

**Mechanismen und Mediatoren der neurovaskulären  
Kopplung im Gehirn**

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. med. vet. Ute Lindauer  
geboren am 15.12.1964 in München

Präsident: Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

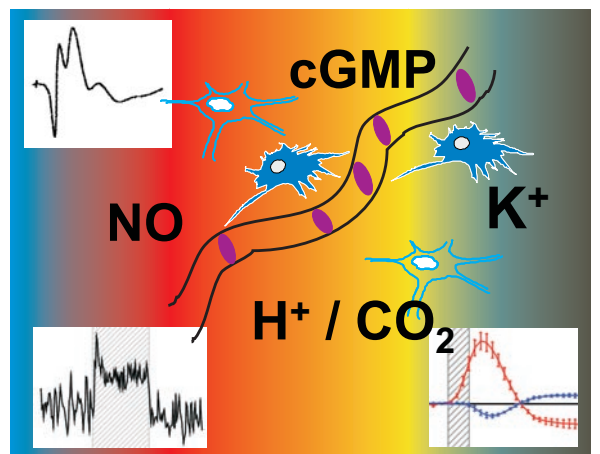
Eingereicht am: 12. Februar 2001

Tag der Habilitation: 02. Oktober 2001

Gutachter:

1. Prof. Dr. Roman L. Haberl

2. Prof. Dr. Oliver Kempfski



**INHALTSVERZEICHNIS:****I Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse**

1.	Einleitung - Das Konzept der neurovaskulären Kopplung.....	3
2.	Tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung neurovaskulärer Kopplung Das Whisker-Stimulationsmodell in der Ratte.....	4
3.	Einfluß der Substratzufuhr auf die Blutflußantwort auf somatosensorische Stimulation.....	7
4.	Rolle des NO bei der neurovaskulären Kopplung.....	10
4.1	Beteiligung des NO am basalen zerebralen Blutfluß.....	11
4.2	Rolle des NO bei der zerebralen Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation..	13
4.3	NO und rhythmische Oszillationen des zerebralen Blutflusses.....	15
5.	Zusammenfassung.....	16
6.	Wissenschaftliche Einordnung.....	17
7.	Literatur.....	19
8.	Abkürzungen.....	23
9.	Danksagung.....	24

**II Zusammenstellung wesentlicher Publikationen** 25

## 1. Einleitung - Das Konzept der neurovaskulären Kopplung

Die Anwendung moderner Techniken in der klinischen Neurologie und neurologischen Forschung am Menschen und im Tierexperiment erlaubt es, aktive Areale des Gehirns während motorischer, sensorischer und kognitiver Aufgaben zeitlich hoch aufgelöst und bildgebend darzustellen. Funktionelle Kernspintomographie (functional magnetic resonance imaging, fMRI), Positronen-Emissionstomographie (PET), sowie optische Methoden wie die Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS), die Optical-Imaging-Spectroscopy (OIS) und die Laser-Doppler Blutflußmessung stehen hierbei im Mittelpunkt des Interesses. Funktionelles MRI, PET und NIRS werden darüberhinaus immer wichtiger in der Diagnostik und therapiebegleitenden Dokumentation während pathologischer Prozesse in der Neurologie.

Trotz dieses großen Potentials bildgebender Techniken im klinischen Ablauf von Diagnostik und Therapie sind diese mit einer wesentlichen Einschränkung der Interpretation der Befunde behaftet: Veränderungen in neuronaler und glialer Aktivität werden nicht direkt erfaßt, es dienen lediglich indirekte, mit der zellulären Aktivität assoziierte Veränderungen des zerebralen Blutflusses, der Blutoxygenierung und des Energiemetabolismus als Signal. Es ist allgemein akzeptiert, daß eine enge Beziehung zwischen neuronaler und glialer Aktivierung, dem Energiemetabolismus und dem zerebralen Gefäßbett besteht – als Phänomen der neurometabolischen und neurovaskulären Kopplung bekannt. Diese enge räumliche und zeitliche Korrelation von elektrischer und metabolischer Aktivität sowie dem regionalen zerebralen Blutfluß ist charakteristisch für das Gehirn und wurde erstmals von Roy und Sherrington im Jahre 1890 beschrieben (Roy and Sherrington, 1890).

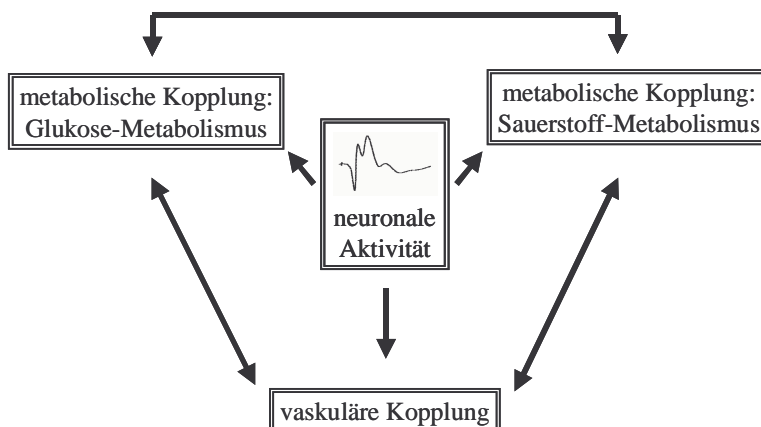


Abb. 1: Konzept der neurovaskulären Kopplung: Neuronale Aktivierung führt entweder direkt oder über eine Erhöhung des Sauerstoff- und Glukosemetabolismus (metabolische Kopplung) zu Veränderungen des regionalen zerebralen Blutflusses (vaskuläre Kopplung).

Funktionelle Bildgebung bedient sich demnach metabolischer und vaskulärer Antworten, um regionale Hirnaktivität darzustellen. Um die gesamte Bandbreite der Informationen, die wir durch moderne funktionelle Bildgebung des Gehirns erhalten, sinnvoll in Diagnostik und Therapie ausschöpfen zu können, brauchen wir daher grundlegende Kenntnisse der physiologischen Vorgänge der neurometabolischen und neurovaskulären Kopplung. Im Rahmen von Krankheitsprozessen kann es zu Störungen neurovaskulärer Kopplung kommen, die ihrerseits selbst den Gewebeschaden verstärken können (Iadecola, 1998). Eine grundlegende Klärung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge der neurovaskulären Kopplung könnte daher auch zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei akuten und chronischen ZNS Erkrankungen führen.

## ***2. Tierexperimentelle Modelle zur Untersuchung neurovaskulärer Kopplung***

### ***Das Whisker-Stimulationsmodell in der Ratte***

Untersuchungen zur Physiologie neurovaskulärer Kopplung können prinzipiell an gesunden, wachen Probanden mithilfe von nicht-invasiven Messtechniken durchgeführt werden. Pharmakologische Intervention zur Klärung beteiligter Mediatoren oder Modulatoren der Blutflußantwort kann allerdings nur über den systemischen Kreislauf und nur in begrenztem Ausmaß erfolgen.

Deshalb befaßten wir uns zu Beginn unserer Untersuchungen zur neurovaskulären Kopplung mit der Entwicklung eines geeigneten tierexperimentellen Modells. Aus Gründen der einfacheren Handhabung wählten wir als Tierspezies die Ratte (*rattus norvegicus*). Trotz der entwicklungsphysiologisch im Vergleich zum Menschen niedrigeren Stellung der Ratte und des Fehlens von kortikalen Gyri (lissencephale Spezies) sind keine grundlegend unterschiedlichen Mechanismen der neurovaskulären Kopplung zu erwarten. Bei der Etablierung des Modells stand neben eines möglichst physiologischen und standardisierbaren Stimulus auch die Wahl eines geeigneten Anästhetikums im Zentrum unseres Interesses.

Die Laser-Doppler Blutflußmethode (laser-Doppler flowmetry, LDF) diente zur Blutflußmessung (Haberl et al., 1989; Dirnagl et al., 1989; Iadecola and Reis, 1990a), die uns eine kontinuierliche Darstellung des regionalen Blutflusses (rCBF) mit einer räumlichen Auflösung von ca. 1 mm<sup>3</sup> (in Abhängigkeit des Lichtleiters) und einer zeitlichen Auflösung von 0,1 s erlaubte. Da mithilfe der LDF in der Ratte keine quantitative Messung in

Absolutwerten möglich ist, Veränderungen eines vorhandenen Ruheflusses sich aber linear darstellen, berechneten wir relative Veränderungen des rCBF in % des Ausgangswertes.

In bisher in der Literatur beschriebenen Modellen zur zerebralen Blutflußregulation kamen elektrische Stimulationen des Gehirns selbst oder peripherer Nerven zum Einsatz, die, im Vergleich zu Untersuchungen am wachen Menschen (Conrad and Klingelhöfer, 1989; Kwong et al., 1992) in der Regel zu unphysiologisch hohen Blutflußantworten führen (Leniger-Follert and Hossmann, 1979; Nakai et al., 1983; Ngai et al., 1988; Iadecola and Reis, 1990a; Iadecola et al., 1990b; Iadecola and Ebner, 1993). Einen physiologischer Stimulus stellt dagegen die Auslenkung der Barthaare (Whisker-Haare) der Ratte dar. Die dicht innervierten Whisker Haare werden zudem von einem großes Areal innerhalb des primären somatosensorischen Kortex repräsentiert, dem sogenannten Barrel-Kortex, der präparatorisch leicht zugänglich im dorsolateralen Bereich des parietalen Kortex zu finden ist (s. A, S.2). Das System der Whisker-Haare und des Barrel-Kortex von Ratte und Maus wurde von Woolsey und Mitarbeitern und von Welker bereits gründlich beschrieben (Woolsey and van der Loos, 1970; Welker, 1971; Woolsey and Rovainen, 1991). Der Whisker-Barrel Bereich umfaßt ca. 20 % des gesamten SI Kortex von Ratte und Maus. Jedes Whisker-Haar ist in einem sogenannten kortikalen Barrel (Tönnchen), repräsentiert, welches wegen seiner Tonnenförmigen Anordnung der kortikalen Zellen so bezeichnet wurde. Die vaskuläre Versorgung jedes Barrels erfolgt über eine penetrierende Arteriole im Versorgungsgebiet der mittleren Zerebralarterie (middle cerebral artery, MCA). Die 35 langen Sinus-Haare der Ratte entsprechen demnach 35 somatotopisch angeordneten Barrels mit einem gesamten Projektionsgebiet innerhalb des SI Kortex von  $9,0 \text{ mm}^2$  (s. A, S.3).

Die Untersuchung neurovaskulärer Kopplung erfolgt optimalerweise an wachen Individuen, da Anästhetika mehr oder weniger stark in die Informationsübertragung von peripheren Reizen zum somatosensorischen Kortex eingreifen. Da es allerdings im tierexperimentellen Ansatz zur Blutflußmessung und pharmakologischen Manipulation der Kopplungsvorgänge im Gehirn der Implantation eines kraniellen Fensters mit Entfernung der Dura mater bedarf, kann auf den Einsatz einer wirkungsvollen Schmerzausschaltung und Neurolepsie nicht verzichtet werden. Die einzusetzenden Anästhetika sollten dabei möglichst Monopräparate darstellen, um nicht durch multiple Wirkmechanismen verschiedener Anästhetika die Interpretation der Ergebnisse zu erschweren. In unserer ersten Studie im Rahmen der Etablierung des Modells verglichen wir daher drei der häufig in der Ratte verwendeten Narkosemittel - Halothan in Lachgas / Sauerstoff, Thiobarbiturat und  $\alpha$ -Chloralose - unter jeweils vergleichbarer Narkosetiefe. Die gesamte vorbereitende Präparation

der Tiere erfolgte unter Halothan in Lachgas / Sauerstoff, sodaß diese Anästhesie in der Halothangruppe weitergeführt wurde und als Vergleichswert des Ruheflusses für die anderen beiden Narkoseformen diente. Thiobarbiturat und  $\alpha$ -Chloralose führten zu einer fast 50 % igen Abnahme des Ruheflusses nach Umstellung der Narkose, was auf eine deutliche Reduktion der Ruheaktivität des zerebralen Kortex im Vergleich zu Halothan hinweist. Zudem ist aber auch bekannt, daß Halothan, wahrscheinlich über einen Stickstoffmonoxid-vermittelten Mechanismus, zu einer Vasodilatation führt (Morita et al., 1977; Maekawa et al., 1989; McPherson et al., 1993). Die Blutflußantwort auf somatosensorische Stimulation ist erhalten, volatile Anästhetika wie das Halothan führen allerdings zu deutlichen Schwankungen im Ruhefluß, wodurch der Einsatz dieser Substanzen in Untersuchungen zur neurovaskulären Kopplung nicht zu empfehlen ist. Anästhetika der Barbituratgruppe dagegen reduzieren den zerebralen Metabolismus, vermindern darüber den Ruhefluß (Goldman and Sapirstein, 1973; Tsubokawa et al., 1980) und führen, wie wir zeigen konnten, zu deutlich kleineren Blutflußantworten auf somatosensorische Stimulation. Alpha-Chloralose alleine (s. A, S.1) oder in Kombination mit Urethan (s. G, S.2) erwies sich hingegen als das optimale Anästhetikum zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung, da es einerseits die zerebrale Grundaktivität und damit den Ruhefluß senkt, andererseits aber evozierte Antworten im somatosensorischen Kortex sowie deren vaskuläre Kopplung nicht wesentlich beeinflusst, sodaß es zu Blutflußantworten auf somatosensorische Stimulation kommt, die in Amplitude und Zeitverlauf denen des wachen Menschen entsprechen.

Neben der Whisker-Stimulation etablierten wir auch die elektrische Stimulation der Vorderpfote der Ratte, die zu identischem zeitlichen Verlauf der mittels LDF gemessenen Blutflußantwort führt.

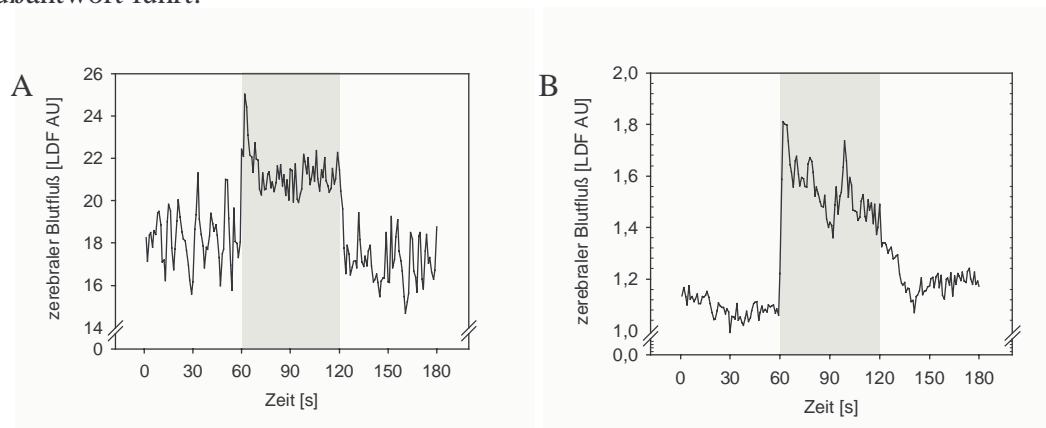


Abb. 2: Somatosensorische Stimulation in der Ratte (A: Whisker-Stimulation, B: elektrische Stimulation der Vorderpfote) führt zu einem raschen Anstieg des mittels LDF gemessenen Ruheflusses, dessen Maximum nach 3-5 s erreicht ist. Unter fortdauernder Stimulation stellt sich ein Plateau ein, und mit Beendigung der Stimulation kehrt der regionale Blutfluß auf sein Ausgangsniveau zurück. Die Erhöhung des Blutflusses auf Whisker-Stimulation beträgt über die Stimulationsdauer von 60 s gemittelt 15 – 20 % des Ruheflusses, während elektrische Stimulation der Vorderpfote je nach Reizstärke zu höheren Blutflußantworten von 35-45 % führt.

### ***3. Einfluß der Substratzufuhr auf die Blutflußantwort auf somatosensorische Stimulation***

Überlegungen zur neurovaskulären Kopplung befassen sich u.a. mit der zentralen Fragestellung nach dem Zweck der Blutflußantwort auf erhöhte neuronale Aktivität. Dient die Blutflußerhöhung dem Antransport der zentralen Substrate des Energiestoffwechsels, dem Sauerstoff und der Glukose, und wird die Vasodilatation getrieben von einem kurzzeitigen Abfall jeweils einer oder beider Substanzen, so müßte es zum einen zu einem kurzzeitigen und möglicherweise messbaren Abfall in der Sauerstoffspannung bzw des Glukosegehalts im Gewebe und im Blut kommen. Zum anderen müßte eine starke Erhöhung des Substrats im Gewebe vor der Stimulation zu einer Abnahme der Blutflußantworten führen. Beide Hypothesen haben wir im Rahmen unserer Studien auf ihre Richtigkeit hin untersucht.

Die Frage nach einem kurzzeitigen und messbaren Abfall in der Sauerstoffspannung zu Beginn erhöhter neuronaler Aktivität wird seit längerem kontrovers diskutiert.

Untersuchungen in unterschiedlichen Spezies und unterschiedlichen Stimulationsparadigmen wurden mit verschiedenen Techniken durchgeführt, es läßt sich aber zunächst keine einheitliche Aussage ableiten.



Tabelle1: Übersicht über Befunde zur frühen Hämoglobin-Deoxygenierung unter funktioneller Aktivierung

Zitat	Methode	Spezies	frühe Deoxygenierung ?
Ernst und Hennig, 1994	fMRI	Mensch	Ja
Menon et al., 1995	fMRI	Mensch	Ja
Obrig et al, 1996	NIRS	Mensch	Nein
Hu et al., 1997	fMRI	Mensch	Ja
Heekeren et al, 1997	NIRS	Mensch	Nein
Fransson et al., 1998	fMRI	Mensch	Nein
Logothetis et al., 1999	fMRI	Affe	Ja
Malonek und Grinvald, 1996	OIS	Katze	Ja
Vanzetta und Grinvald, 1999	O <sub>2</sub> abh. PQ	Katze	Ja
Kim et al., 2000	fMRI	Katze	Ja
Marota et al., 1999	fMRI	Ratte	Nein
Nemoto et al. 1999	OIS	Ratte	Ja
Mayhew et al. 1999	OIS	Ratte	Ja
Silva et al., 2000	MRI	Ratte	Nein

In unseren Untersuchungen zu Oxygenierungsveränderungen unter somatosensorischer Stimulation bei der Ratte kamen zwei voneinander unabhängige Techniken zum Einsatz. Hämoglobinoxygenierungsveränderungen erfaßten wir mittel OIS, Veränderungen des physikalisch im Blut gelösten Sauerstoffs ermittelten wir, wie zuvor von Vanzetta und Grinvald in der Katze eingesetzt (Vanzetta and Grinvald, 1999), durch Messung der Veränderung der Phosphoreszenz-Lebensdauer eines sauerstoffspannungsabhängigen Phosphoreszenz-Farbstoffs. Beide Methoden zeigten in der Ratte nach Whisker-Stimulation keinen frühen Anstieg im deoxygenierten Hämoglobin bzw. Abfall in der intravaskulären Sauerstoffspannung (s. B, S.6-8). Zudem konnten wir zeigen, daß der errechnete Verlauf des Deoxyhemoglobins vom Einsatz des Algorithmus zur Dekonvolution der gemessenen Spektren in der OIS abhängt, und nur durch Einführen eines wellenlängenabhängigen Korrekturfaktors (differential pathlength factor,  $DP(\lambda)$ ) die Spektren korrekt beschrieben werden können (s. C). Während ohne Einführung des DPF auch in unseren Experimenten an der Ratte in Übereinstimmung mit Untersuchungen an der Katze in einem Kooperationsprojekt mit A. Grinvald (s. D, S.3-4) eine frühe Deoxygenierung zu erkennen ist, verschwindet diese vollständig nach Analyse mit dem verbesserten Algorithmus (s. B, S.8).

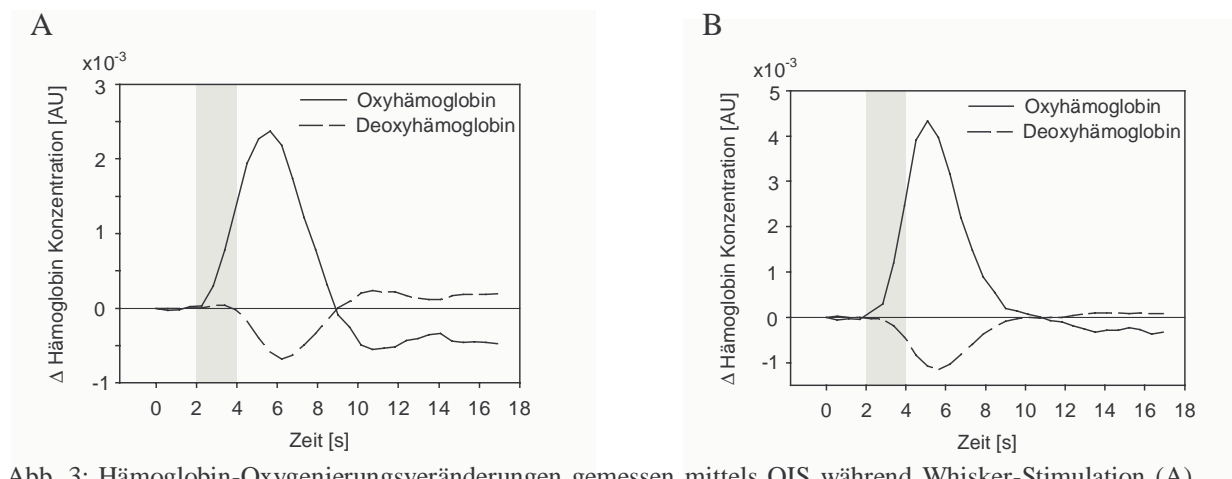


Abb. 3: Hämoglobin-Oxygenierungsveränderungen gemessen mittels OIS während Whisker-Stimulation (A) und elektrischer Vorderpfoten-Stimulation (B) in der Ratte. Es gibt keinen Hinweis auf eine frühe Deoxygenierung, (erkennbar an dem Fehlen eines frühen Anstiegs des Deoxyhämoglobins vor der Hyperoxygenierung) als Signal für die nachfolgende Blutflußantwort, die zu einer Hyperoxygenierung der regionalen Zirkulation führt.

Diese mittels OIS von uns erhobenen Befunde bezüglich der Bedeutung des Berechnungsalgorithmus' können zumindest zum Teil die unterschiedlichen Ergebnisse zur frühen Deoxygenierung erklären, da die Analysen der Untersuchungen von sowohl Malonek

und Grinvald (Malonek and Grinvald, 1996) und Malonek et al. (s. D) als auch Nemoto et al. (Nemoto et al., 1999) ohne  $DP(\lambda)$  Korrektur durchgeführt wurden. Es bleibt dennoch unklar, inwieweit Spezies- oder Stimulationsparadigmen-Unterschiede darüberhinaus für kontroverse Befunde verantwortlich sind.

Unabhängig von den verwendeten Algorithmen zur Beschreibung der gemessenen Spektren ist aber darauf hinzuweisen, daß die bei Malonek und Grinvald (1996) und Malonek et al. (s. D) auftretende frühe Deoxygenierung während visueller Stimulation in der Katze immer zeitgleich mit der Oxygenierungsantwort erfolgt. Eine frühe Deoxygenierung als Signal für die Blutflußantwort müßte hingegen vor der Oxygenierungsantwort zu erkennen sein und sich in einem Anstieg im deoxygenierten Hämoglobin und parallel dazu in einem Abfall im oxygenierten Hämoglobin und damit einem Abfall in der Sauerstoff-Sättigung darstellen. Dieses Muster als Beweis einer Deoxygenierung als Signal der Blutflußantwort ist bisher nicht gezeigt worden. Somit kann eine derartige frühe Deoxygenierung als unwahrscheinlich angesehen werden. Wenn sie als grundlegender Kopplungsmechanismus existierte, müßte sie homogen in allen höheren Säugetierspezies auftreten und mit ausreichender räumlicher und zeitlicher Auflösung der verfügbaren Techniken erfaßbar sein.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zum Fehlen einer frühen Deoxygenierung bei Stimulationsbeginn führte weder eine Hyperoxygenierung noch eine Hyperglykämie während somatosensorischer Stimulation im Whisker-Modell zu einer Veränderung der mittels LDF gemessenen Blutflußantworten (s. E, S.4).

Somit gibt es anhand unserer Befunde keine Hinweise darauf, daß ein möglicherweise kurzzeitig auftretender Substratmangel im Gewebe registriert wird, und auf diesem Wege die Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation initiiert wird.

Die Frage nach dem eigentlichen Signal für die Blutflußantwort und dem primären Ort der Regulation (Arteriole, Kapillare, Venole) bleibt weiterhin ungeklärt.

#### ***4. Rolle des NO bei der neurovaskulären Kopplung***

Eine Reihe von Mechanismen oder Mediatoren können im Rahmen der Frage nach initiierenden und unterhaltenden Faktoren der Blutflußantwort diskutiert werden (Lindauer and Dirnagl, 2000). Neben Metaboliten des Zellstoffwechsels wie Adenosin und  $H^+$  /  $CO_2$

werden neurogene Mechanismen für die Blutflußantwort verantwortlich gemacht (Lou et al., 1987; Cohen et al., 1995; Cohen et al., 1997; Krimer et al., 1998; Sandor, 1999; Elhusseiny and Hamel, 2000).

Das Bioradikal Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) steht seit Jahren im Zentrum des Interesses als idealer Kandidat der neurovaskulären Kopplung. Neben seiner Eigenschaft als starker Vasodilatator mit kurzer Halbwertszeit wird es von vaskulären Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen konstitutiv produziert und kann auf einen Glutamat-Rezeptor vermittelten Mechanismus hin freigesetzt werden. In den im folgenden zusammengefaßten Untersuchungen beschäftigten wir uns speziell mit der Rolle des NO bei der Whiskerstimulationsvermittelten Blutflußantwort und einem möglichen Zusammenspiel von NO mit  $H^+$  und  $CO_2$ .

#### 4.1 Beteiligung des NO am basalen zerebralen Blutfluß

Das NO produzierende Enzym NO Synthase liegt in drei Isoformen vor, der konstitutiv exprimierten endothelialen und neuronalen NO Synthase (cNOS: Typ I, nNOS und Typ III, eNOS, Tabelle 2) sowie der induzierbaren NO Synthase (iNOS, Typ II, Tabelle 2), die im Rahmen von inflammatorischen Prozessen in einer Vielzahl von Zellen induziert werden kann.

Tabelle 2: Isoformen der NOS

Isoform	Zelltyp	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin abhängig	NO Produktion
<u>Konstitutiv exprimiert: cNOS</u>			
Typ I: neuronale NOS, nNOS	Neuron Astrozyt, Endothelzelle	+	kurzzeitig in pM
Typ III: endotheliale NOS, eNOS	Endothelzelle Neuron, Astrozyt		
<u>Induzierbar: iNOS</u>			
Typ II: induzierbare NOS, iNOS	Makrophage, Mikroglia Endothelzelle, Astrozyt, Neuron, glatte Gefäß- muskelzelle	-	langdauernd in nM

Während die iNOS auf proinflammatorische Stimuli hin de novo exprimiert wird und daraufhin unabhängig von intrazellulärem Calcium NO in nanomolaren Konzentrationen produziert wird, führt die Aktivität der cNOS in erster Linie zu einer Calcium/Calmodulin-abhängigen, kontinuierlichen basalen NO Produktion in picomolaren Konzentrationen (Knowles and Moncada, 1994; Griffith and Stuehr, 1995).

Der einzige einheitlich beschriebene und bisher bewiesene Rezeptor für NO im biologischen System stellt die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGC) dar. Nach Bindung von NO an der Häm-Gruppe des Enzyms wird die Produktion von zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cyclic GMP, cGMP) aus Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) katalysiert. Das initiale NO Signal wird somit über cGMP im Rahmen der Signalkaskade an cGMP-abhängige Proteinkinasen, Ionen-Kanäle und Phosphodiesterasen weitergeleitet und in zelluläre Reaktivität übersetzt. So wird zum Beispiel der Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor in der glatten Gefäßmuskelzelle durch Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt letztlich zu einem Abfall der intrazellulären Calcium-Konzentration und damit zur Relaxation der Zelle. Neben der gut beschriebenen, cGMP abhängigen Signalkaskade existieren aber auch eine Reihe von cGMP unabhängigen Reaktionswegen des NO, die in ihrem Ablauf bisher weitaus weniger gut aufgeklärt sind. Ein zentraler Mechanismus hierbei scheint die S-Nitrosylierung von Effektorproteinen durch physiologische wie auch pathophysiologisch erhöhte NO Konzentrationen im Gewebe darzustellen. Im Rahmen der neurovaskulären Kopplung sind hierbei Befunde zur direkten Modulation der Leitfähigkeit von Kalium-Kanälen durch NO von Bedeutung (Bolotina et al., 1994) (zur Übersicht siehe (Denninger and Marletta, 1999)).

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Rolle des NO bei der neurovaskulären Kopplung konnten wir zeigen, daß pharmakologische Inhibition der konstitutiven NOS zu einer signifikanten Abnahme des Ruheflusses in vivo (s. F, S.2) führt. Die Bereitstellung des basalen NO Spiegels scheint darüberhinaus in erster Linie durch die Aktivität der neuronalen Isoform der NOS zu erfolgen, da selektive Inhibition dieser durch Applikation des spezifischen nNOS Blockers 7-Nitroindazole zu einer vergleichbaren Abnahme des zerebralen Blutflusses unter Ruhebedingungen führt (s. G, S.7). Weiterhin konnten wir zeigen, daß zumindest ein signifikanter Teil der basalen vaskulären NO Wirkung über cGMP vermittelt wird, da spezifische Inhibition der löslichen Guanylatzyklase ebenfalls zu signifikanter Vasokonstriktion und damit Abnahme des Ruheflusses führt (s. G, S.8). Dieser

Befund zeigt, daß der basale NO Spiegel im Gewebe funktionell von Bedeutung ist. Zerebrale Gefäße verfügen somit über einen physiologischen, NO vermittelten vasodilatatorischen Tonus, der zu signifikantem Anteil über einen basalen cGMP-Spiegel in der glatten Gefäßmuskelzelle verursacht wird.

Neben seiner direkten vaskulären Funktion an der glatten Gefäßmuskelzelle nimmt NO zusätzlich eine wichtige antiadhäsive Funktion im Rahmen der Leukozyten-Endothel-Interaktion ein. Deshalb war es für weitere Untersuchungen der Rolle des NO bei der physiologischen neurovaskulären Kopplung von Bedeutung, vorab zu untersuchen, inwieweit eine Senkung des basalen zerebralen NO Spiegels durch pharmakologische Blockade der cNOS über eine mögliche Aktivierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu Störungen des Blutflusses in der Mikrozirkulation führt und darüber die Interpretation der Befunde zur neurovaskulären Kopplung erschweren würde.

Unter Verwendung intravitaler konfokaler Laser-scanning Mikroskopie konnten wir allerdings zeigen, daß pharmakologische Inhibition der NOS unter physiologischen Bedingungen zu keiner Aktivierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und daher zu keiner Beeinträchtigung der Fließeigenschaften des Blutes in der zerebralen Zirkulation führt. Lediglich in inflammatorisch vorgeschädigtem Hirngewebe führt die Abnahme des basalen NO Spiegels nach NOS Inhibition zu einer signifikanten Aktivierung des Anheftungsprozesses von Leukozyten am zerebrovaskulären Endothel (s. H, S.4-7).

#### ***4.2 Rolle des NO bei der zerebralen Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation***

Die signifikante Beteiligung des NO / cGMP Systems am regionalen zerebralen Blutfluß des somatosensorischen Kortex der Ratte unter Ruhebedingungen legt die Hypothese nahe, daß dieses auch für somatosensorisch evozierte Veränderungen des Blutflusses von Bedeutung ist.

In unserer frühen Untersuchung zur Rolle des NO bei der neurovaskulären Kopplung konnten wir erstmalig zeigen, daß eine solchermaßen postulierte Beteiligung des NO tatsächlich existiert. Sowohl systemische wie auch topische Gabe des unspezifischen NOS Inhibitors L-NNA (N<sup>0</sup>-Nitro-L-Arginin) führt zu einer ca. 50% igen Reduktion der mittels LDF gemessenen Blutflußantwort auf Whisker-Stimulation der Ratte. Interessanterweise wird nach topischer NOS-Inhibitor Applikation die Blutflußantwort auf Hyperkapnie wie auch auf topisch induzierte, extrazelluläre Azidifizierung, welche beide globale vasodilatatorische

Stimuli darstellen, um mehr als 90 % reduziert (s. F, S.2, sowie I, S.3).

Die neuronale Aktivität selbst wird durch NOS Blockade nicht beeinflusst, wie sowohl im Whisker-Modell als auch im Modell der elektrischen Vorderpfotenstimulation durch Vergleich der somatosensorisch evozierten Potentiale vor und nach NOS-Inhibitor Applikation gezeigt wurde (s. K, S.3).

Die Beteiligung des NO / cGMP Systems bei funktionell fokalen wie auch globalen vasodilatatorischen Stimuli der zerebralen Zirkulation ist prinzipiell auf zwei Wegen vorstellbar:

- Mediator-Funktion des NO / cGMP: auf erhöhte neuronale Aktivität hin wird über einen Glutamat-vermittelten postsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Einstrom die Aktivität der dort lokalisierten nNOS erhöht, zellmembrangängiges NO diffundiert zum Gefäß und führt über die Erhöhung des cGMP in der glatten Gefäßmuskelzelle zur Vasodilatation.
- Modulator-Funktion des NO / cGMP: der basale NO / cGMP Spiegel im kortikalen Gewebe führt über Nitrosylierung bzw. Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung von Zellproteinen (z.B. an Ionenkanälen mit der Folge einer veränderten Leitfähigkeit) und ermöglicht somit die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle auf Vasodilatoren, die bei erhöhter neuronaler Aktivität freigesetzt werden.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß im Rahmen der Blutflußantwort auf Hyperkapnie das NO / cGMP System sowohl im parietalen Kortex als auch im Kleinhirn eine modulatorische Rolle einnimmt (Iadecola et al., 1994; Yang and Iadecola, 1997), während die Blutflußantwort auf elektrische Stimulation der Parallelfasern des Kleinhirns, welches ein rein glutamaterges monosynaptisches System darstellt, im Sinne eines echten Mediators durch NO / cGMP vermittelt wird (Iadecola et al., 1995; Akgoeren et al., 1996; Yang and Iadecola, 1997). Auch die Vasodilatation im Bereich des parietalen Kortex auf elektrische Stimulation des basalen Vorderhirns, eine primär endotheliale, Acetylcholin vermittelte Reaktion, wird über NO als Mediator vermittelt (Iadecola and Zhang, 1996).

So war es für das allgemeine Verständnis der Rolle des NO im somatosensorischen Kortex, dessen Gehalt an konstitutiver NOS signifikant unter der des Kleinhirns liegt (Cholet et al., 1997), von herausragender Bedeutung zu klären, inwieweit der basale NO / cGMP Spiegel die funktionelle neurovaskuläre Kopplung bestimmt:



Unspezifische NOS Inhibition, spezifische Inhibition der neuronalen NOS sowie Inhibition der NO-abhängigen Guanylatzyklase führt neben der Abnahme des Ruheflusses zu einer etwa 50 % igen Reduktion der Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation. Unter fortdauernder NOS Blockade ist es mittels topischer Applikation von unterschiedlichen NO Donoren sowie eines Zellmembran-gängigen cGMP Analogs möglich, das Niveau des Ruheflusses und somit den ursprünglichen basalen NO / cGMP Spiegel vor Applikation des NOS Inhibitors wiederherzustellen, um die Wirkung der basalen NO / cGMP Konzentration von einer echten Mediatorfunktion zu trennen. Die Wiederherstellung des basalen NO wie auch cGMP Spiegels führt zu einer Restitution der Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation unter NOS Blockade, die Applikation von cGMP während fortdauernder Guanylatzyklase Inhibition führt zu gleichem Ergebnis. Wiederherstellung des Ruhetonus der Gefäße unter Verwendung des NO unabhängigen Vasodilatators Papaverin führt hingegen zu keiner Erhöhung der durch NOS Blockade verminderten vaskulären Antwort auf funktionelle Stimulation (s. G, S.5-8).

Das NO / cGMP System im somatosensorischen Kortex agiert somit, entsprechend seiner Funktion während experimenteller Hyperkapnie, durch seinen basalen Gewebespiegel als Modulator im Rahmen der Blutflußantwort während neurovaskulärer Kopplung.

Die Frage nach den eigentlichen Mediatoren der vaskulären Antwort auf funktionelle Stimulation bleibt daher weiterhin ungeklärt. Metaboliten des Zellstoffwechsels wie Adenosin und  $H^+$  /  $CO_2$  , aber auch das in Konzentrationen bis zu 20 mM stark vasodilatatorisch wirkende Kalium, welches bei neuronaler Depolarisation freigesetzt wird, werden nach wie vor als mögliche Kandidaten diskutiert. Vor allem die Rolle des Kaliums, dessen vasodilatatorische Wirkung ebenfalls durch NO modulatorisch beeinflusst wird (Dreier et al., 1995), wird im Rahmen eines astrozytären Kaliumtransports von der Synapse zum regionalen Blutgefäß als potentieller Mechanismus formuliert – eine Hypothese, die in einem zukünftigen Projekt auf ihre Gültigkeit hin zu überprüfen ist.

#### ***4.3 NO und rhythmische Oszillationen des zerebralen Blutflusses***

Das Phänomen periodischer Oszillationen des lokalen zerebralen Blutflusses im Frequenzbereich von 0,1 Hz, auch Vasomotion genannt, ist seit langem bekannt, die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind aber nach wie vor ungeklärt. Unregelmäßiges Auftreten von kleinamplitudigen Oszillationen ist unter physiologischen Bedingungen häufig



zu beobachten. Ein robuster Induktor sehr regelmäßiger Vasomotion mit großer Amplitude allerdings stellt die NOS Inhibition dar. Amplitudenausschläge in der Größenordnung von bis zu 20 % des Ausgangsflusses sind keine Seltenheit (s. L, S.3-4).

Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß der vasodilatatorische Tonus des basalen NO im Gewebe einen vorhandenen Grundrhythmus der Gefäße überlagert. Hierbei scheint es sich aber eher um einen direkten, cGMP unabhängigen Effekt des NO zu handeln, da zwar NO- Donor Applikation, nicht aber cGMP-Analoga Applikation zu einer deutlichen Verminderung der Oszillationen bei fortbestehender NOS Inhibition führt. Auch kommt es nach Guanylatzyklase-Inhibition zu nur geringgradiger Vasomotion. Interessanterweise reduziert aber der NO unabhängige Vasodilatator Papaverin ebenfalls die NOS Inhibition-vermittelte Vasomotion, was auf eine Beteiligung des Calciums bei der rhythmischen Blutflußoszillation schließen läßt. Daß das Auftreten von Vasomotion allerdings keinen Einfluß auf die Reaktivität zerebraler Gefäße auf funktionelle Stimulation hat, beweist die Tatsache, daß nach NOS Inhibition mit nachfolgender cGMP Substitution die Blutflußantwort auf Whisker-Stimulation restituiert, die Vasomotion aber unverändert erhalten ist (s.G, S.8-9).

Welche Mediatoren oder Modulatoren neben dem NO an der Vasomotion beteiligt sind, und inwieweit diese bei starkem Auftreten als Marker gestörter vaskulärer Funktion angesehen werden können, bedarf weiterer Untersuchung.

## ***5. Zusammenfassung***

Zwischen neuronaler und glialer Aktivierung, dem Energiemetabolismus und dem zerebralen Gefäßbett besteht eine enge Beziehung – als Phänomen der neurometabolischen und neurovaskulären Kopplung bekannt. Diese Korrelation von elektrischer und metabolischer Aktivität sowie dem regionalen zerebralen Blutfluß besteht räumliche und zeitliche fokussiert und ist charakteristisch für das Gehirn. Das Verständnis um die Mechanismen und Mediatoren der neurovaskulären Kopplung ist von grundlegender Bedeutung für die korrekte Interpretation moderner bildgebender Verfahren im klinischen Einsatz.

Ein Schwerpunkt unserer Untersuchungen lag in der Überprüfung der Hypothese eines frühen Sauerstoff-oder Glukose-Mangels im Gewebe unter funktioneller Stimulation als mögliches primäres Signal für eine nachfolgende vaskuläre Antwort. Anhand unserer Befunde

können wir jedoch ausschließen, daß ein möglicherweise kurzzeitig auftretender Substratmangel im Gewebe registriert wird, und auf diesem Wege die Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation initiiert wird. Die Frage nach dem eigentlichen Signal für die Blutflußantwort und dem primären Ort der Regulation (Arteriole, Kapillare, Venole) bleibt weiterhin ungeklärt.

Die qualitative wie auch quantitative Charakterisierung des Verlaufs der Blutfluß- und Blutoxygenierungsveränderungen unter somatosensorischer Stimulation bildet die Grundlage für die Untersuchung von Veränderungen dieses Musters unter pathophysiologischen Bedingungen als sogenannter Fingerabdruck spezifischer zerebraler Schädigungen.

Im Rahmen des zweiten Schwerpunkts der dargelegten Untersuchungen beschäftigten wir uns mit der Rolle des Bioradikals NO bei der neurovaskulären Kopplung. Ein im kortikalen Gewebe physiologisch vorhandener basaler NO Spiegel moduliert über die Bereitstellung einer basalen cGMP Konzentration vornehmlich in glatten Gefäßmuskelzellen die Reaktivität zerebraler Gefäße sowohl auf globale vasodilatatorische Stimuli wie die Hyperkapnie als auch auf funktionelle Aktivität wie die Whisker-Stimulation der Ratte.

Da die Bereitstellung des basalen NO / cGMP Spiegels im zerebralen Gewebe für physiologische vaskuläre Antworten von grundlegender Bedeutung ist, ist zu erwarten, daß eine Störung desselben durch pathophysiologische Vorgänge weitreichende Folgen für die adequate Versorgung aktivierter Hirnareale haben dürfte.

## ***6. Wissenschaftliche Einordnung***

Zu Beginn meiner Untersuchungen über Mechanismen und Mediatoren der neurovaskulären Kopplung standen zwei klar formulierte, durch Befunde aus der Literatur gestützte Hypothesen:

- a. Zu Beginn erhöhter neuronaler Aktivität kommt es aufgrund von gesteigertem oxidativem Metabolismus der beteiligten Neuronen- und Astrozytenpopulation zu einem kurzzeitigen Abfall der Sauerstoffspannung im Gewebe. Im Weiteren könnte dieser durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zu dem bereits bekannten Anstieg des regionalen zerebralen Blutflusses führen.

- b. Infolge der glutamatergen Informationsübertragung während somatosensorischer Stimulation erfolgt durch den postsynaptisch auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$  -Einstrom in die Zelle eine Aktivierung der dort lokalisierten NO Synthase. Das freigesetzte NO diffundiert frei durch die Zellmembran zum nächstliegenden Gefäß und führt direkt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase in der glatten Gefäßmuskelzelle zur Vasodilatation.

Im Verlauf der zur Klärung durchgeführten Experimente haben sich beide Hypothesen in ihrer formulierten Form als nicht richtig herausgestellt: Es läßt sich - zumindest mit den uns zur Verfügung stehenden Techniken - keine frühe Deoxygenierung während funktioneller Stimulation detektieren. Es erscheint daher unwahrscheinlich, daß diese der eigentliche Initiator der Blutflußantwort ist. Auch das NO spielt nicht, wie postuliert, eine Mediatorfunktion, wirkt aber als wichtiger Modulator und führt zu einer erhöhten Bereitschaft zerebraler Gefäße, auf andere, nach wie vor nicht bekannte Mediatoren der physiologischen neurovaskulären Kopplung zu reagieren.

Aufgrund unserer Befunde sind eine ganze Reihe von neuen Fragestellungen aufgeworfen, von denen hier exemplarisch nur einige herausgeriffen werden sollen:

- zu a. Welcher Art – aerob oder nicht-aerob - ist der frühe Metabolismus der durch die Stimulation aktivierten Neuronen bzw. Astrozyten ?
- zu b. Was ist die Bedeutung des basalen NO / cGMP Spiegels im Gewebe ? Gibt es pathophysiologische Vorgänge, die zu einer Störung dieses basalen Spiegels führen, und welche Konsequenzen ergeben sich daraus für die zerebrovaskuläre Reaktivität ?

Die Klärung dieser Fragen wird im Zentrum meiner zukünftigen wissenschaftlichen Arbeit stehen.

Im Verlauf meiner Untersuchungen und deren wissenschaftlichen Einordnung hat sich sehr eindrücklich gezeigt, daß ein Widerlegen von Hypothesen in der Wissenschaft aufgrund von unerwarteten Befunden oftmals neue, vielleicht sogar spannendere Sichtweisen eröffnet, und der Wissenschaftler nicht zwangsläufig in einer Sackgasse endet sondern nach sinnvoller Einordnung der Befunde den Blick auf weiterführende Fragestellungen richten kann.

## 7. Literatur

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

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850-853

Cholet N, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G (1997) Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1191-1201

Cohen Z, Ehret M, Maitre M, Hamel E (1995) Ultrastructural analysis of tryptophan hydroxylase immunoreactive nerve terminals in the rat cerebral cortex and hippocampus: their associations with local blood vessels. *Neuroscience* 66:555-569

Cohen Z, Molinatti G, Hamel E (1997) Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:894-904

Conrad B, Klingelhöfer J (1989) Dynamics of regional cerebral blood flow for various visual stimuli. *Exp Brain Res* 77:437-441

Denninger JW, Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411:334-350

Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W (1989) Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:589-596

Dreier JP, Körner K, Görner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, Dirnagl U (1995) Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:914-919

Elhousseiny A, Hamel E (2000) Muscarinic--but not nicotinic--acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:298-305

Ernst T, Hennig J (1994) Observation of a fast response in functional MR. *Magn Reson Med* 31:89-90

Fransson P, Kruger G, Merboldt KD, Frahm J (1998) Temporal characteristics of oxygenation-sensitive MRI responses to visual activation in humans. *Magn Reson Med* 39:912-919

Goldman H, Sapirstein LA (1973) Brain blood flow in the conscious and anesthetized rat. *Am J Physiol* 224:122-126

Griffith OW, Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-36:707-736

Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF (1989) Laser Doppler assessment of the brain microcirculation. *Am J Physiol* 256:H1247-H1254

- Heekeren HR, Obrig H, Wenzel R, Eberle K, Ruben J, Villringer K, Kurth R, Villringer A (1997) Cerebral haemoglobin oxygenation during sustained visual stimulation--a near-infrared spectroscopy study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:743-750
- Hu X, Le TH, Ugurbil K (1997) Evaluation of the early response in fMRI in individual subjects using short stimulus duration. *Magn Reson Med* 37:877-884
- Iadecola C (1998) Cerebral circulatory dysregulation in ischemia. In: *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis, and management*. (Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds) , Massachusetts: Blackwell Science, pp 319-332
- Iadecola C, Ebner T (1993) Focal elevations in local blood flow elicited by microstimulation of the parallel fibre system of the cerebellar cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:S122
- Iadecola C, Li J, Ebner TJ, Xu X (1995) Nitric oxide contributes to functional hyperemia in cerebellar cortex. *Am J Physiol* 268:R1153-R1162
- Iadecola C, Reis DJ (1990a) Continuous monitoring of cerebrocortical blood flow during stimulation of the cerebellar fastigial nucleus: a study by laser-Doppler flowmetry. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:608-617
- Iadecola C, Springston ME, Reis DJ (1990b) Dissociation by chloralose of the cardiovascular and cerebrovascular responses evoked from the cerebellar fastigial nucleus. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:375-382
- Iadecola C, Zhang F (1996) Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol* 271:R990-1001
- Iadecola C, Zhang F, Xu X (1994) SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. *Am J Physiol* 267:R228-R235
- Kim DS, Duong TQ, Kim SG (2000) High-resolution mapping of iso-orientation columns by fMRI. *Nature* 3:164-169
- Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298:249-258
- Krimer LS, Muly EC, Williams GV, Goldman-Rakic PS (1998) Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nat Neurosci* 1:286-289
- Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, Goldberg IE, Weisskoff RM, Poncelet BP, Kennedy DN, Hoppel BE, Cohen MS, Turner R (1992) Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5675-5679
- 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, Dirnagl U (2000) Synaptic activity and regional blood flow: physiology and metabolism. In: *Pain imaging* (Casey KL, Bushnell MC, eds) , Seattle: IASP Press, pp 31-45.
- Logothetis NK, Guggenberger H, Peled S, Pauls J (1999) Functional imaging of the monkey brain. *Nat Neurosci* 2:555-562

Lou HC, Edvinsson L, MacKenzie ET (1987) The concept of coupling blood flow to brain function: revision required? *Ann Neurol* 22:289-297

Maekawa T, Ishikawa T, Nakakimura K, Sakabe T, Takeshita H (1989) Effects of volatile anesthetics on local cerebral blood flow and glucose utilization in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:S289

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

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, 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

McPherson RW, Kirsch JR, Moore LE, Traystman RJ (1993) N omega-nitro-L-arginine methyl ester prevents cerebral hyperemia by inhaled anesthetics in dogs. *Anesth Analg* 77:891-897

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

Morita H, Nemoto EM, Bleyaert AL, Stezoski SW (1977) Brain blood flow autoregulation and metabolism during halothane anesthesia in monkeys. *Am J Physiol* 233:H670-H676

Nakai M, Iadecola C, Ruggiero DA, Tucker LW, Reis DJ (1983) Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus increases cerebral cortical blood flow without change in local metabolism: evidence for an intrinsic system in brain for primary vasodilation. *Brain Res* 260:35-49

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

Ngai AC, Ko KR, Morii S, Winn HR (1988) Effect of sciatic nerve stimulation on pial arterioles in rats. *Am J Physiol* 254:H133-H139

Obrig H, Heekeren H, Ruben J, Wenzel R, Ndayisaba J-P, Dirnagl U, Villringer A (1996) Continuous spectrum near-infrared spectroscopy approach in functional activation studies in the human adult. *SPIE* 2926:58-66

Roy C, Sherrington C (1890) On the regulation of the blood supply of the brain. *J Physiol* 11:85-108

Sandor P (1999) Nervous control of the cerebrovascular system: doubts and facts. *Neurochem Int* 35:237-259

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

Tsubokawa T, Katayama Y, Kondo T, Ueno Y, Hayashi N, Moriyasu N (1980) Changes in local cerebral blood flow and neuronal activity during sensory stimulation in normal and sympathectomized cats. *Brain Res* 190:51-65

Vanzetta I, Grinvald A (1999) Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286:1555-1558

Welker C (1971) Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of SMI cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26:259-275

Woolsey TA, Rovainen CM (1991) Whisker barrels: a model for direct observation of changes in the cerebral microcirculation with neuronal activity. In: *Brain work and mental activity* (Lassen NA, Ingvar DH, Raichle ME, Friberg L, eds), Copenhagen: Munksgaard, pp 189-198

Woolsey TA, van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S1) of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 17:205-242

Yang G, Iadecola C (1997) Obligatory role of NO in glutamate-dependent hyperemia evoked from cerebellar parallel fibers. *Am J Physiol* 272:R1155-R1161



## 8. Abkürzungen

cGMP	cyclic Guanosin-3',5'-Monophosphat
DP( $\lambda$ ), DPF	wellenlängenabhängiger, differentieller Pfadlängenfaktor
fMRI	funktional magnetic resonance imaging, funktionelle Kernspintomographie
LDF	laser-Doppler flowmetry, Laser-Doppler-Blutflußmessung
MCA	middle cerebral artery, mittlere Zerebralarterie
NIRS	Nahinfrarot-Spektroskopie
NO	nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxide synthase, Stickstoffmonoxid-Synthase
OIS	optical imaging spectroscopy, bildgebende optische Spektroskopie
PET	Positronen-Emissionstomographie
O <sub>2</sub> abh. PQ	oxygen dependent phosphorescence quenching, Sauerstoffspannungsabhängige Phosphoreszenz-Abschwächung



## ***9. Danksagung***

Nur durch die Mithilfe anderer konnten die Ergebnisse dieser Arbeit entstehen.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Ulrich Dirnagl, in dessen Abteilung ich seit 1992 arbeite (1992 - 1993 Neurologische Klinik des Klinikums Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München; 1994 - 2001 Abteilung für Experimentelle Neurologie an der Neurologischen Klinik der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin). Herr Prof. Dirnagl war erheblich an der Konzeption und Durchführung der Arbeit beteiligt. Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dirnagl für die Vermittlung von Freude an Wissenschaft und experimentellem Arbeiten in der Neurologie, für die zahlreichen Stunden fruchtbarer Diskussion, für das freundschaftliche Klima in der Abteilung und für die Möglichkeit der eigenständigen Forschungsarbeit danken.

Prof. Dr. Karl-Max Einhäupl, Direktor der Neurologischen Klinik der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, für die großzügige Unterstützung. Nur dadurch war ein schneller und produktiver Start in Berlin möglich.

Prof. Dr. Arno Villringer, Dr. Mathias Kohl-Bareis, Lorenz Gold, Dr. Jens Dreier, Dr. Jörn Gethmann, Dr. Dirk Megow und Prof. Dr. Jörg Weber, Neurologische Klinik der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, für die gute Zusammenarbeit und anregende Diskussion.

Dr. Tilo Wolf, Dr. Jörg Schultze, Dr. Oliver Peters, Georg Roysl, Marc Kühl, Christoph Leithner, Alexander Kunz und Johannes Vrabie, die im Rahmen ihrer Doktorarbeit an dem Projekt mitgearbeitet haben.

Prof. Dr. Amiram Grinvald, Dr. Dov Malonek und Dr. Ivo Vanzetta, Weizmann Institut, Rehovot, Israel, sowie Prof. Dr. Robert Bryan, Baylor College of Medicine, Houston, Texas für die fruchtbare Kooperation und die herzliche Aufnahme im Rahmen meiner Forschungsaufenthalte.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, von der German and Israel Science Foundation (GIF), von der Humboldt-Universität zu Berlin (HSP III) und von der Hermann und Lilly Schilling Stiftung dankenswerterweise unterstützt.

## II Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

- 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. A 1-6
- Lindauer U**, Roysl 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. B 1-14
- Kohl M, **Lindauer U**, Roysl G, Kühl M, Gold L, Villringer A, Dirnagl U (2000) Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals. *Phys Med Biol* 45: 3749-3764. C 1-16
- 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 USA* 94:14826-14831. D 1-6
- Wolf T, **Lindauer U**, Villringer A, Dirnagl U (1997) Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res* 761:290-299. E 1-10
- Dirnagl U, **Lindauer U**, Villringer A (1993) Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett* 149: 43-46. F 1-4
- 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. G 1-13
- Lindauer U**, Dreier J, Angstwurm K, Rubin I, Villringer A, Einhüpl K-M, Dirnagl U (1996) Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1143-1152. H 1-10
- Niwa K, **Lindauer U**, Villringer A, Dirnagl U (1993) Blockade of nitric oxide synthesis in rats strongly attenuates the CBF response to extracellular acidosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 535-539. I 1-5
- Lindauer U**, Megow D, Schultze J, Weber JR, Dirnagl U (1996) Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 216: 207-210. K 1-4
- Dirnagl U, **Lindauer U**, Villringer A (1993) Nitric oxide synthase blockade enhances vasomotion in the cerebral microcirculation of anesthetized rats. *Microvasc Res* 45: 318-323. L 1-6

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- gegen mich keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind
- ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe
- ich die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen habe, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

09. 02. 2001

.....  
Datum

gez. Ute Lindauer

.....  
Unterschrift