für die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration (die dann über die Stern-Volmer-Gleichung errechnet werden kann). Der Vorteil dieser Methode für Messungen des pO_2 in Geweben besteht insbesondere darin, dass sie nichtinvasiv ist (abgesehen von der Injektion der Substanz), folglich insbesondere für Messungen in vivo und in empfindlichen Geweben eine wichtige Alternative darstellt. Zudem bietet sie eine exzellente Zeitauflösung (im Bereich von mehreren Millisekunden). Etliche Substanzen sind für die Anwendung entwickelt worden. Für unsere Messungen erschien eine von Lo et al. (Lo 1997) entwickelte Substanz, ein modifiziertes Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)-Porphyrin am geeignetsten:

2.1.6 Oxy-Phor-R2 (Pd-meso-tetra -(4-Carboxyphenyl)-Porphyrin)

Im Gegensatz zum einfachen Pd-meso-tetra-(4-Carboxyphenyl)-Porphyrin, das nur schlecht in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst werden kann und daher vor der Injektion an Albumin gebunden werden musste (so dass eine große Menge fremden Proteins mit injiziert wurde), ist Oxy-Phor R2 leicht in NaCl löslich. Die Löslichkeit wird durch 16 an das Porphyrin gebundene Carboxyl-Gruppen erreicht (Lo, 1997). Die Bindung an Albumin

erfolgt nach der Injektion im Blutgefäßsystem und bietet zwei wichtige Vorteile: Zum einen verbleibt die Substanz im Blutgefäßsystem. Diese Eigenschaft ist besonders dann wichtig (wie im Fall der vorliegenden Arbeit), wenn Aussagen über den dort herrschenden pO_2 , nicht über den des Gewebes gemacht werden sollen. Zum anderen schützt die Bindung an Albumin teilweise vor Kollisionen mit Sauerstoff, so dass die zu erwartenden Lebensdauern der Phosphoreszenz in einem gut messbaren Bereich liegen (von ca. 16 μs bei $pO_2=150$ mmHg bis etwa 600 μs bei $pO_2 = 0$ mmHg). Die Toxizität der Substanz, die z.B. aufgrund der Photosensibilisierungsreaktionen (s.u.) bestehen könnte, wurde an Mäusen mit Konzentrationen von 77 mg/kg KG und 231 mg /kg KG von Oxy-Phor R2 (als Bolus injiziert) getestet: Histopathologisch ließen sich auch bei 231 mg/kg KG keine Gewebsschädigungen nachweisen, weder 1 noch 5 noch 10 Tage nach der Injektion (Lo, 1997). Da bei diesen Versuchen allerdings die Auswirkung der Einstrahlung definierter Lichtmengen nicht getestet wurde, bleibt offen, inwieweit es bei durch Lichteinstrahlung gesteigerter Radikalproduktion nicht doch zu Schädigungen des Gewebes kommen kann. Oxy-Phor R2 wird mit einer Halbwertszeit von 2-3 h über die Nieren ausgeschieden. Da die Sauerstoffmessung aber nicht von der Konzentration des Porphyrins abhängig ist (lediglich die Intensität, nicht die Lebensdauer der Phosphoreszenz ändert sich, s.o.), beeinträchtigt diese Tatsache die Messungen nicht (erforderlich ist höchstens ein nachinjizieren der Substanz bei sehr langen Messungen). Für Oxy-Phor R2 geben die Hersteller folgende Kalibrationswerte an (Lo, 1997):

Bei $pH = 7.4$ und $Temp. = 38^\circ C$, bei physiologischer Albumin- und (NaCl)-Konzentration ist

$$k_q = 409 \cdot 1/(\text{torr} \cdot \text{sec})$$

$$T_0 = 601 \mu\text{sec}$$

Absorptionsmaximum für die Anregung der Phosphoreszenz: 524 nm

Emissionsmaximum der Phosphoreszenz: 695 nm

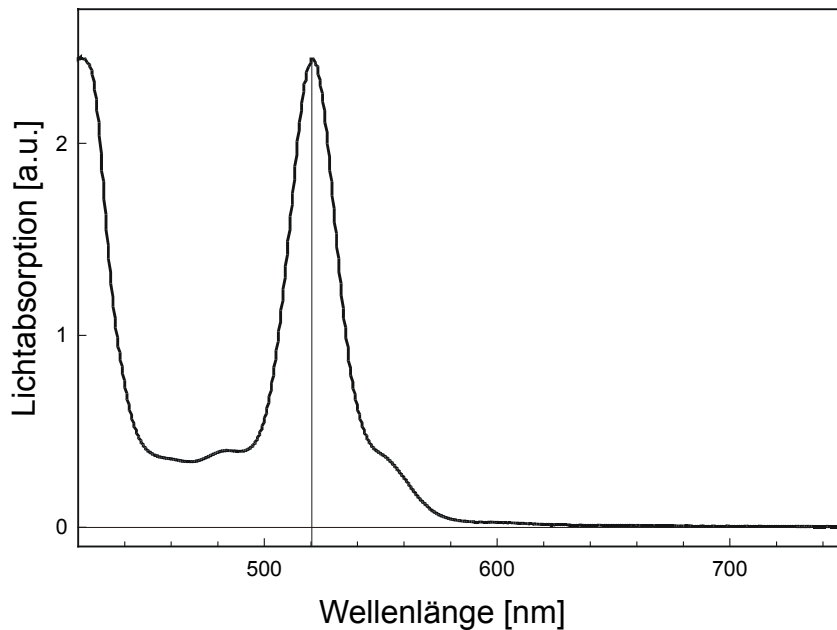
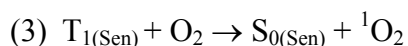
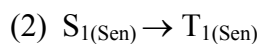
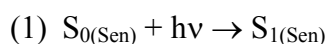


Abb. 6 Absorptionsspektrum von Oxy-Phor R2 (eigene Messung)

Das in physiologischer NaCl-Lösung gemessene Spektrum zeigt die maximale Absorption von Oxy-Phor R2 bei ca. 520nm (Herstellerangaben: 524 nm). Der Filter für das Anregungslicht wurde daher als Bandpassfilter $520\pm 10\text{nm}$ gewählt.

2.1.7. Photosensibilisierung

Die verwendete Substanz, Oxy-Phor R2, gehört der Substanzklasse der Porphyrine an, Substanzen, die in der photodynamischen Therapie (z.B. bestimmter Hauterkrankungen) Verwendung finden. Der dabei genutzte Mechanismus wird als Photosensibilisierung bezeichnet. Die ersten Schritte dieser Reaktionen sind die oben genannten: Nach Absorption eines Photons, Internal Conversion und Intersystem Crossing befindet sich das Porphyrin im ersten angeregten Triplett-Zustand. Durch intermolekularen Energietransfer wird die Energie auf ein Sauerstoffmolekül übertragen, wodurch dieses in den ersten angeregten Singulett-Zustand übergeht. Das Porphyrin geht dabei in den Grundzustand über und kann erneut ein Lichtquant absorbieren, wirkt in dieser Reaktion also als Katalysator:



Sen: Sensibilisator, S_0 : Singulett-Grundzustand, S_1 : erster angeregter Singulett-Zustand, T_1 : erster angeregter Triplett-Zustand, 1O_2 : Sauerstoffmolekül im ersten angeregten Singulett-Zustand

Das sich im angeregten Singulett-Zustand befindende Sauerstoffmolekül hat dann verschiedene Möglichkeiten, die Energie abzugeben: Mit geringer Quantenausbeute erfolgt ein strahlender Übergang in den Triplett-Grundzustand (Phosphoreszenz, s.o.), wahrscheinlicher erfolgt dieser Übergang jedoch strahlenlos (Internal Conversion). Neben diesen beiden Prozessen kann der Sauerstoff die aufgenommene Energie auch in chemische Reaktionen investieren, diese Reaktionen bezeichnet man als Photooxidationen. Solche Reaktionen sind in der Lage Veränderungen im Gewebe hervorzurufen, bei der photodynamischen Therapie ist die erwünschte Veränderung das Absterben von neoplastischen Zellen. Es soll an dieser Stelle deshalb darauf hingewiesen werden, dass unter den Bedingungen des Experimentes durch das injizierte Porphyrin und die von diesem induzierten photochemischen Reaktionen möglicherweise Veränderungen im Gehirngewebe hervorgerufen wurden. Da allerdings die verwendete Substanz Oxy-Phor R2 im Blut an Albumin bindet kann davon ausgegangen werden, dass auch der größte Teil des entstandenen Singulett-Sauerstoffs (aufgrund der extrem geringen Lebensdauer dieses Singulett-Zustands im Bereich von Nano- bis Mikrosekunden) den Blutgefäßraum nicht verlassen hat. Für die zytotoxische Wirksamkeit des Singulett-Sauerstoffs in der photodynamischen Therapie ist die Verteilung des Sensibilisators in den Zellen besonders wichtig. Somit ist anzunehmen, dass während der Experimente nur geringste, die Messung nicht beeinträchtigende, Gewebsveränderungen aufgetreten sind. Die oben genannten Untersuchungen über die Toxizität von Oxy-Phor R2 deuten in die gleiche Richtung.

2.2. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

2.2.1. Liste der verwendeten Materialien

1) **Versuchstiere:** männliche Wistar-Ratten (Charles River, Deutschland), 250-350g Körpergewicht.

2) Material für Präparation, Narkose, Physiologie:

Respirator: Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland

Blutdruckmonitor: RFT Biomonitor, Zwönitz, Deutschland

Atemgasmonitor: Heyer Artema MM 200, Bad Ems, Deutschland, (endexpiratorische Messung von CO₂ und N₂O sowie Atemfrequenz)

Blutgasanalyse: AVL Compact 3 Blood Gas Analyzer, (Analyse von Blut aus der A. femoralis. Gemessen wurden pO₂, pCO₂, pH, Bikarbonat und BE)

Narkose: Isofluran (Vapor 19.3, Drägerwerk, Deutschland), N₂O, α-Chloralose und Urethan über Perfusorsystem

Heizplatte: Eigenbau, Labor für experimentelle Neurologie der Charite, Berlin, Deutschland

Temperaturmonitor: RFT Biomonitor, Zwönitz, Deutschland

3) Material für den Aufbau Optical Imaging

Objektive: Nikkor 50mm, 1:1,2 (2 Stück)

Camera: analoge CCD-Kamera

Imaging-System: Imager 2001, Optical Imaging Inc., Germantown, USA

Filter: Bandpassfilter 570nm

4) Material für den Aufbau Phosphorescence Quenching

Objektive: s.o. + Nikkor 135mm, 1:2,8

Flash-Lamp: LS-1130 Flashpac

Photomultiplier: Hamamatsu H5702-50, Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland

Lichtleiter: Eigenbau

Filter: cut-off 590 nm

Dichroitischer Spiegel: cut-off bei 600 nm

Oxy-Phor R2: Oxygen Enterprises Ltd., Philadelphia, PA, USA

5) Computerprogramme

LabView, Version 4.1

MatLab, Version 5.0.0

2.2.2. Präparation der Versuchstiere

Die Tiere wurden zunächst mit Isofluran 4% in 100% Sauerstoff für ca. 60 sec betäubt, anschließend über eine Maske mit 3% Isofluran in 70% N₂O und 30% Sauerstoff in Allgemeinnarkose gehalten. Über eine rektal eingeführte Sonde wurde die Körpertemperatur kontinuierlich gemessen und über eine Heizplatte konstant bei $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ gehalten. Die Trachea wurde freipräpariert und eingeschnitten, ein kleiner Plastikschauch eingeführt, an der Trachea fixiert und das Tier über den Respirator mit einer Frequenz von ca. 60/min und einem Volumen von (je nach Gewicht) ca. 4 ml mit 0.8-1.5% Isofluran in 70% N₂O und 30% Sauerstoff beatmet. Die endexpiratorische Konzentration von CO₂ und N₂O sowie die Atemfrequenz wurden über einen Atemgasmonitor kontinuierlich gemessen. Anschließend wurden die A. femoralis und V. femoralis dargestellt und kannüliert, über die Arterie wurde kontinuierlich der mittlere arterielle Druck gemessen, in Intervallen wurde zur Blutgasanalyse aus der A. femoralis Blut entnommen und pO₂, pCO₂, pH und Bikarbonat bestimmt. Die Vene wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung (1ml/h) perfundiert, nach dem Ende der Präparation wurde über diesen venösen Zugang α -Chloralose und Urethan (als Bolus 40mg α -Chloralose pro kg Körpergewicht und 400mg Urethan pro kg Körpergewicht, anschließend die gleiche Menge als kontinuierliche Infusion pro Stunde) gegeben.

Die Tiere wurden dann in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt und der Kopf auf beiden Seiten über Metallstifte, die in den äußeren Gehörgang eingeführt wurden, fixiert. Nach einer medianen Hautinzision wurde der rechte M. temporalis nach lateral abpräpariert und der Schädelknochen dargestellt. Mit Hilfe eines Bohrers wurde unter ständiger Kühlung mit NaCl-Lösung ein Rechteck aus dem Schädelknochen herausgelöst. Der Mittelpunkt des

Rechtecks lag dabei ca. 7mm lateral und 3 mm kaudal zum Bregma. Um dieses "Fenster" wurde ein Wachswall am Schädelknochen so befestigt, das kein Blut am Schädelknochen entlang in das Fenster eindringen konnte. Die meningealen Gefäße (A. meningea media) wurden vorsichtig (ohne das darunter liegende Gehirngewebe zu schädigen) verödet (Microcautery), das Fenster wurde mit NaCl-Lösung aufgefüllt und mit einem feinen Deckglas verschlossen.

Da aufgrund der Inzisionen beim Kannülieren der Gefäße und der Trachea sowie bei der Präparation des Fensters erhebliche Schmerzreize gesetzt werden, musste die Anästhesie eine analgetische Komponente enthalten. Zusätzlich sollte das verwendete Anästhetikum jedoch einen möglichst geringen Einfluss auf die neurovaskuläre Kopplung und die im somatosensorischen Kortex evozierten Potenziale haben.

Bei der Wahl des Anästhetikums während der Durchführung der Versuche bestanden im wesentlichen drei Möglichkeiten (Lindauer 1993):

1. Das Fortführen der Isofluran/Lachgas-Narkose: Da Isofluran (oder Halothan) zu deutlichen Schwankungen des Ruheflusses im Gehirn führt, ist diese Narkoseform für Messungen der Blutflussantworten schlecht geeignet
2. Narkose mit Barbituraten: Diese reduzieren den kortikalen Metabolismus und vermindern die Blutflussantwort, auch diese Narkoseform scheint für Messungen der Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation ungeeignet
3. α -Chloralose und Urethan: Dabei bleiben evozierte Potenziale und Blutflussantwort weitgehend erhalten. Diese Narkoseform erscheint daher für Messungen der Blutflussantwort am besten geeignet

Nach Ende der Präparation wurde daher die Anästhesie auf α -Chloralose und Urethan (α -Chloralose 40 mg / kg KG als Bolus, anschließend die gleiche Menge pro Stunde i.v., Urethan 400 mg /kg KG als Bolus und anschließend die gleiche Menge pro Stunde i.v.) umgestellt und frühestens 30 min. nach Narkoseumstellung mit den Messungen begonnen.

2.2.3. Ziel der Versuche

Das Ziel der nun folgenden Versuche war zunächst die Darstellung desjenigen Areals von Nervenzellen im Kortex, die bei der Stimulation eines Barthaars (Single-Whisker-Stimulation) aktiviert sind. Diese Darstellung erfolgte über das unten beschriebene Imaging-System, das Absorptionskarten des im freipräparierten Fenster sichtbaren Kortex erstellt. Die Absorption (gemessen bei 570nm, einem der isosbestischen Punkte des Hämoglobins) nimmt stimulationskorreliert mit dem aufgrund der neurovaskulären Kopplung steigenden Blutvolumen zu, zu sehen sind dann Areale erhöhten Blutvolumens während der Stimulation, die gut mit den Arealen der neuronalen Aktivität korrelieren. Anhand der Lokalisation über das Imaging-System konnte dann der Lichtfleck des Anregungslichtes für die Messung der Sauerstoffkonzentrationsänderungen mittels Phosphorescence Quenching an der richtigen Stelle (Stelle der neuronalen Aktivierung während der Stimulation des Barthaars) fokussiert werden, die Messung der Sauerstoffkonzentrationsänderungen in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität waren dann das Ziel dieser Arbeit.

2.2.4. Aufbau des Optical Imaging

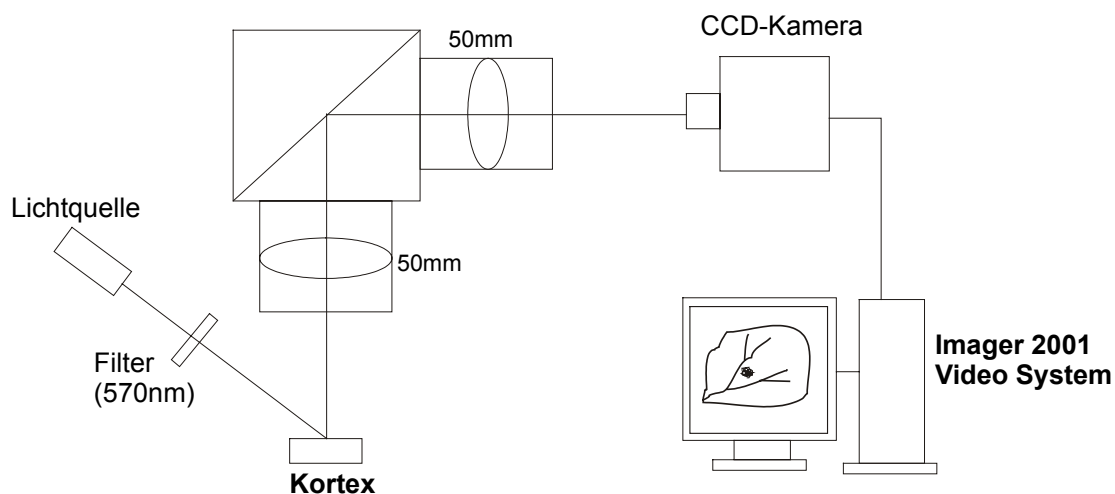


Abb. 7 Aufbau des Optical Imaging

Das kranielle Fenster wird mit Licht von 570 nm (einer der isosbestischen Punkte des Hämoglobins) beleuchtet. Das reflektierte Licht wird über ein Makroskop (bestehend aus zwei 50 mm Objektiven) auf den Chip einer CCD-Kamera fokussiert. Die gemessenen Intensitätswerte werden über das

Imager 2001 Video-System verarbeitet, gespeichert und auf dem Bildschirm als Absorptionsbild des Kortex dargestellt. Das Imager 2001-System kontrolliert gleichzeitig über den Master-8 die mechanische Stimulation des ausgewählten Barthaars.

2.2.5. Versuchsdurchführung des Optical Imaging

Über das oben dargestellte Imaging-System wurden mit dem Ziel der Lokalisation des zum stimulierten Barthaar gehörenden Barrels Absorptionsbilder des Kortex bei 570nm Wellenlänge aufgenommen. Da 570nm ein isosbestischer Punkt des Hämoglobins ist (die Absorption von oxy- und deoxy-Hb ist hier gleich groß), lassen sich somit Blutvolumenveränderungen nachweisen, die mit der vaskulären Antwort auf eine neuronale Aktivierung einhergehen. Es wurden Bilder mit einer Frequenz von ca. 1,7 Hz aufgenommen, pro Block zwei Baselines und zwei Stimulationen, die Gesamtdauer der Bildaufzeichnung pro Baseline bzw. Stimulation betrug 7s, die Stimulation des Barthaars (meist B1 oder B2) erfolgte 2s nach Beginn der Aufzeichnung für 4s bei 4Hz (mechanische Auslenkung des Barthaars um ca. 5-10°). Auf dem Bildschirm stellt das System (Imager 2001) zwei unterschiedliche Bilder dar: Das erste Bild zeigt die gemittelten ersten Baselines der Blöcke geteilt durch die gemittelten zweiten Baselines der Blöcke (zu sehen ist also das Rauschen). Angegeben werden dazu die mittlere Absorption und die Standardabweichung der mittleren Absorption der Baselines. Das zweite Bild zeigt die gemittelten Stimulationsbilder geteilt durch die gemittelten Baselines. Auch hierfür werden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Auf diesem zweiten Bild ist folglich der durch die Stimulation zur Baseline hervorgerufene Unterschied der Absorption zu sehen. Dieser Unterschied ist besonders deutlich im Bereich der durch die Stimulation hervorgerufenen neuronalen Aktivierung (die mit einer Blutvolumenzunahme einhergeht). Mit Hilfe dieses Bildes kann das zum Haar gehörende Barrel lokalisiert werden. Zur Kontrolle, dass die dargestellte Region mit verstärkter Absorption nicht durch zufällige Veränderungen des Blutvolumens (z.B. im Rahmen von spontanen Vasomotionen) zustande kam, wurden die Standardabweichungen der Absorptionen zwischen Baselines und Stimulationen verglichen. Zusätzlich wurde die Möglichkeit des Imager 2001-Systems genutzt, den Zeitverlauf der Absorption für eine bestimmte, vorher auszuwählende Region des Bildes (das sogenannte Superpixel) anzeigen zu lassen. Dieser Zeitverlauf musste der bei einer Stimulation erwartete sein (Absorptionszunahme ein bis zwei Sekunden nach Stimulationsbeginn).

Da die Messung der Sauerstoffkonzentrationsveränderungen mit dem Phosphorescence Quenching in der Mikrozirkulation erfolgen sollten, wurde das zunächst ausgewählte Haar gewechselt, falls das zugehörige Barrel in unmittelbarer Nähe oder unter einem größeren pialen Blutgefäß lag.

2.2.6. Aufbau des Phosphorescence Quenching

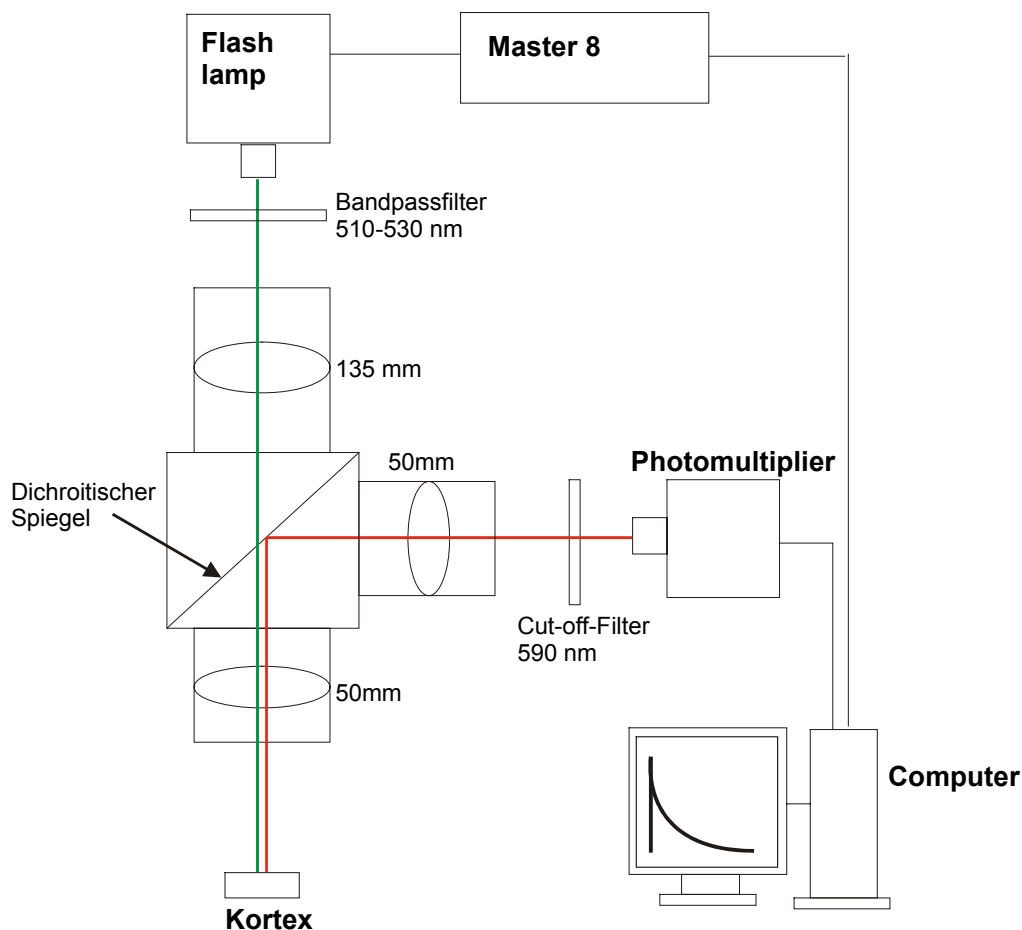


Abb. 8 Darstellung des Versuchsaufbaus für das Phosphorescence Quenching:

Der Computer gibt das Trigger-Signal für die flash lamp und den Stimulator über den Master 8 aus. Das weiße Licht der flash lamp passiert den Bandpassfilter und wird dadurch auf die Wellenlängen 510-530 nm eingengt. Durch das 135 mm und das 50 mm-Objektiv wird ein kreisrunder Lichtfleck (ca. 1,3 mm Durchmesser) auf den Kortex des Versuchstieres fokussiert. Das auf den Kortex treffende Licht regt den in den Blutgefäßen befindlichen Farbstoff zur Phosphoreszenz an. Das Phosphoreszenz-Licht ist Licht einer wesentlich höheren Wellenlänge (ca. 695nm). Vom direkt reflektierten Anregungslicht wird es durch den dichroischen Spiegel (dieser

reflektiert Licht über 590 nm und lässt Licht unter 590nm passieren) und den 590nm cut-off Filter getrennt. Das Phosphoreszenz-Licht wird durch die Optik (zwei 50mm Objektive) auf den Lichtleiter des Photomultipliers fokussiert, die Intensitätswerte werden im Photomultiplier gemessen, die Daten an den Computer weitergegeben und dort für die spätere Analyse gespeichert.

2.2.7. Versuchsdurchführung des Phosphorescence Quenching

1. Single-Whisker-Versuche

Nach Ende der Präparation wurde den Versuchstieren über den venösen Zugang Oxy-Phor R2 (40 mg /kg Körpergewicht) in ca. 1ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst injiziert. Da Oxy-Phor-R2 im Blut an Albumin bindet, verbleibt es im Blutgefäßsystem (Lo, 1997). Nachdem mit Hilfe des Optical Imaging (s.o.) die Lokalisation des zum stimulierten Haar (meist B1 oder B2) gehörenden Whisker-Barrels identifiziert wurde, wurde zunächst der Lichtfleck des Anregungslichts auf diese Stelle fokussiert. Dieser Lichtfleck hatte einen Durchmesser von etwa 1,3 mm. Das vom Kortex emittierte Licht wurde anschließend auf den zum Photomultiplier führenden Lichtleiter fokussiert.

Die Anregung der Phosphoreszenz erfolgte mit Hilfe einer flash-lamp, das Licht wurde durch einen Bandpassfilter ($520 \pm 10\text{nm}$) auf die erwünschte Anregungswellenlänge eingeeengt. Die Intensität der durch dieses Anregungslicht hervorgerufenen Phosphoreszenz (ca. 695 nm Wellenlänge) wurde mit Hilfe des Photomultipliers gemessen, die Daten an den Computer weitergegeben und gespeichert.

Es wurden pro Stimulation 15s oder 20s lang mit einer Frequenz von 100Hz Lichtblitze erzeugt und mit der gleichen Frequenz und Dauer Phosphoreszenzkurven gemessen. Pro Phosphoreszenzkurve wurden mit einer Frequenz von 1Mhz 500 Intensitätswerte gespeichert, der erste 20 μs vor dem Intensitätsmaximum, der letzte 480 μs danach. Zwei bzw. vier Sekunden nach Beginn der Datenaufzeichnung (also nach 200 bzw. 400 Lichtblitzen) wurde das ausgewählte Haar mit Hilfe des mechanischen Stimulators vier Sekunden lang bewegt (Auslenkung etwa 5-10°, Frequenz 4Hz). Die Intensitätswerte wurden später mit Hilfe des unten beschriebenen Programms analysiert. Dabei wurde zunächst mittels eines monoexponentiellen Fits die Lebensdauer und daraus über die Stern-Volmer-Gleichung der $p\text{O}_2$ berechnet.

Es wurden in zufälliger Reihenfolge 15 bzw. 20s -Blöcke von Daten mit Stimulation des Barthaares (Stimulations-Blöcke) und ohne Stimulation des Barthaares (Baseline-Blöcke)

aufgenommen. Es wurden unterschiedlich viele Stimulationen pro Tier durchgeführt, je nachdem wie lange die systemphysiologischen Daten (Blutdruck, endexpiratorischer pCO₂, Blutgase) im erwünschten Rahmen blieben.

2. Whole-Pad Versuche

Die Stimulation aller Barthaare gemeinsam (Whole-pad Stimulation) wurde im Prinzip genauso wie die Single-Whisker Stimulationen durchgeführt. Da das Areal der aktivierten Neurone hierbei wesentlich größer ist als bei der Stimulation eines einzelnen Whiskers konnte auf das vorausgehende Optical Imaging verzichtet werden. Die Lokalisation des Areals wurde anhand der Architektur der pialen und meningealen Gefäße (s.o.) festgelegt. Die Stimulation (auch hier Beginn nach 2s, 4s Dauer mit 4Hz) der zusammengeklebten Whisker wurde mit kurzen Druckluftstößen (air-puff, etwa 10° Auslenkung der Haare) erreicht. Auch hier wurden Stimations- und Baseline-Blöcke in zufälliger Reihenfolge aufgenommen.

2.2.8. Statistische Auswertung

Hier sollte die Frage untersucht werden, ob sich die gemessenen Sauerstoffkonzentrationswerte nach Stimulation signifikant von denen der Baselines unterscheiden.

Für die Gruppe der Single-Whisker-Tiere (n=6) wurden initiale Antwort, Hyperoxygenierung und Undershoot mit Hilfe eines gepaarten t-Tests untersucht. Dem Test liegt die Annahme zugrunde, dass die Messwerte einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. In der Gruppe mit whole-pad Stimulation war die Anzahl der Tiere für eine statistische Auswertung zu gering (n=3).

Für die Gruppe (n=6) der Single-Whisker Tiere wurden die gemittelten Werte (für jedes Tier wurden die gemittelten Baselines von den gemittelten Stimulationen abgezogen) des Zeitraums von -0.5 - 0 s (unmittelbar vor Beginn der Stimulation) mit denjenigen 0.5-1 s (Zeitraum der initialen Antwort), 4.5-5 s (Zeitraum der maximalen Hyperoxygenierung) und 9.5-10 s nach Beginn der Stimulation (Zeitraum des undershoots) mit Hilfe eines gepaarten t-Test verglichen. Eine Trennschärfe (Power) des Tests von 0.7 und ein p-Wert von 0.05 wurden zum Verwerfen der Nullhypothese vorausgesetzt.

2.3. Kurze Beschreibung der Computerprogramme

Zur Verwirklichung der Messungen mussten technische Voraussetzungen geschaffen werden, die es ermöglichten, folgende Aufgaben zu erfüllen:

- 1) Die Stimulation der Barthaare musste zu einem exakt bestimmbar Zeitpunkt mit vorgegebener Dauer und Frequenz erfolgen.
- 2) Mit hoher Frequenz (100 Hz) und exakt zeitlich bestimmbar mussten kurze Lichtblitze auf den Kortex der Ratte fokussiert werden, um die Phosphoreszenz der injizierten Substanz anzuregen.
- 3) Die Intensität des Phosphoreszenzlichtes musste gemessen werden (ein Million Intensitätswerte pro Sekunde um eine genaue Berechnung der Lebensdauer der Phosphoreszenz zuzulassen), dabei musste die zeitliche Beziehung der gemessenen Werte zur Stimulation exakt bestimmbar sein.
- 4) Aus der immensen Menge an Intensitätswerten mussten diejenigen isoliert werden, die bis 500 Mikrosekunden nach dem Lichtblitz gemessen worden waren (also die einzelnen, durch einen Lichtblitz erzeugten Phosphoreszenzkurven).
- 5) Für jede einzelne Phosphoreszenzkurve musste durch mathematische Annäherung (monoexponentieller Fit) die Lebensdauer berechnet werden.
- 6) Über die Stern-Volmer-Gleichung mussten aus den einzelnen Lebensdauern die Sauerstoffkonzentrationen berechnet werden.
- 7) Die berechneten Sauerstoffkonzentrationen mussten im zeitlichen Verlauf dargestellt werden.

Hierzu wurden von mir zwei Computer-Programme erstellt:

2.3.1. Programm zur Datenaufnahme: phosphorescence16.vi (LabView)

Für die unter 1) bis 4) genannten Aufgaben, also Triggerung der Stimulation, Datenaufnahme und Isolieren der einzelnen Phosphoreszenzkurven wurde ein Programm in LabView geschrieben (phosphorescence16.vi). LabView ist eine graphische Programmiersprache, d.h., einzelne Befehle sind durch graphische Symbole repräsentiert, diese können in einem sogenannten Diagramm zu einem Programm verknüpft werden. Dies

bietet den Vorteil, dass man den Fluss der Daten anschaulich darstellen und verfolgen kann. Eingabe und teilweise auch Ausgabe von Daten erfolgen über eine graphische Benutzeroberfläche:

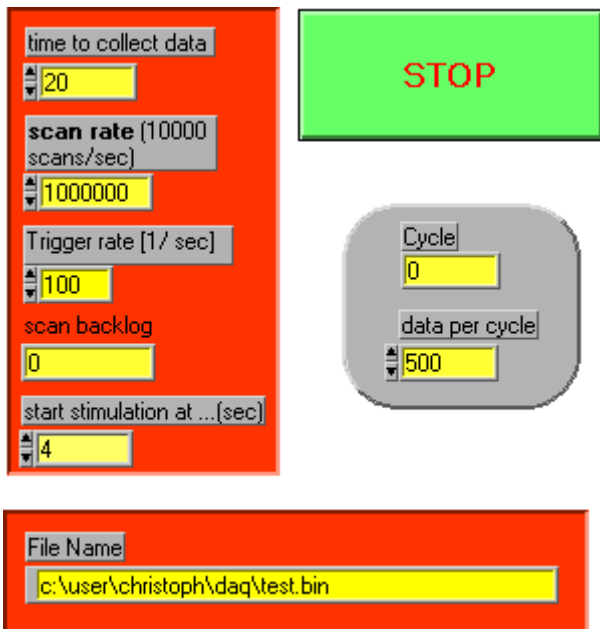


Abb. 10 Benutzeroberfläche von phosfluorescence16.vi

Wählbar sind die trigger rate (Frequenz der Triggerung der flash-lamp, in den Versuchen 100 Hz), die scan rate (Frequenz der Speicherung der Lichtintensitätswerte, in den Versuchen 1 Mhz), die Zeit der Datenaufnahme (in den Versuchen 15 bzw. 20 s), die Anzahl der zu speichernden Werte pro Lichtblitz (data per cycle) sowie der Name unter dem die Daten gespeichert werden (filename).

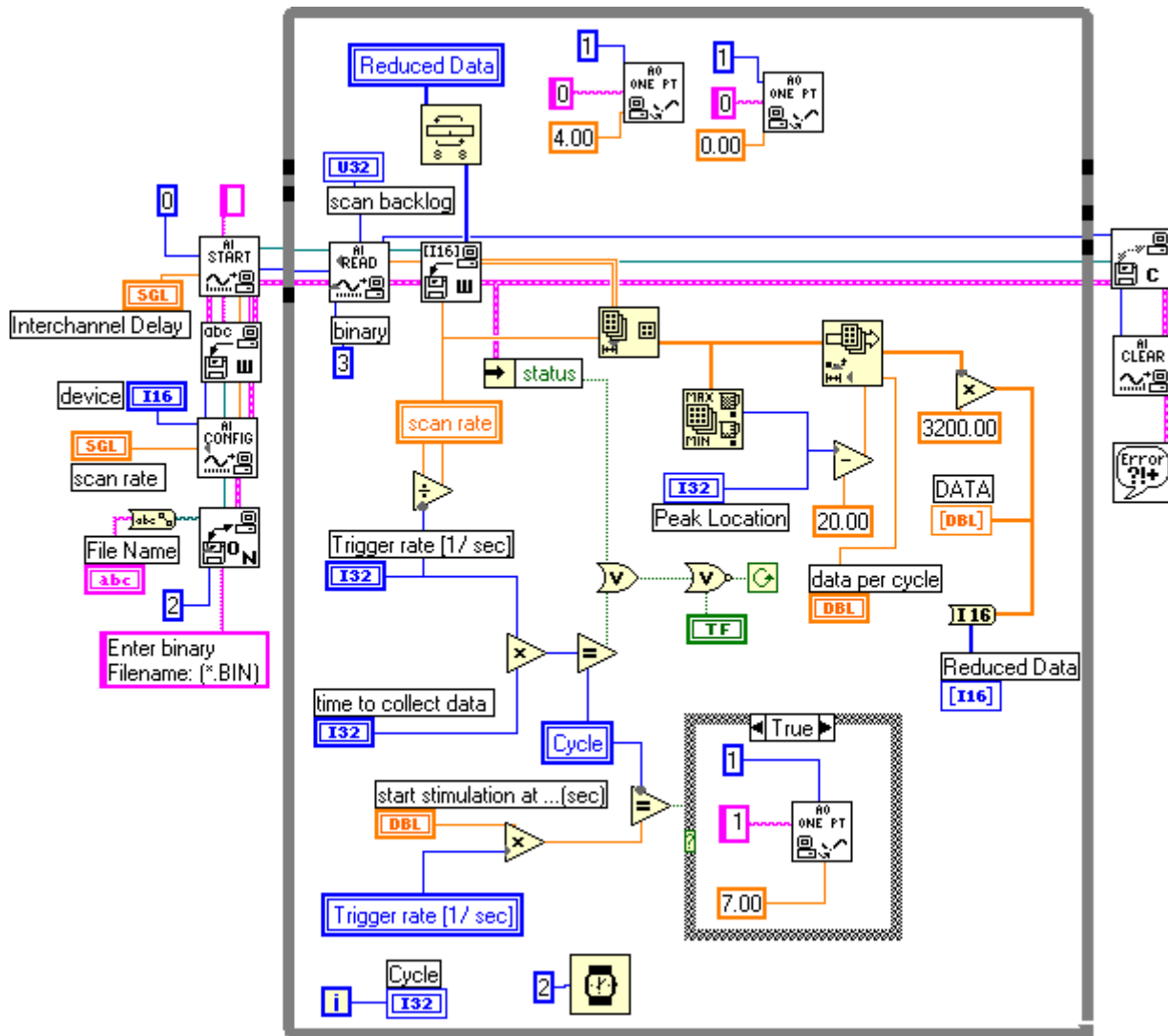


Abb. 9 Diagramm des Programmes phosphorescence16.vi

Das Programm zur Steuerung des Versuchsablaufs und zur ersten Datenanalyse und Speicherung (phosphorescence16.vi): Es gibt zu einer vorgebbaren Zeit Signale an den Master-8 zur Triggerung der Stimulation aus, liest die vom Photomultiplier kommenden Intensitätswerte, analysiert diese und speichert die einzelnen Phosphoreszenzkurven.

2.3.2. Programm zur Auswertung: phos auswert15x.m (MatLab)

Das Programm ist in MatLab (Version 4) geschrieben. Es dient dazu, die oben unter 5) bis 7) genannten Aufgaben, die Berechnung der Sauerstoffkonzentration aus den

Phosphoreszenzkurven der mit Hilfe des LabView-Programms aufgenommenen Daten, durchzuführen. Die mit phosphorescence16.vi gespeicherten Daten enthalten die Intensitätswerte des Phosphoreszenzlichts, diese werden nun von MatLab gelesen, die einzelnen Datenblöcke von 500 μs Länge, die pro Lichtblitz gespeichert wurden, werden einzeln analysiert: Der Fit-Bereich (von 100 μs - 480 μs nach dem Lichtblitz) wird herausgeschnitten, die erhaltene Phosphoreszenzkurve (Annahme: eine von Rauschen überlagerte Exponentialfunktion) wird logarithmiert, die erhaltene Kurve (Annahme: eine durch Rauschen überlagerte Gerade) wird "gefittet" (linear angepasst), das Programm gibt die "Fit-Parameter" (Steigung und Achsenabschnitt) an, aus diesen wird dann die Lebensdauer der Phosphoreszenz berechnet, in die Stern-Volmer-Gleichung eingesetzt und die erhaltenen Werte für die Lebensdauer und den pO_2 gespeichert und dargestellt.

(Da laut Promotionsordnung kein Anhang erstellt werden soll, wird das Programmlisting an dieser Stelle aufgeführt).

Programmlisting phos_auswert15x.m

```
clear
num_stims=59;
for o=1:num_stims;
% Parameter ...
trigger_rate=100;
data_per_cycle=500;
scans_per_second=1000000;
fit_begin=120;
fit_end=500;
quenching_constant=409; % 1/(torr*sec)
tau_zero=601; % usec
num_to_average=10;%Zahl der Cycles, die gemittelt werden ... die Zeitauflösung sinkt
num_to_average2=2; % Anzahl der aufeinanderfolgenden Datenpunkte, die gemittelt werden
time_unit=(10^-3)*num_to_average2;
bad_cycle_limit=1000;
background=-25;
% Laden der Daten und erstellen der Datenmatrix
filename=('1701_ba',num2str(o),'.bin');
fid=fopen(filename);
data_read=(fread(fid,inf,'int16')-background);
status=fclose(fid);
num_complete_cycles=fix(length(data_read)/data_per_cycle);
num_complete_cycles=(fix(num_complete_cycles/num_to_average))*num_to_average;
```

```

data_read2=data_read(1:(num_complete_cycles*data_per_cycle));
datamatrix2a=reshape(data_read2,data_per_cycle,num_complete_cycles);
clear background
% Mitteln der Daten (Parameter dazu s.o.)
figure(2)
datamatrix2=datamatrix2a';
for i=1:(num_complete_cycles/num_to_average);
    datamatrix_av1(i,1:data_per_cycle)= mean(datamatrix2((i-1)*num_to_average+(1:num_to_average),:));
end
for i=1:(data_per_cycle/num_to_average2);
    k=((i-1)*num_to_average2+1:i*num_to_average2);
    datamatrix_av2=datamatrix_av1';
    datamatrix_av(i,:)= mean(datamatrix_av2(k,:));
end
datamatrix2=datamatrix_av;
data_average_plot=reshape(datamatrix2,1,(num_complete_cycles/num_to_average)*...
(data_per_cycle/num_to_average2));
num_complete_cycles=(num_complete_cycles/num_to_average);
plot(1:length(data_average_plot),data_average_plot,'r')
grid on; zoom on; xlabel('time');ylabel('intensity, a.u.');
```

title('Averaged Data');

```

hold off
clear datamatrix_av2 datamatrix_av1
% Vektor für die x-Achse der graphischen Darstellung
time=(1:(length(data_read2)));
% Darstellung der Originaldaten
figure(1)
data_read2=reshape(datamatrix2a,1,num_complete_cycles*num_to_average*...
data_per_cycle);
plot(time,data_read2)
grid on; zoom on; xlabel('time');ylabel('intensity, a.u.');
```

title('Original Data');

```

hold off
clear peak_indices peak_indices2 data_read data_read2 time datamatrix2a
% Darstellen der Originaldaten, eingeschränkt auf den Fit-Bereich.
figure(3)
fit_begin=fit_begin/num_to_average2;
fit_end=fit_end/num_to_average2;
datamatrix3=datamatrix2(fit_begin:fit_end,:);
clear datamatrix2
data_to_fit=reshape(datamatrix3,1,((fit_end-fit_begin)+1)*num_complete_cycles);
time3=(1:((fit_end-fit_begin)+1)*num_complete_cycles);
plot(time3,data_to_fit)

```

```

grid on; zoom on; xlabel('time');ylabel('intesity, a.u.')
% Darstellen der Daten im Fit-Bereich, logarithmiert
figure(4)
semilogy(time3,data_to_fit)
grid on; zoom on; xlabel('time');ylabel('ln(intesity), a.u.')
% Monoexponentieller Fit und Darstellung des Fits mit Fehlerbalken
figure(5)
for i=1:num_complete_cycles
    data_to_fitr=log(datamatrix3(:,i));
    data_to_fit2=data_to_fitr';
    time_to_fit2=((i-1)*(fit_end-fit_begin+1)+1:i*(fit_end-fit_begin+1));
    time_to_fit3=time_to_fit2*time_unit;
    [p,s]=polyfit(time_to_fit3,data_to_fit2,1);
    [z,delta]=polyval(p,time_to_fit3,s);
    plot(time_to_fit3,data_to_fit2,time_to_fit3,z,'r',time_to_fit3,z+delta,'r',time_to_fit3,z-delta,'r')
    hold on;grid on;zoom on;xlabel('time'),ylabel('ln(intensity), a.u.')
% tau(i) ordnet jeder Phosphoreszenzkurve die durch den fit berechnete Lebensdauer zu
    p1=p(1,1);
    tau(i)=(-1/p1)*1000; % tau = decay constant in usec
% pO2(i) entsprechend den mittels Stern-Volmer-Gleichung berechneten pO2
    pO2(i)=(1/quenching_constant*(1/tau(i)-1/tau_zero))*10^6; % pO2 in torr (= mmHg)
end
clear quenching_constant tau_zero data_to_fitr data_to_fit2 time_to_fit3 time_to_fit2 p1 fit_end fit_begin
clear z delta p s datamatrix3
% Darstellung des Zeitverlaufs der Lebensdauer und des pO2
hold off
figure(6)
time_pO2_plot=(1:num_complete_cycles)*(1/trigger_rate)*num_to_average;
plot(time_pO2_plot,tau);hold on;
grid on;zoom on; ylabel('decay time/usec');xlabel('time/seconds');axis([0 max(time_pO2_plot) 0 750]);
STD_tau=std(tau);
Mittelwert_tau=mean(tau);
figure(7)
plot(time_pO2_plot,pO2);hold on;
grid on;zoom on; ylabel('pO2/mmHg');xlabel('time/seconds')
hold off
STD_pO2=std(pO2);
Mittelwert_pO2=mean(pO2);
clear Mittelwert_pO2 STD_pO2 Mittelwert_tau STD_tau time_pO2_plot num_to_average
num_complete_cycles
clear data_average_plot data_per_cycle data_to_fit datamatrix_av fid i num_bad_cycles num_to_average2

```

```
clear scans_per_second status time3 time_unit trigger_rate
% Speichern des Zeitverlaufs der Lebensdauer und des pO2
xfile=(['m'num2str(o)]);
save ([xfile])
clear
end
```

3. Ergebnisse

Im folgenden sollen hier zunächst die Messungen vorgestellt werden, die der Etablierung und Validierung der Methode dienten, anschließend die Messungen der Sauerstoffkonzentration im Verlauf der Whisker-Stimulation.

Zusätzlich werden Ergebnisse einer Computer-Simulation dargestellt, die das Verhalten des gemessenen Signals als ein Mischsignal aus verschiedenen Kompartimenten betrachtet.

3.1. Aufbau der Methode und Etablierung der Messung

3.1.1. Messung vom Kortex ohne Injektion von Oxy-Phor R2

Ein Problem bei den Messungen stellt das Trennen des aufgrund von unvollständiger Filterung mitgemessenen direkt reflektierten Lichts des Anregungslichtblitzes dar. Daher musste der Fit-Bereich so gewählt werden, dass die Intensität des Anregungslichtblitzes zum Zeitpunkt des Fit-Beginns auf die Ausgangsintensität abgesunken war. Um diesen Zeitpunkt zu bestimmen, wurden zunächst Messungen vom Kortex vor der Injektion von Oxy-Phor-R2 gemacht:

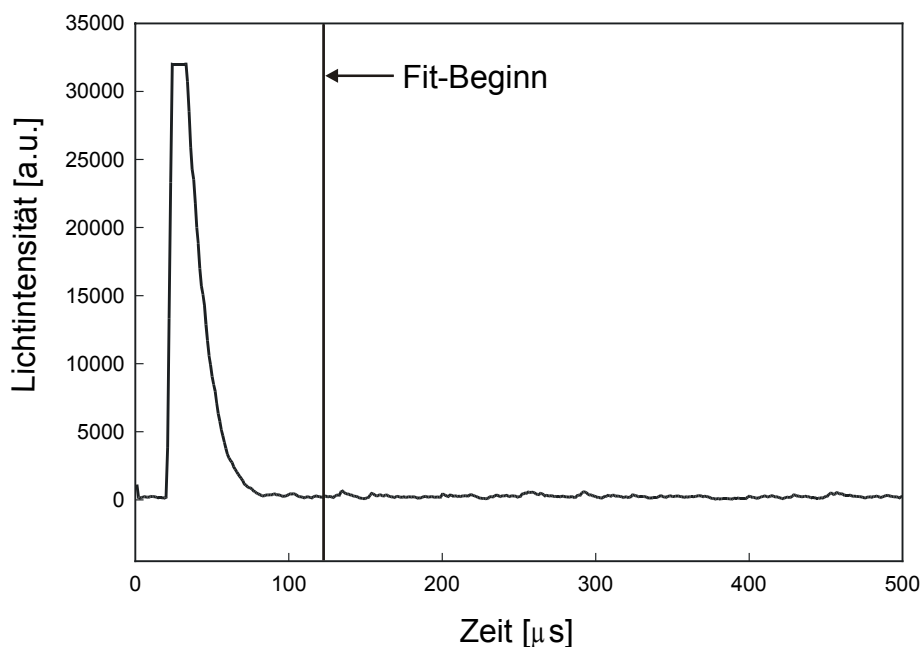


Abb. 11 Messung vom Kortex vor der Injektion von Oxy-Phor R2

Die Abbildung zeigt die vom Photomultiplier gemessene Lichtintensität des Anregungs-Lichtblitzes vor der Injektion von Oxy-Phor R2. Die Filterung des Anregungslichtes (520nm) durch den dichroischen Spiegel und den cut-off Filter ist nicht vollständig, der Anregungslichtblitz ist daher zu

sehen. Da allerdings bei der Berechnung der Sauerstoffkonzentration erst ab $100\mu\text{s}$ nach dem Intensitätsmaximum (hier also bei $t = 120\mu\text{s}$) gefittet wurde, ist die Intensität des reflektierten Lichtes bereits wieder auf das Ausgangsniveau (Rauschen) abgesunken und verfälscht die Daten nicht.

3.1.2. Messungen in vivo: Tod des Versuchstieres

Nachdem es gelungen war, Veränderungen der Sauerstoffkonzentration durch Hinzugeben von Hefe bzw. Einleiten von Stickstoff in eine NaCl-Lösung mit Oxy-Phor R2 mit Hilfe des Phosphorescence Quenching zu messen, folgten die ersten in-vivo-Versuche. Dabei erschien es sinnvoll, zunächst möglichst große Veränderungen des $p\text{O}_2$ in den kortikalen Blutgefäßen herbeizuführen, um zu überprüfen, ob die Messung der Sauerstoffkonzentration in vivo prinzipiell funktionierte. Besonders große Veränderungen des $p\text{O}_2$ in den Blutgefäßen des Kortex lassen sich durch Veränderung des systemischen $p\text{O}_2$ erzielen. Hierzu wurden die $p\text{O}_2$ -Änderungen beim Tod des Versuchstieres, unter Hypoxie (kurzfristige Beatmung mit 100% N_2) und Hyperoxie (geringfügige Erhöhung des $p\text{O}_2$ im inspiratorischen Gasgemisch) gemessen. Zusätzlich ließen sich Konzentrationsveränderungen des Sauerstoffs, die Folge von spontanen Oszillationen des Gefäßdurchmessers kortikaler Arterien sind (sogenannte Vasomotionen), darstellen.

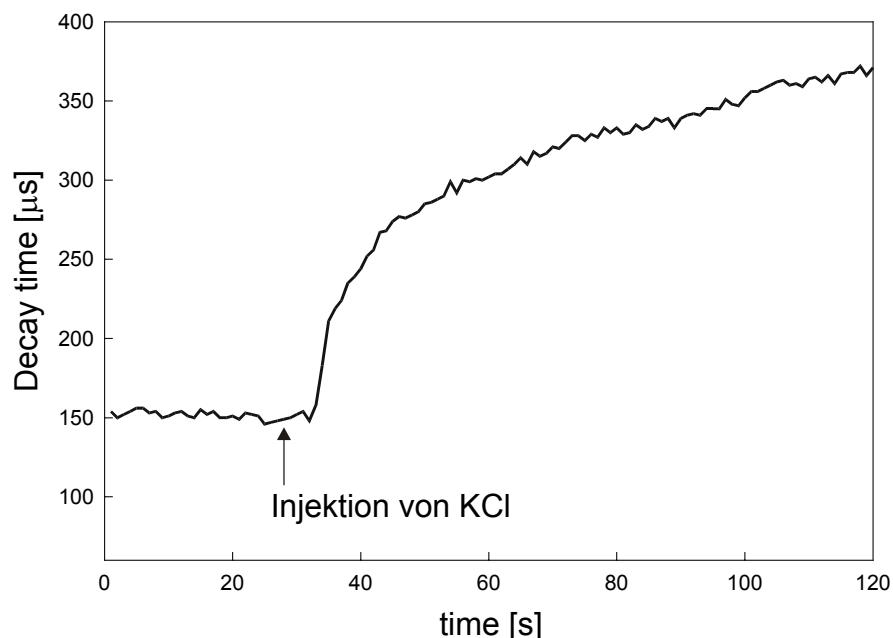


Abb. 12a Tod des Versuchstieres

Ca. 30 Sekunden nach Beginn der Datenaufzeichnung wurden dem Versuchstier 4 ml einer 3 molaren KCl-Lösung intravenös injiziert. Wenige Sekunden später fiel der Blutdruck steil ab, die Atmung sistierte. Wiederum einige Sekunden später ist eine deutliche Verlängerung der in der

kortikalen Zirkulation gemessenen Lebensdauer (= decay time) der Phosphoreszenz von Oxy-Phor R2 festzustellen. Die Lebensdauer steigt zunächst steil, dann flacher werdend über den gesamten Messzeitraum weiter an. Abb. 1b zeigt die über die Stern-Volmer Gleichung (mittels eines monoexponentiellen Fits) berechneten pO_2 -Werte.

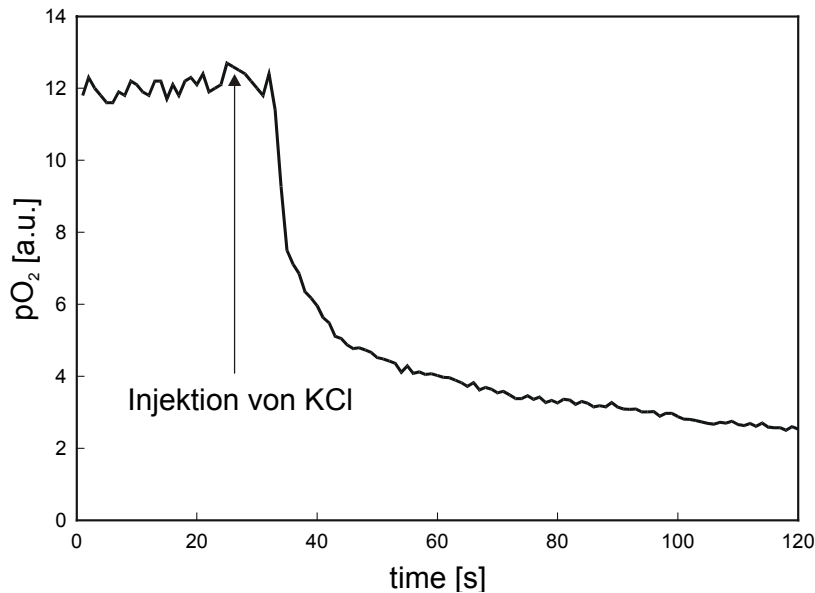


Abb. 12b Tod des Versuchstieres

Die aus den decay-times der Abb. 12a berechnete Sauerstoffkonzentration der kortikalen Mikrozirkulation zeigt den komplementären Zeitverlauf: Wenige Sekunden nach der intravenösen Injektion von KCl fällt die Sauerstoffkonzentration in den kortikalen Blutgefäßen des Versuchstieres steil ab.

3.1.3. temporäre Hypoxie, temporäre Hyperoxie, Vasomotionen

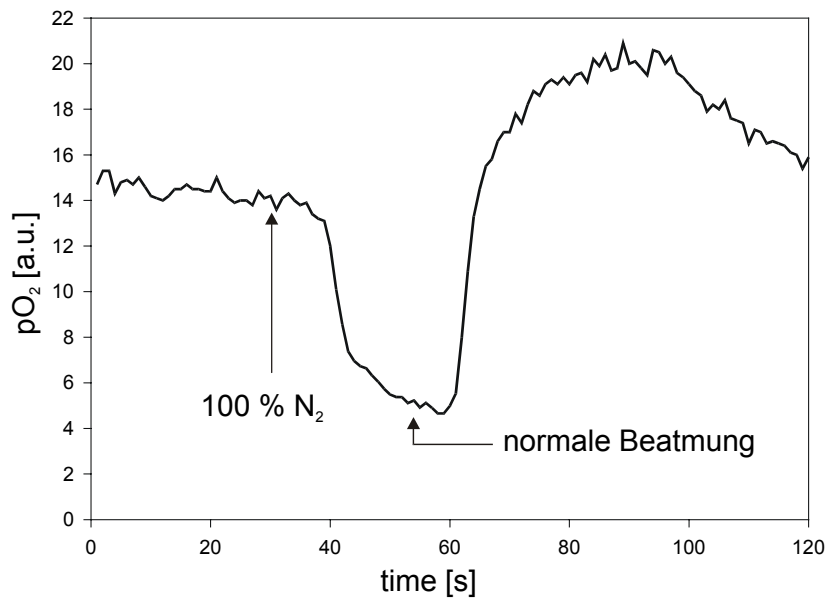


Abb. 13 Temporäre Hypoxie

Die Beatmung des Tieres wurde nach 30s auf 100% N₂ umgestellt. Einige Sekunden später ist ein deutlicher Anstieg der mit dem monoexponentiellen Fit berechneten decay-time zu beobachten. Dieser ergibt den deutlichen, hier dargestellten Abfall des pO₂. Nach ca. 50s wurde die Beatmung wieder auf das vor der Hypoxie verwendete Gasgemisch (Raumluft, etwas mit O₂ angereichert) zurückgestellt. Die decay-time sinkt wenige Sekunden später deutlich ab, der daraus berechnete pO₂ steigt also deutlich an und erreicht Werte, die klar über den Ausgangswerten liegen, um dann langsam wieder abzufallen.

Die dargestellten Veränderungen beim Tod des Versuchstieres bzw. unter Beatmung mit 100% N₂ führen zu sehr großen Veränderungen in der Sauerstoffkonzentration der kortikalen Blutgefäße. Die unter funktioneller Stimulation erwarteten Schwankungen sind wesentlich kleiner. Daher wurden durch leichtes Erhöhen des Anteils von O₂ im inspiratorischen Gasgemisch für eine kurze Zeit (ohne dass dies zu einer Veränderung des gemessenen endexpiratorischen pCO₂ führte) versucht, die unter funktioneller Stimulation sich ergebenden Veränderungen besser anzunähern:

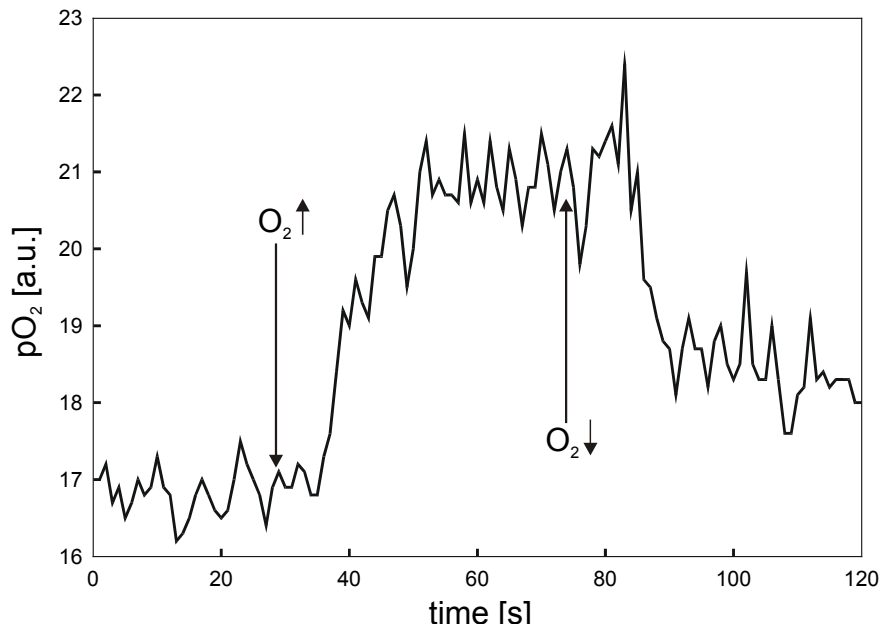


Abb. 14 Temporäre Hyperoxie

Der pO_2 des inspiratorischen Gasgemisches wurde bei $t=30s$ geringfügig erhöht. Wenige Sekunden später zeigt die Messung der Phosphoreszenz einen Abfall der Lebensdauer, dieser entspricht dem hier gezeigten Anstieg des pO_2 .

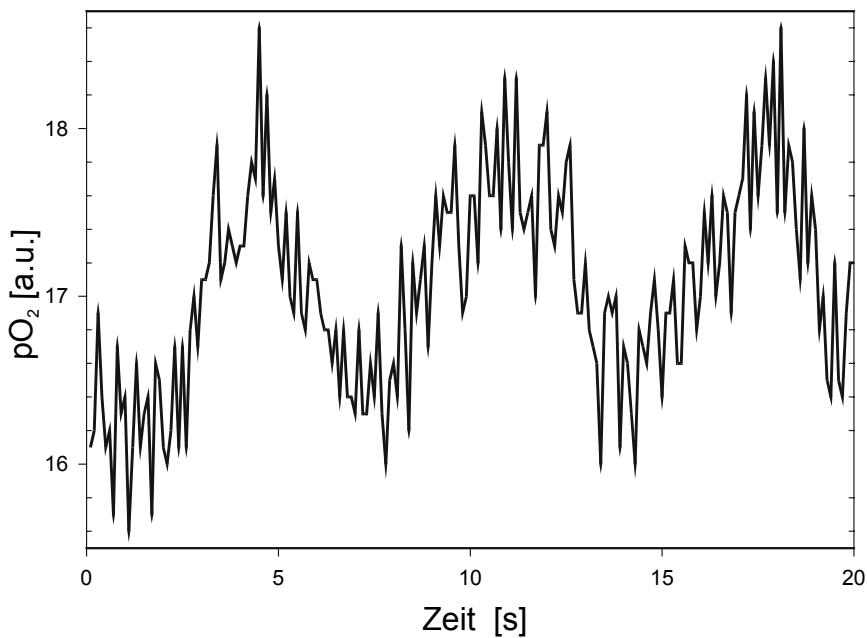


Abb. 15 Vasomotionen (V-Signal)

Spontane, langsame Oszillationen des Gefäßdurchmessers der zuführenden Arterien zu einem Gebiet der Mikrozirkulation im Kortex, sogenannte Vasomotionen (Mayhew 1996) führen zu Oszillationen des pO_2 . Die Frequenz beträgt normalerweise um 0.1 Hz, hier etwa 0.15 Hz.

3.2. Whisker-Stimulation

Nachdem die Messungen der globalen pO₂-Veränderungen gezeigt hatten, dass die Methode prinzipiell in der Lage war, Veränderungen der Oxygenierung des Blutes im Kortex zu messen, begannen wir mit den Messungen unter Whisker-Stimulation. Dabei wurden zwei Stimulationsparadigmen verwendet:

- 1) Mechanische Stimulation eines einzelnen Barthaares (Whiskers): Single-Whisker-Stimulation. Hierbei ist das Areal der neuronalen Aktivität möglicherweise kleiner als das Messvolumen.
- 2) Daher wurden ebenfalls Stimulationen aller Barthaare einer Seite gemeinsam durchgeführt: Whole-pad Stimulation. Bei dieser Art der Stimulation kann sicher davon ausgegangen werden, dass das aktivierte Areal (Oberfläche ca. 3x4 mm) wesentlich größer ist als das Messvolumen (Oberfläche ca. 1.3 x 1.3mm)

3.2.1 Physiologiedaten während der Versuche

Während der Versuche wurden kontinuierlich über einen Monitor mit Alarmfunktion der Blutdruck, die Temperatur und der endexpiratorische pCO₂ gemessen. Periodisch wurde aus dem arteriellen Zugang (A. femoralis) Blut entnommen und der arterielle pO₂, pH und pCO₂ analysiert.

	Single whisker	Whole pad
pO ₂ (arteriell)	113 ± 16,	99 ± 6
pCO ₂ (arteriell)	36 ± 2,	37 ± 3
pH (arteriell)	7.42 ± 0.04	7.43 ± 0.05
Arterieller Blutdruck (mmHg)	114 ± 15,	80 ± 3
Temperatur	37.5 - 38.5 °C	

Tab. 5 Physiologiedaten während der Versuche

Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung bzw. (Temperatur) der gesamte Bereich, in dem die Messwerte lagen.

3.2.2. Änderungen der Sauerstoffkonzentration während Single-Whisker-Stimulation

Die zentralen Versuche dieser Arbeit sind die folgenden Messungen des Verlaufs der Sauerstoffkonzentration in der Mikrozirkulation des somatosensorischen Kortex nach funktioneller Stimulation. Wir fanden, dass die Methode sensitiv genug ist, eine einzelne, vier Sekunden lange Stimulation eines einzelnen Barthaars (single whisker) anhand der Veränderungen der gemessenen Sauerstoffkonzentration der Mikrozirkulation im korrespondierenden Kortexareal nachzuweisen:

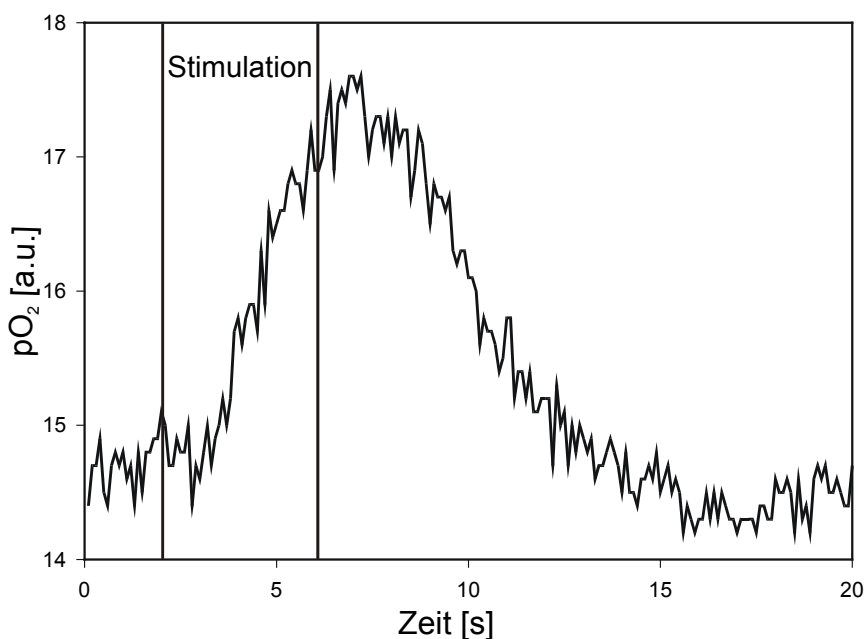


Abb. 16 Einzelne Stimulation eines einzelnen Barthaars

Beispiel für die Veränderungen des pO₂ während Single-Whisker Stimulation: Deutlich zu erkennen ist der etwa ein bis zwei Sekunden nach Stimulationsbeginn einsetzende Anstieg der Sauerstoffkonzentration, ein bis zwei Sekunden nach Ende der Stimulation fällt die Sauerstoffkonzentration wieder ab und erreicht wenige Sekunden später das Ausgangsniveau.

In der aus den Kurven aller sechs Tiere dieser Gruppe (Single-Whisker Stimulation) gemittelten Kurve lassen sich drei Phasen des Verlaufs erkennen:

- 1) initiale Phase: in der ersten Sekunde nach Beginn der Stimulation ist kein deutliches Abweichen von der Baseline zu erkennen, angedeutet sieht man eine Zunahme der decay time, entsprechend eine Abnahme der daraus berechneten Sauerstoffkonzentration

- 2) Hyperoxygenierung: Etwa eine Sekunde nach Beginn der Stimulation beginnt die decay time kürzer zu werden, die daraus berechnete Sauerstoffkonzentration beginnt, steil anzusteigen. Das Maximum des Anstieges wird nach weiteren vier Sekunden erreicht, also etwa fünf Sekunden nach Beginn bzw. eine Sekunde nach dem Ende der Stimulation
- 1) Undershoot: Der Ausgangswert wird acht Sekunden nach Beginn, also vier Sekunden nach dem Ende der Stimulation wieder erreicht, die Baseline wird deutlich unterschritten, der tiefste Wert wird dabei etwa 9.5 Sekunden nach Beginn bzw. 5.5 Sekunden nach dem Ende der Stimulation erreicht. Danach zeigt die Kurve die Tendenz, langsam wieder zum Ausgangswert zurückzukehren.

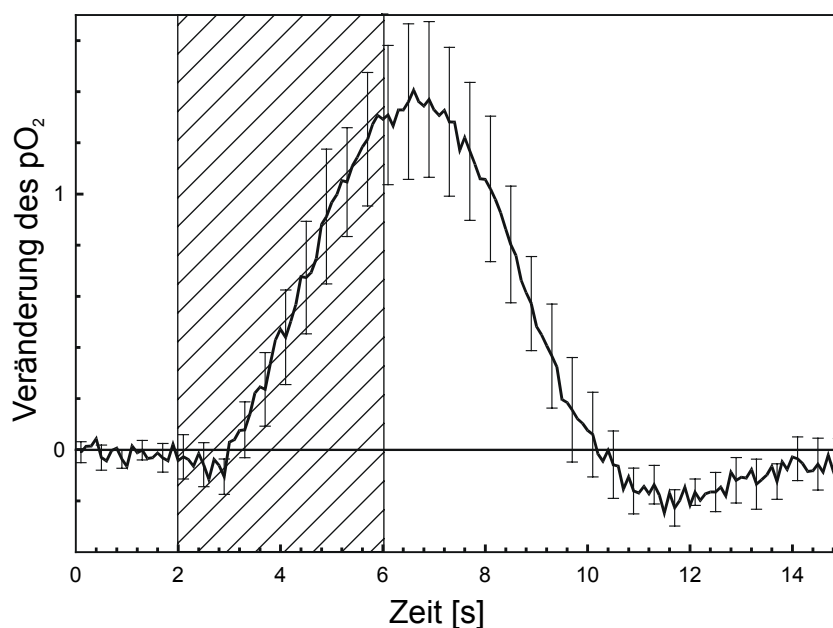


Abb. 17 Single-whisker Stimulationen, über alle Tiere gemittelte Kurve (n=6)

Innerhalb jedes Tieres wurden Stimulationen und Baselines gemittelt und voneinander abgezogen, die so erhaltenen Kurven der sechs Tiere wurden gemittelt, insgesamt 222 Stimulationen an 6 Tieren. Die dargestellten Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Veränderung der Sauerstoffkonzentration auf funktionelle Stimulation zeigt drei Phasen: initiale Antwort, Hyperoxygenierung und Undershoot.

3.2.3. Änderungen der Sauerstoffkonzentration während Whole-pad-Stimulation

Da die exakte Ausdehnung des durch die Stimulation eines einzelnen Barthaars aktivierten Kortexareals nicht bekannt ist, verglichen wir die Veränderungen der Sauerstoffkonzentration, die durch die Stimulation eines einzelnen Barthaars hervorgerufen

wurden mit denen, die sich bei Stimulation aller Haare gemeinsam und damit des gesamten Whisker-Barrel-Kortex ergeben. Die aus allen Stimulationen von 3 Tieren dieser Gruppe gemittelte Kurve zeigt keine qualitative Abweichung von der Kurve der Tiere mit single-whisker Stimulation: Auch hier lassen sich die drei Phasen erkennen. In der initialen Phase zeigt sich keine deutliche Veränderung. Der Anstieg der Sauerstoffkonzentration beginnt auch hier nach etwa einer Sekunde, erreicht sein Maximum etwa eine Sekunde nach Ende der Stimulation, der Ausgangswert wird ebenfalls etwa vier Sekunden nach Stimulationsende erreicht, ein undershoot folgt.

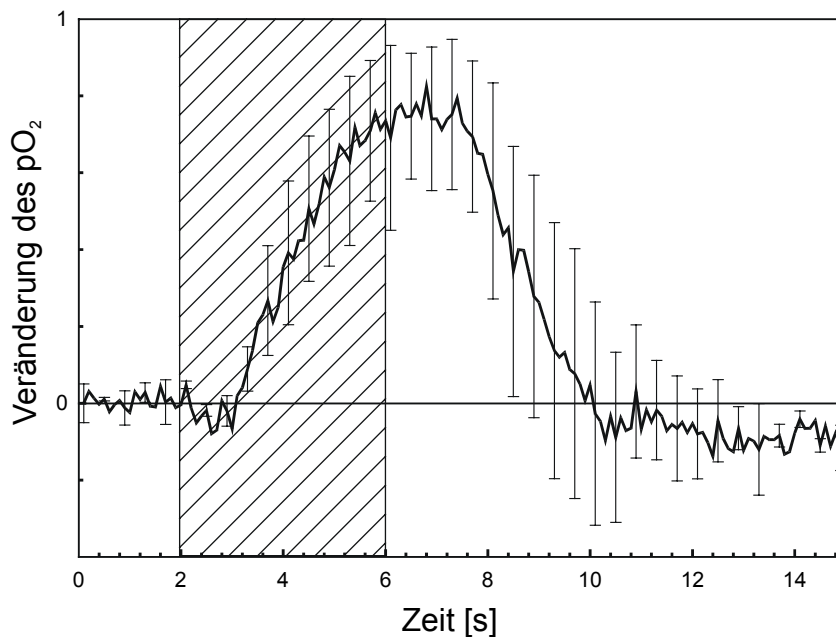


Abb. 18 Whole-Pad-Stimulation, über alle Tiere gemittelte Kurve (n=3)

Die Stimulationen sowie die Baselines der drei Tiere mit whole-pad Paradigma wurden jeweils gemittelt, für jedes Tier wurde die so erhaltene Baseline von der Stimulationskurve abgezogen, die drei so errechneten Kurven wurden wiederum gemittelt, insgesamt 146 Stimulationen an 3 Tieren. Die dargestellten Fehlerbalken sind Standardfehler.

3.2.4. Statistische Auswertung

Für die initiale Antwort ist die Power (Trennschärfe) des Tests zu gering (< 0.7), es kann daher nicht gezeigt werden, dass die angedeutete Verringerung der Sauerstoffkonzentration signifikant ist. Die Hyperoxygenierung ist deutlich signifikant ($p < 0.001$), der undershoot nicht ($p > 0.05$).

3.4. Computer-Simulation im Dreikompartiment-Modell

Die Analyse der Phosphoreszenz-Information mit Hilfe eines monoexponentiellen Fits geht von der Annahme aus, dass im Messvolumen der Messung an jeder Stelle der gleiche pO_2 herrscht. In diesem Fall (z.B. mit guter Annäherung in einer Küvette oder nach dem Tod des Versuchstieres mit Sistieren der Zirkulation erreichbar) ließe sich bei beliebigem Fit-Bereich (die Lebensdauer ist eine Eigenschaft der monoexponentiellen Kurve, die in jedem Bereich der x-Achse gleich ist) nach der Stern-Volmer-Gleichung der pO_2 quantitativ in absoluten Einheiten bestimmen.

Tatsächlich ist der pO_2 im Messvolumen der in-vivo-Versuche jedoch inhomogen verteilt. Grob kann man drei Kompartimente unterscheiden: Arterien (Arteriolen), Kapillaren und Venen (Venulen). Die Sauerstoffkonzentration nimmt von der Arterie über die Kapillare zur Vene hin ab (Vovenko 1999), so dass von einem hinsichtlich der Sauerstoffkonzentration inhomogenen Messvolumen ausgegangen werden muss. Dieser Tatsache trägt man dadurch Rechnung, dass die gemessenen pO_2 -Veränderungen in a.u. (arbitrary units) angegeben werden (siehe Vanzetta 1999). Dabei wird allerdings vorausgesetzt, dass Veränderungen des mittleren pO_2 im Messvolumen gleichsinnige Veränderungen des über den monoexponentiellen Fit berechneten pO_2 bewirken. Eine Erhöhung des pO_2 in welchem Kompartiment auch immer (bei konstantem pO_2 in den übrigen Kompartimenten), sollte zu einer Erhöhung des berechneten pO_2 führen. Dies ist insbesondere wichtig für die Interpretation des Kurvenverlaufs in der initialen Phase der Antwort, wenn davon auszugehen ist, dass der pO_2 sich nicht gleichzeitig in allen Kompartimenten verändert: Nimmt man z.B. als erstes Ereignis nach der Aktivierung einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der Neurone an, der der Gefäßreaktion vorausgeht, so müsste sich der pO_2 zunächst in den Kapillaren verändern (sinken), anschließend (wenn das dann sauerstoffärmere Blut die Venen erreicht hat) in den Venen. Unter konstantem Sauerstoffverbrauch würde bei einsetzender Blutflussveränderung zunächst mehr sauerstoffreiches Blut in die Kapillaren fließen, der pO_2 würde hier steigen, ehe das Blut die Venen erreicht, wo der pO_2 dann ebenfalls steigen würde.

Die Analyse mit monoexponentiellem Fit erfordert also eigentlich den Nachweis, dass der durch den monoexponentiellen Fit hervorgerufene Fehler nicht qualitativer Natur ist (das heißt die berechnete Veränderung des pO_2 muss zumindest in die gleiche Richtung gehen wie die Veränderung des mittleren pO_2 im Messvolumen). Eine Möglichkeit, dies zu überprüfen, stellt eine einfache Simulation des Dreikompartiment-Modells mit dem Computer dar:

3.4.1. Wie verändert sich das Phosphoreszenz-Signal bei isolierten Veränderungen der Sauerstoffkonzentration in einzelnen Kompartimenten ?

Annahmen: Das Messvolumen wird in drei Kompartimente unterteilt: Arterien, Venen und Kapillaren. Diesen wird ein bestimmtes Volumen zugeordnet: 10% den Arterien, jeweils 45% für Kapillaren und Venen. In den Kompartimenten werden unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen angenommen: Arterien: 100 mmHg, Kapillaren 50 mmHg, Venen 15 mmHg. Die Annahmen wurden so gewählt, dass die durch die Simulation erhaltenen decay-times den gemessenen in etwa entsprechen. Ein interessanter und ungeklärter Punkt ist die Tatsache, dass dazu der pO_2 in den Venen sehr tief angenommen werden muss (im Gegensatz zu den Messungen von Vovenko (Vovenko 1999)). Ähnlich hohe decay times (und damit ähnlich tiefe pO_2 -Werte) finden sich in (Vanzetta 1999). Eine mögliche Erklärung ist die Überbewertung von sehr schlecht oxygenierten Kompartimenten durch die monoexponentielle Analyse, die Werte deuten in jedem Fall daraufhin, dass es Bereiche der Mikrozirkulation im Kortex mit derart niedriger Sauerstoffkonzentration geben könnte.

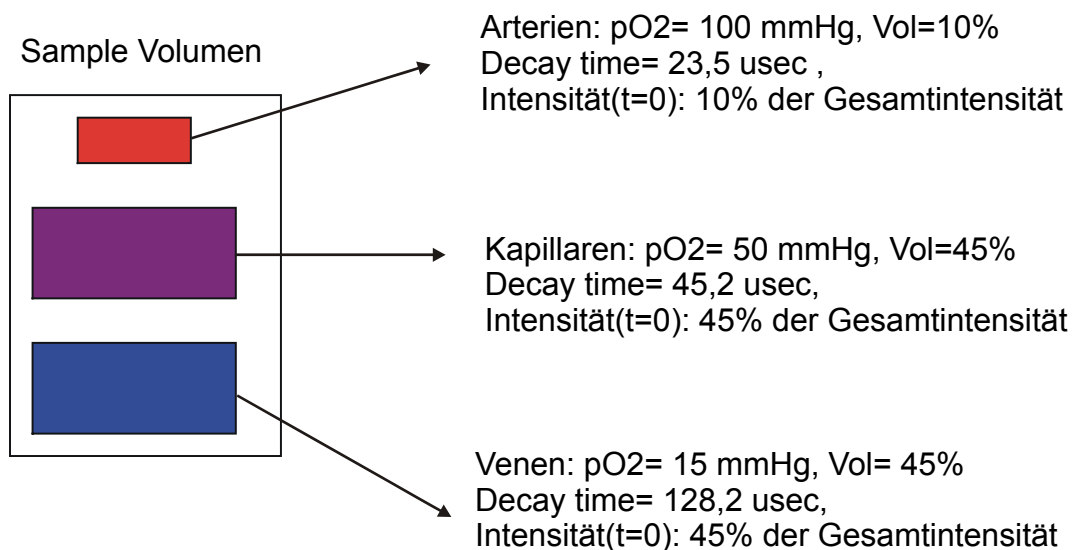


Abb.19 Annahmen für die Simulation der monoexponentiellen pO_2 -Berechnung

Nach der Stern-Volmer-Gleichung wird aus diesen Werten (das Volumen bestimmt die Ausgangsintensität I_0 , der pO_2 die Lebensdauer der Phosphoreszenzkurve) für jedes Kompartiment einzeln die zu erwartende Phosphoreszenzkurve berechnet, die drei Kurven werden addiert und die

entstandene Kurve im Bereich von 100-480 μs wie im für die Versuche verwendeten Computer-Programm monoexponentiell gefittet:

$$I_{\text{Messvolumen}} = I_{\text{Arterien}} + I_{\text{Kapillaren}} + I_{\text{Venen}}$$

Ergebnis der Simulation: Eine Veränderung des $p\text{O}_2$ in den Kapillaren bei gleichbleibendem $p\text{O}_2$ in den Venen ergibt eine gegensinnige Veränderung des mittels monoexponentiellem Fit berechneten $p\text{O}_2$. Ausgehend von den oben dargestellten Annahmen (Arterien: Vol=10%, $p\text{O}_2=100\text{mmHg}$, Kapillaren: Vol=45%; $p\text{O}_2=50\text{mmHg}$, Venen: Vol=45%, $p\text{O}_2=15\text{mmHg}$) ergibt sich ein berechneter $p\text{O}_2$ von 16.04 mmHg (mit monoexponentiellem Fit). Nimmt man eine Abnahme des kapillären $p\text{O}_2$ auf 45mmHg an, so ergibt sich ein berechneter $p\text{O}_2$ von 16.32 mmHg. Obwohl also der angenommene $p\text{O}_2$ in den Kapillaren sinkt, steigt der berechnete $p\text{O}_2$.

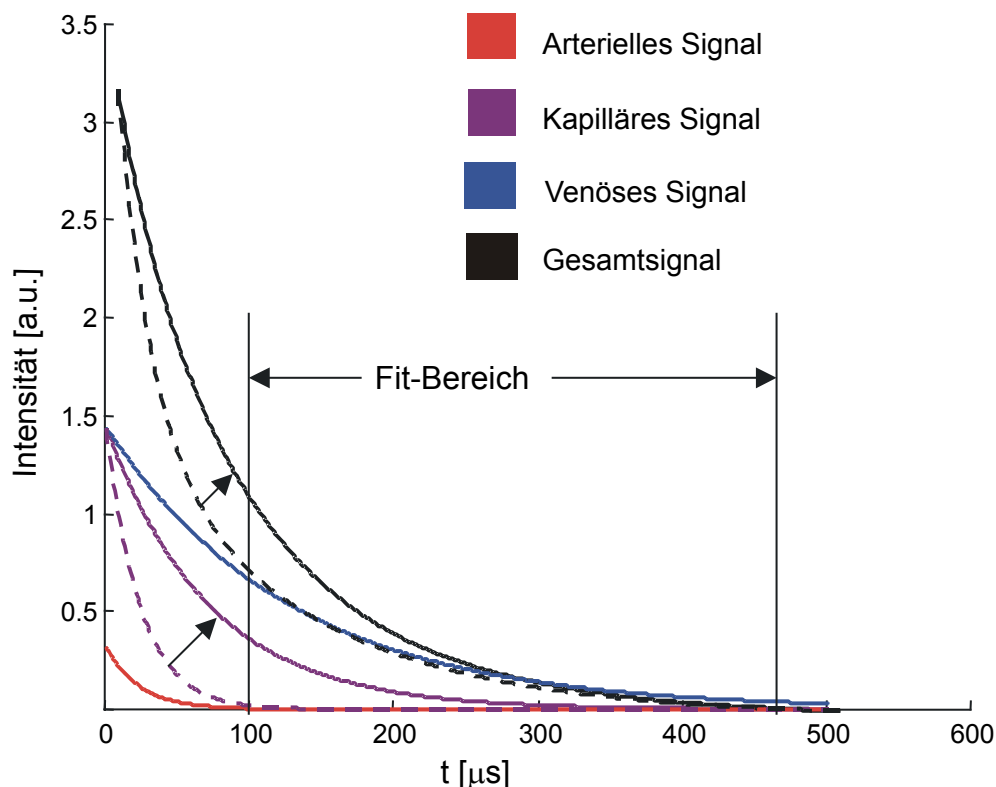


Abb. 20 $p\text{O}_2$ -Veränderung in den Kapillaren bei konstantem $p\text{O}_2$ in Arterien und Venen

Bei hohem $p\text{O}_2$ in den Kapillaren fällt deren Phosphoreszenzkurve sehr steil ab, so dass nach 100 μs (Beginn des Fits) das venöse Signal den Analysebereich dominiert. Ist der $p\text{O}_2$ in den Kapillaren niedriger, so fällt die Kurve weniger steil ab und im Fit-Bereich setzt sich die Gesamtkurve aus der kapillären und venösen zusammen. Dies bewirkt, dass bei Sinken des $p\text{O}_2$ in den Kapillaren (bei

gleichbleibendem pO₂ in den Venen) der mit dem monoexponentielle Fit berechnete pO₂ steigt (Anschaulich gesprochen: Die Phosphoreszenzkurve der Kapillaren "rutscht", da sie bei sinkendem pO₂ flacher wird, in den Fit-Bereich hinein.)

In dieser Berechnung sind wiederum zwei Faktoren nicht berücksichtigt: Die Änderung des Volumens bewirkt ebenfalls eine Änderung des berechneten Signals, außerdem trägt auch die Annahme dreier getrennter Kompartimente der komplexen Inhomogenität der pO₂-Verteilung (Vovenko 1999) nur teilweise Rechnung. Dennoch lässt sich hier zeigen, dass das mittels monoexponentieller Analyse berechnete pO₂-Signal stark venös gewichtet ist und dass bei isolierten Veränderungen der Sauerstoffkonzentration in den besser oxygenierten Kompartimenten, wie sie insbesondere in der initialen Phase nach Stimulation zu erwarten sind, die tatsächlichen Veränderungen der mittleren Sauerstoffkonzentration im Messvolumen unter bestimmten Voraussetzungen qualitativ falsch dargestellt werden.

3.4.2. Alternative zum monoexponentiellen Fit: Der multiexponentielle Fit

Die Tatsache, dass durch den monoexponentiellen Fit qualitative Fehler in der Berechnung des pO₂ dann entstehen, wenn sich der pO₂ in einem besser oxygenierten Kompartiment verändert, während er im am schlechtesten oxygenierten Kompartiment gleich bleibt, führt zu der Frage, wie sich dieser qualitative Fehler vermeiden lässt.

Der Fehler in der Berechnung des pO₂ mit Hilfe des monoexponentiellen Fits besteht in der Annahme, der pO₂ sei homogen im Messvolumen verteilt. Tatsächlich liegen verschiedene Kompartimente (Arterien, Kapillaren, Venen) und auch innerhalb der Kompartimente verschiedene Sauerstoffpartialdrücke vor. In jedem der sehr kleinen Kompartimente mit homogenem pO₂ entsteht eine Phosphoreszenzkurve, deren Lebensdauer sich von der der anderen Kompartimente unterscheidet. Gemessen wird allerdings die aus allen Kompartimenten addierte Lichtintensität der Phosphoreszenz:

$$I(t) = \sum_k^N b_k \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right)$$

I(t): Lichtintensität

b_k: linearer Koeffizient, der den Volumenanteil angibt

τ_k: Lebensdauer der Phosphoreszenz im Kompartiment k

Die mathematisch eleganteste Lösung des Problems besteht im multiexponentiellen Fit. Hierbei wird im (unerreichbaren) Idealfall die gemessene Kurve durch die einzelnen Phosphoreszenzkurven dargestellt, aus denen sie im inhomogenen Messvolumen tatsächlich entsteht. Nimmt man k unterschiedliche pO_2 -Werte an (im Gewebe gibt es sicher unendlich viele, eine Auflösung von z.B. 100 pO_2 -Werten würde allerdings bereits eine sehr genaue Darstellung der pO_2 -Verteilung liefern), so kann man nach der Stern-Volmer-Gleichung die dazugehörigen Lebensdauern (τ_k) berechnen. Mit Hilfe von numerischen Verfahren (siehe Vinogradov 1994, Golub 1997) können dann die Koeffizienten für jedes Kompartiment (b_k) näherungsweise berechnet werden. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis der gemessenen Daten benötigt wird. Für die vorliegenden Daten wurde der Versuch eines multiexponentiellen Fits unternommen, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist allerdings nicht ausreichend. Es ergaben sich teilweise sinnvoll erscheinende, wenn auch nicht in ausreichendem Masse reproduzierbare Analysen:

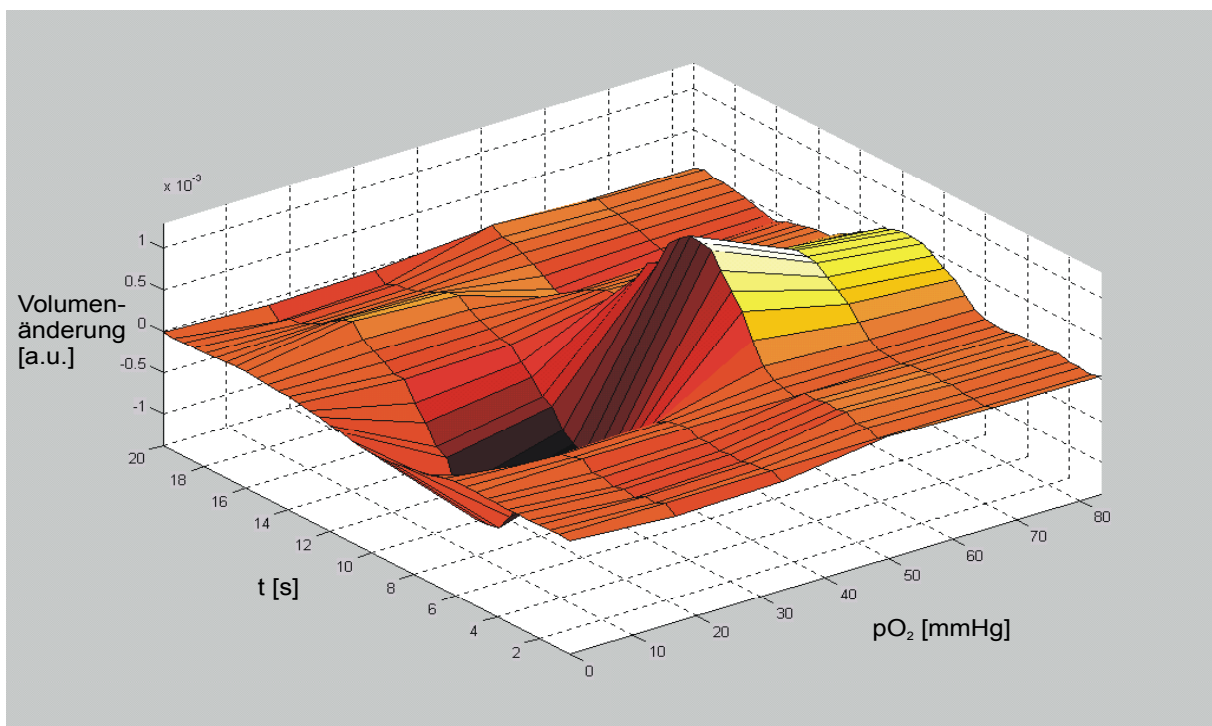


Abb. 21 Zeitverlauf der Änderung der pO_2 -Verteilung unter neuronaler Aktivität

Berechnungen mit Hilfe eines multiexponentiellen Fits weisen aufgrund der schlechten SNR keine konstanten Ergebnisse bei Veränderungen der Parameter des Algorithmus auf. Dennoch zeigt der hier dargestellte Zeitverlauf der Veränderung der pO_2 -Verteilung während der Blutflussantwort, welche Perspektive diese Art der Analyse bietet: die x-Achse stellt die Zeit (t [s]), die y-Achse den

pO_2 (die Veränderung des pO_2 auf Stimulation hin) dar, die z-Achse die Volumenänderung. Dargestellt ist eine einzelne Single-Whisker-Stimulation, die Stimulation beginnt bei $t=4s$. Wenig später ist zu erkennen, dass das Volumen derjenigen Anteile des Gefäßsystems, in denen ein hoher pO_2 herrscht (etwa ab 55 mmHg) zunimmt, das Volumen derjenigen Anteile des Gefäßsystems mit niedrigem pO_2 nimmt ab. Dies entspricht der erwarteten Veränderung bei erhöhtem Blutfluss und nur geringer Sauerstoffausschöpfung (zuvor schlecht oxygenierte Kapillaranteile sind dann besser oxygeniert, gleiches gilt für die Venen. Generell nimmt also der Anteil des schlecht oxygenierten Blutvolumens am Gesamtvolumen ab). Zu erkennen ist auch ein leichter Anstieg des schlechter oxygenierten Blutvolumens (ca. 15-30 mmHg, venöses Kompartiment (Vovenko 1999) nach Ende der Stimulation, eine Beobachtung, die mit den von Buxton (Buxton 1998, Balloon Model) bzw. Mandeville (Mandeville 1999, postarteriolar windkessel) vorgeschlagenen Modellen übereinstimmt.

4. Diskussion

4.1. Messung globaler Veränderungen

Die Messungen von Veränderungen der Sauerstoffkonzentration beim Tod des Versuchstieres, unter temporärer Hypoxie und temporärer Hyperoxie und während Vasomotionen zeigen, dass das Phosphorescence Quenching eine zuverlässige Methode für die Darstellung globaler Veränderungen des pO_2 in der Zirkulation des Gehirns ist. Dabei sind die durch den monoexponentiellen Fit (trotz inhomogener pO_2 -Verteilung) entstehenden Fehler vernachlässigbar. Kritisch werden diese Fehler, wenn sich die Oxygenierung in den einzelnen Kompartimenten isoliert verändert.

Der Vorteil der Methode besteht darin, dass ein vom pO_2 abhängiges Signal ohne Verletzung der Kortexoberfläche gemessen werden kann (im Gegensatz zur Messung mit Sauerstoffelektroden, bei diesen besteht zusätzlich das Problem, dass die Messung selbst Sauerstoff verbraucht.). Die zeitliche Auflösung der Methode ist hervorragend (bis zu 100 Hz) die Angaben bleiben allerdings qualitativ (in a.u.) und können mit einer monoexponentiellen Analyse nicht quantifiziert werden.

4.2. Probleme in der Interpretation bei monoexponentieller Analyse

Die hier verwendete Analyse der Daten zur Berechnung der pO_2 -Veränderungen ist im wesentlichen die gleiche wie in (Vanzetta 1999). Die gemessenen exponentiellen Zerfallskurven wurden von 100-480 μ s nach dem Intensitätsmaximum (erst 100 μ s danach um Einflüsse des Anregungslichtes auszuschließen, s.o.) logarithmiert und linear modelliert, dies entspricht einer monoexponentiellen Analyse der Lebensdauer. Diese Analyse geht von der Annahme eines homogenen pO_2 im Messvolumen aus. Tatsächlich ist dieser allerdings stark inhomogen, Unterschiede ergeben sich sowohl generell entlang des Gefäßbaums (die Oxygenierung fällt von der Arteriole über die Kapillare zur Venole), als auch zwischen einzelnen Kapillaren und besonders Venulen (siehe Vovenko 1999: mittlere Oxygenierung in den kleinsten Arteriolen: 61.5 ± 12 mmHg, Kapillaren: arterielles Ende 57.9 ± 10.6 mmHg, venöses Ende: 40.9 ± 11.5 mmHg, Venulen: sehr heterogen zwischen 15 und 60

mmHg). Diese deutliche Inhomogenität des pO_2 , selbst in einem auf die Mikrozirkulation beschränkten Messvolumen, verhindert, dass mit Hilfe eines monoexponentiellen Fits quantitative Aussagen getroffen werden können (d.h. der pO_2 muss in a.u. angegeben werden).

Es muss also die Behauptung belegt werden, dass, obwohl aufgrund der Inhomogenität des Messvolumens keine quantitativen Aussagen gemacht werden können, zumindest qualitative Aussagen möglich sind. Das bedeutet, dass die Veränderungen des tatsächlichen mittleren pO_2 im Messvolumen mit denen des berechneten pO_2 in ihrer Richtung übereinstimmen müssen. Nimmt also der mittlere pO_2 im Messvolumen ab, so müsste auch der berechnete pO_2 abnehmen. Besonders interessant ist diese Frage für die Analyse der initialen Antwort: Können mit der verwendeten Analyse des Signals isolierte Veränderungen in einzelnen Kompartimenten (wie sie für die initiale Phase der Blutflussantwort zu erwarten sind), qualitativ richtig dargestellt werden ? Nach den oben dargestellten Simulationen ist dies nicht der Fall. Mit Hilfe des monoexponentiellen Fits (und bei den gewählten Fit-Parametern: Fit von 100-480 μs) wird nicht der mittlere pO_2 im Messvolumen, sondern ein venös gewichtetes Signal dargestellt, das Veränderungen in den besser oxygenierten Kompartimenten qualitativ falsch darstellt, solange sie nicht mit gleichsinnigen Veränderungen im venösen (bzw. am schlechtesten oxygenierten) Kompartiment einhergehen. Veränderungen, die eine gleichsinnige pO_2 -Änderung in allen Kompartimenten erzeugen, werden dagegen qualitativ richtig dargestellt. Diese Überlegungen sind zentral für die Diskussion des mit monoexponentieller Analyse berechneten Sauerstoffpartialdrucks in der initialen Phase der Blutflussantwort.

4.3. Messung lokaler Veränderung: Die Blutoxygenierungsantwort auf neuronale Aktivierung

Wie oben (Ergebnisse: Stimulationen) dargestellt lassen sich mit Hilfe des Phosphorescence Quenching aktivitätsbedingte Oxygenierungsveränderungen des Gehirnkortex erfassen. Die Blutoxygenierungsantwort auf neuronale Stimulation zeigt dabei drei unterschiedliche Phasen:

In der initialen Phase (etwa die ersten 1 - 1.5 s nach Stimulationsbeginn) zeigt sich (in der über alle Tiere gemittelten Kurve) ein sehr geringer Abfall des berechneten pO_2 (statistisch nicht signifikant).

Die zweite Phase (ab etwa 1- 1.5 s nach Stimulationsbeginn bis etwa 4 s nach Ende der Stimulation) zeigt eine deutliche und signifikante Hyperoxygenierung.

Die dritte Phase (ab etwa 4 s nach Stimulationsende, einige Sekunden lang) zeigt einen Abfall des berechneten pO_2 unter die Ausgangswerte (undershoot), der in der gemittelten Kurve deutlich zu sehen, allerdings statistisch nicht signifikant ist (er tritt bei einigen Tieren deutlich, bei anderen nicht auf).

Im folgenden sollen die drei Phasen der Blutflussantwort getrennt diskutiert werden:

4.3.1. Die initiale Phase

In der über alle Tiere gemittelten Kurve lässt sich eine geringe, statistisch nicht signifikante Veränderung des berechneten pO_2 erkennen. Diese initiale Veränderung ist weder in der Amplitude noch in der Dauer (Amplitude: ca. 5-10 % der Hyperoxygenierung, Dauer ca. 1s) annähernd so groß wie die in (Vanzetta 1999) gemessene (visueller Kortex von Katzen, Amplitude ca. 30%, Dauer ca. 3 s). Die Messungen von Vanzetta et al. sind die einzigen weiteren veröffentlichten Messungen der vaskulären Antwort auf neuronale Aktivität mittels Phosphorescence Quenching. Vergleicht man sie mit den vorliegenden Messungen, so ergeben sich verschiedene Interpretationsmöglichkeiten bezüglich der unterschiedlichen Ergebnisse. Festzustellen bleibt, dass ein Unterschied in der initialen Antwort offensichtlich ist, obwohl die gleiche Analyse und der gleiche Aufbau verwendet wurden. Unterschiede waren:

- 1) Speziesunterschiede. Vanzetta et. al. führten ihre Messungen an Katzen durch, insbesondere ist hier an die bei Katzen im Vergleich zu Ratten längere mean transit time (kapilläre Passagezeit des Blutes) zu denken;
- 2) Unterschiede in der Anästhesie, die einen deutlichen Einfluss auf die neurovaskuläre Antwort haben kann (Lindauer 1993). Vanzetta et. al. verwendeten Barbiturate, die hier gezeigten Daten wurden unter Anästhesie mit α -Chloralose und Urethan erhoben.
- 3) Unterschiede in der Art der Stimulation und im stimulierten Areal: Die Stimulation bei (Vanzetta 1999) war visuell (visueller Kortex), in der vorliegenden Arbeit somatosensorisch (somatosensorischer Kortex).

Neben der Diskussion der Unterschiede zwischen den hier gezeigten Messungen und denen von Vanzetta et. al. erscheint es ebenso wichtig, mögliche Interpretationen der beobachteten initialen Antwort zu diskutieren. Im wesentlichen existieren zwei Modelle, die das Auftreten von initialen, zur später folgenden Hyperoxygenierung gegensinnigen Veränderungen erklären:

1) Hypoxiehypothese

Nach diesem, von Malonek und Grinvald vorgeschlagenen Modell (Malonek 1996) verbrauchen die Neurone und Astrozyten unmittelbar nach ihrer Aktivierung mehr Sauerstoff, um das zur Repolarisation der Membran bzw. für den Neurotransmitterzyklus (Magistretti 1996) verbrauchte ATP durch aeroben Stoffwechsel wieder aufzufüllen. Dieser O₂-Verbrauch führt zu einem Absinken des pO₂ in den umliegenden Blutgefäßen, da es der Dilatation der Arteriolen und damit dem Einwaschen von besser oxygeniertem Blut vorausgeht (das Areal der Blutgefäße mit initialer Antwort, d.h. sinkendem pO₂ wäre demnach räumlich sehr eng auf das Areal der aktiven Neurone beschränkt). Dieses Absinken würde zugleich ein mögliches Signal für die Vasodilatation darstellen (z.B. über die Freisetzung von NO, einem starken Vasodilatator, das an oxygeniertes, aber nicht an deoxygeniertes Hämoglobin gebunden ist (Stamler 1997)). Das Absinken des pO₂ würde mit einem Absinken der oxy-Hb-Konzentration und einem Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration einhergehen. Letzterer ließ sich in der spektroskopischen Analyse zeigen (Malonek 1996), der oxy-Hb-Abfall allerdings nicht. Der im Phosphorescence Quenching gesehene Abfall des pO₂ (Vanzetta 1999) ist aufgrund der monoexponentiellen Analyse vorsichtig zu interpretieren. Vereinbar wäre er mit einer initialen Hypoxie der Kapillaren und Venulen, nicht mit einer initialen Hypoxie der Kapillaren ohne eine Veränderung des pO₂ in den Venulen (bzw. den am schlechtesten oxygenierten Kompartimenten). Die Interpretation der initial beobachteten Veränderungen als Hypoxie wird in (Vanzetta 1999) gestützt durch die Beobachtung (Spektroskopiesignal bei 570nm), dass das Blutvolumen erst nach Beginn der initialen Veränderungen ansteigt.

2) Blutvolumenhypothese

Da es bislang keinen eindeutigen Beleg für eine initiale Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Neurone gibt, stellt sich die Frage, ob die beobachtete initiale deoxy-Hb-Zunahme in (Malonek 1996) anders als durch initiale Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs der Neurone erklärt werden kann. Eine Möglichkeit stellt die Erklärung durch initiale Veränderung des Blutvolumens dar. Demnach verbrauchen die Neurone unmittelbar nach ihrer Aktivierung zunächst nicht mehr Sauerstoff, die erste Veränderung auf Gefäßebene ist eine Dilatation der Arteriolen. Verschiedene, nicht an eine initiale Hypoxie gebundene Signalmechanismen sind denkbar (siehe Einleitung), z.B. neurogene Mechanismen, H⁺ (initial anaerober

Stoffwechsel), K^+ Die arterioläre Dilatation führt zum Einstrom von sauerstoffreichem Blut, aber auch (über den gestiegenen Druck) zum Anstieg des Blutvolumens. Da das aus den Arteriolen kommende Blut nicht zu 100% mit Sauerstoff gesättigt ist, fließen bei zunächst gleichbleibendem outflow aus den Venen sowohl oxy- als auch deoxy-Hb in das Messvolumen ein, die Konzentrationen von oxy-Hb und deoxy-Hb würden zunächst ansteigen. Diese Überlegungen werden gestützt durch das Modell der diffusionslimitierten Sauerstoffversorgung ((Gjedde 1991), (Buxton 1997)) und das "Balloon Model" (Buxton 1998). Nach dem Modell der diffusionslimitierten Sauerstoffversorgung ist bereits im "Ruhezustand" (vor Stimulationsbeginn) der pO_2 in den Mitochondrien der Neurone nahe Null, d.h. die Neurone verbrauchen den gesamten von den Gefäßen angelieferten Sauerstoff. Sie haben demnach nicht die Möglichkeit, den Gradienten für Sauerstoff zwischen Mitochondrium und Kapillare weiter zu senken und so über eine gesteigerte Diffusion mehr Sauerstoff zu bekommen. Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch wäre demnach erst dann möglich, wenn der pO_2 in der Kapillare und damit der Gradient zwischen Kapillare und Mitochondrium ansteigt. Erhöhter Sauerstoffverbrauch wäre also nur möglich nach der Steigerung des Blutflusses, eine initiale Hypoxie ausgeschlossen. Das Balloon Model beschreibt das Verhalten der Venen bei Blutflussveränderungen: Aufgrund ihrer hohen Compliance nehme ihr Volumen bei Erhöhung des Blutflusses zunächst zu, der outflow steige mit einer Verzögerung gegenüber dem inflow an. Folglich würde eine initiale Blutflusserhöhung zu einer Erhöhung des Volumens führen, je nach Oxygenierung des einfließenden Blutes zu einer Erhöhung der deoxy-Hb- Konzentration im Messvolumen. Mayhew et. al. (Mayhew 1999) haben (wenn auch nur bei wenigen Tieren) die Beobachtung gemacht, dass der von ihnen gemessene initiale Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration verschwindet, wenn das arterielle Blut hyperoxygeniert wird, eine Beobachtung, die die Blutvolumenhypothese stützt: Enthält nämlich das initial einfließende arterielle Blut kein deoxy-Hb, so könnte es auch keinen Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration im Messvolumen verursachen.

	Hypoxiehypothese	Blutvolumenhypothese
pro	Initialer deoxy-Hb-Anstieg in der Spektroskopie (Malonek 1996), (Mayhew 1999)	Initialer Anstieg von oxy-Hb <u>und</u> deoxy-Hb in der Spektroskopie (Malonek 1996), (Mayhew 1999)
	Initial negatives BOLD-Signal in der fMRT (siehe Einleitung)	Der initiale deoxy-Hb-Anstieg verschwindet unter Hyperoxie (Mayhew 1999)
	Initiale pO ₂ -Abnahme im Phosphorescence Quenching (Vanzetta 1999)	Initial negatives BOLD-Signal in der fMRT (siehe Einleitung)
		Balloon model (Buxton 1998)
contra	Initialer oxy-Hb-Anstieg in der Spektroskopie (Malonek 1996), (Mayhew 1999)	Späterer Anstieg (Vanzetta 1999) des Blutvolumens in der Spektroskopie (570nm)
	Mit DPF-Korrektur kein initialer deoxy-Hb-Abfall (Lindauer 2000)	
	Der initiale deoxy-Hb-Anstieg verschwindet unter Hyperoxie (Mayhew 1999)	
	Diffusion limited model (Buxton 1997), (Gjedde 1991)	

Tab. 7 pro und contra der beiden Erklärungsmodelle für die initiale Antwort

Der in dieser Arbeit gezeigte Verlauf der Oxygenierung in der initialen Phase der Blutflussantwort ergibt folgende Schlussfolgerungen:

Eine Veränderung der Oxygenierung in der initialen Phase der Blutflussantwort auf neuronale Aktivierung trat bei den vorliegenden Messungen zumindest manchmal auf, sie ist von ihrer Amplitude her im somatosensorischen Kortex von Ratten sehr viel kleiner als im visuellen Kortex von Katzen. Welcher Art diese Oxygenierungsveränderung ist, lässt sich mit Hilfe einer monoexponentiellen Analyse nicht zeigen. Sowohl eine initiale Hypoxie der Kapillaren und Venulen als auch eine initiale Hyperoxygenierung der Kapillaren bei noch konstantem pO₂ in den Venulen würden ein Absinken des berechneten pO₂ ergeben. Der beobachtete Effekt ist jedenfalls nicht stabil reproduzierbar und seine Amplitude her sehr

klein im Vergleich zur anschließenden Hyperoxygenierung. In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, ob eine größere initiale Antwort unter bestimmten Bedingungen erzeugt werden kann, dies ließe dann möglicherweise auch Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus zu. Anhaltspunkte dafür bieten z.B. das Verschwinden des initialen deoxy-Hb-Anstiegs unter Hyperoxie (Mayhew 1999), dies legt im Umkehrschluss nahe, dass der initiale Anstieg des deoxy-Hb unter Hypoxie größer würde (ein Indiz für die Volumenhypothese). Belege für die Hypoxiehypothese wären am elegantesten durch eine Blockade der neurovaskulären Kopplung zu erbringen: Bei aufgehobener Gefäßreaktion sollte dann unter neuronaler Aktivierung der pO_2 in den umliegenden Gefäßen abfallen, die deoxy-Hb-Konzentration sollte ansteigen. Der Anstieg würde nicht mehr (wie nach der Hypothese unter intakter Kopplung) durch wenig später einfließendes gut oxygeniertes Blut "maskiert". Ein unter blockierter Kopplung größer werdender Anstieg des deoxy-Hb (im Quenching Abfall des pO_2) würde so gleichzeitig das oxygen limitation model widerlegen (Gjedde 1991, Buxton 1997). Umgekehrt wäre bei einer Verringerung des oxy-Hb-Anstieges unter Kopplungsblockade ein weiterer Beleg für die Blutvolumenhypothese gefunden.

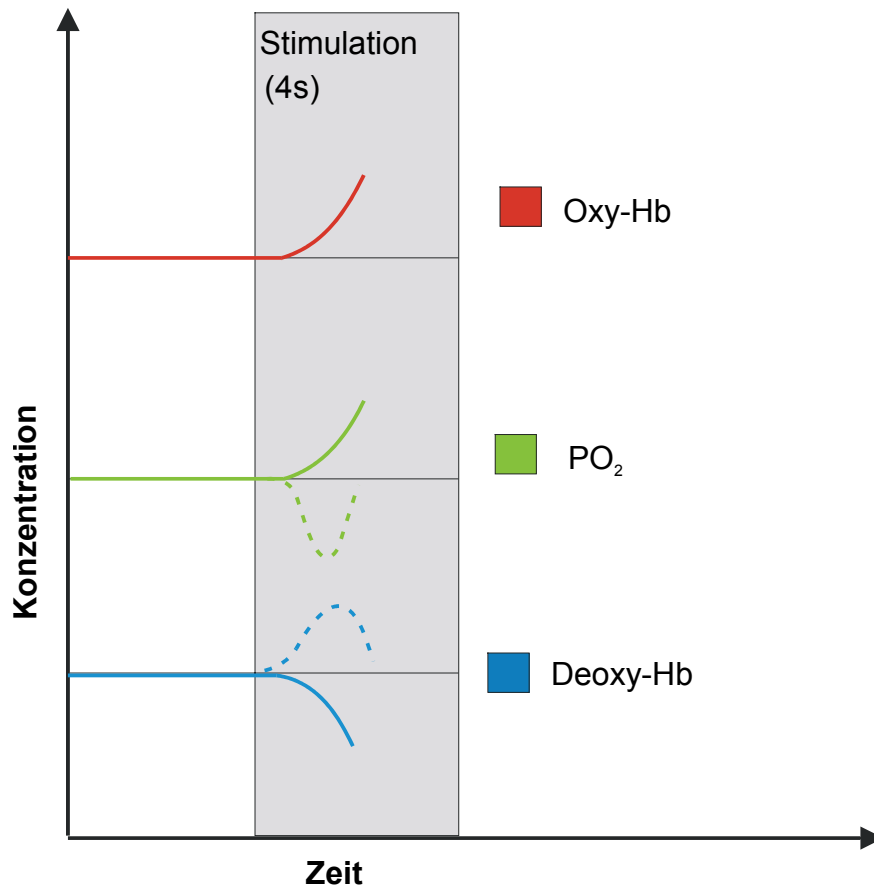


Abb. 22 initiale Blutoxygenierungsantwort

In der Literatur besteht Uneinigkeit über den Verlauf der initialen Blutoxygenierungsantwort: Einige Autoren haben einen initialen Anstieg des deoxy-Hb gezeigt, andere nicht. Insgesamt ist unklar, unter welchen Bedingungen der "initial dip" zustande kommt. Alle Autoren zeigen übereinstimmend keinen initialen Abfall des oxy-Hb. Die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Verläufe sind hier als gestrichelte bzw. durchgehende Linien dargestellt.

4.3.2. Die Hyperoxygenierung

Es zeigt sich als zweite Phase der Blutoxygenierungsantwort eine statistisch signifikante Hyperoxygenierung (signifikanter Anstieg des mit Hilfe eines monoexponentiellen Fits berechneten pO_2), die ca. 1-1,5 Sekunden nach Stimulationsbeginn begann und ca. 1-1,5 Sekunden nach Ende der Stimulation ihren Maximalwert erreichte. Etwa vier Sekunden nach Ende der Stimulation erreichte die Oxygenierung wieder das Ausgangsniveau. Die Hyperoxygenierung ist zu erklären durch den stark ansteigenden Blutfluss bei gleichzeitig nur gering ansteigendem Sauerstoffverbrauch der Neurone. Diese Beobachtung bestätigt die Messungen von Fox und Raichle 1986 (Fox 1986), dass der Blutfluss stärker ansteigt als der Sauerstoffverbrauch: Der nur gering steigende Sauerstoffverbrauch bei gleichzeitig stark

ansteigender Anlieferung von Sauerstoff durch den stark gestiegenen Blutfluss ergibt eine Hyperoxygenierung in den lokalen Blutgefäßen im Vergleich zum nicht aktivierten Zustand. Die Beobachtung, dass der Blutfluss relativ weit mehr ansteigt als der Sauerstoffverbrauch ist in der Zwischenzeit von vielen Autoren mit unterschiedlichen Methoden bestätigt worden (siehe Tabellen zu CBF und $CMRO_2$ in der Einleitung). Die Hyperoxygenierung scheint allerdings für die Sauerstoffversorgung auch bei nur gering steigendem Sauerstoffverbrauch der Neurone notwendig zu sein, da die Sauerstoffausschöpfung (OEF) bei erhöhtem Fluss und damit sinkender mean transit time abnimmt (Buxton 1997). Eine Kopplung des Blutflusses an den Sauerstoffverbrauch wäre demnach trotz überproportional steigendem Blutfluss gegeben. Die Beobachtung einer Hyperoxygenierung unter neuronaler Aktivität wird ebenfalls bestätigt durch ein positives BOLD-Signal in der fMRT unter neuronaler Aktivität (Ogawa 1990), sowie durch die Messung eines deoxy-Hb-Abfalls und oxy-Hb-Anstieges bei neuronaler Aktivierung in der Imaging Spectroscopy (Malonek 1996, Mayhew 1999, Lindauer 2001). Messungen der vaskulären Antwort auf neuronale Aktivität im visuellen Kortex von Katzen mit Phosphorescence Quenching zeigten ebenfalls eine deutliche Hyperoxygenierung (Vanzetta 1999). Da davon ausgegangen werden kann, dass spätestens eine mean transit time (bei der Ratte ca. 1,4 s, bei Anstieg des Blutflusses weniger als 1,4 s) nach Dilatation der Arterien und Arteriolen die Veränderungen der Sauerstoffkonzentration in allen Kompartimenten im Vergleich zum Ausgangszustand in die gleiche Richtung weisen, lässt sich hier die Hyperoxygenierung auch mit monoexponentiellem Fit sicher zeigen.

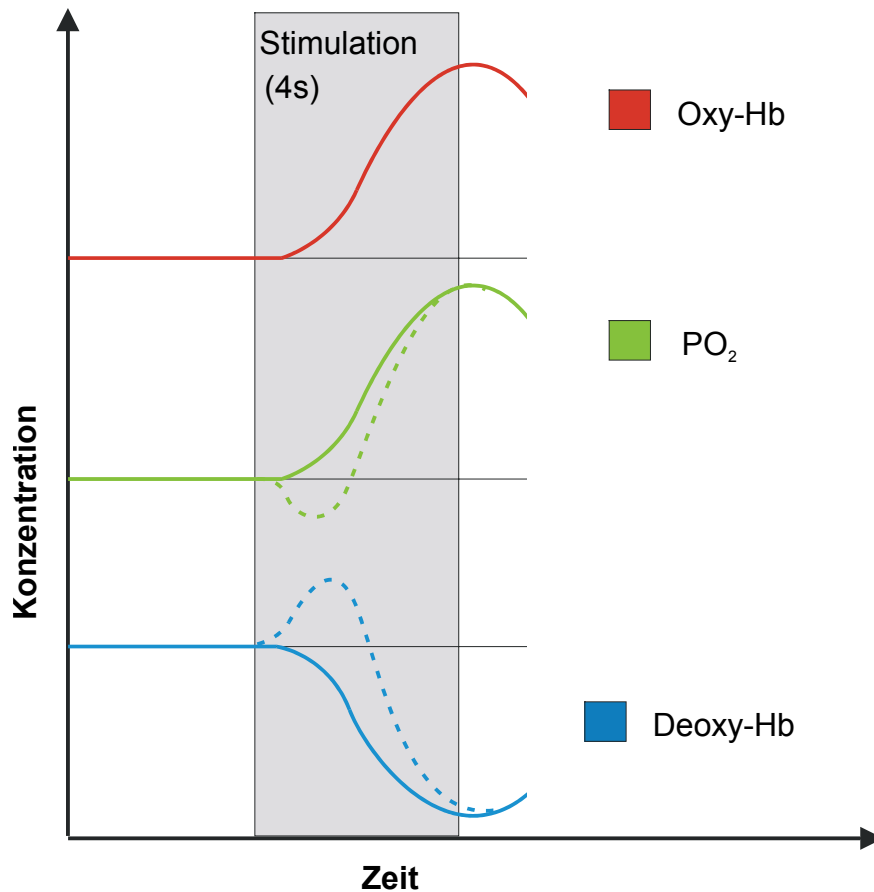


Abb. 23 Hyperoxygenierung

Ein bis zwei Sekunden nach Beginn der Stimulation zeigt sich im Kortex der Ratte ein ausgeprägter Anstieg von oxy-Hb und pO_2 , ein deutlicher Abfall von deoxy-Hb. Diese Messungen werden übereinstimmend von nahezu allen Autoren bestätigt.

4.3.3 Der Undershoot

In den gemittelten Kurven der meisten Tiere ist irgendwann nach dem Ende der Stimulation zu erkennen, dass die berechnete Oxygenierung unter das Ausgangsniveau fällt, wenngleich einige Tiere dieses Charakteristikum der Kurve nicht zeigen. Gemittelt über die 6 Tiere der Single-Whisker-Gruppe ergibt sich daher ein deutlicher undershoot, der statistisch allerdings nicht signifikant ist. Mittelt man auf den Ausgangswert zurückkehrende Kurven mit solchen, die deutlich darunter liegen, so wird die gemittelte Kurve ebenfalls unter dem Ausgangswert liegen. Ein solcher undershoot zeigt sich ebenfalls in einigen BOLD-fMRI-Daten sowie in Daten der Imaging Spectroscopy (Lindauer 2001).

Die Simulation im Dreikompartiment-Modell zeigt, dass ein solcher Effekt im Phosphorescence Quenching sowohl mit einem nach der Stimulation erhöhten venösen Volumen (bei gleichem venösem pO_2 wie vor der Stimulation) als auch mit einer

verminderten Oxygenierung in den Venen erklärbar ist. Eine Erhöhung des (venösen) Blutvolumens über die Stimulation hinaus beschreiben Mandeville et. al. sowohl in Messungen (fMRT- Messungen des Blutvolumens) als auch in einem Modell (Mandeville 1999).

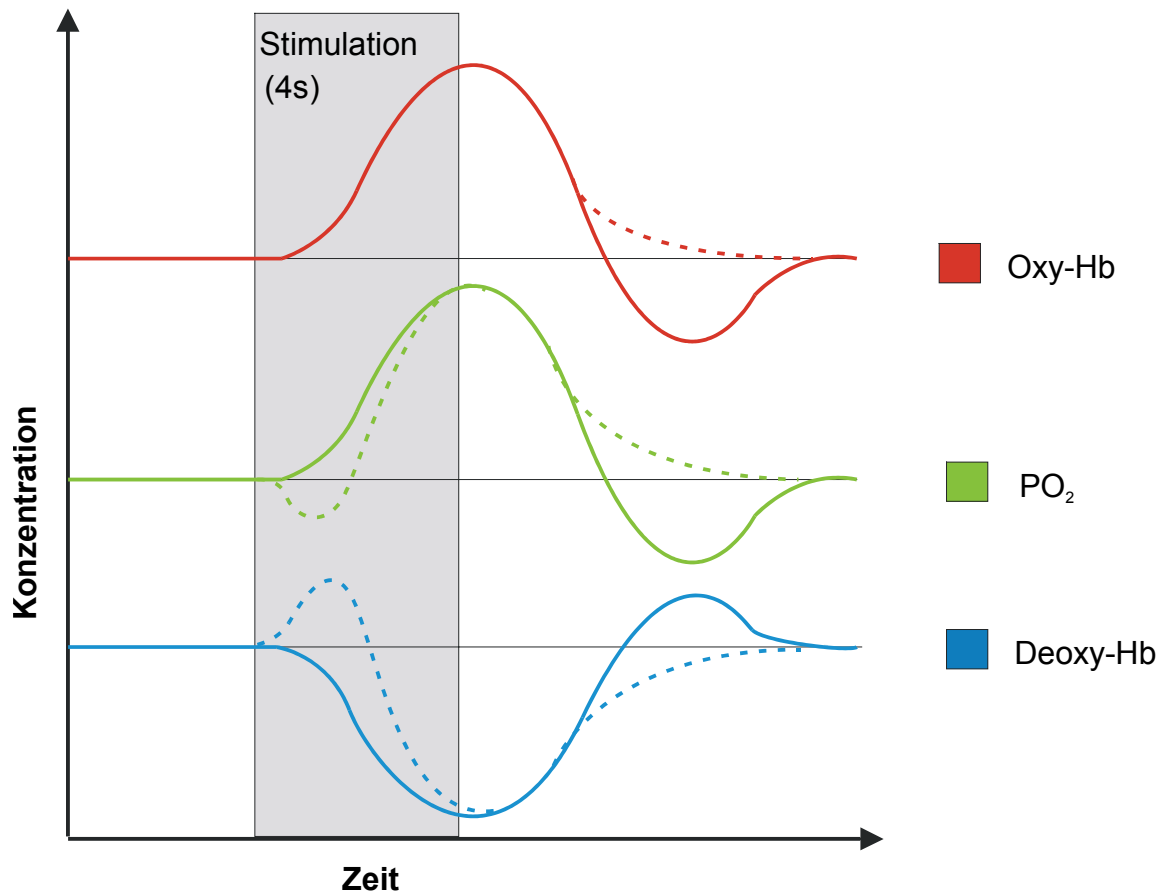


Abb. 24 undershoot

Ein ähnlich heterogenes Bild wie für die initiale Antwort ergibt sich für das Verhalten der Blutoxygenierung einige Sekunden nach Stimulationsende: Während bei einigen Tieren die Werte auf die vor der Stimulation gemessenen zurückfielen, unterschritten sie diese bei anderen Tieren deutlich und reproduzierbar. Diese Beobachtung zeigt sich nicht nur im Phosphorescence Quenching, sondern auch in der Imaging Spectroscopy (Lindauer 2001).

4.4. Möglichkeiten der Verbesserung durch multiexponentielle Analyse

Die Tatsache, dass die Veränderungen der initialen Phase bei Verwendung eines monoexponentiellen Fits nicht sicher interpretiert werden können, ergibt die Frage nach einer Möglichkeit, die Daten dennoch sicher hinsichtlich ihrer physiologischen Implikationen deuten zu können. Einen attraktiveren Ausweg stellt die multiexponentielle Analyse dar. Diese bietet die Möglichkeit, die Sauerstoffverteilung im Messvolumen quantitativ (in mmHg) zu berechnen. Leider erfordert die multiexponentielle Analyse ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis (Vinogradov 1994, Golub 1997). Die hier erhaltenen experimentellen Daten weisen dies nicht auf, so dass keine stabil reproduzierbare multiexponentielle Analyse möglich ist.

In weiteren Experimenten ließe sich klären, ob eine genaue Berechnung der Sauerstoffverteilung und die Beobachtung der Veränderung der Sauerstoffverteilung in den Blutgefäßen bei neuronaler Aktivität möglich ist. Die hier gezeigte Versuchsanordnung könnte dazu wie folgt abgewandelt werden:

Da die Berechnung der Sauerstoffverteilung die Beschränkung des Messvolumens auf die Mikrozirkulation mit Vermeidung von größeren Gefäßen obsolet macht (dann können ja anhand der dargestellten Sauerstoffverteilung die Kompartimente unterschieden werden), könnte das Messvolumen auf einen großen Teil des Areals neuronaler Aktivität ausgedehnt werden: Bei whole-pad-Stimulation auf über 2*2 mm (indem das 135mm-Objektiv durch ein 50mm-Objektiv ersetzt wird), dies würde eine Steigerung der Lichtintensität im Vergleich zu den hier durchgeführten Versuchen um einen Faktor von etwa fünf bedeuten. Zusätzlich könnte nach exakter Bestimmung des Zeitverlaufs der Intensität des Anregungslichtblitzes (vor Injektion des Farbstoffes) dieser von den gemessenen Kurven subtrahiert und der Fit-Bereich so zeitlich weit nach vorne geschoben werden (unmittelbar zum Zeitpunkt des Anregungsblitzes). Auch dies würde die SNR weiter verbessern. Erste Berechnungen mit den hier zur Verfügung stehenden Daten zeigen bereits sinnvolle Ergebnisse hinsichtlich der physiologischen Interpretation, die allerdings nicht stabil reproduzierbar sind. Mit Hilfe einer Darstellung der Sauerstoffverteilung könnten die einzelnen Kompartimente unterschieden werden und dadurch Interpretationsprobleme, wie sie bei der Berechnung mit monoexponentiellem Fit auftreten, vermieden werden.

4.5. Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit gezeigten Messungen der Veränderung der Sauerstoffkonzentration in der Mikrozirkulation des Kortex von Ratten nach neuronaler Stimulation lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- 1) Die Blutoxygenierungsantwort auf neuronale Stimulation lässt sich in drei Phasen einteilen: in einer initialen Phase kommt es zu einer sehr geringfügigen Zunahme der Lebensdauer der Phosphoreszenz des injizierten Porphyrins. Dies könnte erklärt werden durch initial gestiegenen Sauerstoffverbrauch der Neurone oder initial gesteigerten Blutfluss. Diese erste Phase hat (bei Ratten) eine Dauer von 1 - 1.5 s. In einer zweiten Phase kommt es zu einem deutlichen Abfall der gemessenen Lebensdauer, diese entspricht einer Zunahme der Sauerstoffkonzentration im Areal der neuronalen Aktivität. Diese Hyperoxygenierung beginnt etwa 1-1.5 s nach Stimulationsbeginn und hält bis etwa 3-5 s nach Stimulationsende an. Sie ist erklärbar durch eine starke Zunahme des Blutflusses bei relativ weniger starker Zunahme des Sauerstoffverbrauchs der Neurone und Astrozyten. Dieser zweiten Phase folgt bei einigen Tieren eine dritte Phase, in der die Sauerstoffkonzentration unter das Ausgangsniveau abfällt (undershoot). Dieser undershoot beginnt ca. 3-5 s nach Stimulationsende und hält einige Sekunden lang an. Der undershoot kann erklärt werden durch ein über das Stimulationsende hinaus erhöhtes venöses Volumen.
- 2) Die Messung von Sauerstoffkonzentrationsveränderungen in den Blutgefäßen mittels Phosphorescence Quenching ist hinreichend sensitiv, einzelne, vier Sekunden andauernde Stimulationen eines einzelnen Barthaars einer Ratte anhand der durch die Stimulation hervorgerufenen Blutoxygenierungsantwort nachzuweisen. Die Anwendung einer monoexponentiellen Analyseverfahren führt dabei allerdings zu Schwierigkeiten in der Interpretation der gemessenen Daten: Isolierte Veränderungen in einzelnen Kompartimenten können zur fehlerhaften Berechnung der mittleren Sauerstoffkonzentration führen. So müssen die berechneten Verläufe der Sauerstoffkonzentration vorsichtig interpretiert werden. Die Anwendung eines multiexponentiellen Näherungsverfahrens könnte diese Schwierigkeiten in der Interpretation der Daten vermeiden.

5. Zusammenfassung

Das Gehirn ist das faszinierendste und gleichzeitig am wenigsten verstandene Organ des menschlichen Körpers. Die Aufklärung seiner Funktion erscheint sowohl für das Verständnis seiner physiologischen Aufgaben als auch für die Erforschung von verschiedensten Krankheiten, in deren Rahmen Gehirnfunktionen beeinträchtigt werden interessant. Eine der Methoden, die wesentlich zum heutigen Verständnis der Gehirnfunktion beitragen ist die funktionelle Bildgebung. Sie beruht größtenteils auf einem Phänomen, das bereits 1890 von Roy und Sherrington (Roy 1890) postuliert wurde: der neurovaskulären Kopplung.

Der Begriff der neurovaskulären Kopplung bezeichnet die Zusammenarbeit von Nervenzellen, Gliazellen und Blutgefäßen im Gehirn. Vereinfacht dargestellt besteht diese Zusammenarbeit darin, dass in einem aktivierten Gehirnareal, d.h. einem Areal mit gegenüber dem Ruhezustand erhöhter Nervenzellaktivität, die Durchblutung ansteigt. Bei gleichzeitig relativ geringer steigendem Sauerstoffverbrauch (Fox 1986) der lokalen Neurone und Gliazellen führt der steigende Blutfluss zu einem "Auswaschen" von deoxy-Hb und zum "Einwaschen" von oxy-Hb in das aktivierte Areal, die Konzentration von deoxy-Hb fällt, die von oxy-Hb steigt durch die Aktivierung an.

Das Absinken der deoxy-Hb-Konzentration kann aufgrund seiner magnetischen Eigenschaften mittels funktioneller Magnet-Resonanz-Tomografie dargestellt werden. Dabei bleibt die Genauigkeit dieser Darstellung einigen Beschränkungen unterworfen. Da das Areal mit durch die Aktivierung gestiegenem Blutfluss größer ist als das Areal der aktivierten Neurone selbst und aufgrund der zeitlichen Verschiebung des Blutflussanstieges gegenüber der Aktivierung bleibt die räumliche und zeitliche Auflösung der fMRT geringer, als es für eine detaillierte Darstellung von Substrukturen der neuronalen Organisation des Gehirns benötigt wird.

Eine Entdeckung von Malonek (Malonek 1996) scheint einen Ausweg aus der Beschränkung der räumlichen und zeitlichen Auflösung der fMRT zu weisen: Seine Arbeitsgruppe beobachtete, dass unmittelbar nach der neuronalen Aktivierung im Kortex von Katzen die deoxy-Hb-Konzentration anstieg. Diesen initialen Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration interpretierten die Autoren als Zeichen des neuronalen Sauerstoffverbrauchs vor Beginn der überschießenden Blutflussantwort. Dieser Effekt (aufgrund der damit korrespondierenden Abnahme des BOLD-Signals in der fMRT als "initial dip" bezeichnet) sollte also räumlich und zeitlich wesentlich enger mit der neuronalen Aktivität korreliert sein als die durch die später folgende Blutflussantwort bedingte Abnahme des deoxy-Hb.

Aufgrund der Tatsache, dass in den selben Messungen auch die Konzentration von oxy-Hb initial anstieg und aufgrund von methodischen Problemen (Kohl 2000) bleiben allerdings Zweifel an der Interpretation der Daten. Der Versuch, unter der oben beschriebenen Annahme die Auflösung der fMRT zu verbessern, schien tatsächlich erfolgreich zu sein. Kim et al. (Kim 2000) stellten Substrukturen des visuellen Kortex (Cortical Columns) dar, wenn auch hier Zweifel an der Interpretation geboten scheinen (Logothetis 2000). Eine spätere Arbeit der gleichen Gruppe erreicht allerdings eine ähnlich hohe Auflösung durch Darstellung von Blutflusseffekten (Duong 2001).

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, den Verlauf der Konzentration von physikalisch gelöstem Sauerstoff in den Blutgefäßen der Mikrozirkulation des Hirnkortex von Ratten nach neuronaler Aktivierung in diesem Areal darzustellen. Besonderes Augenmerk gilt dabei der initialen Phase und der Frage, ob sich unmittelbar nach der Aktivierung eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Mikrozirkulation des aktivierten Areals nachweisen lässt.

Als Tiermodell wurde der somatosensorische Kortex von Ratten gewählt, speziell das Areal, in dem die Barthaare (Whisker) repräsentiert sind, der sogenannte Whisker-Kortex. Hier sind die Neuronen in Form von kleinen "Barrels" (Fässer) organisiert, jedes dieser Barrel erhält afferente Impulse von einem der Barthaare. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Barthaare für die Orientierung der Ratte ist deren neuronale Repräsentation im Kortex besonders ausgedehnt. Dieses Tiermodell bietet daher optimale Voraussetzungen mittels eines physiologischen Stimulus (Auslenkung der Barthaare) eine ausreichend große vaskuläre Antwort zu erzeugen.

Als Methode zur Messung der Sauerstoffkonzentration wurde das Phosphorescence Quenching gewählt. Hierbei wird dem Tier intravenös eine Substanz injiziert, deren Phosphoreszenzverhalten von der Sauerstoffkonzentration in ihrer unmittelbaren Umgebung abhängt. Durch Messung der mittels eines kurzen Lichtblitzes angeregten Phosphoreszenz kann dann auf die Sauerstoffkonzentration zurückgeschlossen werden. Da das Licht bei dieser Methode frei auf den Kortex bzw. von dort zurückgelangen muss, legten wir bei den Versuchstieren unter Narkose ein kraniales Fenster an.

Aufgrund der Vergleichbarkeit mit Ergebnissen einer weiteren Methode, der Imaging Spectroscopy wurde als Versuchsparadigma zunächst die Stimulation eines einzelnen Barthaares gewählt. Da das Areal aktivierter Neurone hierbei möglicherweise kleiner als dasjenige Areal ist, von dem das Messsignal stammt, wurde zum Vergleich ein zweites Paradigma mit Stimulation aller Barthaare gewählt. Beide Paradigmen umfassten

Messungen mit einer Frequenz von 100Hz, zwei Sekunden vor der Stimulation beginnend, einen vier Sekunden umfassenden Stimulationszeitraum sowie neun Sekunden Messungen nach dem Ende der Stimulation.

Die dargestellte Blutoxygenierungsantwort auf neuronale Aktivität lässt drei Phasen erkennen: In einer initialen Phase zeigt sich in den über alle Tiere gemittelten Kurven eine sehr geringe, statistisch nicht signifikante Abnahme der Sauerstoffkonzentration, ein deutlicher, etwa 1 - 1,5 Sekunden nach Beginn der Stimulation einsetzender Anstieg der Sauerstoffkonzentration, gefolgt von einem in den über alle Tiere gemittelten Kurven deutlichen, aber statistisch nicht signifikanten undershoot der Sauerstoffkonzentration. Es zeigt sich kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsparadigmen (Single-Whisker vs. Whole-Pad).

Da das Messsignal aus einem Kortexareal von etwa 1,3 mm Durchmesser in der Aufsicht stammt, ist es zwangsläufig ein Mischsignal aus verschiedenen Kompartimenten (Arteriolen, Kapillaren und Venulen). Die zur Errechnung der Sauerstoffkonzentrationsveränderungen aus dem Messsignal verwendete Methode des "monoexponentiellen Fits" wurde mittels einer Computer-Simulation auf ihre Verlässlichkeit hinsichtlich der Berechnung von Sauerstoffkonzentrationsveränderungen aus einem solchen Mischsignal untersucht. Dabei zeigte sich, dass insbesondere dann, wenn sich die Sauerstoffkonzentration in einzelnen Kompartimenten isoliert verändert (also insbesondere in der initialen Phase), die Berechnung der Sauerstoffkonzentrationsveränderung mittels monoexponentiellem Fit fehlerhaft sein kann.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass die Konzentration von physikalisch gelöstem Sauerstoff in der Mikrozirkulation des Gehirnkortex von Ratten nach neuronaler Stimulation einen dreiphasigen Verlauf nimmt. In den ersten 1-1,5 Sekunden zeigt sich eine lediglich geringe Veränderung, gefolgt von einer deutlichen Zunahme (Hyperoxygenierung). Wiederum 1-1,5 Sekunden nach Stimulationsende fällt die Sauerstoffkonzentration ab und unterschreitet bei vielen Tieren zeitweise den Ausgangswert (undershoot).

Die Interpretation der berechneten Sauerstoffkonzentration eines Mischsignals aus verschiedenen Kompartimenten bei der Methode des Phosphorescence Quenching muss bei der Verwendung eines monoexponentiellen Fits mögliche Fehler der Methode berücksichtigen.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

PET	- Positronenemissionstomografie
FMRT	- funktionelle Magnetresonanztomografie
BOLD	- blood oxygenation level dependent
Hb	- Hämoglobin
oxy-Hb	- oxygeniertes Hämoglobin
deoxy-Hb	- deoxygeniertes Hämoglobin
CBF	- cerebral blood flow
CBV	- cerebral blood volume
CMRO ₂	- cerebral metabolic rate of oxygen
a.u.	- arbitrary units (willkürliche Einheiten)
SNR	- signal to noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)
pO ₂	- Sauerstoffpartialdruck
OEF	- oxygen extraction fraction
KG	- Körpergewicht

6. Literaturverzeichnis

- Akgoeren N, Dalgaard P, Lauritzen M (1996) Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Res* 710:204-214.
- Belliveau JW, Kennedy DN, McKinstry RC, Buchbinder BR, Weisskoff RM, Cohen MS, Vevea JM, Brady TJ, Rosen BR (1991) Functional Mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* 254:716-719.
- Buxton RB, Frank LR (1997) A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:64-72.
- Buxton RB, Wong EC, Frank LR (1998) Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model [In Process Citation]. *Magn.Reson.Med* 39:855-864.
- Caesar K, Akgoren N, Mathiesen C, Lauritzen M (1999) Modification of activity-dependent increases in cerebellar blood flow by extracellular potassium in anaesthetized rats. *J.Physiol.(Lond.)* 520 Pt 1:281-92:281-292.
- Chen W, Zhu, XH, Gruetter R, Seaquist ER, Adriany G, Ugurbil K (2001) Study of Tricarboxylic Acid Cycle Flux Changes in Human Visual Cortex During Hemifield Visual Stimulation Using ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ MRS and fMRI. *Magnetic Resonance in Medicine* 45:349-355.
- Davis TL, Kwong KK, Weisskoff RM, Rosen BR (1998) Calibrated functional MRI: mapping the dynamics of oxidative metabolism. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:1834-1839.
- Duong TQ, Kim DS, Ugurbil K, Kim SG (2001) Localized cerebral blood flow response at submillimeter columnar resolution. *PNAS USA* 98:10904-10909

- Ernst T, Hennig J (1994) Observation of a fast response in functional MR. *Magn Reson Med* 31:89-90.
- Fox PT, Raichle ME (1986) Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83:1140-1144.
- Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C (1988) Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241:462-464.
- Fujita H, Kuwabara H, Reutens DC, Gjedde A (1999) Oxygen consumption of cerebral cortex fails to increase during continued vibrotactile stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:266-271.
- Gjedde A, Ohta S, Kubawara H, Meyer E (1991) Is oxygen diffusion limiting for blood-brain transfer of oxygen ? In: *Brain work and mental activity. Alfred Benzon Symposium 31* (Lassen NA, Ingvar DH, Raichle ME, Friberg L eds), pp 177-184. Copenhagen: Munksgaard.
- Golub AS. Analysis of Phosphorescence in Heterogenous Systemes Using Distributions of Quencher Concentrations. Popel AS, Zheng L, and Pittman RN. *Biophysical Journal* 73, 452-465. 7-1997.
- Grinvald A, Sloviter H, Vanzetta I (2000) Non-invasive visualization of cortical columns by fMRI. *Nat.Neurosci.* 3:105-107.
- Hoge RD, Atkinson J, Gill B, Crelier GR, Marrett S, Pike GB (1999) Linear coupling between cerebral blood flow and oxygen consumption in activated human cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:9403-9408.
- Hu X, Le HT, Ugurbil K (1996) Evaluation of the early response in fMRI using short stimulus duration. *NeuroImage* 3:Suppl.1,S7.
- Hyder F, Chase JR, Behar KL, Mason GF, Siddeek M, Rothman DL, Shulman R (1996) Increased tricarboxylic acid cycle flux in rat brain during forepaw stimulation detected with $^1\text{H}[^{13}\text{C}]$ NMR. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 93:7612-7617.

Hyder F, Kennan RP, Kida I, Mason GF, Behar KL, Rothman DL (2000) Dependence of Oxygen Delivery on Blood Flow in Rat Brain: A 7 Tesla Nuclear Magnetic Resonance Study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:485-498.

Iadecola C, Kraig RP (1991) Focal elevations in neocortical interstitial K⁺ produced by stimulation of the fastigial nucleus in rat. *Brain Res.* 563:273-277.

Kim DS, Duong TQ, Kim SG (2000) High-resolution mapping of iso-orientation columns by fMRI. *Nature* 3:164-169.

Kohl, M. Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals. Lindauer, U, Royl, G, Kühl, Gold, Villringer, and Dirnagl. *Phys Med Biol* 45, 3749-3764. 2000. UK.

Leniger-Follert E, Hossmann KA (1979) Simultaneous measurements of microflow and evoked potentials in the somatomotor cortex of the cat brain during specific sensory activation. *Pflügers.Arch.* 380:85-89.

Lindauer U, Royl G, Leithner C, Kühl M, Gold L, Gethmann J, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U (2001) No Evidence for Early Decrease in Blood Oxygenation in Rat Whisker Cortex in Response to Functional Activation. *NeuroImage* 13:988-1001.

Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1993) Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anesthetics. *Am J Physiol* 264:H1223-H1228

Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U (1999) Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* 277:H799-H811

Lindauer U, Dirnagl U (2000) Synaptic activity and regional blood flow: physiology and metabolism. In: Pain imaging (Casey KL, Bushnell MC eds), pp (in press)Seattle: IASP Press.

- Lo, LW. A new, water soluble, phosphor for oxygen measurements in vivo. Vinogradov, SA, Koch, CJ, and Wilson, DF. Oxygen Transport to Tissue XIX. 1997. New York, Plenum Press.
- Logothetis NK, Guggenberger H, Peled S, Pauls J (1999) Functional imaging of the monkey brain [see comments]. *Nat.Neurosci.* 2:555-562.
- Logothetis NK (2000) Can current fMRI techniques reveal the microarchitecture of cortex ? *Nat.Neurosci.* 3:413
- Magistretti PJ, Pellerin L (1996) Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 777:380-7:380-387.
- Malonek D, Grinvald A (1996) Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: Implications for functional brain mapping. *Science* 272:551-554.
- Malonek D, Dirnagl U, Lindauer U, Yamada K, Kanno I, Grinvald A (1997) Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:14826-14831.
- Mandeville JB, Marota JJ, Ayata C, Zaharchuk G, Moskowitz MA, Rosen BR, Weisskoff RM (1999) Evidence of a cerebrovascular postarteriole windkessel with delayed compliance. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:679-689.
- Marota JJ, Ayata C, Moskowitz MA, Weisskoff RM, Rosen BR, Mandeville JB (1999) Investigation of the early response to rat forepaw stimulation. *Magn.Reson.Med.* 41:247-252.
- Mayhew J, Johnston D, Martindale J, Jones M, Berwick J, Zheng Y (2001) Increased Oxygen Consumption Following Activation of Brain: Theoretical Footnotes using Spectroscopic Data from Barrel Cortex. *NeuroImage* 13:975-987.

- Mayhew J, Zheng Y, Hou Y, Vuksanovic B, Berwick J, Askew S, Coffey P (1999) Spectroscopic Analysis of Changes in Remitted Illumination: The Response to Increased Neural Activity in Brain. *NeuroImage* 10:304-326.
- Mayhew JE, Askew S, Zheng Y, Porrill J, Westby GW, Redgrave P, Rector DM, Harper RM (1996) Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *Neuroimage*. 4:183-193.
- Menon RS, Ogawa S, Hu X, Strupp JP, Anderson P, Ugurbil K (1995) BOLD based functional MRI at 4 Tesla includes a capillary bed contribution: echo-planar imaging correlates with previous optical imaging using intrinsic signals. *Magn.Reson.Med* 33:453-459.
- Nemoto M, Nomura Y, Sato C, Tamura M, Houkin K, Koyanagi I, Abe H (1999) Analysis of optical signals evoked by peripheral nerve stimulation in rat somatosensory cortex: dynamic changes in hemoglobin concentration and oxygenation. *J Cereb.Blood Flow Metab.* 19:246-259.
- Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW (1990) Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci* 87:9868-9872.
- Ohta S, Reutens DC, Gjedde A (1999) Brief Vibrotactile Stimulation Does Not Increase Cortical Oxygen Consumption When Measured by Single Inhalation of Positron Emitting Oxygen. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19:260-265.
- Paulson OB, Newman EA (1987) Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow. *Science* 237:896-898.
- Prichard J, Rothman D, Novotny E, Petroff O, Kuwabara T, Avison M, Howseman A, Hanstock C, Shulman R (1991) Lactate rise detected by ¹H NMR in human visual cortex during physiologic activation. *Proc Natl Acad Sci* 88:5829-5831.
- Roy C, Sherrington C (1890) On the regulation of the blood supply of the brain. *J Physiol* 11:85-108.

- Röder, B. Einführung in die molekulare Photobiophysik. 1999. Leipzig, Teubner Studienbücher.
- Rubio R, Berne RM, Bockman EL, Curnish RR (1975) Relationship between adenosine concentration and oxygen supply in rat brain. *Am J Physiol* 228:1896-1902.
- Silva AC, Lee SP, Iadecola C, Kim SG (2000) Early temporal characteristics of cerebral blood flow and deoxyhemoglobin changes during somatosensory stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:201-206.
- Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276:2034-2037.
- Ueki M, Linn F, Hossmann KA (1988) Functional activation of cerebral blood flow and metabolism before and after global ischemia of rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:486-494.
- Vafae MS, Meyer E, Marrett S, Paus T, Evans AC, Gjedde A (1999) Frequency-dependent changes in cerebral metabolic rate of oxygen during activation of human visual cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:272-277.
- Vanzetta I, Grinvald A (1999) Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286:1555-1558.
- Vinogradov SA. Phosphorescence Lifetime Analysis with a quadratic programming algorithm for Determining Quencher Distributions in Heterogenous Systems. Wilson DF. *Biophysical Journal* 67, 2048-2059. 11-1994.
- Vovenko E (1999) Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats. *Pflugers Arch.* 437:617-623.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

Lindauer U, Royl G, Leithner C, Kühl M, Gold L, Gethmann J, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U (2001) No Evidence for Early Decrease in Blood Oxygenation in Rat Whisker Cortex in Response to Functional Activation. *NeuroImage* 13:988-1001.

Lebenslauf

27.06.1975	geboren in Ostfildern-Ruit
1981-1984	Mozartschule in Neuhausen a.d.F.
1984-1994	Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Braunschweig
1994	Abitur
1994-1995	Zivildienst (Pflegedienst in einer orthopädischen Klinik in Braunschweig)
1995-1997	Studium der Humanmedizin an der FU Berlin
1997	Physikum
ab 1997	Studium der Humanmedizin an der HU Berlin
1998	1. Staatsexamen
1997-2000	Tutor für Histologie am Institut für Anatomie der FU Berlin
2001	2. Staatsexamen
2001/2002	Praktisches Jahr
	1. Terial an der Charite Berlin, Neurologie
	2. Terial an der Charite Berlin, Infektiologie

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Anderer verfasst habe. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar. Soweit fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, sind die Quellen angegeben, wie auch bei sonst verwendeten Hilfsmitteln und Literaturangaben.

Berlin, den April 2002

Christoph Leithner