

Aus dem Institut für Physiologie, Abt. Neurophysiologie,
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION



**Elektrophysiologische Untersuchungen zu Einflüssen von
ionotropen Glutamatantagonisten sowie 5-HT_{1A}-Agonisten auf die
Kaliumchlorid-induzierte „spreading depression“ im
neokortikalen Hirnschnittpräparat der adulten Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Hagen Krüger
aus Magdeburg

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

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. U. Heinemann, Berlin
2. Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Luhmann, Düsseldorf
3. Prof. Dr. med. U. Eysel, Bochum

Datum der Promotion: 17. April 2000

Erklärung an Eides Statt:

Ich erkläre an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt, die benutzte Literatur sowie Hilfsmittel vollständig erwähnt habe und die Dissertation noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist. Diese Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Sofern fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, ist dies als Quelle und im Literaturverzeichnis angegeben.

Berlin, den 1.7.1999

Hagen Krüger

Erklärung:

Die dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heiko J. Luhmann und Herrn Prof. Dr. med. Uwe Heinemann von mir selbst durchgeführt und ausgewertet worden bis auf das Experiment für Abb. 9 und 10, welches gemeinsam mit Frau Dipl.-Biol. Kristin Raabe durchgeführt wurde.

Teile der Arbeit sind bereits publiziert oder in Manuskriptform in Bearbeitung. Die Abbildungsbeschriftungen erfolgten deshalb in englischer Sprache.

Danksagung:

Diese Arbeit entstand zwischen dem Oktober 1994 und dem Januar 1997 am Institut für Physiologie, Abteilung Neurophysiologie, der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.

Für die Überlassung des Themas und die Übernahme der Arbeit, die hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, Förderung in verschiedener Form sowie sehr guten Arbeitsbedingungen im Labor möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Uwe Heinemann sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heiko J. Luhmann, ohne dessen exzellente, freundschaftliche Betreuung und effiziente Einführung in wissenschaftliche Arbeitsweisen diese Arbeit nicht entstanden wäre. Die begeisternde, verantwortungsvolle Zusammenarbeit war für das Gelingen von sehr großer Bedeutung.

Darüber hinaus hat es mir viel Freude bereitet, am Institut für Physiologie zu arbeiten und ich möchte allen Mitarbeitern für ihre fachkundige Hilfe und die wertvollen Diskussionen danken.

Meinen Eltern gebührt für ihre Geduld und fortwährende Unterstützung Dank.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen (SFB 194) und der Studentischen Forschungsförderung der Charité unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	VI
LISTE DER ABKÜRZUNGEN.....	VIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 PATHOGENESE UND MECHANISMEN DER ISCHÄMISCHEN ZELLSCHÄDIGUNG.....	2
1.1.1 Exzitotoxizität.....	3
1.1.2 Spreading depression (SD) und Periinfarktdepolarisationen.....	5
1.1.3 Stickstoffmonoxid (NO) und freie Radikale.....	6
1.1.4 Mitochondriale Dysfunktion.....	7
1.1.5 Entzündung und immunologische Faktoren.....	8
1.1.6 Thrombozyten und Serotonin.....	9
1.1.7 Genetische Veränderungen.....	10
1.1.8 Wachstumsfaktoren.....	11
1.1.9 Apoptose.....	11
1.2 SPREADING DEPRESSION (SD).....	12
1.3 REZEPTOREN UND FUNKTION DER SYNAPTISCHEN TRANSMISSION IM NEOKORTEX.....	17
1.4 FRAGESTELLUNG.....	22
2. MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 AUFBAU DES NEOKORTEX.....	24
2.2 NEOKORTIKALE HIRNSCHNITTPRÄPARATION.....	26
2.3 INTERFACE-MEßKAMMER.....	28
2.4 VERWENDETE TESTSUBSTANZEN.....	29
2.5. ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ABLEITTECHNIK.....	31
2.5.1 Synaptisch-evozierte Feldpotentiale.....	33
2.5.2 Induktion der Spreading depression (SD).....	34
2.6 UNTERSUCHUNGSPARAMETER UND STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	34
3. ERGEBNISSE.....	37
3.1 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN DER REPETITIVEN SPREADING DEPRESSION IN VITRO.....	37
3.1.1 Ausbreitungsmuster der spreading depression <i>in vitro</i>	37
3.1.2 Funktionelle Eigenschaften der repetitiven spreading depression.....	39
3.2 EINFLUß DER REPETITIVEN SD AUF DIE SYNAPTISCHE TRANSMISSION.....	43
3.3 PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON GLUTAMATREZEPTOREN.....	46
3.3.1 Pharmakologische Blockade des AMPA-Glutamatrezeptors mit NBQX.....	46

3.3.2 Nicht-kompetitive Blockade des NMDA-Glutamatrezeptors durch Ketamin	49
3.3.3 Gleichzeitige Blockade der NMDA- und AMPA-Glutamatrezeptoren	52
3.4 PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES 5-HT _{1A} -SEROTONINREZEPTORS	55
3.4.1 Effekte von 8-OH-DPAT	55
3.4.2 Effekte von BAY x 3702.....	61
4. DISKUSSION.....	67
4.1 SPREADING DEPRESSION IN VITRO UND IN VIVO	67
4.2 EINFLUß DER REPETITIVEN SD AUF DIE SYNAPTISCHE TRANSMISSION	71
4.3 ROLLE DES AMPA-GLUTAMATREZEPTORS.....	74
4.4 ZUR FUNKTION DES NMDA-GLUTAMATREZEPTORS	75
4.5 ROLLE DES 5-HT _{1A} -SEROTONINREZEPTORS	77
4.6 ZUM AUSBREITUNGSMECHANISMUS DER SPREADING DEPRESSION	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	82
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	84
7. VERÖFFENTLICHUNGSNACHWEIS	96
Publikationen	96
Symposiumsbeiträge	96
8. CURRICULUM VITAE.....	97
9. ABSTRACT.....	98

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

$[Ca^{2+}]_e$	Extrazelluläre Kalziumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
$[K^+]_e$	Extrazelluläre Kaliumkonzentration
μM	Mikromolar
8-OH-DPAT	(\pm)-8-Hydroxy-2-(di-n-propylaminotetralin)hydrobromid
AC	Alternate current [engl.: Wechselfeldspannung]
aCSF	Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
AD	Anoxische Depolarisation
AMPA	(\pm)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAY x 3702	(-)-(R)-2-[4-[(Chroman-2-ylmethyl)amino]butyl]-1,1-dioxo-1,2-benzisothiazol-3(2H)-onmonohydrochlorid
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CSD	Cortical spreading depression
DC	Direct current [engl.: Gleichspannung]
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FP	Feldpotential
GABA	γ -Aminobuttersäure
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
MCA	A. cerebri media [engl.: middle cerebral artery]
min	Minute
MK-801	5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclo-hepten-5,10-iminmaleat; Dizocilpin
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
NBQX	6-Nitro-7-sulphamoylbenz(f)quinoxalin-2,3-dion
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
rCBF	Regionaler zerebraler Blutfluß
s	Sekunde
SD	Spreading depression
V	Volt
ZNS	Zentralnervensystem

1. EINLEITUNG

Die Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen zerebralen Perfusion ist eine Vitalfunktion und ihre Beeinträchtigung durch eine Ischämie oder Blutung führt zum klinischen Syndrom des akuten Schlaganfalls (Apoplexia cerebri, stroke [engl.], apoplektischer Insult).

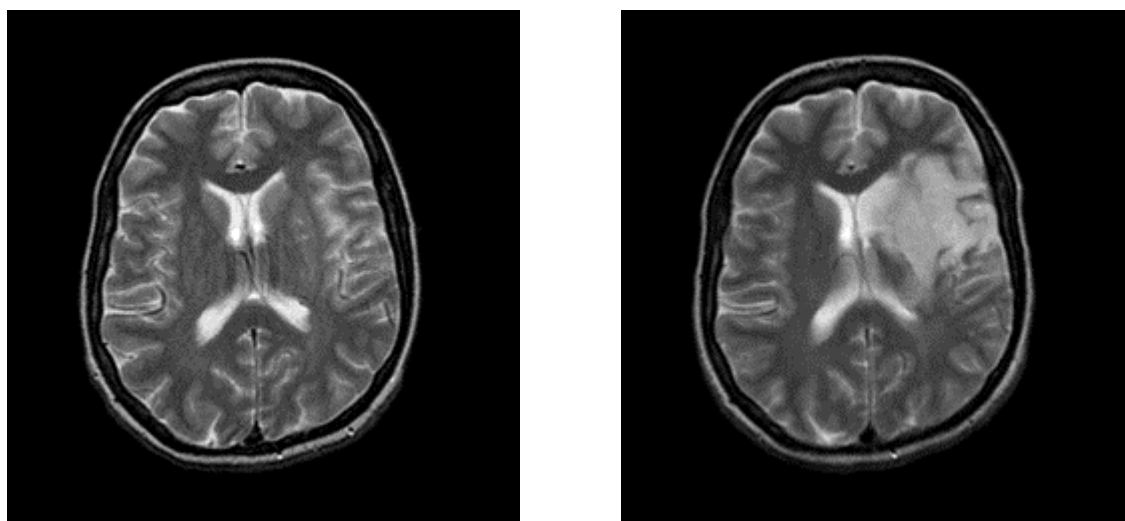


Abb. 1. Links: T2-gewichtete Magnetresonanztomographie (MRT)-aufnahme einer 45jährigen Frau 8 Stunden nach Einsetzen eines fokalen neurologischen Defizits (rechtsseitige Hemiparese, Dysarthrie). Das von der A. cerebri media versorgte Gebiet der linken Hemisphäre zeigt zu diesem Zeitpunkt mit der verwendeten Aufnahmetechnik nur geringe Signalveränderungen. Rechts: Präsentation des akuten Gefäßverschlusses im Versorgungsgebiet der A. cerebri media 4 Tage nach Beginn der neurologischen Symptomatik mit deutlichen T2-Signalveränderungen in der linken Hemisphäre (aus: www.med.harvard.edu, 1998).

Der klinische Begriff umschreibt den meist abrupten Beginn („vom Schlag getroffen“) eines charakteristischen neurologischen Defizits, welches die gestörte Funktion des betroffenen Hirnareals widerspiegelt. Der zerebrale Insult ist nach der koronaren Herzkrankheit und den malignen Tumoren die dritthäufigste Todesursache der über 60jährigen in den Industriestaaten. Ursache der akuten Hirndurchblutungsstörung beim Schlaganfall ist in 85 % ein arterieller embolischer oder thrombotischer Gefäßverschuß, in den verbleibenden 15 % eine spontane Gefäßruptur mit nachfolgender intrazerebraler oder subarachnoidaler Blutung (Fieschi et al. 1989). Die Inzidenz dieser Erkrankung ist stark altersabhängig und beträgt durchschnittlich 42,4-88/100000 Einwohner/Jahr und steigt in Deutschland von 10,1/100000 in der Altersgruppe der 30-39jährigen auf 159,2/100000 Einwohner/Jahr bei den über 60jährigen (Berger et al. 1998). Die allgemeine Prävalenz wird in den westlichen Ländern mit 500-600/100000 Einwohner angegeben und weist eine seit Jahren sinkende Mortalität auf. Unabhängige Risikofaktoren, die die Wahrscheinlich-

keit, am Schlaganfall zu erkranken, deutlich erhöhen, sind (1) systolischer Blutdruck über 140 mm Hg, (2) Zigarettenrauchen, (3) Diabetes mellitus sowie als nicht beeinflussbare Faktoren (4) positive Familienanamnese und (5) männliches Geschlecht. Die auch gegenwärtig limitierten therapeutischen Optionen zur Minimierung der Schlaganfallfolgen unterstreichen die Bedeutung einer Schlaganfallprävention durch eine Modifikation beeinflussbarer Risikofaktoren. Während etwa 10 % der Patienten bereits in der Akutphase versterben, behalten über 50 % der Patienten lebenslang neurologische Defizite im Sinne mentaler und physischer Beeinträchtigungen. Dies kann dauerhafte Hilfe im tagtäglichen Leben, Pflege, Invalidisierung oder Frühverrentung erfordern. Vor diesem individuellen aber auch sozioökonomischen Hintergrund stellen die umfangreichen Forschungsarbeiten zum akuten Schlaganfall eine Möglichkeit dar, neue Strategien zur immer besseren Therapie der Akutphase und damit auch zur verbesserten Langzeitprognose dieser Erkrankung zu entwickeln. Ende 1995 wurde die Therapie der akuten, fokalen zerebralen Ischämie beim Menschen, die lange Zeit ausschließlich auf supportive Maßnahmen beschränkt war, durch die Einführung des Fibrinolytikums Alteplase (humaner rekombinanter Plasminogen-Aktivator, t-PA, Actilyse®) zur Lysetherapie beim ischämischen Hirninfarkt für einen Teil der Schlaganfallpatienten bereichert (The NINDS t-PA Stroke Trial). Nach Verabreichung dieses Medikaments innerhalb von 3 Stunden nach Einsetzen der neurologischen Symptomatik steigt mit dieser nicht ungefährlichen Therapie der Patientenanteil, der durch einen akuten ischämischen Schlaganfall nach 3 Monaten kein neurologisches Defizit aufweist, von 38 % um absolut 12 % auf 50 % (Marler, 1995). Da jedoch nur etwa 50 % der akuten Schlaganfallpatienten ein Krankenhaus innerhalb von 3 Stunden erreicht (Smith et al. 1998) und eine spätere thrombolytische Therapie (3-6 h) mit Alteplase den klinischen Verlauf nicht mehr signifikant verbessert, sind neue oder ergänzende neuroprotektive Strategien wünschenswert, die das therapeutische Fenster erweitern und das endgültige Ausmaß der Hirninfarzierung weiter verringern.

1.1 Pathogenese und Mechanismen der ischämischen Zellschädigung

Eine immer genauere Erforschung der zellulären Mechanismen bei akuter fokaler Ischämie ist von Bedeutung, da nur so eine rationale Methode bei der Suche nach neuen, potentiell neuroprotektiven Strategien möglich ist.

Grundlage gegenwärtiger Vorstellungen zur Pathophysiologie der zerebralen Ischämie ist das Konzept der ischämischen Penumbra (Astrup et al. 1981). Inzwischen ist allgemein akzeptiert, daß in der Peripherie einer ischämischen Zentralzone (engl. ischemic core) mit irreversibel geschädigten Zellen, abhängig von Kollateralgefäßen und lokalem Perfusionsdruck, eine weitere Zone mit gestörter Perfusion, die Penumbra, existiert. Positronenemissionstomographie (PET)-Studien ergaben, daß die Penumbra hämodynamisch durch einen reduzierten Blutfluß bei erhöhter Sauerstoffextraktionsfraktion gekennzeichnet ist, da das Gewebe bestrebt ist, die Sauer-

stoffstoffwechselrate aufrecht zu erhalten (Obrenovitch, 1995). Im Gegensatz zur Zentralzone, deren Zusammenbruch des oxidativen Stoffwechsels sich in einer verringerten Perfusion und verminderten Sauerstoffstoffwechselrate widerspiegelt, sind die Neurone und Gliazellen der Penumbra zwar elektrisch „stumm“, aber prinzipiell in der Lage, die Ischämie zu überleben, da der zelluläre Energiestoffwechsel und die transmembranalen Ionengradienten basal (noch) intakt sind.

Klinisch wird ein ischämischer Schlaganfall durch die neurologischen Folgen der embolischen oder thrombotischen Gefäßokklusion im Versorgungsgebiet der häufig betroffenen A. cerebri media manifest. Das Ausmaß der Blutflußreduktion, Grad der Kollateralisierung und die Dauer des Gefäßverschlusses bestimmen die Größe der ischämischen Region. Dabei können der Hauptstamm, zentrale Äste (Aa. centrales, lenticulo-striate arteries) oder oberflächliche kortikale Endäste betroffen sein. In jedem dieser Fälle sind es jedoch insbesondere neokortikale Strukturen, die infolge spärlicher pialer Kollateralen von einer kritischen Reduktion des zerebralen Blutflusses („misery perfusion“) betroffen sind (Hatashita et al. 1990). Bei einem Drittel der Patienten tritt eine Eigen-Rekanalisation des okkludierten Gefäßes eines Mediainfarktes innerhalb von 6 Stunden nach Einsetzen der klinischen Symptomatik ein (Fieschi et al. 1989). Minderperfundiertes Gewebe bei erhaltener Sauerstoffstoffwechselrate - die Penumbra - existiert bei der Hälfte der Patienten bis zu 17 Stunden. Es kann vom endgültigen Infarkt volumen einen Anteil von 6 - 50 % ausmachen und bietet deshalb eine Möglichkeit therapeutischer Interventionen (Marchal et al. 1996; Heiss et al. 1999). Das Volumen von nicht-infarziertem, ehemaligem Penumbrawebe korreliert direkt mit der möglichen Verbesserung der neurologischen Symptomatik und steht deshalb im Zentrum therapeutischer Bemühungen (Furlan et al. 1996). Ohne Behandlung wird das variable Volumen der Penumbra im Verlaufe der Zeit jedoch kleiner - das Gebiet der Infarzierung breitet sich aus.

Was sind die Faktoren des ischämischen Zelltodes? Anhand von Tierexperimenten ist deutlich geworden, daß die transiente fokale zerebrale Ischämie eine kurzzeitige und langfristige Modulation zahlreicher Zellfunktionen auslöst, die zu ischämisch-hypoxisch induzierten zellulären Dysfunktionen und zum akuten oder verzögerten Zelltod führen können. Die Zellveränderungen beginnen innerhalb weniger Minuten und halten bis zu 10 Tagen beim Menschen an (Saunders et al. 1995). Verschiedene Mechanismen scheinen daran beteiligt: Exzitotoxizität, Periinfarktdepolarisationen, freie Radikale und Stickstoffmonoxid, mitochondriale Dysfunktion, immunologische Faktoren, Serotonin, spezieller Bedarf an neurotrophen Wachstumsfaktoren, apoptotischer Zelltod - die Schädigungskaskade des ischämischen Zelltodes ist multifaktoriell. Um die Querverbindungen und teilweise positiven Feed-back Schleifen dieser Mechanismen untereinander aufzuzeigen, soll auf die Konsequenzen dieser Faktoren eingegangen werden.

1.1.1 Exzitotoxizität

Nach einem Gefäßverschluß führen Sauerstoff- und Glukosemangel in der ischämischen Zentralzone zu einem intrazellulären Energiemangel, der den Erhalt des zellulären Membranpotentials

beeinträchtigt. Besonders rasch ist die Na^+/K^+ -ATPase betroffen, die einen Großteil des durch oxidative Phosphorylierung bereitgestellten ATPs für den energieabhängigen Na^+/K^+ -Antiport (Erecinska, Silver, 1994) benötigt. Weitere gestörte, energieabhängige Transportprozesse sind der im Austausch für K^+ -Ionen erfolgende $\text{Na}^+/\text{Glutamat}$ transport neuronaler und glialer Zellen, der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Madl, Burgesser, 1993; Bickler, Hansen, 1994). Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen an präsynaptischen exzitatorischen Terminalen über spannungsabhängige Kalziumkanäle vom Q-, P- und N-Typ, die durch eine Membrandepolarisation infolge der erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_e$) im ischämischen Gebiet aktiviert werden können, führt zur Glutamatexozytose und verstärkten exzitatorischen synaptischen Transmission (Cousin et al. 1997). Die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration selbst resultiert aus den gestörten energieabhängigen ionalen Transportprozessen (Ekholm et al. 1992). Die Aktivierung Glutamatrezeptor-assoziiierter (NMDA-, AMPA-, Kainatrezeptor) als auch spannungsabhängiger Ionenkanäle an postsynaptischen Membranen bewirkt einen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen, dem passiv Wasser, Cl^- -Ionen und eine ischämische Zellschwellung folgt (Choi, 1992). Diese Zelldehnung bewirkt zusätzliche Membranlecks für den Eintritt von Ca^{2+} -Ionen und eine Aktivierung dehnungsempfindlicher, mechanosensitiver Kationenkanäle (Sackin, 1995). Eine pathologische intrazelluläre Kalziumüberladung und mangelnde Sequestrierung von Ca^{2+} -Ionen im endoplasmatischen Retikulum aktiviert in Neuronen und Astrozyten die zytosolische Protease Calpain (kalziumaktivierte neutrale Protease), die durch Spektrinproteolyse zur Zytoskelettdegradation und Störung axonaler Transportprozesse beiträgt (Siman, Noszek, 1988; Waxman et al. 1991). Weiterhin konvertiert Calpain I das Enzym Xantindehydrogenase zur Xantinoxidase, deren Reaktion von Hypoxanthin und Xantin zur Harnsäure eine weitere Quelle freier Radikale (ROS) wie Hyperoxid-Anion (O_2^-) ist. Die aktivierten Phospholipasen (PLA_2 , PLC) und Endonukleasen führen einerseits zur Destruktion von Membranen und zur Arachidonsäureproduktion, andererseits zur DNA Fragmentation. Die induzierbare Stickstoffmonoxid synthase (iNOS) kann neuroprotektive und/oder neurotoxische Aktivitäten entfalten (Verrecchia et al. 1995). Zink - wie Kalzium ein divalent Kation - kann bei Zelldepolarisationen oder aktivierten Glutamatrezeptoren vermehrt in die Zelle durch spannungsabhängige Kalziumkanäle, aktivierte NMDA- und AMPA-/Kainat-Rezeptoren oder Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers gelangen und toxische intrazelluläre Konzentrationen erreichen (Sensi et al. 1997). Die Summe der ausgelösten Sekundärprozesse führt zu irreversiblen Zellschäden, so daß alle Strukturen der ischämischen Zentralregion (Neurone, Glia, Endothelzellen der Blutgefäße) in einem nekrotischen Zelltod untergehen. Dieser Zelltod ist morphologisch von ischämischer Zytoplasmenschwellung, Zytoplasmavakuolisierung, Dilatation des endoplasmatischen Retikulums (ER), der Mitochondrien und Ablösung einzelner Ribosomen vom rauhen ER gekennzeichnet. Am Ende des nekrotischen Prozesses ist die Plasmamembran (Plasmolyse) und die Membran des Zellkerns (Karyolyse) zerstört (Van Lookeren Campagne, Gill, 1996).

1.1.2 Spreading depression (SD) und Periinfarktdepolarisationen

Am Rand der ischämischen Zentralzone - der *Penumbra* - treten unter experimentellen Bedingungen nach Verschluss der A. cerebri media oder photothrombotischer Infarzierung im Rattencortex wellenförmige Erhöhungen des extrazellulären Kaliums (Branston et al. 1977) sowie repetitive, temporäre starke Depolarisationen auf (Nedergaard, Astrup, 1986; Back et al. 1994), die sich in kortikale Regionen ausbreiten, die nicht direkt von der akuten Infarzierung betroffen sind (Dietrich et al. 1994) und in vielen Merkmalen Leao's „spreading depression“ (SD)-Depolarisationen (Leao, 1944) ähneln. Die massiven SD-Depolarisationen werden in zunehmenden Maße als ein entscheidender Faktor angesehen, der zum neuronalen Zelltod in der Penumbra und zum Ausbreiten der Hirninfarzierung nach fokaler zerebraler Ischämie beiträgt (Nedergaard, 1996).

Die Ausbreitung einer SD-Welle ist von (1) einer starken Depolarisation des Membranpotentials neuronaler und glialer Zellen, (2) einer Negativierung des extrazellulären DC-Potentials zwischen ca. -10 und -40 mV, (3) einer gravierenden Störung der Ionenhomöostase sowie von Veränderungen auf (4) metabolischer und (5) genetischer Ebene begleitet. Die Anzahl, Amplitude und Dauer von SD-Wellen korreliert dabei mit dem endgültigen Infarktvolume (Mies et al. 1993; Back et al. 1996). Die eingetretene Umverteilung extra- und intrazellulärer Ionen erhöht den Energiebedarf ATP-abhängiger Ionenpumpen und stimuliert die Glukoseverwertung (Shinohara et al. 1979). Der Anstieg des Glukosemetabolismus ist unter Zellkulturbedingungen in Neuronen und Astrozyten nachweisbar und mit Ouabain (g-Strophanthin), einem Herzglykosid mit hochaffiner Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase, zumindest in Astrozyten blockierbar (Sokoloff et al. 1996). Unter adäquater Blutversorgung erhöhen SD-Wellen den Glukosebedarf im Kortex um 77 % (Kocher, 1990) sowie den Sauerstoffverbrauch um 45 % (Mayevsky, Weiss, 1991), dem mit reaktiver Hyperperfusion entsprochen wird, um das Glukoseangebot und die Sauerstoffträger (das oxygenierte Hämoglobin der Erythrozyten) zu erhöhen. Dennoch reicht die metabolische Aktivierung auch unter normoxischen und physiologischen hämodynamischen Bedingungen nicht aus: es kommt während der SD zu einem Anstieg des Laktatgehalts um 66% und einer Abnahme des pH-Werts um 0,3 Einheiten (Kocher, 1990) im Sinne einer Gewebsazidose bei anaerober Glykolyse (Csiba et al. 1985) mit geringer Energieausbeute. Weiterhin verbleibt im Verlauf einer SD ein Teil des intramitochondrialen NADH^+ und Cytochroms im reduzierten Zustand, so daß der ATP-Gewinn in der Atmungskette vermindert ist (Haselgrove et al. 1990). Unter ischämischen Bedingungen ist jedoch diese metabolische Entkopplung nach SD-induzierten Ionenverteilungen drastisch verstärkt, da die reaktive Blutflußerhöhung in der Penumbra auf die hämodynamische Kapazität vorhandener Kollateralkreisläufe begrenzt ist: die limitierte Sauerstoff- und Glukosezufuhr führt durch zusätzlich ausgelöste SDs und den dadurch erhöhten Energiebedarf in der Penumbra zu transienten Hypoxien (Back et al. 1994). Die Dauer einer SD ist unter ischämisch-hypoxischen Bedingungen deutlich verlängert, was die beeinträchtigte Funktion der Na^+/K^+ -ATPase, die veränderten Ionengradienten wieder auszugleichen, widerspiegelt. Die

zahlreichen zellulären Veränderungen im Verlauf einer SD werden in einem gesonderten Kapitel detaillierter beschrieben.

Es treten in den neokortikalen Strukturen an mehreren Stellen weitere Periinfarktdepolarisationen auf - die Hypoxie-induzierte plötzliche anoxische Depolarisation, bei der es ähnlich wie bei der SD auch zu einem Natrium- und Kalziumeinstrom in die depolarisierten Zellen kommt (Luhmann, 1996). Dies erhöht den Energiebedarf in der Penumbra weiter und verändert das kritische Verhältnis zwischen Aufrechterhaltung eines basalen zellulären Membranpotentials bzw. ischämischen Zelltods in Richtung einer Zerstörung der zellulären Energiehomöostase und eines irreversiblen Zellschadens weiter, da die depolarisierten Zellen in der Penumbra die für die zelluläre Integrität notwendigen energieabhängigen Transportprozesse zur Repolarisation nicht bewältigen können (Riepe et al. 1995). Besonders Neurone der Schicht II/III sind für hypoxisch-ischämische Schädigungen sensibel (Nedergaard, Diemer, 1987). Ein Natrium- und Kalziumeinstrom erfolgt u.a. auch am NMDA-Glutamatrezeptor, der durch SD-Wellen, einem verminderten spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block unter ischämischen Bedingungen oder durch extrazelluläres Glutamat aktiviert werden kann (Obrenovitch, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß unter *in vivo* Bedingungen der globalen Ischämie als auch der MCA-Okklusion Glutamatantagonisten am N-Methyl-D-aspartat- (NMDA-) Rezeptor (Iijima et al. 1992) sowie am (\pm) - α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure (AMPA-) Rezeptor (Gill et al. 1992) neuroprotektiv wirken und das Infarkt volumen verringern. Die Ergebnisse und auch der Effekt einer kombinierten NMDA- und AMPA-Rezeptor Blockade waren z.T. jedoch auch widersprüchlich, da verschiedene Autoren der NMDA- oder AMPA-Rezeptorblockade eine größere neuroprotektive Wirkung bei der zerebralen Ischämie zuschreiben (Sheardown et al. 1993; Buchan et al. 1993; Swan, Meldrum, 1990). Im zeitlichen Verlauf gesehen, ist exzitotoxisches Glutamat in der Penumbra jedoch nur gering erhöht und im MCA-Okklusionsmodell der transienten fokalen zerebralen Ischämie auf die Zeit der Ischämie begrenzt - dennoch setzen sich die Gewebeschäden auch nach Reperfusion fort (Obrenovitch et al. 1993; Margail et al. 1996).

1.1.3 Stickstoffmonoxid (NO) und freie Radikale

Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen kommt es in Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und vaskulären Endothelzellen infolge der aus verschiedenen Quellen erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer gesteigerten Produktion von $NO\cdot$ über die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) als auch zur Bildung reaktiver Sauerstoffderivate (ROS) wie O_2^- , $ONOO^-$, $OH\cdot$ und H_2O_2 (Peters et al. 1998). Der Einstrom von extrazellulärem Kalzium u.a. über die geöffneten Ionenkanäle des NMDA-Rezeptors stimuliert dabei sowohl die Kalzium-/Calmodulin-regulierte neuronale NOS (nNOS) als auch die endotheliale Isoform (eNOS) dieses Enzyms, welche daraufhin das Substrat L-Arginin verstärkt zu $NO\cdot$ und L-Citrullin umwandeln (Pieper et al. 1999). Zur erhöhten $NO\cdot$ -Synthese im Ischämiegebiet trägt auch eine neugebildete, induzierbare Isoform der NOS (iNOS) bei, deren Bildung unter diesen pathophysiologischen Bedingungen durch Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interferon- γ (IFN- γ) in vaskulären Endothelzellen sowie in infil-

trierenden polymorphkernigen Granulozyten des Infarktgebiets stimuliert wird (Grandati et al. 1996). $\text{NO}\cdot$ ist sehr reaktionsfreudig, da es aufgrund seines ungepaarten Elektrons Radikalcharakter besitzt und so mit dem Hyperoxid-Anion (O_2^-) zum Peroxynitritanion (ONOO^-) reagieren kann. Peroxynitrit ist durch induzierte DNA Strangbrüche sowohl direkt als auch durch sein Zerfallsprodukt, dem Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) neurotoxisch (Xia et al. 1996). Erhöhtes $\text{NO}\cdot$ kann so als weitere zytotoxische Kaskade unter ischämischen Bedingungen die Energieproduktion der Mitochondrien und Glykolyse stören sowie den intrazellulären Glutathionbestand als typisches antioxidatives („ROS-scavenger“) Molekül verringern (Dawson, Dawson, 1996). Die ambivalente Rolle einer erhöhten NO-Produktion nach transientser fokaler zerebraler Ischämie drückt sich darin aus, daß $\text{NO}\cdot$ als diffundierbares Gas neben seinen neurotoxischen Wirkungen in seinen verschiedenen Oxidationsstufen (NO^+ , NO^-) nach Bindung an die extrazelluläre Redoxbindungsstelle des NMDA-Glutamatrezeptors die Aktivität des unter ischämischen Bedingungen übererregten Rezeptors verringern kann und so neuroprotektiv wirkt (Lipton et al. 1993). Die dennoch überschießende ROS-Produktion nach fokaler zerebraler Ischämie verursacht weitere DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche, Basencrosslink sowie die Oxidation einzelner Nucleotidbasen. Es setzen Mechanismen zur Beseitigung der neu aufgetretenen DNA-Schäden mittels der DNA-Reparaturenzyme Endonuklease, Poly(ADP-ribose)polymerase und DNA Ligase ein, wobei die Reaktionen der Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) stark ATP und NAD abhängig sind und den Energiemangel im ischämischen Gebiet weiter erhöhen (Pieper et al. 1999). Die Hemmung der Poly(ADP-ribose)polymerase wirkt neuroprotektiv und vermindert NMDA-Rezeptor-assoziierte neuronale Schäden im Kortex (Lo et al. 1998). Demnach besteht unter ischämischen Bedingungen ein weiteres gestörtes Gleichgewicht, das von einer übermäßigen Produktion reaktionsfreudiger Radikale bei vermindertem Vorhandensein von antioxidativen Molekülen gekennzeichnet ist, welche wie die Superoxiddismutase (SOD) unter physiologischen Bedingungen als „Radikalfänger“ wirken (Keller et al. 1998).

Obwohl die ROS-Produktion unter ischämischen Bedingungen zeitlich nicht mit auftretenden SD-ähnlichen Periinfarktdepolarisationen korreliert (Peters et al. 1998), scheint der schädigende Einfluß von $\text{NO}\cdot$ und seiner Nitrosoverbindungen zu überwiegen, da die experimentelle Ausschaltung des NOS I Gens in Knockout-Mäusen zu einer geringeren Anzahl von SD-Depolarisationen, einem verminderten exzitatorischen Neurotransmitterefflux und verkleinerten finalen Infarktvolumen führt (Shimizu-Sasamata et al. 1998).

1.1.4 Mitochondriale Dysfunktion

Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt auch zu einer Kalziumüberladung der Mitochondrien. Hinzu kommt die Anhäufung freier Fettsäuren als Folgen der PLA_2 Aktivierung, die zur mitochondrialen Dysfunktion und Schädigung des oxidativen Stoffwechsels beiträgt (Siesjö, 1991). Die Folge ist eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Atmungskette und Störung des ATP/ADP Transporters. Die Mitochondrien sind unter hypoxisch-ischämischen Energiemangel („oxidativer Stress“) dilatiert, das mitochondriale transmembranale Potential verringert sich und sie produzie-

ren durch den fortlaufenden Elektronentransport bei reduzierter Atmungskette (Entkopplung) zusätzliche reaktive Sauerstoffderivate (ROS) wie O_2^- und H_2O_2 . Vorallem Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) der Atmungskette wird durch ROS geschädigt mit der Folge eines weiteren Energiemangels durch die verminderte mitochondriale ATP-Produktion. Dies erhöht die zelluläre Empfindlichkeit für weitere Schäden (Davis et al. 1997). Die Öffnung einer Protonenpore in der inneren Mitochondrienmembran führt zum Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten von H^+ und zum Sistieren der ATP-Produktion (Kristian, Siesjö, 1998), während eine Permeabilitätsstörung der äußeren Mitochondrienmembran zur Cytochrom C Freisetzung und nachfolgenden Caspasenaktivierung führt (Green, Reed, 1998). Der Grad der mitochondrialen Dysfunktion bei exzitotoxischer Überstimulierung sowie die Aufrechterhaltung oder der Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials ist unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen ein kritischer Faktor in der Einleitung des Zelltodes als Nekrose oder Apoptose (Ankarcrona et al. 1995, Abbrachio et al. 1999).

1.1.5 Entzündung und immunologische Faktoren

Die akute fokale zerebrale Ischämie löst innerhalb weniger Stunden eine starke Entzündungsreaktion im Hirnparenchym aus (Stoll et al. 1998). In der Peripherie eines Hirninfarktes der Maus oder Ratte kommt es nach MCA-Okklusion unter Wirkung von $NO\cdot$ zur verstärkten Expression der Cyclooxygenase II (COX-II), dem Schlüsselenzym der proinflammatorischen Prostaglandinbiosynthese (Nogawa et al. 1998). Das Substrat der COX-II - Arachidonsäure - wird unter ischämischen Bedingungen über kalziumaktivierte Phospholipasen (z.B. PLA_2 , PLC) verstärkt aus Membranen freigesetzt. Weitere Folgen der PLA_2 Aktivierung ist die Anhäufung freier Fettsäuren, die zur mitochondrialen Dysfunktion infolge Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Atmungskette führt sowie die Generierung von Thrombozyten-aktivierenden Faktor (engl. platelet activating factor, PAF) aus Membranlipiden (Katsura et al. 1993). Das Phospholipid PAF bindet als Transskriptionsfaktor an eine PAF-sensitive Domäne und bewirkt ebenfalls eine verstärkte Expression von COX-II (Bazan, Allan, 1996). Die Reaktionsprodukte des COX-II Enzyms- Prostaglandin E_2 (PGE_2), freie Radikale (O_2^-), Thromboxan A_2 (TXA_2)- entstehen im perinukleären endoplasmatischen Retikulum, modulieren die Glutamatfreisetzung und wirken proinflammatorisch bzw. vasokonstriktorisch sowie plättchenaggregierend auf das umgebende Hirnparenchym und sind darüber hinaus eine weitere ROS-Quelle (Katsuki, Okuda, 1995). Im Ergebnis umgeben nach einigen Stunden neutrophile Granulozyten, aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten das Infarktterritorium (Lin et al. 1998). Die Granulozyten sind über einen speziellen Mechanismus eingewandert: Ischämische Neurone, Gliazellen und Endothelzellen der nekrotischen Zentralzone als auch der Penumbra setzen Zytokine wie Interleukin- 1β (IL- 1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), PAF, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) frei, die proinflammatorisch die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten fördern. Diese Zytokine führen zur endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen (AM). Auf den Endothelzellmembranen erscheinen P-Selektin, E-Selektin, interzelluläres-AM-1 (ICAM-1), ICAM-2, vaskuläres-AM-1

(VCAM-1), die die Gegenrezeptoren für entsprechende leukozytäre Plasmamembranliganden (L-Selektin, CD11_{a,b,c}/CD18) auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten darstellen (Del Zoppo, 1996). Diese Rezeptoren ermöglichen die Anlagerung von Leukozyten und deren Übertritt (Transmigration, Extravasation) ins Hirnparenchym, der mit einem „respiratory burst“ und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffderivate einhergeht. Die experimentelle Ausschaltung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 führt zu einer geringeren neutrophilen Granulozytenakkumulation im infarzierten Kortex, zu geringeren neurologischen Folgeschäden nach zerebraler Ischämie und zu einer höheren Überlebensrate (Connolly, Jr. et al. 1996). Neben der schädigenden Wirkung von freigesetzten Radikalen tragen Neutrophile zum begleitenden Hirnödem eines Infarkts bei, da sie die Permeabilität der Endothelzellen erhöhen und die Effektivität der Blut-Hirn-Schranke verringern.

1.1.6 Thrombozyten und Serotonin

Im Hirnparenchym humaner post-mortem Spezimen konnte ein verminderter Serotoningehalt nach zerebraler Ischämie nachgewiesen werden (Jellinger et al. 1978). Den Namen erhielt diese Substanz, nachdem man frühzeitig feststellte, daß aktivierte Thrombozyten zur Blutstase in das Serum (Sero-) eine Substanz freisetzen, die den Tonus (-tonin) von Blutgefäßen erhöht und so die Blutstase fördert. *In vivo* entfaltet Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) intravasale und zelluläre Wirkungen als Neurotransmitter über gegenwärtig 14 klassifizierte 5-HT-Rezeptoren (Alexander, Peters, 1999). Aktivierte Thrombozyten, die sich intravasal an Endothelläsionen aufgelagert haben (Thrombozytenadhäsion), setzen ADP, TXA₂ und Serotonin frei, die die weitere Thrombozytenaggregation fördern. Auf aktivierten Thrombozyten erscheint der Glykoprotein (GP)-Integrinrezeptor GP II_B/III_A, der die Bindung von Fibrinogen ermöglicht, als auch P-Selektin (Simoons, Deckers, 1995). Damit fördern aktivierte Thrombozyten die Fibrininformation und die Einbeziehung von Erythrozyten in den wachsenden Thrombus. Die Thrombozytenakkumulation im gesamten ipsilateralen Kortex nach Verschuß der A. cerebri media führt über eine Fibrinogenbindung am GP II_B/III_A-Rezeptor der Thrombozyten auch nach Reperfusion des ischämischen Gebietes zur fortgesetzten Fibrininformation, neuer Mikrothrombenbildung und anhaltenden postischämischen Hypoperfusion. Die Gabe von Inhibitoren des Glykoprotein II_B/III_A-Rezeptors reduziert experimentell drastisch die Infarktgröße und verbessert den postischämischen Blutfluß (Choudhri et al. 1998).

Unter physiologischen Bedingungen vermitteln die zahlreichen Serotoninrezeptoren sehr unterschiedliche Wirkungen. Auf die größeren Hirngefäße wirkt Serotonin über den 5-HT₂-Rezeptor vasokonstriktorisch, während es piale Gefäße dilatiert (Auer et al. 1985). Darüber hinaus ist der größte Serotoningehalt in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts zu finden, wo es über den 5-HT₄-Rezeptor motilitätsfördernd wirkt. Die Verhinderung der serotonergen Vasokonstriktion und damit Wirkung von 5-HT₂ Antagonisten wie Ketanserin haben sich in Tiermodellen der transienten zerebralen Ischämie als wenig neuroprotektiv herausgestellt (Piera et al. 1995). Die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors im ZNS ist möglicherweise ein neuer attraktiverer

neuroprotektiver Ansatz. Der postsynaptische 5-HT_{1A}-Rezeptor, dessen Vorkommen auch in den besonders ischämieulnerablen Regionen Neokortex (insbesondere Schicht II/III) und Hippocampus (insbesondere Pyramidenzellen der CA1 Region) zahlreicher Säugetierspezies und des Menschen nachgewiesen wurde (Burnet et al. 1995; del Olmo et al. 1998), ist ein G-Protein gekoppelter, transmembranaler Rezeptor, dessen hydrophobe Polypeptidschleifen die Membran als α -Helix siebenmal durchdringen („Serpentinrezeptor“). Nach Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors öffnen sich G-Protein-gekoppelte K⁺-Kanäle, über deren Kaliumausstrom die Zelle hyperpolarisiert wird (Andrade et al. 1986). Diese Membranhyperpolarisation führt durch die geringere Leitfähigkeit von spannungsaktivierten Na⁺- und Ca²⁺-Ionenkanälen zu einem verminderten Na⁺- und Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Durch eine nachfolgende Aktivierung der second messenger IP₃ und der Proteinkinase C kommt es zu einer zeitlichen Amplifikation des ursprünglichen transduzierten Signals, so daß eine langanhaltende hyperpolarisierende Wirkung mit einer Senkung der neuronalen Entladungsrate eintritt (Andrade, Nicoll, 1987). Desweiteren bewirkt die Aktivierung von präsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren an exzitatorischen glutamatergen Terminalen über einen verminderten präsynaptischen Kalziumeinstrom eine verminderte Glutamatfreisetzung (Schmitz et al. 1995b) und damit möglicherweise eine geringere Exzitotoxizität im ischämischen oder bereits reperfundierte Hirnparenchym. Es konnte weiter gezeigt werden, dass Agonisten des 5-HT_{1A}-Rezeptors (8-OH-DPAT, Buspiron, Gepiron, Ipsapiron und BAY R 1531) das Infarktvolume nach MCA-Okklusion in Ratte und Maus verkleinern (Bielenberg, Burkhardt, 1990; Prehn et al. 1991). Die Analyse des neuen, selektiven, potenten 5-HT_{1A}-Agonisten BAY x 3702 ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen (Semkova et al. 1998).

1.1.7 Genetische Veränderungen

Die neuen Genprodukte der Infarkt- und Periinfarktzone sind Ausdruck von zeitlich aufeinanderfolgenden Wellen neuer Genexpression, die in den hypoxisch-ischämisch veränderten Neuronen, Glia- und Endothelzellen in unterschiedlichem Ausmaß und nicht einheitlicher Sequenz ablaufen (Feuerstein et al. 1996). Die schnellste und auch wieder rasch abfallende genetische Reaktion ist die Expression der „sehr frühen Gene“ (immediate early genes, IEG) c-jun, jun B, c-fos, die zum Teil als Transkriptionsfaktoren für andere Gene wirken. Innerhalb eines Tages ist die Immunoreaktivität von Hitzeschockproteinen (heat shock proteins, hsp) wie hsp-70 und hsp-72 nachweisbar. Eine erhöhte Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8; der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1; der Selektine und Wachstumsfaktoren (growth factors) NGF (nerv growth factor), BDNF (brain-derived nerv growth factor), NT-3, -4/5 (Neurotrophin-3,-4/5), bFGF (basic fibroblast growth factor), p53, insulin-like growth factor, CNTF (ciliary neurotrophic factor), PDGF (platelet derived growth factor) sind über mehrere Tage nachweisbar, aber jeweils in verschiedenen Hirnregionen, Infarktsubkompartimenten und nichtischämischen Zellpopulationen unterschiedlich (Feuerstein et al. 1996). Neben der chemotaktischen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen anziehenden Wirkung von Zytokinen, verstärkt IL-1 über eine Induktion der NOS auch die Bildung von NO \cdot . Eine andere Gruppe von verstärkt gebildeten

Genprodukten- die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) beeinflussen die „Extrazellulärmatrix“ und modulieren u.a. durch proteolytische Einwirkungen auf die Basalmembran der Endothelzellen die Dichtheit der Blut-Hirn-Schranke (BBB). Eine Hemmung dieser proteolytischen Enzyme wirkt neuroprotektiv und verringert die Infarktgröße (Romanic et al. 1998). Schließlich werden in einigen Zellen auch Proteine der bcl-2 und bcl-xl Familie verstärkt gebildet, die eine neuroprotektive Wirkung entfalten und zur Stabilisierung der Zellen gegenüber hypoxisch-ischämischen Schäden beitragen (Matsushita et al. 1998).

1.1.8 Wachstumsfaktoren

Neurotrophe Wachstumsfaktoren entfalten ihre neuroprotektiven Wirkungen über eine Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase (TrkA, TrkB, TrkC) oder Rezeptor-Serin/Threonin-Kinase. Zellulär verstärkt produzierte oder therapeutisch applizierte Wachstumsfaktoren können in verschiedenen Modellen der zerebralen Ischämie neuroprotektive Wirkungen entfalten (Lindvall et al. 1992; Tanaka et al. 1995). Wachstumsfaktoren aktivieren zum einen Transkriptionsfaktoren, die Gene von DNA-Reparaturproteinen vermehrt exprimieren. Darüber hinaus sind sie an anabolen Prozessen, wie der verstärkten Expression von antioxidativen Enzymen wie der SOD, des calciumbindenden Proteins Calbindin und der Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins beteiligt und können über einen Erhalt der intrazellulären Kalziumhomöostase und des mitochondrialen Membranpotentials neuroprotektiv wirken. Wachstumsfaktoren können darüber hinaus auch die Expression von Rezeptoren der exzitatorischen Aminosäuren modulieren (Nikolics et al. 1996).

1.1.9 Apoptose

Nach transientser fokaler zerebraler Ischämie konnte neben dem akuten, nekrotischen Zelltod des Infarktkerns auch ein verzögerter, apoptotischer Zelltod von Neuronen und Gliazellen insbesondere der kortikalen Penumbra region nachgewiesen werden (Du et al. 1996). Apoptose ist als Form des programmierten Zelltods im Gegensatz zum nekrotischen Zelluntergang ultrastrukturell von (1) Zytoplasmaschrumpfung, (2) Erhalt der Membran- und Mitochondrienintegrität, (3) Abwesenheit einer Entzündungsreaktion, (4) kondensiertem, randständigen Chromatin im Zellkern, (5) oligonukleosomaler DNA-Fragmentation sowie möglicher finaler Zelldesintegration durch Zytoplasmafragmente (Apoptosekörperchen) gekennzeichnet (Thompson, 1995). Apoptosekörperchen können von umgebenden Mikroglia und Makrophagen ohne Entzündungsreaktion phagozytiert werden (Rupalla et al. 1998). Das Vorkommen von Apoptose nach zerebraler Ischämie konnte in neuronalen Zellen mit vergleichbaren morphologischen Kriterien auch für humane Proben gezeigt werden (Guglielmo et al. 1998). Apoptose kann am Zelltod nach ischämischen Hirninfarkt dahingehend beteiligt sein, daß, abhängig von der Intensität des zytotoxischen Stimulus, Zellen mit starken Schäden, wie sie im Infarktzentrum vorliegen, überwiegend einem akuten, nekrotischen Zelltod erliegen, während leichtere pathophysiologische Prozesse beispielsweise in der Penumbra überwiegend einen verzögerten, programmierten, apoptotischen Zelltod induzieren können (Bonfoco et al. 1995). Für die Ausführung des zellulären Apoptose-

programms ist die Aktivierung einer Familie von Zysteinproteasen - den Caspasen - notwendig (Cohen, 1997). Von der zahlreichen Familie der Caspaseenzyme wird nach transientser fokaler zerebraler Ischämie u.a. Caspase-3 (CPP32) verstärkt exprimiert (Chen et al. 1998). Ein proteolytische Substrat dieses Schlüsselenzyms der Apoptose ist das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), dessen Spaltung nach Induktion des programmierten Zelltods durch Caspase-3 möglicherweise zelluläre ATP und NAD Bestände für andere apoptotische Proteolytisen reservieren soll, die PARP sonst für seine DNA-Reparaturaktivität benötigt (Cohen, 1997). Eine Verminderung der Apoptose nach ischämischen Hirninfarkt durch Caspaseinhibitoren (z.B. Z-DEVD-FMK) wirkt *in vitro* und *in vivo* neuroprotektiv, vermindert die Anzahl apoptotischer Zellen der Infarktregion und verkleinert das finale Infarktvolumen (Endres et al. 1998).

1.2 Spreading depression (SD)

Repetitive kortikale Depolarisationen vom SD-Typ, wie sie in der Penumbra eines ischämischen Hirninfarktes von Tiermodellen auftreten (Nedergaard, Astrup, 1986), sind ein sehr wichtiger Faktor in der Schädigungskaskade des ischämischen Zelltods (Parsons, 1998). SD Episoden spielen unter ischämischen Bedingungen eine entscheidende Rolle in der Ausbreitung der irreversiblen Hirninfarzierung, da sie die Schwelle einzelner Neurone, in einem irreversiblen Zelltod während oder nach einer akuten fokalen zerebralen Ischämie unterzugehen, erheblich absenken. Da das Penumbragewebe vor der Infarzierung therapeutisch potentiell geschützt werden kann, sind die mit einer SD-assoziierten Veränderungen auf elektrophysiologischer, metabolischer, vaskulärer und genetischer Ebene von Interesse.

SD-Depolarisationen im Neokortex sind mit drastischen Ionenströmen, einem transienten Zusammenbruch transmembranaler Ionengradienten und erhöhtem ATP-Verbrauch verbunden. SD beschreibt nach Initiierung eine plötzliche Negativierung des extrazellulären DC-Potentials (des EEG-Potential) um 10 - 40 mV, welches unter normoxischen Bedingungen nach 1-2 min repolarisiert (Abb. 2) (aus (Lauritzen, 1994)). Diese lokale, zeitweise Auslöschung der neuronalen und glialen Aktivität, die mit einer starken Membrandepolarisation der beteiligten Zellen (Neurone, Astrozyten) verbunden ist, breitet sich mit einer Geschwindigkeit von 3-5 mm/min wellenförmig innerhalb der ipsilateralen Hemisphäre aus (Leao, 1944). Das Phänomen wurde 1944 erstmals am Kaninchen beschrieben und ist inzwischen für viele Nagetierspezies nachgewiesen sowie *in vitro* (Avoli et al. 1995) und in Einzelfällen *in vivo* (Mayevsky et al. 1996) vom humanen Kortex abgeleitet worden. Unter experimentellen Bedingungen kann eine SD durch elektrische Stimulation, mechanische Verletzung, Verschluss der A. cerebri media, 4-Aminopyridin, verminderte extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration oder erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration ausgelöst werden (Leao, 1944; Back et al. 1996; Psarropoulou, Avoli, 1993; Mody et al. 1987; Amemori et al. 1987). Grafstein postulierte 1956, daß ein Anstieg der $[K^+]_e$, 1959 van Harrefeld, daß extrazellu-

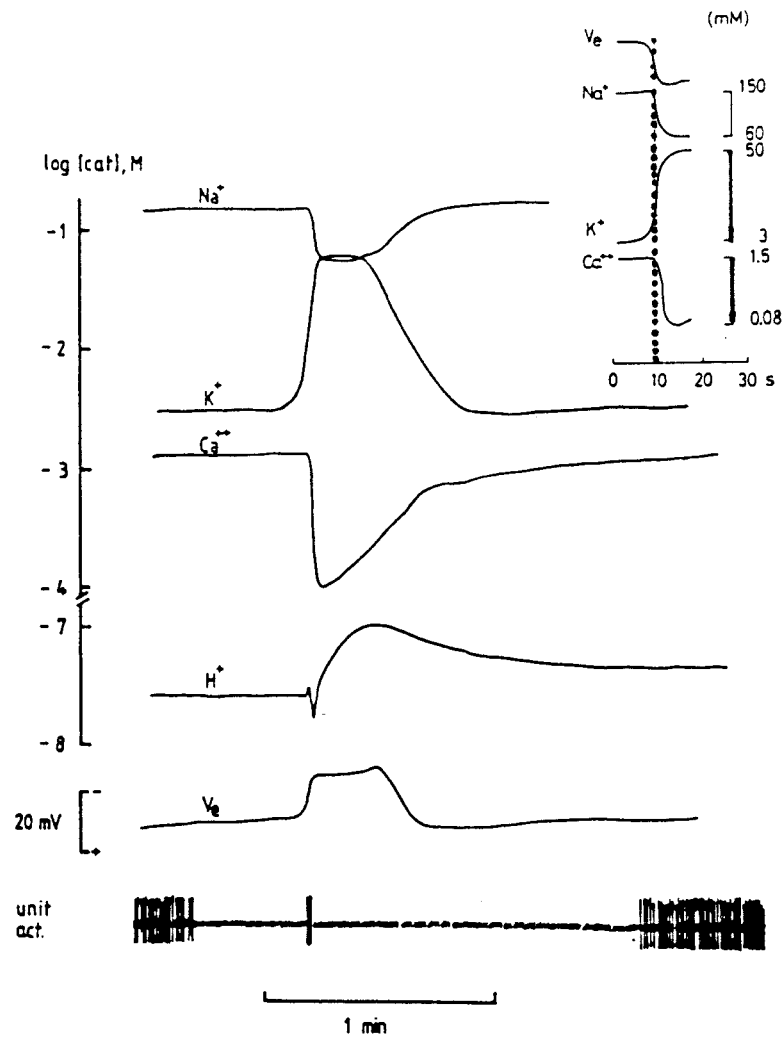


Abb. 2. Typische extrazelluläre elektrophysiologische Veränderungen während einer spreading depression (SD) im Rattenhirn. Die Veränderungen der interstitiellen Ionenkonzentration nach Auslösung einer SD im frontalen Kortex von Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Kalzium (Ca^{2+}) und Wasserstoff (H^+) können mit ionenselektiven Elektroden im parietalen Kortex aufgenommen werden. Die Aktivität einer „einzelnen Einheit“ (single unit activity) sowie Änderung des extrazellulären Potentials (V_e ; entspricht DC-Potential, siehe Methoden) wird jeweils mit einer einzelnen Mikroelektroden registriert. Beachte die nach transientem Verlöschen der neuronalen Aktivität (unit act.) einsetzende starke Negativierung des extrazellulären DC-Potentials (V_e), die von einem drastischen Anstieg der $[\text{K}^+]_e$ von 3mM auf 50mM bei gleichzeitigem Abfall der $[\text{Na}^+]_e$ und $[\text{Ca}^{2+}]_e$ verbunden ist. Aus (Lauritzen, 1994).

läres Glutamat zur Auslösung und Ausbreitung einer SD-Welle führt. Die Beteiligung der ionotropen Glutamatrezeptoren wie NMDA- oder AMPA-Rezeptoren an der Induktion und Ausbreitung der SD-Wellen wird durch die unterschiedlichen Effekte entsprechender selektiver Rezeptorantagonisten wie MK-801 und NBQX kontrovers beurteilt (Mies et al. 1994; Nellgård, Wieloch, 1992). Neuerdings werden im SD-Ausbreitungsmechanismus interzelluläre elektrische

Synapsen - gap junctions - diskutiert, deren Öffnungszustand pH-abhängig und $[Ca^{2+}]_i$ -abhängig reguliert wird (Nedergaard et al. 1995). Die Notwendigkeit einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration zur Auslösung und Ausbreitung einer SD-Welle erscheint inzwischen zweifelhaft (Obrenovitch, Zilkha, 1995). Insgesamt ist eine abschließende, schlüssige Kausalkette der Ereignisse, die zur Generierung und Ausbreitung einer SD führen, nicht vorhanden. Neben einer möglichen Beteiligung an Migräneattacken mit Aura („klassische Migräne“) (Lauritzen, 1994; Olesen, 1994) ist von enormer pathophysiologischer Bedeutung, daß eine lineare Korrelation zwischen der Frequenz der SD-Depolarisationen und dem finalen Infarktvolumen nach MCA-Okklusion besteht (Mies et al. 1993) und ionotrope Glutamatantagonisten, die Anzahl und Amplitude einer SD verringern, das Infarktvolumen verringern (Mies et al. 1993; Iijima et al. 1992). Im Gegensatz dazu kann im nichtischämischen Hirn die Vorbehandlung mit SD-Depolarisationen das Infarktvolumen einer 3 Tage späteren MCA-Okklusion *verringern* und wahrscheinlich über eine vermehrte Produktion des Wachstumsfaktors BDNF in Neuronen und Gliazellen ein Phänomen der partiellen ischämischen Toleranz auslösen (Matsushima et al. 1996; Kawahara et al. 1997).

Die großen Ionenströme über aktivierte Ionenkanäle und Rezeptor-assoziierte Ionenkanäle während der räumlichen und zeitlichen Ausbreitung einer SD im Hirnparenchym sind von einem vorübergehenden Abfall der extrazellulären Na^+ -, Cl^- - und Ca^{2+} - Ionenkonzentration und einem transienten Anstieg der extrazellulären K^+ - und interstitiellen H^+ - (= Abfall des pH-Wertes) Ionenkonzentration gekennzeichnet (Lauritzen, 1994) und erfordern mit der Stimulierung der Na^+/K^+ ATPase einen erheblichen metabolischen Aufwand (Kocher, 1990), um die stark depolarisierten Neurone und Gliazellen zu repolarisieren (Sugaya et al. 1975). Astrozyten sowie Mikroglia nehmen über geöffnete spannungsabhängige Ionenkanäle K^+ , Cl^- und HCO_3^- -Ionen auf (Walz, 1997), während in den Neuronen $NaCl$ akkumuliert und das Zytoplasma azidotisch wird. Die gliale Kaliumaufnahme aus dem Extrazellulärraum sowie die sinkende extrazelluläre $NaCl$ -Konzentration sind für das zu registrierende negative extrazelluläre Potential mit verantwortlich (Hossmann, 1996). Gleichzeitig führt die $NaCl$ -Akkumulation in den Neuronen sowie die Kaliumaufnahme durch Glia-Zellen zu einem passiven Einstrom von Wasser in die entsprechenden Zellen. Die Umverteilung extra- und intrazellulärer Ionen sowie von interstitiellem Wasser läßt Neurone und gliale Zellen auf Grund intrazellulärer impermeabler Makromoleküle osmotisch massiv schwellen und verkleinert den Extrazellulärraum auf etwa 50 % des Ausgangswertes (Hansen, 1985). Die veränderte Zusammensetzung und das geschrumpfte Volumen des Extrazellulärraums, die erhöhte zelluläre Membranpermeabilität, die geänderte synaptische Transmission sowie intrinsische Chromophore verändern auch die Lichtbrechung an der Hirnoberfläche und sind insgesamt als verstärktes intrinsisches optisches Signal (IOS) durch die Reflektionszunahme (bzw. Transmissionsabnahme) als eine sich in Raum und Zeit ausbreitende Welle mit optischen Methoden ebenfalls registrierbar (Yoon et al. 1996). Unter normoxischen Bedingungen und adäquater Glukoseversorgung ist nach 1 - 2 min die extrazelluläre K^+ - Konzentration wieder

auf prä-SD Werte normalisiert (Hablitz, Heinemann, 1989), die Zellen repolarisieren und die SD ist beendet. Eine zweite SD kann nur nach einer absoluten Refraktärzeit von ca. 2 min und in einer relativen Refraktärzeit von ca. 10 - 20 min lediglich mit verminderter Amplitude und geringerer Ausbreitungsgeschwindigkeit ausgelöst werden (Brand et al. 1998). Unter ischämischen Bedingungen kann die Dauer von Periinfarkt-SD 2 - 10 min und länger betragen (Back et al. 1994), da die limitierte Energiezufuhr die Zeitdauer der Zellrepolarisierung verlängert (Gido et al. 1993). Bei einer SD ist die metabolische Aktivierung, d.h. die Steigerung des Glukose- und Sauerstoffbedarfs, für 1 - 2 min mit einer Vasodilatation und Verdopplung des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF) gekoppelt, während danach eine für ca. 1 h langanhaltende Vasokonstriktion mit Verminderung des rCBF um 20 - 30 % zu registrieren ist (Lauritzen, 1994). Da bei einer Migräne mit Aura ebenfalls eine zerebrale Blutflußreduktion um mindestens 20 % feststellbar ist (Olesen et al. 1981), die für 4 - 8 Stunden bestehen bleibt (Lauritzen, Olesen, 1984), wird ein SD-ähnliches Phänomen und assoziierte „spreading oligemia“ von verschiedenen Autoren der Aurasymptomatik eines Migräneanfalls beim Menschen pathophysiologisch zu Grunde gelegt (Olesen et al. 1981; Welch, 1997). Andere Arbeitsgruppen haben eine Relevanz für den Menschen bezweifelt (Blau, 1992).

Trotz der DC-Potentialänderung assoziierten Blutflußerhöhung wird auch im normoxischen Hirn während einer SD ein Teil der Glukose anerob verstoffwechselt: es kommt zu einem Anstieg von Laktat, Absinken des zyttoplasmatischen pH-Wertes und NADH Gehalts der Mitochondrien (Mayevsky, Weiss, 1991; Csiba et al. 1985). Die Erhöhung der interstitiellen K^+ -Ionenkonzentration auf 40 - 60 mM während der Ausbreitung einer SD (Lauritzen, Hansen, 1992) führt zu einer Aktivierung präsynaptischer Ca^{2+} - Kanäle an exzitatorischen Terminalen, die nach einem Einstrom von Ca^{2+} - Ionen Glutamat exozytotisch freisetzen (Nicholls, 1993). Mit modernen Mikrodialysemethoden wurde ermittelt, daß dies einem leichten, vorübergehenden Anstieg der interstitiellen Glutamatkonzentration von 6 mM auf 30 - 40 mM entspricht (siehe Abb. 7 und 8 in Zilkha et al. 1995). Die SD-assozierte Glutamatfreisetzung führt zu einer Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren, so daß es u.a. über den NMDA-Rezeptor zu einem zusätzlichen Kalziumeinstrom in die Zelle kommt: die Ausbreitung einer SD wird von extrazellulärem Ca^{2+} und einer NMDA-Rezeptor Aktivierung gefördert. Der Abfall der $[Ca^{2+}]_e$ von 1,5 mM auf 0,08 mM im Kortex (Lauritzen, 1994) während einer SD legt neben einem nahezu Ausgleich der extra- und intrazellulären $[Ca^{2+}]$ eine zusätzliche intrazelluläre Kalziumbindung oder Sequestrierung nahe (Herrerias, Somjen, 1993). Dem würde die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) während einer SD entsprechen (Krivanek, Koroleva, 1996). Die PKC wird durch eine Kalziumbindung aktiviert und transloziert danach von der zytosolischen PKC Form zur Plasmamembran, wo sie Substratproteine phosphoryliert. Da die Aktivierung der PKC die Aktivität des NMDA-Rezeptorproteins über einen verringerten Mg^{2+} -Block verstärken kann (Chen, Huang, 1992), ist dies möglicherweise ein Faktor zur autokatalytischen Verstärkung der Zelldepolarisation nach NMDA-Rezeptoraktivierung während einer SD, die so zusammen mit Zelldiffusionspo-

tentialen zur messbaren (sehr hohen) negativen DC-Potentialänderung von 10 - 40 mV beiträgt. Der verhältnismäßig geringe Anstieg des Glutamats im Verlauf einer SD dauert nur ca. 5 min (Zilkha et al. 1995), so daß die PKC-Aktivierung zu einer intrazellulären zeitlichen Amplifikation des Signals beitragen kann. Da die Blockade spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle oder Glutamatrezeptor-assoziiierter Ionenkanäle die SD in Amplitude und Dauer zwar verringern, aber nicht völlig auslöschen (Jing et al. 1993), müssen weitere Kanäle, Rezeptoren, Zellstrukturen an diesem Ereignis beteiligt sein.

Die dramatischen Umverteilungen von Ionen im Verlauf einer SD lösen auf mehreren Ebenen weitere zelluläre Veränderungen aus. SD-Depolarisationen scheinen in Tiermodellen für einen Großteil der genetischen Veränderungen und neuen Genprodukten nach fokaler zerebraler Ischämie über eine Aktivierung des NMDA-Glutamatrezeptors verantwortlich (Siesjö et al. 1995; Miettinen et al. 1997). SD-Wellen tragen zur vorübergehenden verstärkten Expression der „sehr frühen Gene“ (immediate early genes, IEG) c-jun, jun B, c-fos, KROX 24 sowohl in der direkten Infarktregion als auch im gesamten ipsilateralen Kortex außerhalb der direkt von der Ischämie betroffenen Region bei (Hossmann, 1996). Während repetitive SD-Depolarisationen einen Großteil der Proteinsynthese vor allem in vulnerablen Neuronen der kortikalen Schicht II/III um ca. 37 % vermindern (Mies, 1993), erhöht sich die Immunoreaktivität von Streßproteinen: es kommt zu einem Anstieg der Hitzeschockproteine (heat shock proteins, hsp) hsp70 und hsp32 (= Hämoxygenase-1). Weiterhin werden durch SD-Wellen Wachstumsfaktoren wie NGF, BDGF, und bFGF, ihre entsprechenden Tyrosinkinaserzeptoren trkB und trkC als auch Gewebsplasminogen-aktivator (t-PA) induziert (Herrera et al. 1993; Kawahara et al. 1997; Kariko et al. 1998). Es ist gegenwärtig unklar, welche der genetischen Veränderungen zu einem zellulären Schutz dienen und welche eine Ausweitung neuronaler Schäden darstellen, da das hsp70 Hitzeschockprotein andere veränderte Zellproteine binden und so Zellen vor nachfolgenden Schäden schützen kann sowie verstärkt gebildeten Wachstumsfaktoren eine protektive Rolle für kortikale Neurone zugeschrieben wird (Kokaia et al. 1995). Andererseits kann t-PA postischämische neuronale Schäden unabhängig von seinen thrombolytischen Eigenschaften durch eine verstärkte Exzitotoxizität verstärken (Wang et al. 1998). Ebenfalls kontrovers werden erhöhte zelluläre BDNF-Konzentrationen einerseits in Zusammenhang mit dem Phänomen der partiellen ischämischen Toleranz von Neuronen gebracht („ischemic preconditioning“) (Kawahara et al. 1997), andererseits scheint BDNF auch an einer postischämischen neuronalen Hyperexzitabilität beteiligt (Scharfman, 1997). SD-Wellen sind auch in der Lage, Gliazellen zu aktivieren: es kommt zu einer Ansammlung reaktiver Mikrogliazellen (Gehrmann et al. 1993) und Astrozytose (Kraig et al. 1991), wobei Astrozyten während einer SD einen alkalischen pH-Wert im Zytoplasma aufweisen. SD-Wellen induzieren insbesondere in ischämievulnerablen Neuronen der kortikalen Schicht II/III das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese - die Cyclooxygenase II (Miettinen et al. 1997). Insgesamt sind damit repetitive SD-Depolarisationen über eine Gliazellaktivierung und durch die COX II-Induktion an der massiven Entzündungsreaktion nach fokaler zere-

braler Ischämie beteiligt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass SD-Wellen zu Schäden am Zytoskelett von Zellen beitragen, die nicht direkt von der primären Ischämie betroffen waren, in dem sie zum Abbau des Strukturproteins Mikrotubulin-assoziiertes Protein 2 (MAP2) als frühes Zeichen einer Zellschädigung beitragen (Iijima et al. 1998).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die pathogenetische Rolle der SD bei Ischämie-induzierten Zellschäden auf folgenden Mechanismen beruht: (1) während einer SD kommt es infolge massiver Überaktivierung des NMDA-Rezeptors zu einer kritischen Kalziumüberladung und nachfolgender „Kalziumtoxizität“ auf die Zelle, (2) SD-Episoden tragen zu einer starken Entzündungsreaktion bei, (3) SDs schädigen das Zytoskelett von entfernten, nicht von der Ischämie betroffenen Neuronen, (4) SD-Wellen verursachen unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen eine metabolische Entkopplung im Hirnparenchym, die sich in einer Entgleisung des sensiblen Gleichgewichts von Energiebedarf und Energiebereitstellung ausdrückt und zu Gewebshypoxien führt. Diese Mechanismen verstärken eine Ausweitung des ischämisch-hypoxischen Hirnschadens und fördern eine allmählichen Einbeziehung der Penumbra in das infarzierte Hirngewebe.

Die Kausalkette der Beteiligung der SD an der Migräne ist nach wie vor wesentlich spekulativer. Nach Lauritzen (Lauritzen, 1994) startet eine Migräneattacke mit einer lokalen SD, d.h. mit einer Depolarisation von Neuronen und Gliazellen in der okzipitalen Hirnrinde. Die Ausbreitung der SD über den Kortex würde der Skotomsymptomatik einer Migräneattacke entsprechen. SD und nachfolgende Oligämie aktivieren Neurone im Hirnstamm vom Ncl. caudalis des N. trigeminus (Moskowitz et al. 1993). Die so im Hirnstamm generierte neuronale Dysfunktion kann über perivaskuläre Afferenzen zur späteren arteriellen Dilatation und über die Ausschüttung vasoaktiver Neuropeptide wie CGRP (calcitonin gene-related peptide) an vasalen Endigungen des N. trigeminus zur meningealen Entzündungsreaktion sowie Schmerzempfindung führen (Reuter et al. 1998; Hall, Smith, 1998). Ein Teil der vasalen Dysregulation kann durch Sumatriptan, einem klinisch verwendeten 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}-Rezeptoragonisten in der Migränebehandlung, aufgehoben werden und den durch Vasodilatation induzierten Kopfschmerz beseitigen (Jansen et al. 1992). Die SD-induzierte Aktivierung des Hirnstammes bleibt jedoch erhalten und könnte so das häufige erneute Auftreten von Migränekopfschmerzen innerhalb von 24h nach initialer Sumatriptan-gabe erklären.

1.3 Rezeptoren und Funktion der synaptischen Transmission im Neokortex

Die kortikale Funktion wird zu einem großen Teil über chemische Synapsen realisiert, an denen der von der präsynaptischen Zelle ausgeschüttete Neurotransmitter eine Wirkung an der postsynaptischen Zelle über Rezeptorproteine der subsynaptischen Membran entfaltet. Da diese Rezeptoren neben ihrer physiologischen Bedeutung auch Grundlage einer pharmakologischen Stra-

tegie bei pathophysiologischen Zuständen bilden, soll auf 3 wichtige Rezeptorsysteme und ihre Neurotransmitter eingegangen werden.

Die wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im Neokortex sind Glutamat und Aspartat (Cotman et al. 1987), deren Wirkung auch durch selektive Rezeptoragonisten imitiert oder durch Antagonisten blockiert werden kann. Eine übermäßige Erregung von Nervenzellen durch L-Glutamat ist seit der Exzitotoxizitätshypothese von Olney (Olney, Sharpe, 1969) ein wichtiges hypothetisches Glied in der pathophysiologischen Kausalkette neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimersche Erkrankung, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson, Morbus Huntington aber auch des Schlaganfalls und der traumatischen Hirnschädigung (Lipton, Rosenberg, 1994). Ihre Funktion der chemischen synaptischen Transmission entfalten die exzitatorischen Aminosäuren Aspartat und Glutamat über die Aktivierung von Glutamatrezeptorsubtypen, die nach dem jeweiligen bevorzugten Agonisten benannt wurden: den ionotropen (Liganden-gesteuerten) N-Methyl-D-aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor (AMPA-Rezeptor) sowie Kainatrezeptor stehen metabotrope (G-Protein-gekoppelte) Glutamatrezeptoren (mglu1-mglu8) gegenüber (Watkins, Evans, 1981; Pin, Duvoisin, 1995). Alle Rezeptoren sind aus 5 spezifischen Untereinheiten aufgebaut, deren Komposition die Funktionalität des Rezeptors bestimmt. Der NMDA-Rezeptorkomplex hat eine postsynaptische Lokalisation an Synapsen, Zellsomata und Dendriten und ist nach Aktivierung für einen Einwärtsstrom von Na^{+} - und Ca^{2+} - sowie für einen Auswärtsstrom von K^{+} -Ionen permeabel (Hollmann, Heinemann, 1994). Der NMDA-Rezeptor kann selektiv durch NMDA-aktiviert werden und besitzt eine Reihe von weiteren Bindungsstellen, die die Rezeptoraktivität modulieren. So besitzt der NMDA-Rezeptor im Kationenkanal eine Bindungsstelle für die Antagonisten MK-801 und PCP sowie eine allosterische Zink-, an der extrazellulären Domäne eine Glykolisierungs-, Redoxpotential-, pH-sensitive-, Glutamatbindende-, NMDA-bindende, APV- und CPP-bindende, Glycin- sowie Polyaminbindende und an der intrazellulären Domäne eine phosphorylierungssensitive, die Kationenpermeabilität modulierende, Stelle (Hollmann, Heinemann, 1994). Die Glycinbindung ist eine Voraussetzung zur Rezeptoraktivierung. Der NMDA-Rezeptor zeichnet sich weiterhin durch einen spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block aus, der durch eine Membrandepolarisation aufgehoben werden kann und den Kationeneinwärtsstrom erhöht (Mori, Mishina, 1995). Gegenwärtige NMDA-Antagonisten wirken an der Glutamaterkennungsstelle, der Glycin-bindenden Stelle, der Polyaminuntereinheit oder - wie die nicht-kompetitive Antagonisten Phencyclidin (PCP, „angel dust“), Ketamin oder Dizocilpin (MK-801) am Ionenkanal, der mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert ist (Rogawski, 1993). Nicht-kompetitive NMDA-Antagonisten wie Ketamin blockieren NMDA-Rezeptor-vermittelte Antworten nur bei geöffnetem Ionenkanal, d.h. ihre Wirkung setzt eine vorangegangene Aktivierung des Rezeptors voraus und kann nicht durch einen Überschuss des Agonisten (z.B. Glutamat) aufgehoben werden (= nicht-kompetitiver Antagonist). Das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission, das für plastische Prozesse des Gehirns wie Lernen und

Gedächtnis wichtig ist, ist von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors abhängig (Collingridge, Bliss, 1987). Deshalb beeinträchtigt die pharmakologische Blockade des NMDA-Rezeptors die NMDA-abhängige und AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Plastizität der Neurotransmission (Bear, Malenka, 1994), wobei die eintretende dissoziative Anästhesie mit Halluzinationen die z.T. erwünschte Wirkung bei der mißbräuchlichen Verwendung als Rauschmittel (z.B. PCP) darstellt.

Auch die ionotropen nicht-NMDA-Rezeptoren (AMPA-Rezeptor, Kainat-Rezeptor) sind wie der NMDA-Rezeptor postsynaptisch lokalisiert. Sie zeichnen für die schnelle exzitatorische synaptische Transmission verantwortlich (Lambert et al. 1989). Die AMPA-Rezeptoren sind nach Aktivierung für monovalente Kationen wie Na^+ (einwärts) und K^+ (auswärts) permeabel und durch GYKI53655 oder NBQX selektiv blockierbar (Alexander, Peters, 1999). Bei Abwesenheit der Rezeptoruntereinheit Glu2 exprimieren einige Neurone AMPA-Rezeptoren, die auch für Ca^{2+} permeabel sein können (Hollmann et al. 1991). Die Beteiligung des ionotropen Kainat-Rezeptors an der synaptischen Transmission wurde bisher im Hippocampus nachgewiesen, wo es nach Aktivierung dieses Rezeptors an der präsynaptischen Membran von inhibitorischen GABAergen Synapsen zur verminderten GABA Freisetzung kommt (Clarke et al. 1997), während seine Aktivierung an der postsynaptischen Membran von CA3 Pyramidenzellen eine exzitatorische postsynaptische Antwort auslöst (Vignes, Collingridge, 1997).

Glutamat aktiviert nicht nur Liganden-gesteuerte Rezeptor-Ionenkanalkomplexe sondern auch Rezeptoren, die an ein G-Protein gekoppelt sind (Nakanishi, 1994). Bisher sind 8 der sogenannten metabotropen Glutamatrezeptoren bekannt, die in 3 Gruppen (I: *mglu1* und *mglu5*; II: *mglu2* und *mglu3*; III: *mglu4*, *mglu6*, *mglu7*, *mglu8*) unterteilt werden können (Pin, Duvoisin, 1995). G-Proteine sind Proteine, die nach ihrer Aktivierung GDP freisetzen und GTP an ihrer Guanin-nukleotidbindenden Domäne aufnehmen. Im nun GTP-gebundenen Zustand können G-Proteine die Aktivität von Ionenkanälen oder second messenger regulieren, bis die Signalwirkung durch eine GTP-Hydrolyse beendet ist. Präsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren sind möglicherweise an einer Inhibition der Transmitterausschüttung über die Inaktivierung spannungssensitiver Kalziumkanäle (VSCC) beteiligt (Pin, Duvoisin, 1995). Die Aktivierung postsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren der Gruppe I führt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer Erhöhung der intrazellulären second messenger Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Neben einer Verminderung der K^+ -Leitfähigkeit erhöhen diese second messenger die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zum einen setzt IP_3 Ca^{2+} aus intrazellulären Kompartimenten frei, zum anderen aktiviert DAG die Proteinkinase C, potenziert damit die NMDA-Rezeptor-Ionenströme und bewirkt so auch eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Schoepp, Conn, 1993).

Neben diesen Rezeptoren für den exzitatorischen Transmitter Glutamat existieren auch Bindungsstellen für den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA), die je nach dem ausgelösten Ionenstrom als GABA_A - oder GABA_B -Rezeptor bezeichnet werden (Matsumo-

to, 1989). Die Erregung des postsynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptorproteins bewirkt ein schnelles (fast) inhibitorisches postsynaptisches Potential (f-IPSP), daß über eine einwärts gerichtete erhöhte Leitfähigkeit für Cl⁻-Ionen zustande kommt und auf die Zellmembran hyperpolarisierend wirkt. Demgegenüber führt die Aktivierung des prä- und postsynaptisch lokalisierten GABA_B Rezeptors über ein G-Protein zu einem langsamen inhibitorisches postsynaptisches Potential (l-IPSP), daß zu einem verstärkten Ausstrom von K⁺-Ionen führt und ebenfalls auf die Zellmembran hyperpolarisierend wirkt (Andrade et al. 1986). Die Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren wirkt wahrscheinlich über eine verminderte Ca²⁺-Leitfähigkeit auf die Zellaktivität hemmend (Thompson, Gähwiler, 1989). Hemmende GABAerge Neurone sind im Kortex als Interneurone zwischen andere Neurone geschaltet und bilden mit ihnen an Dendriten, Zellsoma oder Axonen Synapsen und tragen so zu Informationsverarbeitung bei.

Das serotonerge System entfaltet seine Wirkung über gegenwärtig 14 klassifizierte 5-Hydroxytryptamin-(5-HT-, Serotonin-)Rezeptoren (Alexander, Peters, 1999) und Störungen der serotonergen Neurotransmission sind an Erkrankungen wie Depressionen, Autismus oder Migräne beteiligt. Neben zahlreichen anderen Effekten wirkt Serotonin über den 5-HT_{1A}-Rezeptor modulierend sowohl auf die exzitatorische als auch inhibitorische Funktion von Neuronen (Schmitz et al. 1995b; 1995c). Der 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptorsubtyp existiert im Säugetier-ZNS als präsynaptischer, inhibitorischer („somatodendritischer“) Autorezeptor an Dendriten oder Zell soma serotonerger Neurone, als postsynaptischer Rezeptor an vielen nicht-serotonergen Neuronen (Fletcher et al. 1993) sowie an glutamatergen Terminalen (Raiteri et al. 1991) und ist zur Signaltransduktion an ein G-Protein gekoppelt. Die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors durch selektive Agonisten (8-OH-DPAT, BAY x 3702) führt zu einer verstärkten auswärtsgerichteten K⁺-Leitfähigkeit (Andrade et al. 1986; Araneda, Andrade, 1991) und zur Aktivierung verschiedener second messenger Systeme: der intrazelluläre cAMP Spiegel sinkt, während IP3 und DAG ansteigen (Liu, Albert, 1991). Insgesamt wird die Zellmembran hyperpolarisiert und die Entladungsschwelle des Neurons erhöht. Beispiel eines selektiven 5-HT_{1A}-Antagonisten ist (±)WAY 100635 (Alexander, Peters, 1999).

Zur physiologischen zellulären Kommunikation im Neokortex ist eine feine Balance von Rezeptorsystemen der exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Transmission notwendig. Die Aktivierung afferenter Fasern führt zur Ausbreitung eines Aktionspotentials bis zu den synaptischen Terminalen, die die Neurotransmitter in Speichervesikeln enthalten (Greengard et al. 1993). Bei Eintreffen des Aktionspotentials werden durch Depolarisation der präsynaptischen Endigung spannungssensitive Kalziumkanäle vom P- und N-Typ aktiviert, die daraufhin eine erhöhte Leitfähigkeit für Kalziumionen aufweisen (Dunlap et al. 1995). Die aus dem Einstrom extrazellulärer Kalziumionen resultierende erhöhte intraterminale Kalziumkonzentration löst über die Proteine Synaptobrevin und Syntaxin die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynap-

tischen Membran aus (Ferro-Novick, Jahn, 1994). Das in den Vesikeln enthaltene Glutamat oder Aspartat wird exozytotisch in den synaptischen Spalt freigesetzt und diffundiert im Falle der schnellen synaptischen Funktion zu den AMPA-Rezeptorproteinen der postsynaptischen Membran (Nicholls, Attwell, 1990). Die Transmitter-Rezeptorbindung löst an der subsynaptischen Membran eine Permeabilitätsänderung von für den jeweiligen Rezeptortyp charakteristischen Ionen aus. Im Falle des AMPA-Rezeptors mündet es schließlich mit einem exzitatorischen postsynaptischen Potential in einer Membrandepolarisation der postsynaptischen Zellen, beispielsweise der Pyramidenzellen in Schicht II/III. Ist die Anzahl der aktivierten präsynaptischen Fasern groß genug und die eintreffenden EPSPs depolarisieren die postsynaptische Zellen bis zur Schwelle, wird ein Aktionspotential nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip generiert. Ein geringer Teil der extrazellulären Feldpotentialantwort von Schicht II/III beruht auch auf der Aktivierung des NMDA-Rezeptors über glutamaterge Fasern.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Exzitation von Neuronen durch eine starke inhibitorische Kontrolle begrenzt. Über ebenfalls exzitatorische glutamaterge Fasern werden dabei intrinsische GABAerge Interneurone des Neokortex erregt, die daraufhin den hemmenden Transmitter GABA aus präsynaptischen Terminalen freisetzen, die an Dendriten, Zellsoma oder Axonen Kontakt zu anderen Zellen aufnehmen. Über eine Aktivierung des GABA_A- oder GABA_B-Rezeptors wird analog den oben beschriebenen Mechanismen an der postsynaptischen Zelle ein inhibitorisches Potential ausgelöst, das zu einer Hyperpolarisation der subsynaptischen Membran führt. Die Lokalisation hemmender, GABAerger Synapsen ist verschieden (Sutor, Luhmann, 1995): (1) einerseits kann ein über Dendriten einer Pyramidenzelle einlaufendes exzitatorisches postsynaptisches Potential bereits vor Eintreffen am Pyramidenzellsoma mit einem inhibitorischen postsynaptischen Potential nach Aktivierung des GABA_A- und GABA_B-Rezeptors verrechnet werden (feed-forward inhibition). (2) Weiterhin stehen die Axonterminalen exzitatorischer als auch inhibitorischer Fasern über axoaxonische Synapsen mit dem Axon eines GABAergen Interneurons über den GABA_B-Rezeptor unter einer präsynaptischen Inhibition. (3) Die Anzahl der freigesetzten GABA-Vesikel einer hemmenden Synapse wird im Sinne einer Begrenzung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung zusätzlich durch Erregung des GABA_B-Autorezeptors an der präsynaptischen Membran reguliert, der die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt detektiert. (4) Schließlich erregt ein zum Pyramidenzellaxon fortgeleitetes Aktionspotential gleichzeitig austretende Axonkollaterale, die exzitatorische glutamaterge Synapsen mit inhibitorischen Interneuronen bilden, welche sie über den AMPA-Rezeptor erregen können. Das so erregte GABAerge Neuron kann hemmende Synapsen auch mit der Pyramidenzelle bilden, von der es ursprünglich erregt wurde. Nach der GABA-Freisetzung führt dann ein EPSP, das unter Ruhebedingungen an der postsynaptischen Pyramidenzelle ein Aktionspotential auslösen kann, auf Grund der GABAergen Hyperpolarisation zu keinem Aktionspotential mehr, da das Membranpotential weiter von der Schwelle der Aktionspotentialauslösung entfernt ist (rekurrente Hemmung). Unter extrazellulären Bedingungen kann mit Feldpotentialantworten

nach einer Doppelreizstimulation hauptsächlich die GABAerge rekurrente Hemmung indirekt durch eine verminderte Exzitation der Pyramidenzellen erfasst werden.

1.4 Fragestellung

Die Komplexität der bei einer transienten akuten fokalen zerebralen Ischämie oder auch Migräne einsetzenden zellulären Abläufe macht zu einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie eine Isolierung einzelner potentiell zellschädigender Faktoren und den Ausschluß interferierender Variablen, die die Auswertung von Ergebnissen erschweren, wünschenswert. Diese im Tiermodell realisierten Vorteile kennzeichnen jedoch auch gleichzeitig den Hauptnachteil, den Untersuchungen dieser Art aufweisen: es können nur mit Einschränkungen reale Verhältnisse eines klinischen Schlaganfalls oder einer Migräneattacke beim Menschen wiedergegeben werden. Die ergänzende direkte Untersuchung pathophysiologischer Konzepte am Menschen im Rahmen von Pilotstudien und unter Berücksichtigung ethischer Gesichtspunkte ist unverzichtbar und an den Einsatz nichtinvasiver bildgebender Verfahren gebunden, mit denen eine immer bessere *in vivo* Darstellung von Prozessen bis auf zellulärer Ebene gelingt (Weiler, 1999). Bei den hier vorgestellten Untersuchungen sollten transiente DC-Potentialänderung nach Applikation einer Kaliumchlorid (KCl)-Lösung auf den Neokortex adulter Ratten unter normoxischen Bedingungen näher charakterisiert und auf eine potentielle Beeinflussung der kortikalen synaptischen Funktion untersucht werden. Obwohl SD-Wellen im Kortex und physiologischer Sauerstoffversorgung keine morphologischen Schäden verursachen (Nedergaard, Hansen, 1988), sind die elektrophysiologischen Eigenschaften repetitiver SD-Episoden und ihr Einfluß auf die kortikale Funktion unter normoxischen Bedingungen nicht untersucht. Zur Einschätzung der synaptischen Funktion wurden reizinduzierte elektrische Feldpotentialantworten herangezogen. Die Applikation einer KCl-Lösung gilt als eine Standardmethode zur SD-Auslösung im intakten Kortex zahlreicher Nagetierspezies und der Katze (Obrenovitch, 1995). Da die KCl-induzierte extrazelluläre DC-Potentialänderung einen Großteil der SD-assozierten Ionen- und Wasserbewegungen widerspiegelt, wird SD hier deshalb synonym dafür gebraucht. Zur Isolierung des elektrophysiologischen Phänomens SD sollte deshalb zunächst ein geeignetes Modell zur reproduzierbaren SD-Auslösung im neokortikalen Hirnschnitt unter *in vitro* Bedingungen etabliert werden. Das *in vitro* System eines Hirnschnittpräparats erschien unter verschiedenen Gesichtspunkten als geeignet. Die Zusammensetzung des Extrazellulärums von Zellen des Hirnparenchyms kann unter diesen Bedingungen kurzfristig beeinflußt werden, wichtige physiologische Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Glukosekonzentration, Sauerstoffsättigung können standardisiert und konstant gehalten werden - interferierende kardiovaskuläre und systemische Wirkungen am Ganztier *in vivo* fallen weg. Elektroden werden hier nicht nach allgemeinen stereotaktischen Atlanten sondern unter exakter visueller Kontrolle für jeden Hirnschnitt individuell plaziert. Dies gewährlei-

stet ein hohes Maß der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus bedarf die dargestellte z.T. widersprüchliche Rolle von AMPA- und NMDA- Antagonisten in verschiedenen Modellen der zerebralen Ischämie aber auch die unterschiedlich dargestellte Beteiligung dieser Rezeptoren an Auslösung und Ausbreitung der SD weiterer Untersuchungen. Interessant wäre die Beantwortung der Frage, ob sich die unterschiedlichen neuroprotektiven Effekte dieser Substanzen *in vivo* in einer unterschiedlichen Beeinflussung von SD-Parametern in einem *in vitro* SD-Modell widerspiegeln. Der mit einer SD verbundene, z.T. rezeptorabhängige, Einstrom von Natrium-Kalzium- und Chloridionen macht gerade ionotrope Glutamatrezeptoren für eine Untersuchung interessant, um über eine pharmakologische Blockade dieser Rezeptoren eine potentielle Beteiligung an der SD herauszufinden. Die Beteiligung spannungsabhängiger Kationenkanäle an der SD (Jing et al. 1993) macht durch eine hyperpolarisierende Wirkung selektiver Agonisten des 5-HT_{1A}-Rezeptors auch den 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptor für eine Untersuchung auf SD-modulierende Eigenschaften interessant. Zur weiteren Untersuchung sollten deshalb folgende Fragen beantwortet werden:

- (1) Was kennzeichnet das Ausbreitungsmuster einer SD *in vitro*?
- (2) Was sind die elektrophysiologischen Eigenschaften repetitiver SD-Episoden unter normoxischen Bedingungen ?
- (3) Wie wird die kortikale Funktion anhand der exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Transmission unter adäquater Glukose und Sauerstoffversorgung von repetitiven SD-Wellen beeinflusst?
- (4) Welche ionotropen Glutamatrezeptoren sind an einer SD unter *in vitro* Bedingungen beteiligt?
- (5) Ist eine Beeinflussung typischer SD-Parameter durch selektive Serotoninagonisten am 5-HT_{1A}-Rezeptor möglich?

2. MATERIAL UND METHODEN

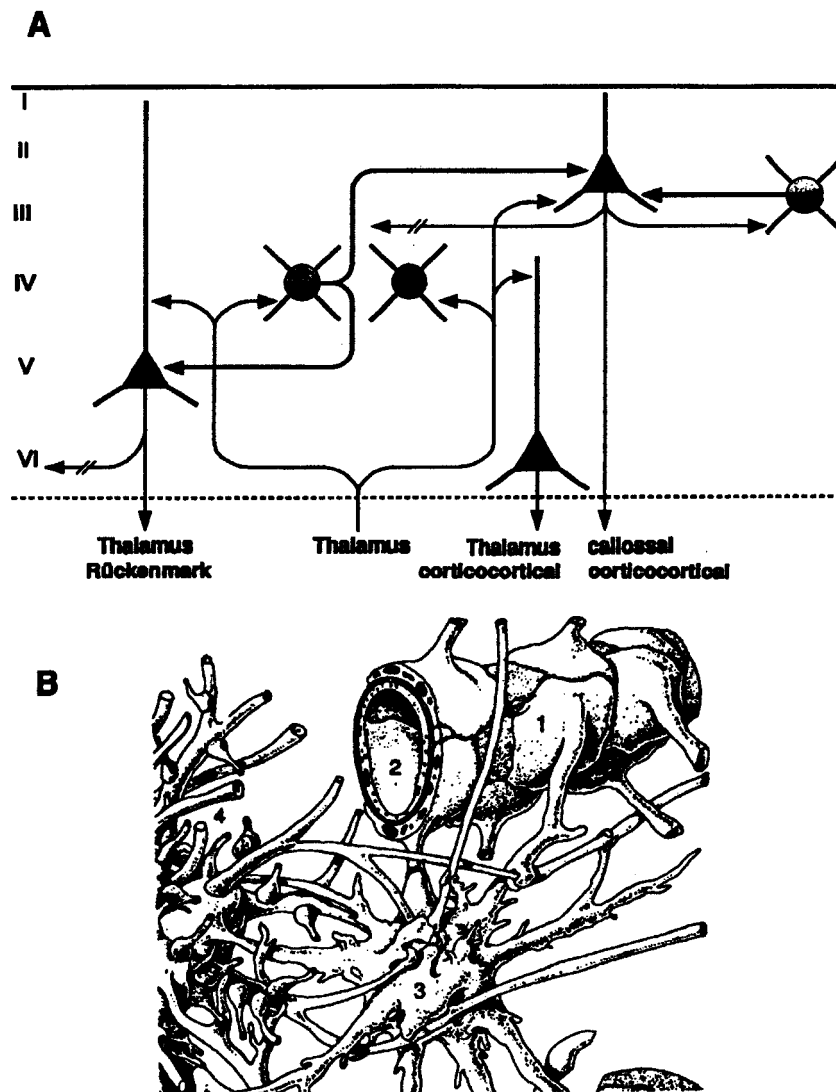
2.1 Aufbau des Neokortex

Da alle Messungen im Neokortex der Ratte stattfanden, soll auf den Bau dieses Hirnabschnitts eingegangen werden.

Das ektodermale zentrale Nervensystem (ZNS) mit Gehirn und Rückenmark ist aus Nervenzellen (Neuronen) und nicht-neuronalen Zellen (Glia-Zellen) aufgebaut. Von außen umgibt der Cortex cerebri (Großhirnrinde) haubenförmig die darunterliegende weiße Substanz (Substantia alba) des Großhirns sowie darin eingebettete Hirnkerne und wird als entwicklungsgeschichtlich jüngster Hirnabschnitt (Neokortex) angesehen. Bereits makroskopisch ist der Kortex durch eine gräuliche Farbe (Substantia grisea) von der weißen Substanz unterscheidbar. Der Neokortex gliedert sich in verschiedene Areale, die funktionell aus vertikalen Kolumnen unterschiedlicher kortikaler Responsivität aufgebaut sind (Mountcastle, 1957; Hubel, Wiesel, 1959 & 1962; Creutzfeldt, Kuhnt, 1973). Horizontal zur Kortexoberfläche lassen sich mikroskopisch unter NISSL-Färbung 6 verschiedene Schichten erkennen (I-VI):

I	Lamina molecularis
II	Lamina granularis externa
III	Lamina pyramidalis externa
IV	Lamina granularis interna
V	Lamina pyramidalis interna
VI	Lamina multiformis

Die darin befindlichen Neurone kommunizieren mittels Neurotransmitter hauptsächlich durch chemische Synapsen oder gap junctions („elektrische Synapsen“) (Dermietzel, Spray, 1993) miteinander, können durch eine exzitatorische oder inhibitorische Zellantwort Informationen hierarchisch geordnet oder parallel verarbeiten bzw. verändern (van Essen et al. 1992) und bilden so insgesamt ein funktionelles Netzwerk. Die hier vorgestellten Untersuchungen fanden alle im primär-somatosensorischen Kortex des Gyrus postcentralis adulter (Alter >28 Tage postnatal) Albinoratten des Stammes Wistar statt. Dieser Teil des Parietallappens erhält zahlreiche Afferenzen (thalamokortikal, callosal, trigeminal) und sendet corticofugale Fasern zu Thalamus, Corpus callosum, motorische Kerngebiete, Brücke, Rückenmark, sowie intrakortikalen Efferenzen zu anderen Neokortexregionen aus, deren Fasersysteme von den Axonen der Projektionsneurone gebildet werden (Abb. 3A). Die Gliazellen stellen mit 90 % den häufigster Zelltyp des Kortex (Barres, 1991) dar und werden in Astrozyten, Oligodendroglia und Mikroglia unterteilt. Astro-



zyten sind neben anderen Funktionen für die Redistribution einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration nach neuronaler Aktivität verantwortlich (Dietzel et al. 1980) und bilden

Abb. 3A (obere Abb.): Vereinfachtes Schema der afferenten thalamokortikalen, intrakortikalen und efferenten Verbindungen im Neokortex der Ratte. Der adulte Neokortex der Ratte besteht wie der anderer Säugetiere aus 6 horizontalen Zellschichten (dargestellt am linken Bildrand). Schwarze Dreiecke symbolisieren exzitatorische Pyramidenzellen (Transmitter: Glutamat), der schwarze Kreis eine multipolare Sternzelle sowie grau schraffierte Kreise veranschaulichen inhibitorische Interneurone (Transmitter: γ Aminobuttersäure (GABA)). (aus Luhmann, 1993).

3B: Neurone mit ihrem Dendritenbaum (4, links) sind von Gliazellen (3, hier nur Astrozyt) und zerebralen Kapillaren (2) umgeben, wobei letztere zusammen mit umschließenden Astrozytenfortsätzen die Blut-Hirn-Schranke („BBB“- blood-brain-barrier) bilden (aus Ganong, 1997). Unter in vitro Bedingungen hat die Blut-Hirn-Schranke keinen Einfluß.

durch eine besonders enge Kopplung mittels gap junctions ein funktionelles Synzytium (Sontheimer et al. 1990). Weiterhin bestimmen Astrozyten mit ihren Fortsätzen die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (siehe Abb. 3B) und sind über Transportproteine an der Homöostase der Neurotransmitter Glutamat und GABA beteiligt. Oligodendrocyten bilden Myelinmarkscheiden um die auswachsenden Axone heranreifender Neurone und formen gemeinsam mit Astrozyten die Trakte innerhalb der weißen Substanz (Hildebrand et al. 1993). Mikroglia stellen die immunkompetente Zelle des ZNS dar und können durch verschiedenste pathologische Reize aktiviert und stufenweise zur phagozytierenden, zytotoxischen Zelle transformiert werden. Die Präsenz und Funktion aktivierter Mikroglia stellt somit einerseits einen frühzeitigen, empfindlichen Sensor für pathologische Vorgänge unterschiedlichster Genese dar, andererseits werden die pathologischen Prozesse selbst gehemmt oder aber auch gefördert (Kreutzberg, 1996).

Die Neurone des Neokortex lassen sich morphologisch in Pyramidenzellen und nichtpyramidale Zellen unterscheiden. Ein Teil der Zellen weist an den Dendriten Dornfortsätze auf, an denen oft die Kontaktaufnahme mit anderen Zellen über exzitatorische Synapsen erfolgt. Der überwiegende Teil der laminären Schicht II/III besteht aus bedornen Pyramidenzellen, in denen immunohistochemisch Glutamat oder Aspartat nachgewiesen werden kann und die so eine exzitatorische Funktion ausüben (Feldman, 1984). Funktionell sind diese Neurone Projektionsneurone, die über kortikofugale Fasertrakte Verbindungen zu anderen Neuronen herstellen. Eine weitere exzitatorische Zelle des Neokortex ist die multipolare Sternzelle, die die Funktion eines Schaltneurons zukommt und die morphologisch viele Dornfortsätze an den Dendriten aufweist. Eine andere nichtpyramidale Zellart stellen die intrinsischen Interneurone dar, die an den Dendriten keine oder wenig Dornfortsätze erkennen lassen, histochemisch positiv auf den inhibitorischen Neurotransmitter GABA reagieren (Houser et al. 1984) und somit eine inhibitorische Funktion ausüben. Da zu den Zellarten, die im Neokortex eine selektive Vulnerabilität gegenüber pathophysiologischen Einflüssen aufweisen, Pyramidenzellen der Schicht II/ III sowie die inhibitorischen Interneurone zählen (Rosner et al. 1986; Romijn et al. 1988), fanden die extrazellulären Messungen in Schicht II/III des Neokortex statt.

2.2 Neokortikale Hirnschnittpräparation

Die Entwicklung der *in vitro* „Slice-Präparation“ stellte eine große Weiterentwicklung der neurophysiologischen Techniken dar, da so eine gezielte Isolierung und standardisierte Beeinflussung physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen möglich wurde. Die Tierpräparation zur Gewinnung der neokortikalen Rattenhirnschnitte wurde gemäß einer vorbeschriebenen Methode nach Luhmann und Heinemann durchgeführt (1992).

Insgesamt wurden für die hier vorgestellten Versuche 45 männliche Albinoratten des Stammes Wistar verwendet, wobei von jeder Ratte mehrere Hirnschnitte gewonnen wurden (4 - 10). Je-

weils zu Versuchsbeginn wurde eine 4 - 8 Wochen alte und ca. 150 – 190g wiegende Ratte in einem Deckelglas mittels Ether-getränktem Fließpapier tief narkotisiert. Nach Sistieren der Spontanatmung (ca. 30 - 60s) war aufgrund potentieller hypoxisch-ischämischer Hirnschäden schnelles Handeln notwendig; bei optimalem Verlauf dauerte die Präparation bis zur Entnahme des Hirnblocks etwa eine Minute. Die Ratte wurde schnell aus dem Deckelglas entnommen und durch eine Tierguillotine dekapitiert. Nach einem rostrokaudalen Skalpellschnitt auf der Kalotte entlang der Sutura sagittalis von Nase in Richtung Nacken konnten Fell, Haut und Muskeln manuell rasch entfernt werden. Am oberen Ende des Os occipitale und Beginn der Sutura lambdoidea wurde danach mit einem spitz zulaufendem Skalpell eingestochen und kaudal davon gelegene Kalotten- und Hirnteile (Hirnstamm, Kleinhirn, Teil der Okzipitalregion) mit zwei seitlichen, bis durch die Hirnbasis geführten Schnitten, entfernt. Dies legte den kaudalen Zugang für die Knochenschere frei und durch flache, die Kortexoberfläche möglichst nicht berührende Schnitte innerhalb der Fissura longitudinalis superior bis zum Bregma wurde der Schädel vollständig eröffnet. Die auseinander getrennten Kalottenhälften wurden zusammen mit der anhaftenden Dura mater vorsichtig mit einer Knochenzange in möglichst einer einzigen Bruchbewegung auf beiden Seite entfernt. Bei suboptimalem Präparationsverlauf konnten der Kortexoberfläche weiter anhaftenden Durateile mit feiner Pinzette entfernt werden, wobei die mit der Pinzette berührten Kortexteile anschließend verworfen und nicht zur Slicepräparation verwendet wurden. Die nun freiliegende Kortexoberfläche wurde schnell durch mehrere Tropfen 4°C kalter artifizieller zerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF) gekühlt, welche folgende Zusammensetzung (in mM/l) hatte:

NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	NaHCO ₃	Glukose
124	3	1.25	1.8	1.6	26	10

Durch 2 bis auf die Schädelbasis geführte koronare Schnitte 5 mm ventral und dorsal des Sulcus praecentralis wurde ein den primären somatosensorischen Kortex enthaltender Gewebblock (Zilles, Wree, 1985) vom übrigen Gehirn abgetrennt. Vorsichtig konnte das separierte Gehirngewebe mit einem rechtwinklig umgebogenen Spatel an der Basis des Lobus parietalis ansetzend herausgehoben und in ein Vorratsgefäß mit eiskalter (4°C), oxygenierter aCSF überführt werden. Die Oxygenierung erfolgte durch eine Begasung mit Karbogen (Gasgemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂). Nach Sättigung der aCSF-Lösung mit dem Karbogen-Gasgemisch stellte sich mit der bereits enthaltenen Bikarbonatpufferung bei 34°C ein pH-Wert von 7,4 ein. Der Gewebblock wurde nach 1 Minute weiterer Kühlung und Oxygenierung im Vorratsgefäß mit einem Spatel auf einem Filterpapier zum Abtrocknen kurz aufgesetzt und im Schlitten eines Campden Vibratoms (Campden Instr., Loughborough, UK) auf einem Teflon-Block mittels Zyanoakrylat-Sekundenkleber Krazy Glue (Borden Inc., Columbus, U.S.A.) fixiert und anschließend unter aCSF-Kühlung, die das Vibratomschneidmesser gut bedeckte, in 400µm dicke Gewebsschnitte (engl. slices) geschnitten. Diese Schnittdicke stellt bei adulten Tieren eine Sauerstoff- und Nähr-

stoffversorgung durch Diffusion auch in der Mitte des Schnittes sicher (Richards, 1981). Die obersten und untersten Schnitte wurden wegen der durch die Schnittpräparation traumatisierten Schnittfläche verworfen. Die gewonnenen Schnitte wurden danach einzeln mit einer großlumigen Pipette unter Sog zügig in eine mit aCSF gefüllte Petrischale überführt, in der der letzte Präparationsschritt stattfand: jeder koronare Hirnschnitt ergab durch Auseinandertrennung der Hemisphärenteile entlang der Fissura longitudinalis cerebri 2 endgültige Schnitte, von denen durch Skalpellschnitte ein Segment freipräpariert wurde, welches ausschließlich somatosensorischen Kortex an einem verbleibenden Rest Substantia alba enthielt.

2.3 Interface-Meßkammer

Alle Gewebsschnitte wurden nun in eine oxygenierte Vorratskammer (in Wasserbadheizung auf 32 – 33 °C temperiert) bzw. 2 x 2 Schnitte in die beiden inneren Perfusionskammern des Deckels der Interface (Grenzschicht)-Doppelmeßkammer aus dem Institutseigenbau eingebracht, die in Höhe der Schnitte eine Temperatur von 34°C sicherstellten. Die Interface-Meßkammer bestand aus Plexiglas und war auf einer magnetischen vibrationsgedämpften Arbeitsplatte fixiert. Die Kammer enthielt im unteren Teil destilliertes Wasser, das über eine Heizspirale unter Thermofühlerkontrolle erwärmt wurde. In das erwärmte Wasserbad wurde über einen mehrfach perforierten Polyethylenschlauch Karbogengas eingeleitet, befeuchtet und vorgewärmt. Über dem Wasserbad stellte sich so eine mit Wasserdampf und Karbogengas gesättigte Phase ein, die über seitliche Öffnungen mit den oberen Perfusionskammern in Verbindung stand. An der Heizung war meist ein höherer Sollwert als die gewünschte Temperatur von 34°C in Höhe der Gewebsschnitte eingestellt, da sich das gesättigte Gasgemisch beim Aufsteigen und Eindringen in die eigentliche Meßkammer im oberen Teil wieder leicht abkühlte. Die untere Schnittseite wurde in den Kammern auf Nylonnetzen oder mehreren Lagen KODAK-Linsenpapier gelagert, die eine große Diffusionsoberfläche für die zwischen den Fasern entlang laufende aCSF-Flüssigkeit bot, und kontinuierlich mit aCSF in einer Flußgeschwindigkeit der Badlösung von 1 - 1,2 ml/min umspült. Die umspülende Badlösung wurde über Polyethylenschläuche mittels Abimed-Peristaltikpumpe aus einem Vorratsgefäß zugeführt, das in einer Wasserbadheizung vorgewärmt wurde. Sollte eine Testsubstanz eingewaschen werden, wurde der zuführende Schlauch in ein anderes Vorratsgefäß mit der in einer gewünschten Konzentration gelösten Substanz umgehängt. Vor Beginn der Messungen wurden die Schnitte 1 Stunde inkubiert, wobei beide inneren Kammern mit Filterpapier abdeckt wurden, um die Gasphase über der oberen Schnittseite gesättigt zu halten und ein potentielles Austrocknen der Schnittoberfläche zu verhindern, da der Hirnschnitt sehr sensibel auf ein Austrocknen an der Oberfläche reagiert. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß der Hirnschnitt durch herabfallende Tropfen aus einer übersättigten Gasphase traumatisiert werden kann. Unter Abdeckung der Meßkammer mit Filterpapier stellte

sich dann ein System ein, in dem der inkubierte Schnitt allseits mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm umspült und mit Nährstoffen versorgt wurde sowie an der Oberfläche zusätzlich mit einem gesättigten Karbogas begast wurde. Insgesamt ermöglicht dieses Verfahren eine sichere Oxygenierung des Hirnschnittes auch im Inneren und ein gutes Ableiten von extrazellulären Feldpotentialen über Extrazellulärelektroden, die unter mikroskopischer Sichtkontrolle im Schnittpräparat positioniert wurden ein. Der gesamte Aufbau war von einem Faraday-Käfig umgeben, um „noise“-Artefakte der zahlreichen umgebenden 50-Hz-Stromnetzkaabel zu reduzieren.

2.4 Verwendete Testsubstanzen

Die für die *in vitro* Untersuchungen verwendeten Substanzen wurden mit destilliertem Wasser als konzentrierte Stammlösung hergestellt, in Einzeldosen pipetiert und bei -18°C eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurde die gewählte Testsubstanz aufgetaut und auf die gewünschte Konzentration mit aCSF verdünnt. Verwendet wurden in Badapplikation:

-der selektive AMPA-Rezeptor-Antagonist 6-Nitro-7-sulphamoylbenz(f)quinoxalin-2,3-dion (NBQX; Novo Nordisk, $10\ \mu\text{M}$)

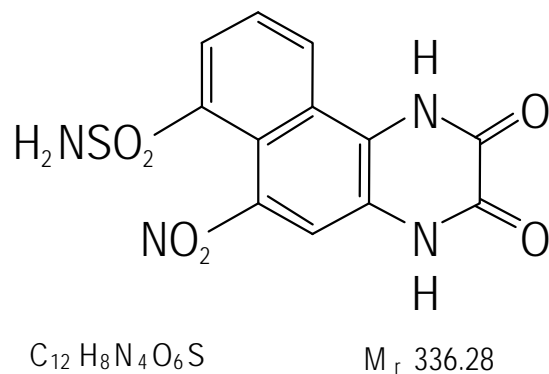


Abb. 4a. Struktur von NBQX

- der selektive NMDA-Rezeptor-Antagonist Ketamin (als Hydrochloridsalz; Sigma, $100\ \mu\text{M}$)

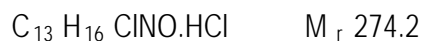
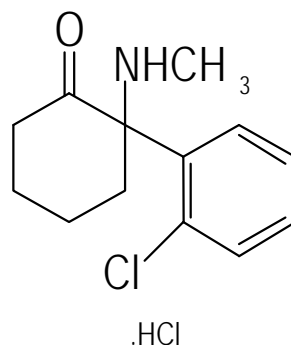
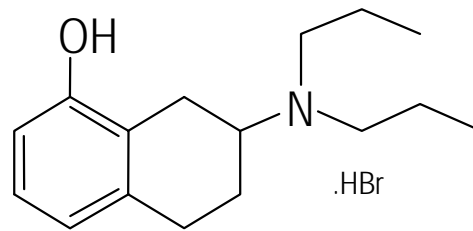


Abb. 4b. Struktur von Ketamin

-der selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist (±)-8-Hydroxy-2-(di-n-propylaminotetralin)hydrobromid (8-OH-DPAT; Sigma; 1, 10 und 100 μM)

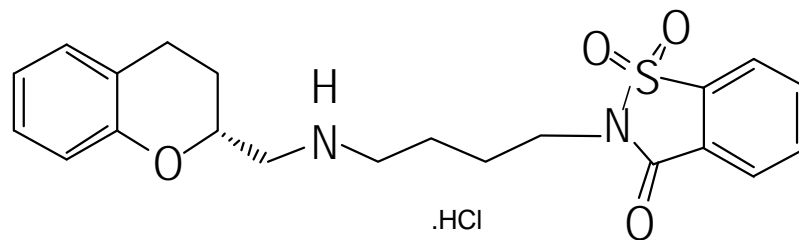


C₁₆ H₂₅ NO.HBr

M_r 328.29

Abb. 5. Struktur von 8-OH-DPAT

-der selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist (-)-(R)-2-[4-[(Chroman-2-ylmethyl)amino]butyl]-1,1-dioxo-1,2-benzisothiazol-3(2H)-onmonohydrochlorid (BAY x 3702; Bayer AG; 1, 10 und 100 μM)



C₂₁H₂₄N₂O₄S.HCl

M_r 436.96

Abb. 6. Struktur von BAY x 3702

2.5. Elektrophysiologische Ableittechnik

Alle elektrophysiologischen Ableitungen erfolgten in Schicht II/III des primär somatosensorischen (Par1 Region) in einem Segment des Parietallappens der adulten Wistar-Ratte (Abb. 7A, 1-2). Für die Feld- und DC-Potentialaufzeichnung wurden 2-5 M Ω messende Mikroelektroden verwendet, die aus einlumigen Thetaglaskapillaren hergestellt und dazu an einem vertikalen Elektrodenziehgerät unter starkem Erwärmen auf eine Spitze von etwa 1 μ m ausgezogen wurden. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde jede nur einmal zu verwendende Glaselektrode kurz vor einem Versuch auf ca. 3 μ m Öffnungsdurchmesser mechanisch zurückgebrochen. Vor Versuchsbeginn wurde die Glaselektrode mittels Injektionsspritze blasenfrei mit aCSF gefüllt, ein chlorierter Silberdraht eingebracht und durch einen Manipulator in gute Position zum Hirnschnitt gebracht und schließlich unter mikroskopischer Sichtkontrolle in Schicht II/III des Hirnschnittes positioniert. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte es, Konzentrationsänderungen aller extrazellulären Ionen durch transmembranalen Ionenströme infolge von Neuronenaktivität im Hirnschnitt als elektrische Potentialänderungen durch die elektrisch leitende aCSF Lösung und den Chloriddraht auf einen Vorverstärker zu übertragen. Um von einer konstanten Zellanzahl, die zu diesem Signal beitragen, ausgehen zu können, verblieb jede der Elektroden an ihrem ursprünglichen Ort zu Beginn der Messung. Eine Impedanzwandlung ermöglicht die Registrierbarkeit des Signals, das durch den Vorverstärker 10fach verstärkt wurde, nach einem Tiefpaß von hohen Störfrequenzen befreit und nochmals 100fach nachverstärkt wurde.

Das verhältnismäßig langsame SD-Signal wurde mit einem Einkanalthermoschreiber oder bei dem Versuch mit einer 8fach-Extrazellulärelektrode mittels 8-Kanalschreiber aufgezeichnet. Schnelle Signalveränderungen wie die der evozierten synaptischen Aktivität wurden mit einem Speicheroszillographen festgehalten und auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Beide Potentiale wurden neben der graphischen Darstellung nach analog-digitaler on-line Wandlung auf einem Labor-PC mittels des TIDA Softwareprogramms (Heka Electronic, Lambrecht) auf der Computerfest-

Abb. 7. A: Schematische Darstellung eines Rattengehirns, der knöchernen Schädel ist entfernt (A). (A1) Laterale Gesamtansicht. Die vertikale Linie markiert die Schnittebene zur Gewinnung der koronalen Hirnschnitte. (A2) Veranschaulichung der einzelnen Kortexte eines Koronalschnittes. Fr1 und 3: frontaler Kortex, primäres Motorkortexareal; Fr2: frontaler Kortex, supplementäres Motorkortexareal; HL: hindlimb, sensomotorisches Areal; Par1: parietaler Kortex, primäres somatosensorisches Areal, Par2: parietaler Kortex, sekundäres somatosensorisches Areal. Nach (Mittmann, 1994). Darstellung des Versuchsaufbaus im neokortikalen Schnittpräparat des Areals Par1 der Ratte (B). Eine mit aCSF gefüllte extrazelluläre Glaselektrode befindet sich in Schicht II/III. Über eine bipolare Reizelektrode Schicht VI wurden afferente Fasern stimuliert (\bullet), die zu den Neuronen der Schicht II/III projizieren und deren synaptische Feldpotentialantworten registriert. Daran anschließend wurde ein Tropfen aus einer mit 3 M KCl-Lösung gefüllten Glaselektrode ca. 200 μ m lateral der aCSF Elektrode auf die Schnittoberfläche appliziert. Dieses Verfahren löst eine typische spreading depression aus. Die eintretende Veränderung des extrazellulären DC-Potentials wurden mit einem XY-Schreiber sowie on-line mit einem Computer aufgezeichnet.

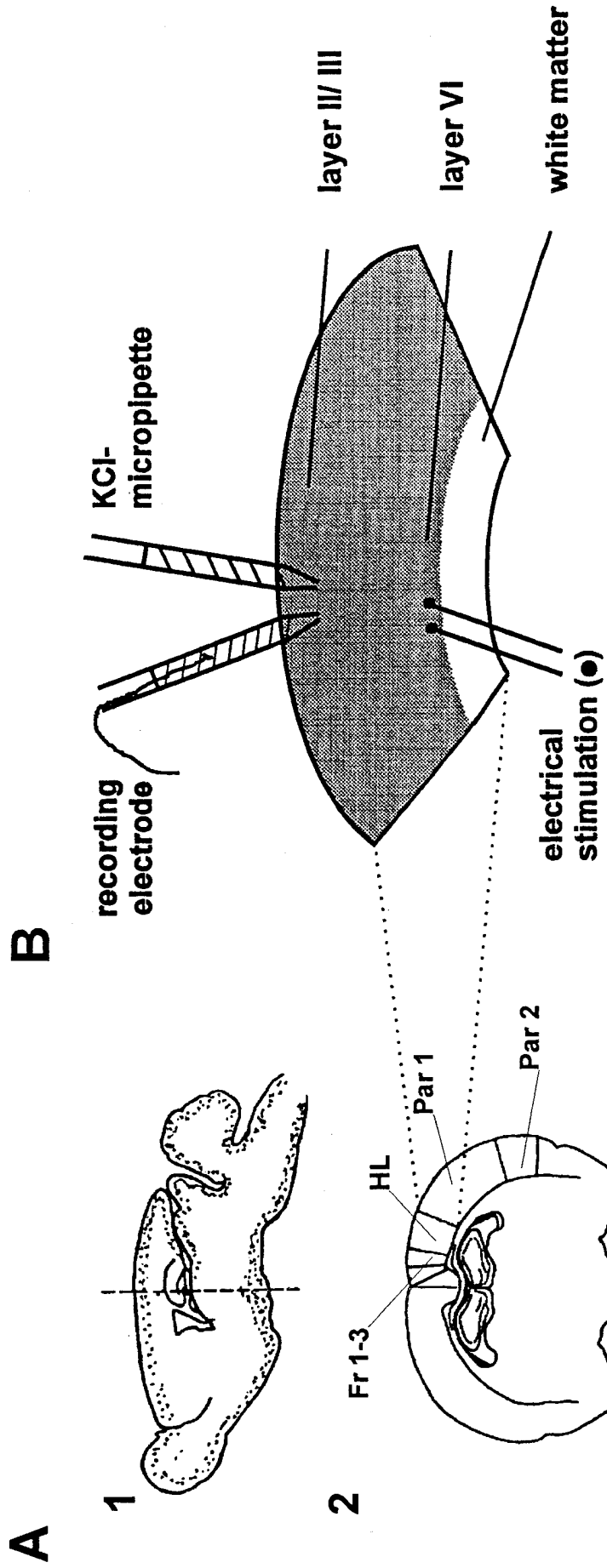


Abb. 7.

platte gespeichert sowie off-line ausgewertet.

2.5.1 Synaptisch-evozierte Feldpotentiale

Zum Hervorrufen einer synaptischen Extrazellulärantwort supragranulärer Zellpopulationen wurden thalamokortikale Afferenzen in Schicht VI des Neokortex kurz über der beginnenden Substantia alba mittels parallel zur pialen Oberfläche mit in den Hirnschnitt eingeführten Reizelektrode orthodrom gereizt (Abb. 7B). Die dazu benötigte bipolare Reizelektrode wurde aus scharfen Wolframdrahtelektroden gefertigt, die in bilumiges Thetaglas so eingelassen wurden, daß sie noch ca. 1 cm aus dem Thetaglas herausragten. Mit erwärmten Schellack wurden sie danach in der Glaskapillare fixiert. An zwei Platin-Iridiumdrähte, die mit den Elektroden verbunden und auch jeweils durch Schellack voneinander separiert waren, wurden zwei Silberdrähte angelötet, die später die Verbindung zur Reizisoliereinheit herstellten. An der Reizisoliereinheit war die Reizstärke (2 - 40 V) einstellbar, wobei das Gerät selbst durch ein Reizgenerator (Master 8 A.M.P.I.) angetriggert wurden. Am Reizgenerator war die gewünschte Stimulationsdauer (200 μ s) und der Interstimulusintervall (15 - 20 ms) frei wählbar. Die durch orthodrome Stimulation afferenter Nervenfasern evozierten synaptischen Antworten postsynaptischer Zellen konnten mit der extrazellulären Feldelektrode in Schicht II/III registriert werden. Obwohl die transmembranalen Ströme einer einzelnen aktivierten Zelle mit dieser Methode nicht aufgezeichnet werden kann, kommt es durch die Aktivierung einer Vielzahl von Zellen, zu denen die gereizten Afferenzen projizieren, zu einer ausreichenden Summation des Signals, um über die elektrisch leitenden aCSF-Lösung registriert zu werden. Elektrophysiologische Messungen wurden nur in Hirnschnitten ausgeführt, deren Feldpotentialantwort, gemessen als absoluter Betrag der Differenz von positivster und negativster Potentialspitze (FP1 bzw. FP2), mindestens 1mV betrug („peak-to-peak“-Feldpotentialantwort) und eine intakte Doppelpulshemmung aufwiesen. Ein Doppelpulsprotokoll mit dem vorgenannten Interstimulusintervall von 15 - 20 ms wurde verwendet, um die Intaktheit von Verbindungen vor Versuchsbeginn zu kontrollieren bzw. den Einfluß einer oder mehrerer SDs auf die exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission zu ermitteln. Die Reizung thalamokortikaler Afferenzen zu Pyramidenzellen der Schicht II/III bewirkt eine gleichzeitige Aktivierung von Kollateralen zu inhibitorischen Interneuronen in den granulären Schichten. Die Stimulierung dieser hemmenden Interneurone bewirkt die Auslösung eines GABA vermittelten schnellen inhibitorischen postsynaptischen Potentials (f-IPSP), das auf Pyramidenzellen supragranulärer Schichten hyperpolarisierend und hemmend wirkt. Bei dem verwendeten Interstimulusintervall beträgt die Unterdrückung der Feldpotentialantwort in Schicht II/III auf den zweiten orthodromen Reiz im Durchschnitt 50-70 % (Luhmann, Heinemann, 1992). Die Stärke dieser sogenannten Doppelpulshemmung ist aufgrund einer höheren Reizschwelle der inhibitorischen Schaltkreise stark von der Eingangsreizstärke der thalamokortikalen Afferenzen und ihrer Kollateralen abhängig, da die inhibitorischen Interneurone bei einer verminderten Reizung der zu ihnen projizierenden afferenter Fasern auch eine verminderten Menge des inhibitorischen Neurotransmitter GABA freisetzen. Deshalb erfolgte eine Standardisierung der Feldpoten-

tialaufzeichnung durch eine Verdopplung der Stimulusintensität, die notwendig war, um eine maximale Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus zu erzielen. Die maximale Feldpotentialantwort war erreicht, wenn die Amplitude auf den ersten Reiz gemessen als Betrag der Feldpotentialantwort vom negativsten bis zum positivsten Wert, bei Erhöhung der Reizstärke nicht mehr zunahm. Die Ermittlung der Effizienz der GABAergen intrakortikalen Inhibition erfolgte aus der Berechnung der relativen Hemmung der Feldpotentialantwort auf den zweiten Stimulus gemäß der Formel (Luhmann, Heinemann, 1992):

$$\text{Doppelpulshemmung [\%]} = \frac{\text{Feldpotential1 (FP1)} - \text{Feldpotential2 (FP2)}}{\text{Feldpotential1 (FP1)}}$$

2.5.2 Induktion der Spreading depression (SD)

Die extrazelluläre Kaliumkonzentration beträgt im Gehirn unter physiologischen Bedingungen 3 mM und kann sich während neuronaler Aktivität auf 12 mM erhöhen (Somjen, 1975; Somjen, 1979). Während einer spreading depression kann die Kaliumkonzentration auf Werte von 40 - 60 mM ansteigen (Lauritzen, Hansen, 1992). Diese Sequenz wurde mit der extrazellulären Mikrotropfenapplikation einer 3 M KCl Lösung aus einer Mikrokapillare (Durchmesser 33 - 36 µm) 200 µm lateral von der die DC-Potentialänderung aufzeichnenden Extrazellulärelektrode vorweggenommen und führte zur reproduzierbaren Auslösung einer typischen spreading depression. Die Negativierung des DC-Potential erfolgte abrupt und ohne jegliche Latenzzeit.

2.6 Untersuchungsparameter und statistische Auswertung

Bei extrazellulären Messungen in Schicht II/III des Neokortex der adulten Ratte wurden im allgemeinen nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde Parameter nach folgendem Schema untersucht:

- bei Versuchsbeginn Überprüfung der Intaktheit des Schnittes anhand der transienten Feldpotentialänderung auf einen orthodromen Doppelstimulus (FP1 bzw. FP2)
- Auslösung einer SD und Aufzeichnung der assoziierten DC-Potentialänderung (SD1)
- ggf. Einwaschen einer Substanz für 30 min
- wiederum Auslösen einer Feldpotentialantwort (FP1 bzw. FP2)
- erneute Auslösung einer SD und Aufzeichnung der assoziierten DC-Potentialänderung.

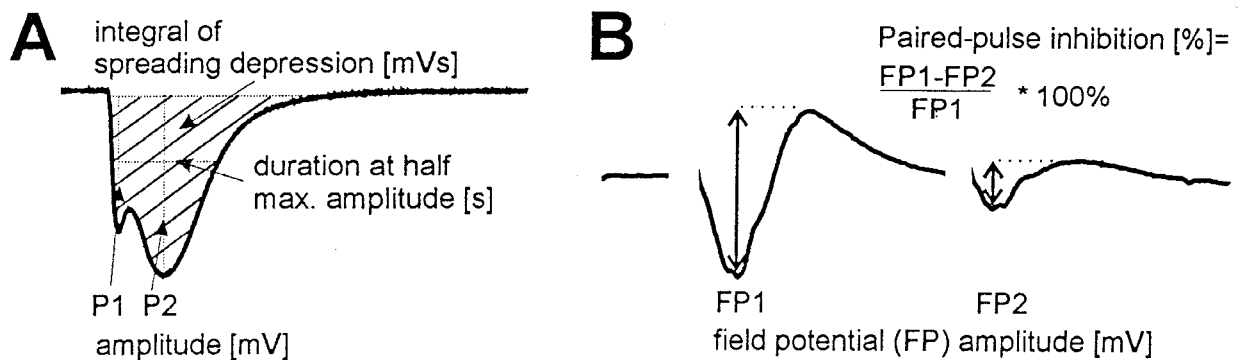


Abb. 8. A: Typischer Verlauf einer KCl-induzierten spreading depression (SD). Die starke Potentialnegativierung entspricht der SD-assoziierten DC-Potentialänderung. Die Pfeile weisen auf die analysierten SD-Parameter: Amplitude (getrennt nach erstem (P1) und ggf. zweitem Maximum (P2), jeweils in mV; Dauer bei halbmaximaler Amplitude in s sowie Integral der SD in mVs.

B: Repräsentatives Beispiel von durch einen elektrischen Doppelreiz ausgelösten Feldpotentialantworten (FP, jeweils in mV). Die Amplitude einer FP-Antwort auf den zweiten Reiz (FP2) ist je nach Interstimulusintervall und Reizintensität deutlich kleiner als die erste FP-Antwort (FP1). Die Effizienz der intrakortikalen GABAergen Inhibition kann aus dem Verhältnis der Hemmung der zweiten Antwort zur ersten Antwort quantifiziert werden (paired-pulse inhibition, [%]). Negative Potentiale in A und B sind jeweils nach unten aufgezeichnet, die Stimulusartefakte wurden entfernt.

Die Überprüfung der synaptischen Feldpotentialantwort erfolgte durch orthodrome Doppelpulsreizung im Abstand von 20 s. Die so gewonnenen 10 - 12 Feldpotentialantworten wurden PC-gestützt gemittelt und die Amplitude der ersten Feldpotentialantwort (FP1), die Amplitude der zweiten Feldpotentialantwort (FP2) sowie die Stärke der Doppelpulshemmung ermittelt. Betrug FP1 mindestens 1 mV und die Doppelpulshemmung mindestens 40 % wurde der Schnitt verwendet. Zur nun folgenden Auslösung der spreading depression wurde die Tropfenapplikation angewandt. Dabei wurde ein Mikrotropfen der KCl-Lösung aus einer stumpf gebrochenen Glaselektrode 200 µm lateral der aufnehmenden Extrazellulärelektrode direkt auf die Hirnschnittoberfläche appliziert. Nach 3 - 4 s erfolgte der abrupte Beginn der DC-Potentialnegativierung einer SD. Da die verwandten Mikropipetten immer auf einen gleichen Öffnungsdurchmesser von 33 - 36 µm gebrochen waren, ist von einem konstanten Tropfenvolumen auszugehen. Die so aufgezeichnete SD wurde auf die maximale negative Amplitude (Peak1), gegebenenfalls auf eine nach einer relativen Positivierung folgende zweite negative Amplitude (Peak2), auf die Dauer bei halbmaximaler Amplitude sowie auf die Fläche unterhalb der Ausgangslinie (Integral) untersucht. Eine Übersicht der Untersuchungsparameter gibt Abb. 8. In der Versuchsreihe der Ermittlung der Ausbreitungsgeschwindigkeit mit einer 8fach-Extrazellulärelektrode fand keine Auswertung der Feldpotentiale statt, da die Reizelektrode nur unter der ersten Feldpotentialelektrode in den Hirnschnitt eingeführt und dort belassen wurde, da ein mehrfaches Umsetzen unter die

verbleibenden 7 Elektroden den Schnitt umfangreich traumatisiert hätte und bei jeder Reizung eine unterschiedlich große Zellpopulation erregt worden wäre.

Da Testreihen bei einem hier vorliegenden Stichprobenumfang von $n = 8 - 10$ nicht normalverteilt sind, wurden zur PC-gestützten Analyse auf signifikante Unterschiede nichtparametrische statistische Tests unter Verwendung der Programme Excel und SPSS herangezogen. Zum Vergleich von mehreren verbundenen Stichproben kam der Friedmann-two-way-ANOVA-Test zum Einsatz. Beim Vergleich von 2 verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test, bei 2 nicht verbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Als signifikant wurden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bei $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**) angesehen. Wenn nicht anders angegeben, erfolgt die Angabe der Messwerte als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung.

3. ERGEBNISSE

3.1 Funktionelle Eigenschaften der repetitiven spreading depression *in vitro*

3.1.1 Ausbreitungsmuster der spreading depression *in vitro*

In dieser Versuchsgruppe wurde der elektrophysiologische Parameter Ausbreitungsgeschwindigkeit einer SD ($n = 12$) erfaßt. Die KCl-Applikation auf einen koronalen Hirnschnitt der ParI Region, der Teile des somatosensorischen Kortex und der darunterliegenden weißen Substanz enthielt, gestattete die reproduzierbare Auslösung einer einzelnen SD-Welle. Die on-line Digitalisierung auf einem Labor-PC sowie kontinuierliche analoge Aufzeichnung mit einem Mehrkanalschreiber gestatteten die Identifizierung einer SD anhand (1) der typischen Form (siehe Abb. 8A), (2) des abrupten Beginns der Negativierung des DC-Potentials sofort nach KCl-Applikation (3) der großen negativen Amplitude zwischen durchschnittlich -10 und -40 mV und (4) der Rückkehr der SD-assoziierten der Negativierung des DC-Potentials zur Ausgangslinie innerhalb von 1- 2 min. Unter diesen Bedingungen wurde mit einer speziellen 8-fach Extrazellulärelektrode, deren einzelne Elektroden ca. 0,5 mm voneinander entfernt waren, die Zeit bestimmt, die das DC-Potential benötigte, um während der räumlichen Ausbreitung in mediolateraler Richtung die jeweils nächste Elektrode zu erreichen. Die so ermittelte Ausbreitungsgeschwindigkeit einer SD im Neokortex unter *in vitro* Bedingungen betrug durchschnittlich $3,77 \pm 1,85$ mm/min ($n = 12$, Abb. 9), ein typischer mediolateraler Ausbreitungsverlauf ist in Abb. 10. gezeigt.

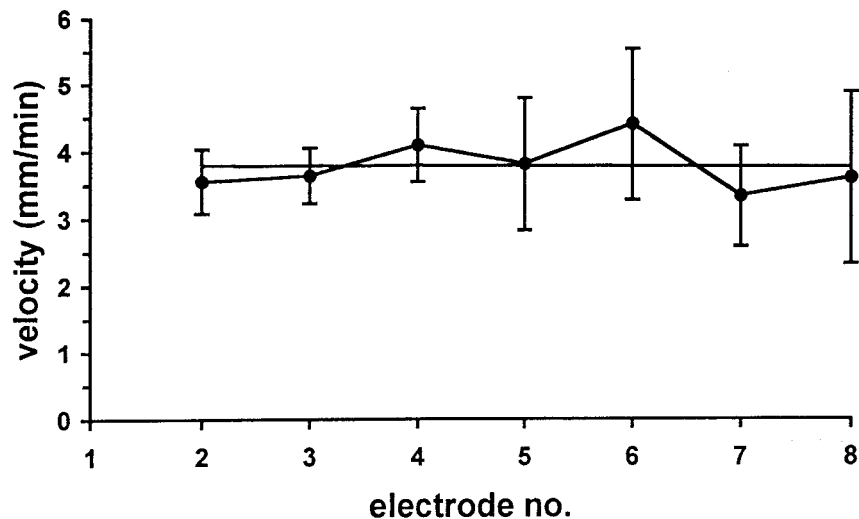


Abb. 9. *Quantitative Darstellung der Ausbreitungsgeschwindigkeit einer SD, die sich in mediolateraler Richtung im Neokortex der Ratte entlang von 8 Extrazellulärelektroden ausbreitet ($n = 12$). Die Geschwindigkeit an jeder Elektrode, die jeweils 0,5 mm von einander entfernt waren, ist als arithmetisches Mittel (schwarzer Punkt) mit dem Standardfehler des Mittelwertes (T-Balken in positiver und negativer Richtung) aufgetragen.*

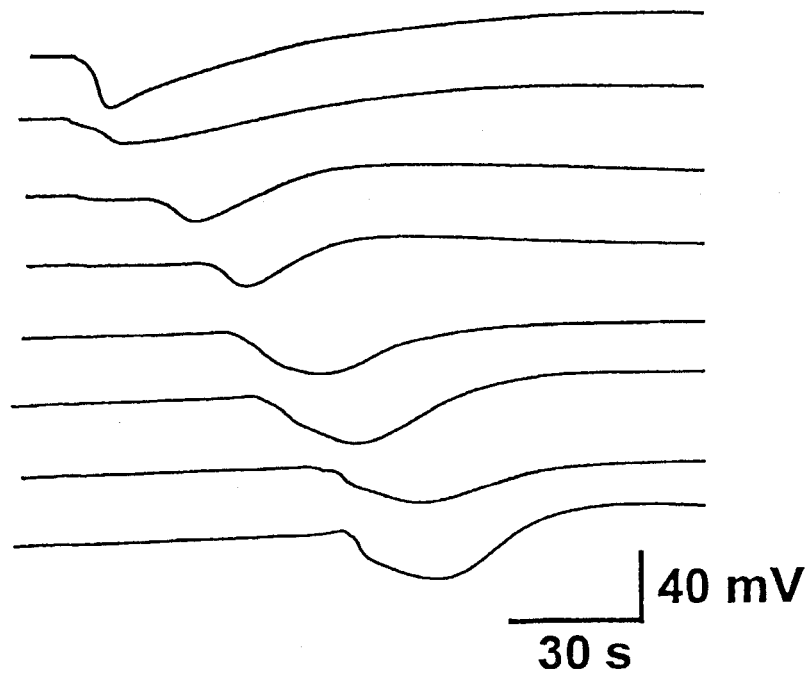
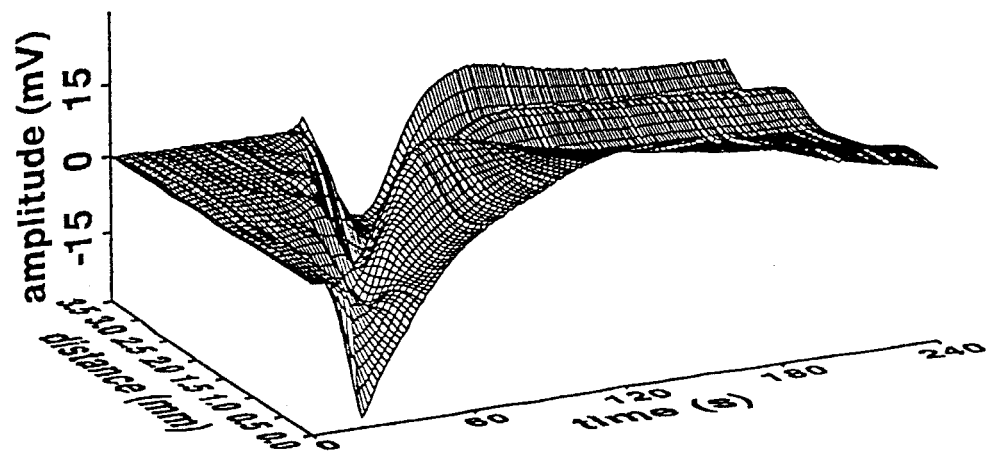
A**B**

Abb. 10. A: Graphische Darstellung eines typischen Beispiels der mediolateralen Ausbreitung einer KCl-induzierten spreading depression entlang von 8 Extrazellulärelektroden im Neokortex der Ratte. B: Gleiche Registrierung wie in A, hier aber als computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion des Ausbreitungsmusters der SD gezeigt.

3.1.2 Funktionelle Eigenschaften der repetitiven spreading depression

In dieser Versuchsgruppe wurden die funktionellen Eigenschaften einer vierfachen spreading depression ($n = 14$) in supragranulären Schichten des primären somatosensorischen Kortex von adulten (> 28 Tage) Ratten anhand von Messungen der SD-assoziierten Veränderungen des extrazellulären DC-Potentials untersucht. Um einen potentiellen Effekt der repetitiven SD auf die Funktion der exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Transmission zu erfassen, wurden vor der ersten SD (Kontrollbedingungen) sowie ca. 5 min vor jeder weiteren SD die extrazellulären Feldpotentialantworten ($n = 54$) auf einen orthodromen Doppelpuls registriert. Eine SD wurde nach der Registrierung des dazugehörigen Feldpotentials von der Auswertung ausgeschlossen, da die Repolarisierungszeit deutlich länger als 60 s betrug. Nach der ersten SD wurden dabei im Abstand von jeweils 30 Minuten an der gleichen Stelle in Schicht II/III des Neokortex drei weitere SD-Episoden ausgelöst. Die hier *in vitro* simulierte Frequenz von 2 SD-Depolarisationen pro Stunde liegt im Bereich der SD-Häufigkeit, wie sie unter *in vivo* Bedingungen in der Randzone ischämischer Hirninfarkte beobachtet wird (Hossmann, 1996).

Bei den ausgewerteten 53 SD-Wellen waren bei 35 (66 %) deutlich 2 Komponenten erkennbar, die nachfolgend auch als „peak“ 1 (P1) und „peak 2“ (P2) (nicht gefüllter bzw. gefüllter Pfeil in Abb. 11, Reihe B) bezeichnet werden. Nach einer ersten Spitze mit einer gemittelten Amplitude von $21,2 \pm 6$ mV trat dabei eine zweite Spitze mit einer Amplitude von $23 \pm 5,6$ mV auf. Bei 13 SD-Wellen (25 %) war nur die erste Komponente mit einer Amplitude von $18,8 \pm 4,8$ mV ($n = 13$) nachweisbar. Bei 5 Ableitungen bestand die SD nur aus der zweiten, späten Spitze mit einer Amplitude von $20,5 \pm 4,0$ mV ($n = 5$). Von SD1 über SD2 und SD3 bis SD4 veränderten sich die Amplituden der beiden SD-Komponenten unter dem beschriebenen Versuchsprotokoll nicht signifikant ($p = 0,729$ für den Vergleich aller P1 Amplituden sowie $p = 0,334$ für den Amplitudenvergleich aller P2, Friedmann-two-way-ANOVA-Test; Abb. 12A). So betrug die Durchschnittsamplitude von P1 bzw. P2 der ersten SD $19,4 \pm 4,2$ mV ($n = 11$) bzw. $24 \pm 5,7$ mV ($n = 10$). Nach 30 min waren diese Werte bei SD2 nicht signifikant verändert und wurden mit

Abb. 11. Eigenschaften repetitiver SD-Episoden (B, SD1 - SD4) und ihr Einfluß auf orthodrom evozierte Feldpotentialantworten (A, 1 - 4) im somatosensorischen Kortex (Par I) der Ratte. Ca. 5 min vor der extrazellulären Registrierung des DC-Potentials einer durch KCl in Schicht II/III ausgelösten SD (SD1 - SD4) wurde die mit einer orthodromen Doppelpulsstimulation (••, Einzelstimulusdauer 200 μ s, Interstimulusintervall 15 - 20 ms) hervorgerufene synaptische Aktivität supragranulärer Schichten als Feldpotentialantworten (A1 - 4) aufgenommen. Die Spuren 1 - 4 unter A sind gemittelte Antworten aus jeweils 12 nacheinander im Abstand von 20 s aufgenommenen extrazellulären Feldpotentialregistrierungen. A1 repräsentiert die Feldpotentialantwort unter Kontrollbedingungen vor der ersten SD (Reihe B SD1). Deutlich erkennbar ist eine Verminderung der Doppelpulshemmung durch die jeweils größer werdende 2. Feldpotentialantwort (A2 - 4) bei etwa gleichbleibender 1. Feldpotentialantwort (A2 - 4) mit steigender Anzahl der SD-Episoden. Die SD-Amplitude, die Dauer der SD bei halbmaximaler Amplitude und das SD-Integral bleiben dabei von SD zu SD etwa konstant (SD1 - SD4). Die Pfeile unter einer SD kennzeichnen die beiden SD-Komponenten (nicht gefüllter Pfeil weist auf P1, gefüllter Pfeil zeigt zu P2).

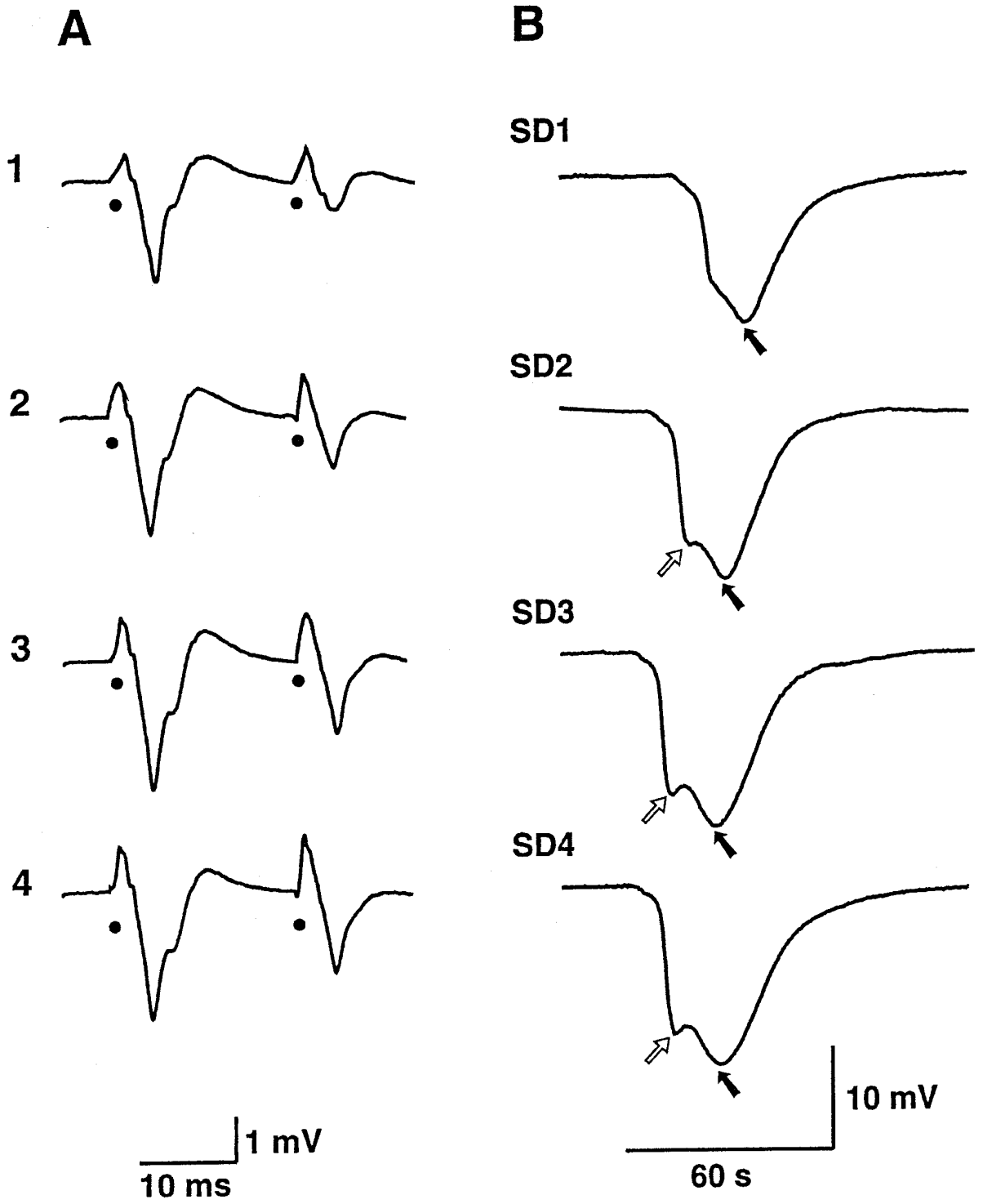


Abb.11.

21,0 ± 6,1 mV (n = 13) bzw. 23,4 ± 5,3 mV (n = 10) ermittelt. Bei SD3 ergab sich eine durchschnittliche Amplitude von P1 bzw. P2 von 20,6 ± 6,2 (n = 13) bzw. 21,2 ± 5,2 (n = 11). Nach etwa 90 min umfaßte die gemittelte Amplitude von SD4 21,3 ± 6,8 mV (P1; n = 11) und 22,3 ± 6,1 mV (P2; n = 9).

Auch die bei halbmaximaler Amplitude gemessene durchschnittliche SD-Dauer (Abb. 12B) sowie das gemittelte SD-Integral (Abb. 12 C) zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der 4 SD-Wellen (p = 0,0818 bzw. p = 0,2197; Friedmann-two-way-ANOVA-Test). Die ermittelte durchschnittliche SD-Dauer bewegte sich von SD1 zu SD2 zwischen 30,2 ± 10 s (n = 14) und 30,5 ± 9,5 s (n = 14). Diese Dauer verringerte sich bei SD3 auf 27,2 ± 9,7 s (n = 14) bzw. erhöhte sich bei SD4 auf 32,1 ± 12 s; n = 11, beides jeweils nicht signifikant. Das Durchschnittsintegral betrug bei SD1 778 ± 372 mVs (n = 14), 762 ± 332 mVs (n = 14) bei SD2 und 621 ± 287 mVs (n = 14) bzw. 759 ± 407 mVs (n = 11) bei SD4 und variierte damit auch ausschließlich nicht signifikant. Eine Übersicht der gesamten ermittelten quantitativen SD-Parameter bei Auslösung im Intervall von 30 min an der selben neokortikalen Stelle gibt Tabelle 1 sowie Abb. 12 A - C.

SD	Peak 1 (P1) [mV]	Peak 2 (P2) [mV]	Dauer bei halbmaximaler Amplitude [s]	Integral [mVs]
1.	19,4 ± 4,2; n = 11	24 ± 5,7; n = 10	30,2 ± 10; n = 14	778 ± 372; n = 14
2.	21,0 ± 6,1; n = 13	23,4 ± 5,3; n = 10	30,5 ± 9,5; n = 14	762 ± 332; n = 14
3.	20,6 ± 6,2; n = 13	21,2 ± 5,2; n = 11	27,2 ± 9,7; n = 14	621 ± 287; n = 14
4.	21,3 ± 6,8; n = 11	22,3 ± 6,1; n = 9	32,1 ± 12; n = 11	759 ± 407; n = 11

Tab. 1. Tabellarische Darstellung der relativ konstant bleibende SD-Parameter Amplitude (als separat gemessene P1 und P2), Dauer bei halbmaximaler Amplitude und Integral im Verlauf einer repetitiven, 4fachen SD als arithmetischer Mittelwert ± Standardabweichung; Anzahl.

Da unter diesem Kontrollbedingungen alle Parameter von den ersten 2 hintereinander ausgelösten SD nahezu konstant blieben, wurde das Verfahren - Auslösen der Kontroll-SD - Auslösen einer zweiten SD nach 30 min - auch bei der späteren Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die SD angewendet, d.h. signifikante Änderungen von Amplitude, Dauer oder Integral der zweiten SD können in diesem Modell mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit allein auf die Substanz zurückgeführt werden.

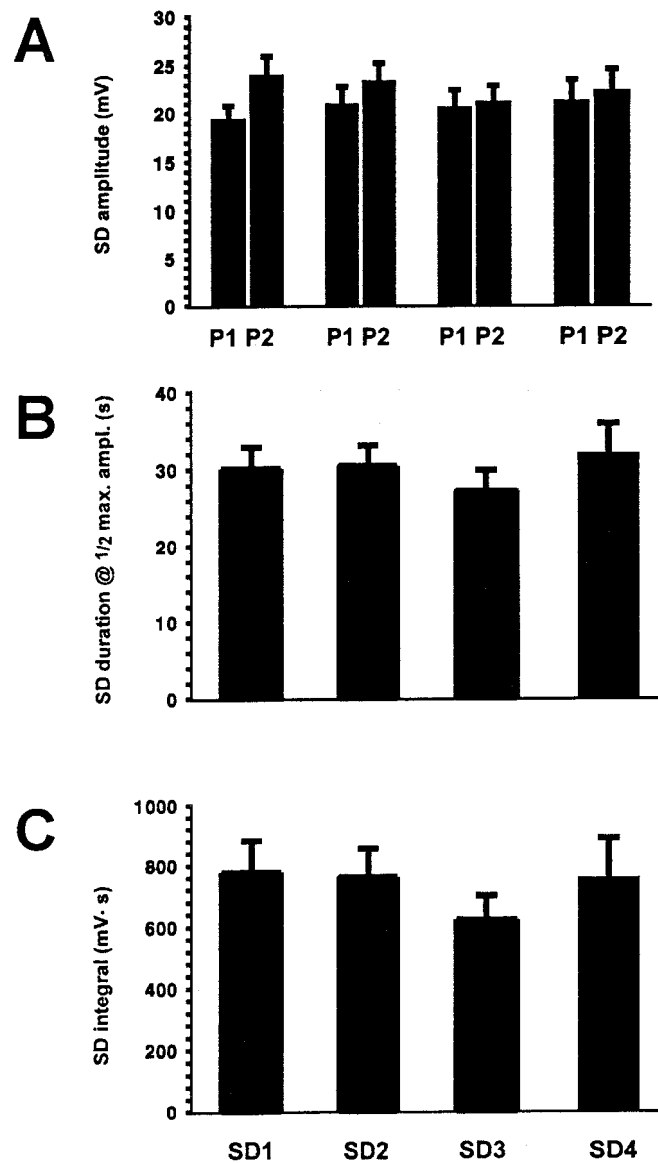


Abb. 12: Durchschnittliche Amplitude (A), Dauer bei halbmaximaler Amplitude (B) und Integral (C) von vier im Abstand von 30 min ausgelösten SD-Episoden in vitro. P1 und P2 (A) symbolisieren die in Abb. 11 mit weißen bzw. schwarzem Pfeil gekennzeichneten beiden SD-Komponenten. Alle Werte sind als arithmetischer Mittelwert (Säulen) mit jeweiligem Standardfehler des Mittelwertes (T-Balken der Säule) dargestellt; jeweilige Anzahl siehe Text.

3.2 Einfluß der repetitiven SD auf die synaptische Transmission

Um den Effekt der repetitiven SD auf die exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission zu erfassen, wurden ca. 5 Minuten vor der Auslösung einer SD in der neokortikalen Schicht II/III 12 orthodrom evozierte Feldpotentialantworten aufgezeichnet, die durch einen Doppelreiz in der darunterliegenden Schicht VI ausgelöst wurden. Die 12 Feldpotentialantworten auf die orthodrome Stimulation wurden computergestützt gemittelt und quantitativ ausgewertet. Dementsprechend spiegeln die zuerst aufgezeichneten Feldpotentialantworten (Abb. 11 A1; Abb. 14A SD1) die Verhältnisse unter Kontrollbedingungen, die zweiten evozierten Potentiale (Abb. 11 A2; Abb. 14A SD2) die synaptische Funktion nach einer SD, die dritten Feldpotentialantworten (Abb. 11 A3; Abb. 14 SD3) die Stärke der exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Transmission nach 2 SD-Episoden usw. wieder. Während einer SD sind die exzitatorischen synaptischen Antworten stark vermindert so daß eine quantitative Auswertung in diesem Zeitraum nicht möglich ist (Abb. 13).

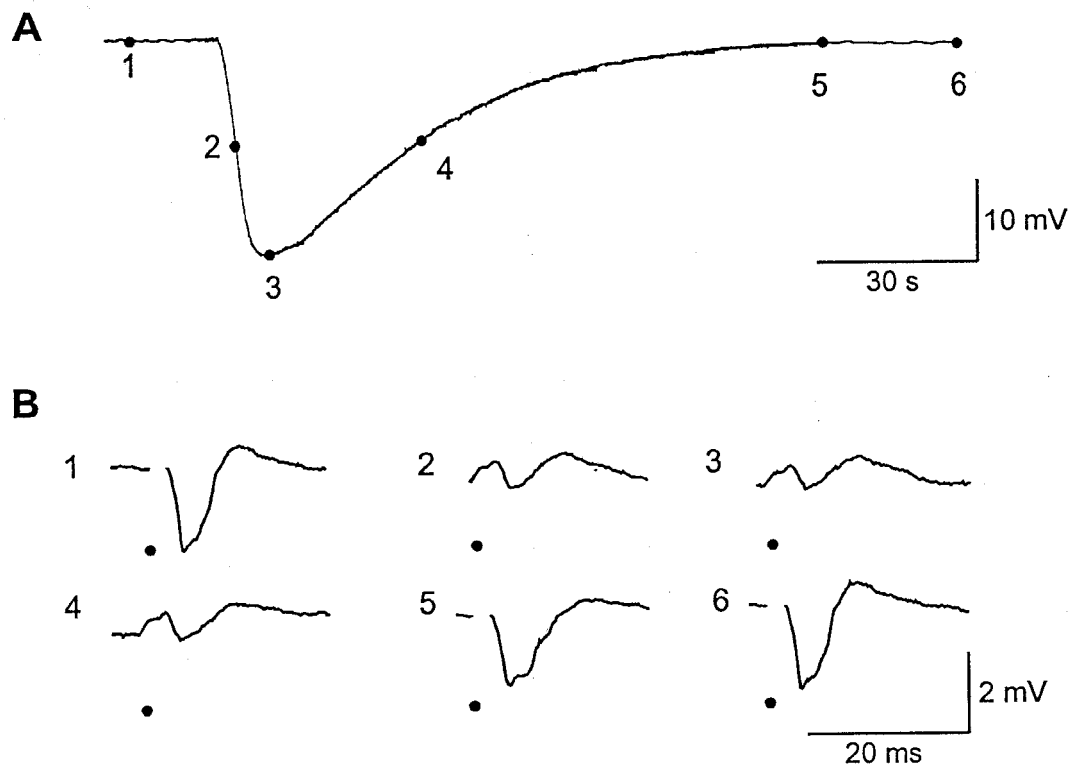


Abb. 13. Gleichzeitige Registrierung einer einzelnen KCl-induzierten spreading depression (A) und orthodromer synaptischer Feldpotentialantworten, aufgenommen zu den jeweils markierten Zeitpunkten (1 - 6). Deutlich sichtbar ist die Unterdrückung der exzitatorischen synaptischen Transmission während (2 - 5) und die Rückkehr zur Ausgangsaktivität nach (6) einer spreading depression.

Nach Beendigung einer SD erholt sich die exzitatorische synaptische Transmission wieder. (Abb. 13 B 6). Es wurde ein Doppelpulsprotokoll verwendet, um neben der exzitatorischen auch das inhibitorische synaptische System zu erfassen. Luhmann & Heinemann haben in einer früheren Studie (1992) gezeigt, daß unter normoxischen Bedingungen die Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus 1 - 8 mV beträgt und unter dem hier gewählten Interstimulusintervall die Feldpotentialantwort nach dem zweiten Stimulus im Durchschnitt auf mindestens 40-50 % vermindert ist (hier auch als Doppelpulshemmung, -inhibition bezeichnet). Sowohl Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus als auch die Stärke der Doppelpulshemmung sind unter physiologischen Bedingungen für einen Beobachtungszeitraum von mindestens 10 min relativ konstant, wenn in diesem Zeitraum im Abstand von 15 s gereizt wurde (Luhmann, Heinemann, 1992). Auf diesen Untersuchungen aufbauend, wurden die evozierten Feldpotentiale auf potentiellen Änderungen durch die SD untersucht. Zwei Feldpotentialregistrierungen wurden inklusive der 4. SD von der Analyse ausgeschlossen, als sie nach 3 applizierten SD polyphasische epileptiforme Aktivität aufwiesen.

Im Gegensatz zu den SD-Parametern, verringerte sich die Doppelpulshemmung im Verlauf der repetitiven SD signifikant ($p = 0,0005$, gemessen als Vergleich aller Doppelpulshemmungen: vor SD1, nach SD1, nach SD2 und nach SD3; Friedmann-two-way-ANOVA-Test; Abb. 11 Reihe A, Abb. 14 B) und verursachte eine kortikale Disinhibition. Unter Kontrollbedingungen (vor der ersten SD-Episode, Abb. 11, A1) betrug die Durchschnittsamplitude der Feldpotentialantwort auf den ersten bzw. zweiten Stimulus $2,61 \pm 0,89$ mV bzw. $0,73 \pm 0,59$ mV ($n = 14$; Abb. 14A). Die Doppelpulshemmung betrug unter diesen Bedingungen $73,9 \pm 12,5$ %. Nach der ersten SD (Abb. 11, A2) verminderte sich die Doppelpulsinhibition signifikant ($p < 0,01$; Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test; $n = 14$) auf $64,0 \pm 18,6$ %, was aus einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,01$; Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test; $n = 14$) der Amplitude der zweiten Reizantwort auf $1,16 \pm 0,85$ mV bei nicht signifikant veränderter Amplitude der ersten Reizantwort ($3,11 \pm 1,29$ mV; $n = 14$) resultierte. Nach einer weiteren SD (Abb. 11, A3) verminderte sich die Doppelpulshemmung auf $48,7 \pm 32,5$ % ($p < 0,01$), was wiederum auf eine signifikante ($p < 0,01$) vergrößerte Feldpotentialantwort auf den zweiten Stimulus ($1,61 \pm 1,31$ mV, $n = 14$) bei nicht signifikant veränderter Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus ($2,92 \pm 1,09$ mV) zurückzuführen war. Nach der dritten SD betrug die Amplitude der ersten Reizantwort $2,87 \pm 1,11$ mV und die der zweiten Reizantwort $1,74 \pm 1,39$ mV ($p < 0,01$). Daraus errechnete sich eine Doppelpulshemmung von $42,5 \pm 34,3$ %, die im Vergleich zur vorhergehenden Doppelpulshemmung ebenfalls signifikant ($p < 0,01$) vermindert und somit insgesamt auf $57,5$ %, bezogen auf die inhibitorische Aktivität vor den SD-Depolarisationen, abgefallen und damit fast halbiert war. Eine Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse gibt folgende Tabelle (Tab. 2) sowie Abb. 14:

FP	FP Amplitude 1 (FP 1) [mV]	FP Amplitude 2 (FP 2) [mV]	Doppelpulshemmung [%] (FP1-FP2)/FP1*100%
1.	2,61 ± 0,89; n = 14	0,73 ± 0,59; n = 14	73,9 ± 12,5; n = 14
2.	3,11 ± 1,29; n = 14	1,16 ± 0,85; n = 14	64,0 ± 18,6; n = 14
3.	2,92 ± 1,09; n = 14	1,60 ± 1,31; n = 14	48,7 ± 32,5; n = 14
4.	2,87 ± 1,11; n = 12	1,74 ± 1,39; n = 12	42,5 ± 34,3; n = 12

Tab. 2. Verminderung der Doppelpulshemmung der synaptischen Funktion nach 4 SD-Episoden.

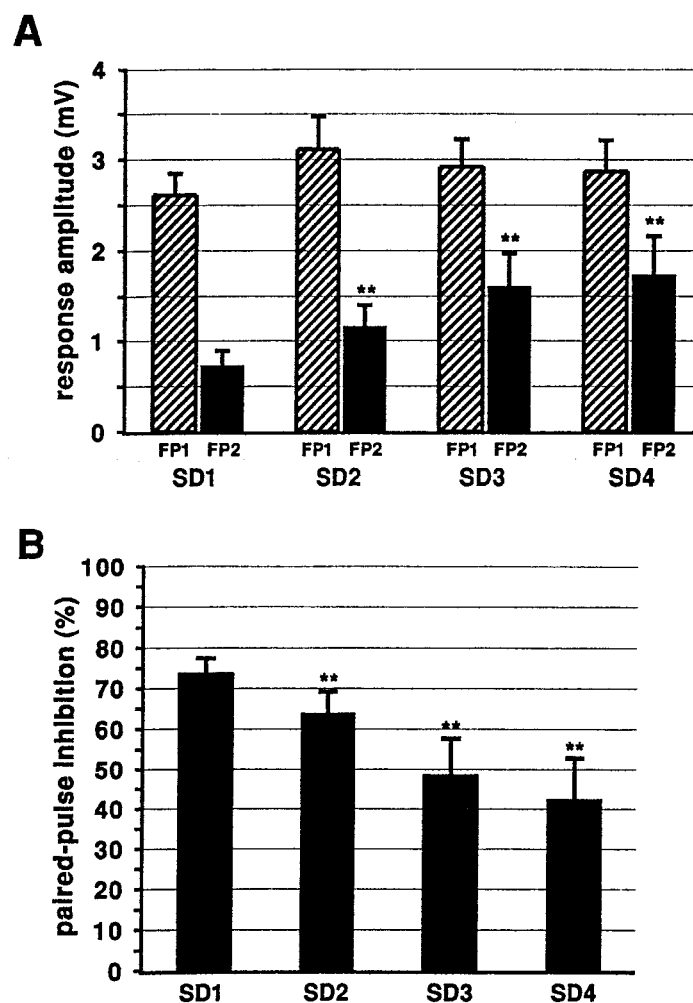


Abb. 14: Die Säulendiagramme zeigen den Einfluß der repetitiven SD auf die synaptische Funktion, dargestellt als arithmetisch gemittelte Werte Amplitude (A) der ersten Feldpotentialantwort (FP1, gestreifte Säule A) und der zweiten Feldpotentialantwort (FP2, schwarze Säule A) vor der entsprechenden SD sowie die daraus errechnete Doppelpulshemmung (B). Als T-Balken ist jeweils der Standardfehler des Mittelwertes aufgetragen. ** kennzeichnet eine signifikante Veränderung $p < 0,01$ (Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test).

Die relativ konstant bleibende Amplitude der Feldpotentialantwort auf den ersten Reiz zeigt, daß sich unter *in vitro* Bedingungen die exzitatorische synaptische Transmission nach repetitiven SD-Depolarisationen erholt und nicht signifikant beeinflusst wird ($p = 0,1432$, Friedmann-two-way-ANOVA-Test). Da die eingetretene verminderte Doppelpulshemmung sowohl aus einer verminderten Exzitation als auch von einer verringerten intrakortikalen Inhibition resultieren kann (Luhmann et al. 1993), legen die hier dargestellten Experimente nahe, daß die SD-induzierte Disinhibition in diesem Modell auf einer selektiven Supprimierung der intrakortikalen GABAergen Inhibition beruht, da sich die exzitatorische synaptische Antwort auf den ersten Stimulus nur geringfügig veränderte.

3.3 Pharmakologische Untersuchungen zur Rolle von Glutamatrezeptoren

Um die an der Induktion und Ausbreitung einer SD beteiligten Rezeptoren zu analysieren, schlossen sich nun Experimente über den Einfluß des AMPA-Antagonisten NBQX (10 μM) und den NMDA-Antagonisten Ketamin (100 μM) auf die Eigenschaften einer SD unter *in vitro* Hirnschnittbedingungen an. Bei diesen Untersuchungen wurde nach Beendigung der ersten SD, d.h. Rückkehr des DC-Potentials auf Ausgangsaktivität, die entsprechende Substanz 30 min lang in der entsprechenden Badkonzentration eingewaschen und eine zweite SD an der gleichen Stelle nach 30 min ausgelöst. Die initial ausgelöste SD wurde wie auch die zweite SD auf Amplitude, Dauer bei halbmaximaler Amplitude sowie Integral untersucht. Vor jeder SD wurden die synaptischen Feldpotentialantworten gemessen und die entsprechende Doppelpulshemmung der synaptischen Aktivität daraus errechnet.

3.3.1 Pharmakologische Blockade des AMPA-Glutamatrezeptors mit NBQX

Bei diesen Experimenten wurde nach Beendigung der ersten SD 6-Nitro-7-Sulphamoylbenzo(f)quinoxalin-2,3-dion (NBQX) zur Blockade des (\pm)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure(AMPA-)Rezeptors, einem ionotropen Glutamatrezeptor, 30 min lang in einer Badkonzentration von 10 μM eingewaschen und eine zweite SD an der gleichen Stelle nach 30 min ausgelöst. Rezeptorbindungsstudien an kortikalen Membranen der Ratte ergaben im Vergleich zu [3H]-Kainatbindungsstellen eine ca. 30fach höhere Affinität von NBQX zu [3H]-AMPA- Bindungsstellen (Sheardown et al. 1990), was es im Gegensatz zu CNQX und DNQX als hochselektiven Antagonisten des AMPA-Subtyps von ionotropen non-NMDA-Glutamatrezeptoren charakterisiert. NBQX ist ohne Wirkung am NMDA-Rezeptor.

Unter Kontrollbedingungen (Abb. 15 B1; linke Säulen in E, F) betrug in 13 Hirnschnitten von 7 Tieren die Durchschnittsamplitude von P1 bzw. P2 der ersten SD $18,4 \pm 5,9$ mV ($n = 13$) bzw. $22,4 \pm 5$ mV ($n = 10$). Die bei halbmaximaler Amplitude gemessene durchschnittliche SD-Dauer sowie das gemittelte SD-Integral wurden mit $33,4 \pm 13,6$ s bzw. mit 811 ± 456 mVs bestimmt,

jeweils $n = 13$. Keiner dieser Parameter veränderte sich nach der NBQX-Applikation im Bad und einer Einwaschzeit von 30 min unter dem beschriebenen Versuchsprotokoll signifikant ($p > 0,22$, Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test; Abb.15 B2, rechte Säulen in E, F). Unter der AMPA-Rezeptorblockade ergab sich eine durchschnittliche SD-Amplitude von P1 bzw. P2 von $21,1 \pm 11$ mV ($n = 13$) bzw. $26,5 \pm 7,6$ mV ($n = 7$). Die SD-Dauer verringerte sich gering nicht signifikant auf $30,9 \pm 15,4$ s ($n = 13$) wie auch das SD-Integral, das mit 782 ± 703 mVs ($n = 13$) ermittelt wurde [nicht gezeigt]. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in dem gewählten *in vitro* Modell die Aktivierung von non-NMDA-Glutamatrezeptoren von geringer Bedeutung für die Entstehung und Ausbreitung einer Kaliumchlorid-induzierten spreading depression im neocorticalen Hirnschnittpräparat der Ratte ist.

5 min vor SD1 und SD2 wurden in der neokortikalen Schicht II/ III wiederum 12 orthodrom evozierte Feldpotentialantworten aufgezeichnet, um die exzitatorische und inhibitorische synaptische Funktion in jedem Hirnschnitt zu registrieren. Unter Kontrollbedingungen (Abb. 15 A1; linke Säulen C und D) betrug in dieser Versuchsgruppe die Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus $3,47 \pm 1,35$ mV ($n = 13$) und auf den zweiten Stimulus unter dem hier gewählten Interstimulusintervall von 15 ms $1,23 \pm 0,89$ mV ($n = 13$). Somit errechnete sich eine Doppelpulshemmung $64,4 \pm 23,7$ %.

Frühere Studien haben gezeigt (Sutor, Luhmann, 1995), daß die Aktivierung afferenter Fasern im Neokortex der Ratte, wie sie durch den in Schicht VI applizierten elektrischen Doppelreiz stattfindet, ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) in der postsynaptischen Zelle (hier neokortikale Pyramidenzelle) auslöst. Dessen extrazellulär meßbares Korrelat ist beispielsweise die unter Abb. 15 A1 gezeigte Feldpotentialantwort. Da dieses EPSP hauptsächlich mit den

Abb. 15. Einfluß des selektiven AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX auf die KCl-induzierte spreading depression (SD) (B, 1 - 2) und auf orthodrom evozierte Feldpotentialantworten (A, 1 - 2) in der neokortikalen Hirnschnittpräparation adulter (Alter > 28 Tage) Ratten. 5 min vor der ersten SD (B 1) wurden 12 Feldpotentialantworten auf eine orthodrome Doppelpulsstimulation (••) registriert, die als gemittelte Spur dargestellt ist (A1). Nach dem Auslösen der ersten SD im parietalen Kortex (B1) wurde der ionotrope AMPA-Antagonist NBQX in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in die aCSF-Badlösung gegeben und für die Dauer von 30 min in den Hirnschnitt eingewaschen. Nach Beendigung der Einwaschzeit erfolgten wiederum extrazelluläre Feldpotentialregistrierungen (A2) und es wurde an der gleichen Stelle eine zweite SD (B2) ausgelöst. Deutlich erkennbar ist die fast vollständige Blockierung der synaptischen Übertragung nach NBQX-Applikation, die der AMPA-Rezeptor Blockade zugeschrieben werden kann (A2), und die etwa unveränderte SD-Amplitude, SD-Dauer und SD-Integral unter AMPA-Rezeptor Blockade (B2). Die Pfeile unter der ersten SD (B1) kennzeichnen die beiden SD-Komponenten (nicht gefüllter Pfeil weist auf P1, gefüllter Pfeil zeigt zu P2).

Quantitative Darstellung ($n = 13$) der durchweg nicht signifikanten Veränderungen als arithmetische Mittelwerte (Säulen) und der dazugehörigen Standardabweichung (T-Balken) der synaptischen Feldpotentialantwort (C), der Doppelpulshemmung der synaptischen Antwort (D), der SD-Amplitude (E, getrennt nach Peak 1 und Peak 2) sowie der SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude (F), jeweils unter Kontrollbedingungen in aCSF (linke Säulen in C, D, E, F) sowie unter AMPA-Rezeptor Blockade mit $10 \mu\text{M}$ NBQX in der Badlösung (rechte Säulen in C, D, E, F).

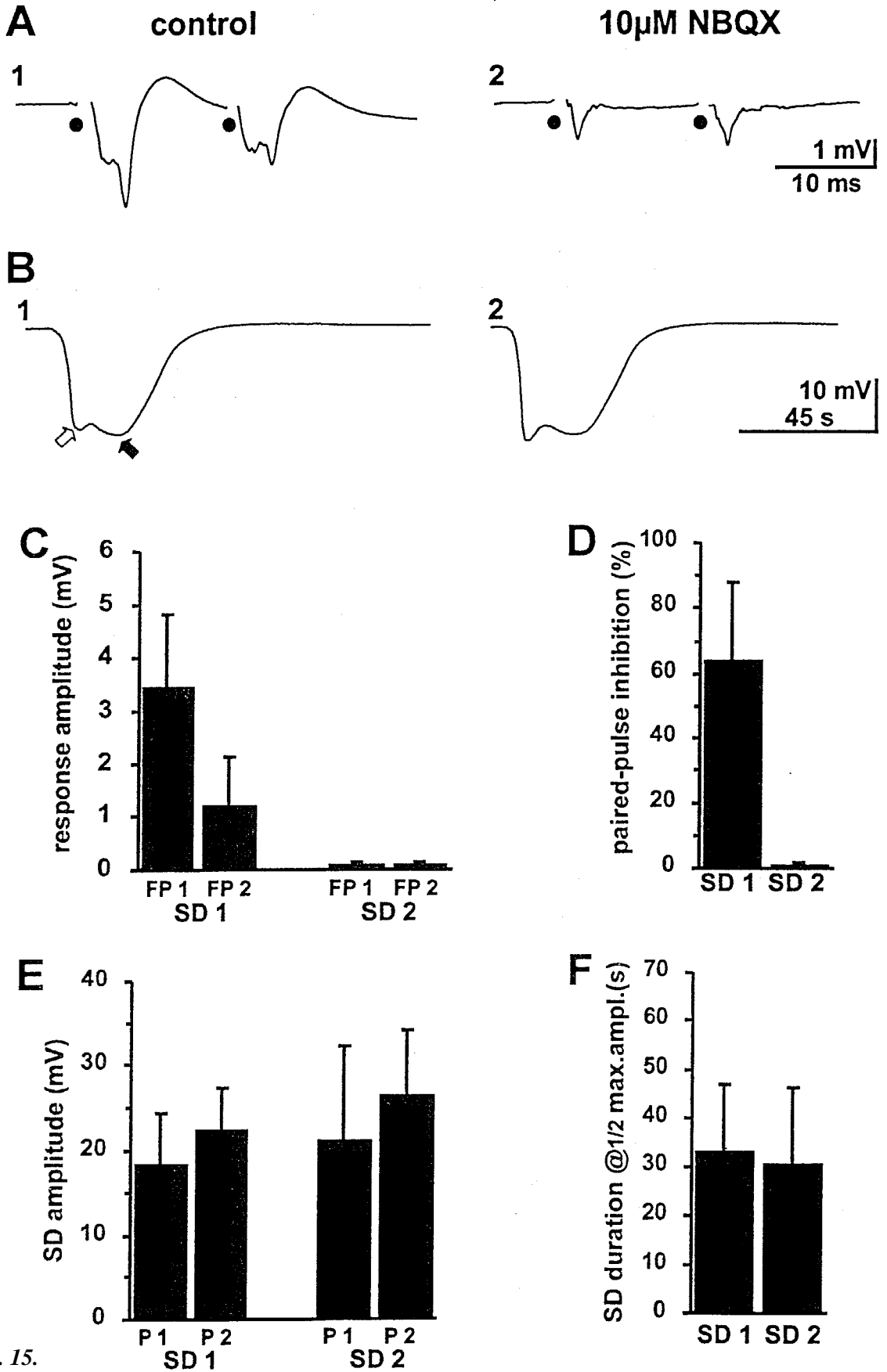


Abb. 15.

exzitatorischen Neurotransmittern Glutamat und Aspartat über den AMPA-Glutamatrezeptor übertragen wird (Sutor, Hablitz, 1989), ist in Abb. 15 A2 der geringe NMDA-Rezeptor vermittelte Anteil isoliert, da der AMPA-Rezeptor durch das Einwaschen des selektiven Antagonisten NBQX und somit ein Großteil der synaptischen Übertragung blockiert wurde. Demnach konnte nach Einwaschen von NBQX keine weitere Auswertung der Feldpotentialantworten erfolgen, da aus der ohnehin fast vollständig blockierten synaptischen Übertragung kein potentieller Einfluß einer SD abgegrenzt werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß 10 μM NBQX, eingewaschen für 30 min nach einer SD, die orthodrom evozierte exzitatorische Feldpotentialantwort fast vollständig blockiert, während es auf elektrophysiologische Parameter einer SD wie Amplitude, Dauer, Integral nur eine marginale Wirkung ausübt.

3.3.2 Nicht-kompetitive Blockade des NMDA-Glutamatrezeptors durch Ketamin

Bei diesen Untersuchungen wurde Ketamin (100 μM) als nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptorkomplex-assoziierten Kationenkanals (Thomson et al. 1985; Alexander, Peters, 1999) zur Blockade des NMDA-Rezeptors für eine Zeit von 30 min nach Auslösen der ersten SD eingewaschen. Die unter 3.2 beschriebene SD-induzierte kortikale Disinhibition trat auch unter Ketamin auf. So betrug die gemittelte Amplitude der synaptischen Feldpotentialantwort unter Kontrollbedingungen in aCSF (Abb. 16 A1) $3,58 \pm 1,4$ mV ($n = 12$) bzw. $1,07 \pm 0,98$ mV ($n = 12$) (Abb. 16 C, linke Säulen, FP1 bzw. FP2). Die daraus errechnete Doppelpulshemmung der synaptischen Funktion betrug $71,9 \pm 18,8$ % (Abb. 16 D, linke Säule, $n = 12$). Diese Kontrollwerte sind in guter Übereinstimmung mit den Kontrollwerten, wie im Versuchskollektiv der repetitiven, d.h. vierfachen, SD oder in der NBQX Gruppe beschrieben wurden. Ca. 30 min nach der ersten SD und nachdem Ketamin 30 min lang eingewaschen war, unterschied sich die synaptische Funktion auf eine orthodrome Doppelpuls-Stimulationsprotokoll signifikant: während die Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus unter Ketamin sich nur geringfügig auf $3,49 \pm 1,53$ mV verminderte, erhöhte sich die Feldpotentialantwort nach dem zweiten Stimulus in Ketamin signifikant ($p < 0,01$; $n = 12$) auf $1,98 \pm 1,67$ mV. Damit wurde eine signifikante ($p < 0,01$) Herabsetzung der GABAergen Effizienz auch unter Ketaminapplikation auf $44,6 \pm 28,3$ % im Vergleich zum Ausgangswert errechnet (Abb. 16 D, rechte Säule).

Andererseits ließen sich unter NMDA-Rezeptorblockade ebenfalls statisch signifikante deutliche Unterschiede für die während einer SD gemessenen Parameter des extrazellulären DC-Potentials ermitteln (Abb. 16 B 1,2). Ketamin reduzierte die durchschnittliche SD-Amplitude (jeweils P1 bzw. P2) der ersten SD signifikant ($p < 0,01$) in 12 Hirnschnitten von $19,8 \pm 5,2$ mV bzw. $25,0 \pm 5,0$ mV auf $12,8 \pm 4,6$ mV (65 %) (P1). Die zweite, langsamere Komponente (P2) trat unter NMDA-Rezeptorblockade in keinem der Fälle auf, was eine entscheidende Bedeutung des NMDA-Rezeptors an dieser SD-Komponente auf zellulärer oder molekularer Ebene nahelegt (Abb. 16 B2 und E). Ebenfalls signifikant ($p < 0,05$; $n = 12$) wurde die SD-Dauer von $34,9 \pm$

12,4 s auf $22,2 \pm 12,0$ s (64 %) (Abb. 16 F) bzw. das SD-Integral ($p < 0,01$; $n = 12$; nicht gezeigt) von 862 ± 346 mVs auf 393 ± 226 mVs (46 %) nach 30minütiger Ketamineinwaschung verringert. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß zwar eine SD-induzierte Disinhibition der synaptischen Funktion auch unter Ketamin auftritt, aber die SD-Amplitude und -Dauer durch eine NMDA-Rezeptorblockade auf ca. 64 % reduziert, das SD-Integral sogar fast halbiert werden können. Demnach ist die NMDA-Rezeptor Aktivierung deutlich an der Auslösung und Ausbreitung einer SD beteiligt.

Abb. 16. Dargestellt wird der typische Verlauf der synaptischen Feldantwort auf eine orthodrome Doppelpulsstimulation (••) vor (A1) und ca. 30 min nach (A2) einer SD und Ketaminapplikation. Die SD unter Kontrollbedingungen (B1) wurde durch den Einfluß des NMDA-Rezeptorantagonisten Ketamin nach 30 min Einwaschzeit auf ca. 46 % ihres Integrals reduziert (B 2). Deutlich ist ebenfalls die im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 11 B1, 2) etwa auf 64 % verringerte SD-Amplitude und SD-Dauer unter NMDA-Rezeptorblockade (B2). Die Pfeile unter der ersten SD (B1) kennzeichnen die beiden SD-Komponenten (nicht gefüllter Pfeil weist auf P1, gefüllter Pfeil zeigt zu P2).

*Die signifikanten Veränderungen im Säulendiagramm: arithmetische Mittelwerte (Säulen) und die dazugehörigen Standardabweichung (T-Balken) der synaptischen Feldpotentialantwort ($n = 12$; C), der Doppelpulshemmung der synaptischen Antwort ($n = 12$; D), der SD-Amplitude (E, getrennt nach Peak 1 [$n = 11$] und Peak 2 [$n = 7$]) sowie der SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude ($n = 12$, F), jeweils unter Kontrollbedingungen in aCSF (linke Säulen in C, D, E, F) sowie unter NMDA-Rezeptorblockade mit $100 \mu\text{M}$ Ketamin in der Badlösung (rechte Säulen in C, D, E, F). * markiert die Signifikanz $p < 0,05$, ** stellt eine Signifikanz $p < 0,01$ dar.*

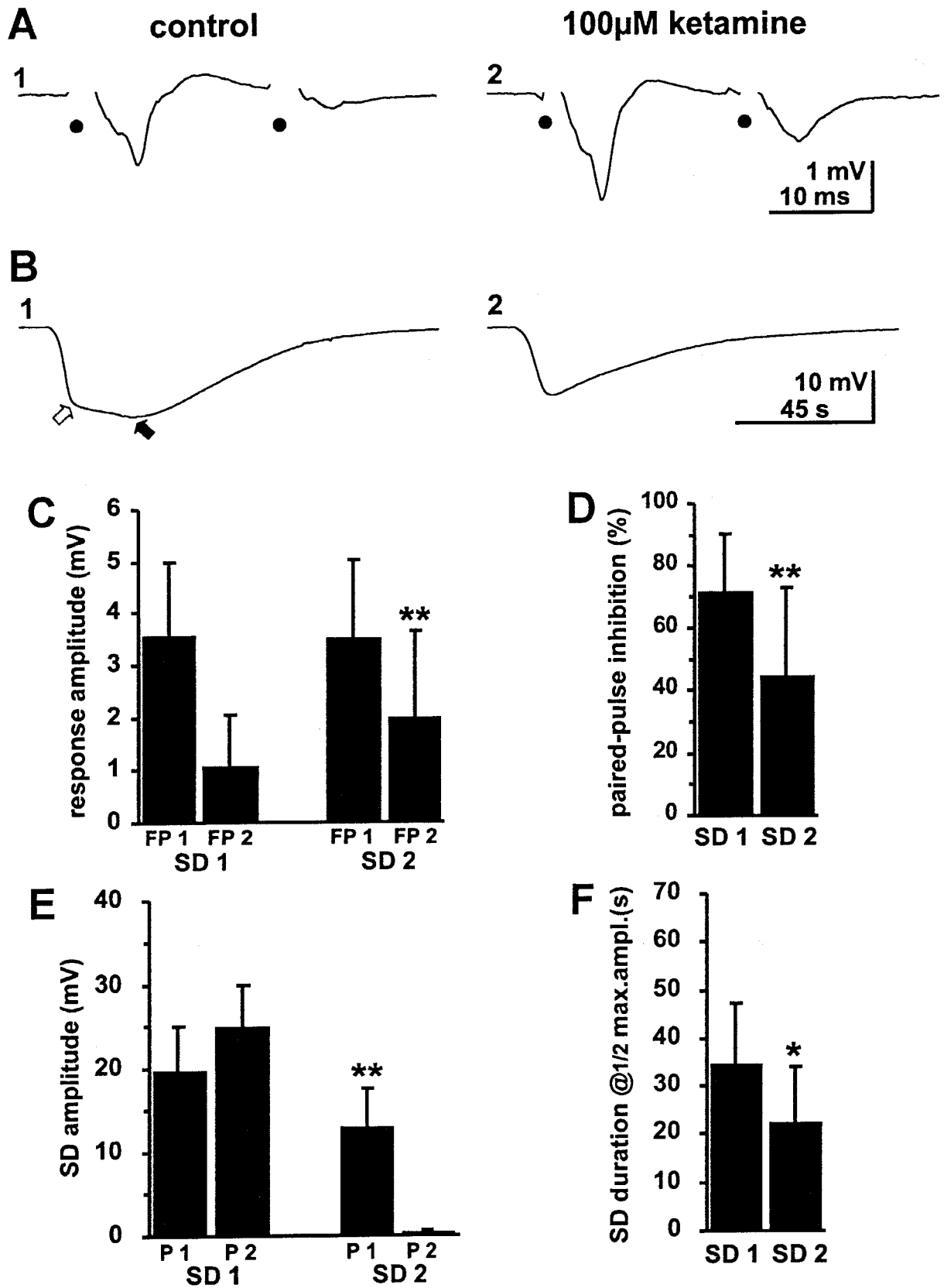


Abb. 16.

3.3.3 Gleichzeitige Blockade der NMDA- und AMPA-Glutamatrezeptoren

In einer weiteren Versuchsgruppe interessierte die Fragestellung, wie sich das Ausbreitungsmuster einer spreading depression nach einer kombinierten Blockade ionotroper Glutamatrezeptoren verändert.

Zunächst wurden wiederum vor SD1 orthodrom evozierte Feldpotentialantworten aufgezeichnet, um die exzitatorische und inhibitorische synaptische Funktion und Intaktheit von projizierenden Afferenzen in jedem Hirnschnitt zu registrieren. Die Feldpotentialantwort unter Kontrollbedingungen (Abb. 17 A1; linke Säulen C) betrug auf den ersten Stimulus $3,72 \pm 0,98$ mV ($n = 9$) und auf den zweiten Stimulus $1,64 \pm 0,59$ mV ($n = 9$). Die daraus errechnete Doppelpulshemmung betrug $55,0 \pm 13,0$ % ($n = 9$; Abb. 17 D). Durch das Einwaschen von NBQX ($10 \mu\text{M}$) als Antagonisten des AMPA-Subtyps von ionotropen non-NMDA-Glutamatrezeptoren sowie Ketamin ($100 \mu\text{M}$) als nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptorkomplexes, konnte keine weitere Auswertung der Feldpotentialantworten erfolgen, da die synaptische Übertragung durch die AMPA- und NMDA-Rezeptorblockade vollständig blockiert war und ausschließlich Reizartefakte registriert wurden (Abb. 17 A2; rechte Säulen C, D). Andererseits konnte bei diesen Untersuchungen unter AMPA- und NMDA-Rezeptorblockade eine drastische Reduktion der SD-Amplitude von $22,4 \pm 5,0$ mV (P1; $n = 9$) und $23,3 \pm 7,0$ mV (P2; $n = 7$) unter Kontrollbedingungen auf $8,8 \pm 5,9$ mV (39 %, P1, $p < 0,01$, $n = 8$) beobachtet werden (Abb. 17 B1,2; E). Die zweite, langsame SD-Komponente (P2) war unter kombinierter AMPA- und NMDA-Rezeptorblockade ebenfalls wie unter 3.3.2 beschrieben blockiert. Die SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude verringert sich signifikant ($p < 0,01$) von $31,9 \pm 14,9$ s auf $19,3 \pm 6,6$ s (61 %, Abb. 17 F, $n = 9$). Folglich war auch das SD-Integral drastisch verkleinert: von 862 ± 387 mVs in aCSF auf 256 ± 214 mVs (30 %, nicht gezeigt, $n = 9$) nach NBQX und Ketamin Applikation.

Interessanterweise zeigte ein statistischer Vergleich der unabhängigen Versuchsgruppen einer alleinigen Ketaminapplikation sowie der kombinierten Ketamin + NBQX Gabe eine geringe, aber dennoch signifikant höhere SD-Reduktion in der Gruppe einer gleichzeitigen NMDA-Rezeptor- und AMPA-Rezeptorblockade (vgl. Abb. 16 B2 und 17 B2). Obwohl sich beide Versuchsgruppen in den Ausgangsparametern durchschnittliche SD-Amplitude, SD-Dauer, SD-Integral und auch in der SD-Dauer unter Substanzeinfluß nicht unterschieden (alle $p > 0,23$; Mann-Whitney-U-Test), ergab zwar auch der Amplitudenvergleich ($12,8 \pm 4,6$ mV in Ketamin und $8,8 \pm 5,9$ mV in Ketamin und NBQX) keine Signifikanz am 0,05 Level ($p = 0,0756$), jedoch der Integralvergleich. Während unter NMDA-Rezeptorblockade das Integral auf 393 ± 226 mVs (auf 46 %) reduziert war, verringerte es sich unter kombinierter NMDA- und AMPA-Rezeptorblockade weiter auf 258 ± 214 mVs (auf 30 %; $p = 0,0466$; Mann-Whitney-U-Test). Diese Ergebnisse unterstreichen den fördernden Einfluß einer Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren auf die Amplitude, Zeitdauer und Integral einer SD unter *in vitro* Bedingungen. Unter Berücksichtigung der zuvor gezeigten Wirkungslosigkeit einer alleinigen NBQX Applikation wird hier wahrscheinlich indirekt überwiegend die Wirksamkeit der NMDA-

Rezeptorblockade unterstrichen. Dennoch scheint ein synergistischer Effekt einer kombinierten NMDA- und AMPA-Rezeptorblockade einzutreten, der zu einer zusätzlichen SD-Verminderung führt. Andererseits läßt die zu beobachtende nach wie vor inkomplette SD-Blockade auf die Beteiligung weiterer Rezeptoren oder Ionenkanäle schließen.

Abb. 17 A, B: Einfluß einer gleichzeitigen Applikation des selektiven AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX und des selektiven NMDA-Rezeptorantagonisten Ketamin auf die KCl-induzierte spreading depression (SD) (B, 1 - 2) sowie auf orthodrom evozierte Feldpotentialantworten (A, 1 - 2). Dargestellt wird die vollständige Blockierung der synaptischen Übertragung nach NBQX und Ketamin-Applikation (A2) und die signifikant verminderte SD-Amplitude sowie SD-Dauer bei kombinierter AMPA- und NMDA-Rezeptorblockade (B2). Die Pfeile unter der ersten SD (B1) kennzeichnen die beiden SD- Komponenten (nicht gefüllter Pfeil weist auf P1, gefüllter Pfeil zeigt zu P2).

*C-F: Mittelwerte (Säulen) und Standardabweichung (T-Balken) der Veränderungen der synaptischen Antwort (C; n = 9), der Doppelpulshemmung der synaptischen Antwort (D; n = 9), der SD-Amplitude (E, getrennt nach Peak 1 [n = 9] und Peak 2 [n = 7]) sowie der SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude (F, n = 9), jeweils unter Kontrollbedingungen in aCSF (linke Säulen in C, D, E, F) sowie unter AMPA- und NMDA-Rezeptorblockade mit 10 µM NBQX und 100 µM Ketamin in der Badlösung (rechte Säulen in C, D, E, F). * markiert die Signifikanz $p < 0,05$, **stellt eine Signifikanz $p < 0,01$ dar.*

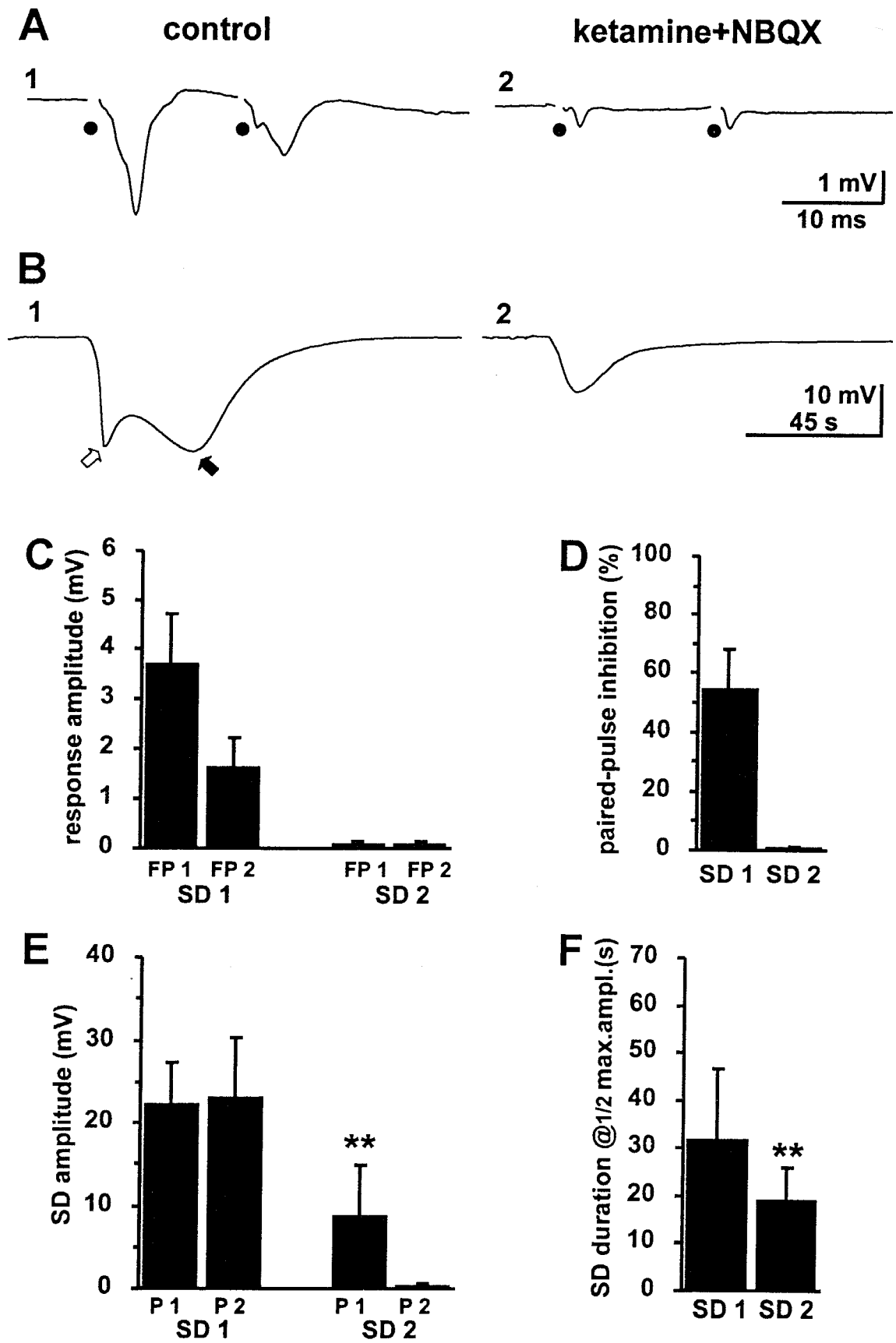


Abb. 17.

3.4 Pharmakologische Untersuchungen zur Rolle des 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptors

In dieser Versuchsreihe sollte die potentielle Rolle einer Aktivierung des 5-HT_{1A}-Subtyps der Serotoninrezeptoren für die spreading depression analysiert werden. Die selektiven 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT und BAY x 3702 wurden in unterschiedlichen Konzentration (1, 10, 100 µM) auf eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung bezüglich ihres Einflusses auf die exzitatorische und inhibitorische Transmission als auch auf die elektrophysiologischen SD-Parameter Amplitude, Dauer sowie Integral untersucht.

3.4.1 Effekte von 8-OH-DPAT

Bei diesen Experimenten wurde nach Beendigung der ersten SD (\pm)-8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralinhydrobromid (8-OH-DPAT) zur Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors eingesetzt (Gozlan et al. 1983). Die Verteilung des 5-HT_{1A}-Rezeptors stimmt mit hochaffinen Bindungsstellen für 8-OH-DPAT im Neokortex gut überein (Nenonene et al. 1994). Die Substanz wurde 30 min lang in einer Badkonzentration von 1, 10 sowie 100 µM getrennt eingewaschen und eine zweite SD an der gleichen Stelle nach 30 min ausgelöst. Um auch in dieser Versuchsreihe einen potentiellen Effekt auf die Funktion der exzitatorische und inhibitorische synaptischen Transmission zu erfassen, wurden vor der ersten SD (Kontrollbedingungen) sowie ca. 5 min vor der zweiten SD die extrazellulären Feldpotentialantworten auf einen orthodromen Doppelreiz registriert.

Die im Versuchskollektiv der repetitiven, d.h. vierfachen SD bereits nach einer SD zu beobachtende kortikale Disinhibition (siehe Kapitel 3.2) war bereits unter **1 µM 8-OH-DPAT** (Abb. 18) verstärkt ($p < 0,05$; $n = 8$). Die ermittelte paired-pulse Inhibition betrug dabei $63,4 \pm 19,5$ % unter Kontrollbedingungen und $15,1 \pm 47,7$ % ($n = 8$) in 1µM 8-OH-DPAT (Abb. 18 A1, 2; D). Dies resultierte aus einer (nicht signifikanten) Verminderung der Amplitude der ersten Reizantwort von $4,0 \pm 2,1$ mV (aCSF) auf $3,6 \pm 1,9$ mV (in 1 µM 8-OH-DPAT) bei gleichzeitig signifikant ($p < 0,05$) erhöhten Amplitude der zweiten Reizantwort von $1,68 \pm 1,29$ mV ($n = 8$, Kontrolle) auf $2,9 \pm 1,6$ mV (1 µM 8-OH-DPAT, $n = 8$, Abb. 18 C). Früherer Studien haben gezeigt (Schmitz et al. 1995a; 1995b; 1995c), daß die Aktivierung des präsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptors über eine verringerte Glutamatfreisetzung zu einer verminderten exzitatorischen synaptischen Transmission als auch zu einer Inhibition hemmender Interneurone führt. Die in Abb. 18A 2 registrierte Disinhibition der kortikalen synaptischen Funktion stellt demnach neben einer SD-induzierten verminderten GABAergen Funktion den additiven Effekt eines verminderten exzitatorischen Inputs durch die präsynaptische 8-OH-DPAT Wirkung dar.

Die SD-Parameter waren mit 1 µM 8-OH-DPAT bis auf eine Erhöhung der Amplitude von peak 1 ($22,6 \pm 7$ mV auf $28,1 \pm 6,9$ mV; $p < 0,05$; $n = 8$) nicht signifikant verändert (Abb. 18 B1, 2; E, F). So betrug die SD-Amplitude von peak 2 ($n = 7$) $25,5 \pm 7,7$ mV und $27,7 \pm 8$ mV, die SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude $39,2 \pm 14,3$ s und $37 \pm 15,6$ s ($n = 8$) sowie das SD-Integral

1038 ± 523 mVs und 1168 ± 540 mVs (n = 8; nicht gezeigt), jeweils in aCSF bzw. in 1 µM 8-OH-DPAT.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors mit 8-OH-DPAT in einer Badkonzentration von 1 µM zwar zu einer kortikalen Disinhibition der synaptischen Funktion, aber zu keiner Verringerung der SD-Amplitude oder Verkürzung der SD-Dauer führt.

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Studien mit **10 µM 8-OH-DPAT** (Abb. 19 A1,2). Der präsynaptische Einfluß der 5-HT_{1A}-Rezeptoraktivierung unter *in vitro* Bedingungen im Hirnschnitt war auch hier nachweisbar. Die Reduktion der intrakortikalen Inhibition drückte sich auch hier bei extrazellulären Aufzeichnungen in einer signifikanten Verminderung der Doppelpulshemmung von 66,5 ± 18,5 % auf 30,4 ± 49,5 % (p < 0,05; n = 9) sowie in einem signifikanten Ansteigen der Amplitude der zweiten Reizantwort von 1,29 ± 1,21 mV auf 2,55 ± 1,74 mV (p < 0,05; n = 9) aus (Abb. 19 D, C). Die Amplitude der ersten Antwort betrug 3,41 ± 1,82 mV (aCSF) sowie 3,59 ± 1,45 mV (10 µM 8-OH-DPAT; Abb. 19 C).

Die Eigenschaften der SD (Abb. 19 B1, 2) waren bei der Badkonzentration von 10 µM 8-OH-DPAT ausschließlich nicht signifikant verändert, jedoch zeichnete sich ein Trend ab, der auf eine Verringerung der SD-Dauer und des SD-Integrals hinwies. So verringerte sich die SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude von 40,7 ± 20,3 s auf 29,5 ± 13,8 s (Abb. 19 F) und das SD-Integral von 1005 ± 681 mVs auf 701 ± 351 mVs (nicht gezeigt). In beiden Fällen wurde jedoch das Signifikanzniveau p < 0,05 nicht erreicht (p = 0,0858 bzw. p = 0,0506; jeweils n = 9). Die SD-Amplitude (Abb. 19 E) blieb relativ konstant und variierte im Durchschnitt zwischen 19,7 und 22,2 s (n = 9 für P1 und n = 7 für P = 2).

Deutlich ausgeprägter waren die Effekte in einer Badkonzentration von **100 µM 8-OH-DPAT** (Abb. 20). Die Substanz wurde hier an 9 Hirnschnitten untersucht. Der drastische Verlust der intrakortikalen Inhibition weitete sich zu einem Zustand der Doppelpulsfaszilation aus, d.h. die zweite Feldpotentialantwort hatte eine größere Amplitude als die erste. Das arithmetische Mittel der Feldpotentialantwort unter Kontrollbedingungen betrug hier 4,38 ± 1,1 mV (FP1) sowie 2,3 ± 0,83 mV (FP2, n = 9, Abb. 20 A1, linke Säulen C). Nachdem 8-OH-DPAT 30 min lang eingewaschen war (Abb. 20 A2) verringerte sich bei der nun anschließenden Meßreihe die Amplitude der ersten Reizantwort signifikant (p = 0,0109) auf 2,45 ± 1,32 mV bei gleichzeitig signifikant (p = 0,0178) auf 3,98 ± 1,41 mV erhöhten Amplitude der zweiten Feldpotentialantwort (n = 9; Abb. 20, rechte Säulen C). Folglich war auch ein kompletter Verlust der Doppelpulshemmung von 47,9 ± 15,7 % auf -111,4 ± 122 % festzustellen (p = 0,0077; n = 9, Abb. 20, rechte Säule D).

Sehr deutlich wurde bei den SD-Parametern die SD-Dauer nach der 5-HT_{1A}-Rezeptoraktivierung durch 100 µM 8-OH-DPAT signifikant (p < 0,05; n = 9) verkürzt (Abb. 20 B1, 2). Die bei halbmaximaler Amplitude gemessene durchschnittliche SD-Dauer verringerte sich von 42,0 ±

15,6 s auf $21,2 \pm 10,6$ s (auf ca. 52 %; Abb. 20 F). Das SD-Integral verringerte sich damit von 1155 ± 487 mVs auf 606 ± 548 mVs (auf 48 %; $n = 9$, [nicht gezeigt]), erreichte jedoch nicht das $p < 0,05$ Signifikanzlevel ($p = 0,0506$), während die SD-Durchschnittsamplitude der P1 bzw. P2 von $24,7 \pm 7,3$ mV ($n = 9$) und $25,9 \pm 6,7$ mV ($n = 8$) auf $23,6 \pm 11,2$ ($n = 9$) und $26,1 \pm 8,7$ mV ($n = 6$) sich nur nicht signifikant veränderte (Abb. 20 E).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in dem gewählten *in vitro* SD-Modell der Ratte die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors ab einer Badkonzentration von 100 µM 8-OH-DPAT neben dem Verlust der kortikalen Inhibition eine signifikante Verkürzung der SD-Dauer bewirkt.

Abb. 18, 19, 20. Die Grafiken zeigen die Veränderungen der synaptischen Transmission (jeweils A) als auch der KCl-induzierten spreading depression (SD, jeweils B) durch die Wirkung des 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 18: 1 µM; Abb. 19: 10 µM; Abb. 20: 100 µM). Unter Badapplikation der genannten Substanz kam es in allen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen zu einer deutlichen Verminderung der intrakortikalen Inhibition (jeweils A2). Dargestellt wird weiterhin die mit steigender Konzentration des 5-HT_{1A}-Agonisten zunehmende Verkürzung der SD-Dauer (jeweils B2). Die Pfeile unter der ersten SD (B1) kennzeichnen die beiden SD-Komponenten (nicht gefüllter Pfeil weist auf P1, gefüllter Pfeil zeigt zu P2). **Quantitative Ergebnisse der Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors unter 8-OH-DPAT-Badapplikation nach 30 min Einwaschen (jeweils C-F).** Die Säulen stellen arithmetische Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung (T-Balken) in C: der synaptischen Feldpotentialantwort, in D: der Doppelpulshemmung der synaptischen Antwort (jeweils $n = 8$, $n = 9$ bzw. $n = 9$), in E: der SD-Amplitude, getrennt nach Peak 1 ($n = 8$, $n = 9$ bzw. $n = 9$) und Peak 2 ($n = 7$, $n = 7$ bzw. $n = 6$), sowie in F: der SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude ($n = 8$, $n = 9$ bzw. $n = 9$); jeweils unter Kontrollbedingungen in aCSF (linke Säulen in C, D, E, F) sowie mit 1, 10, oder 100 µM 8-OH-DPAT in der Badlösung (rechte Säulen in C, D, E, F) dar. * markiert die Signifikanz $p < 0,05$, ** stellt eine Signifikanz $p < 0,01$ dar.

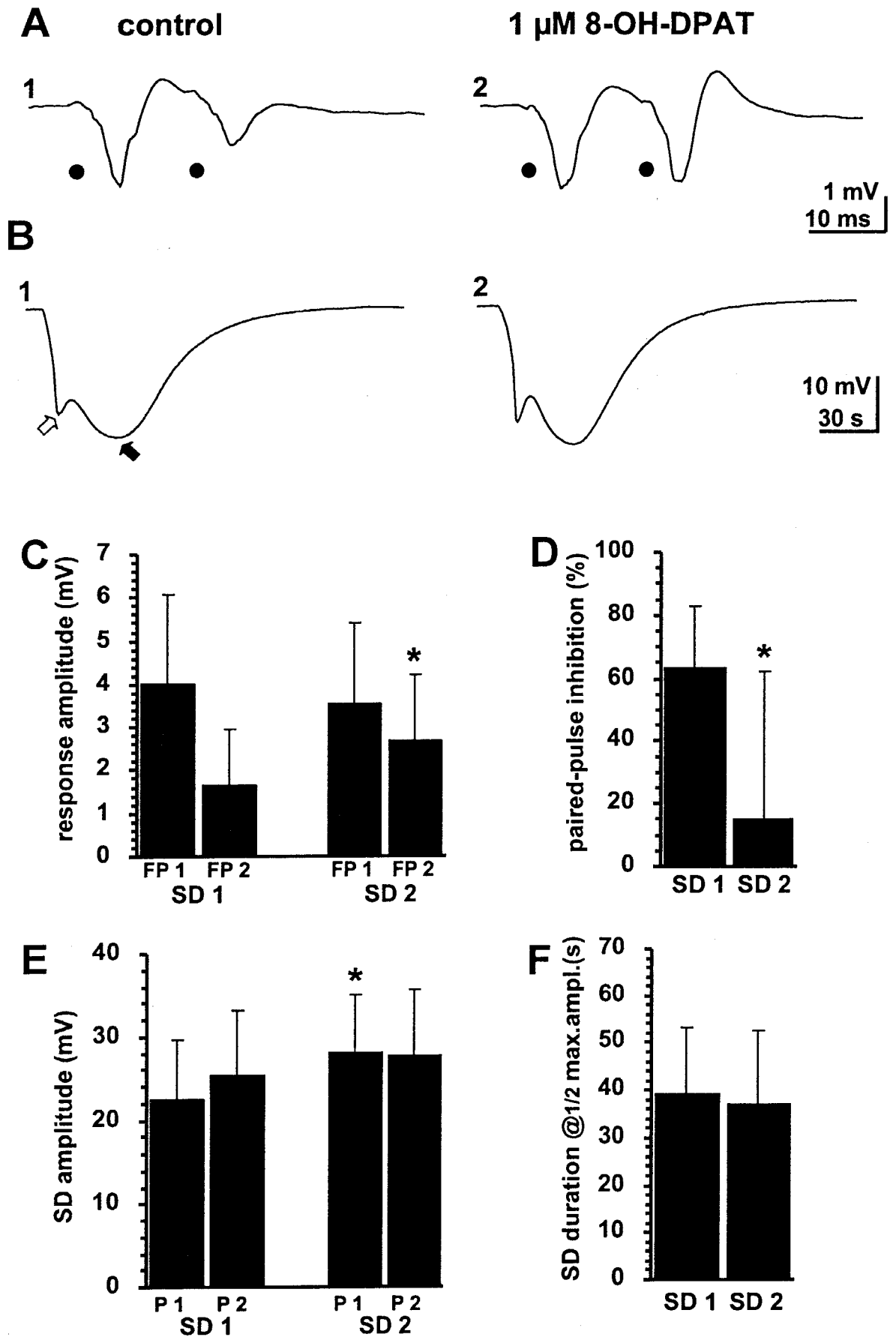


Abb. 18.

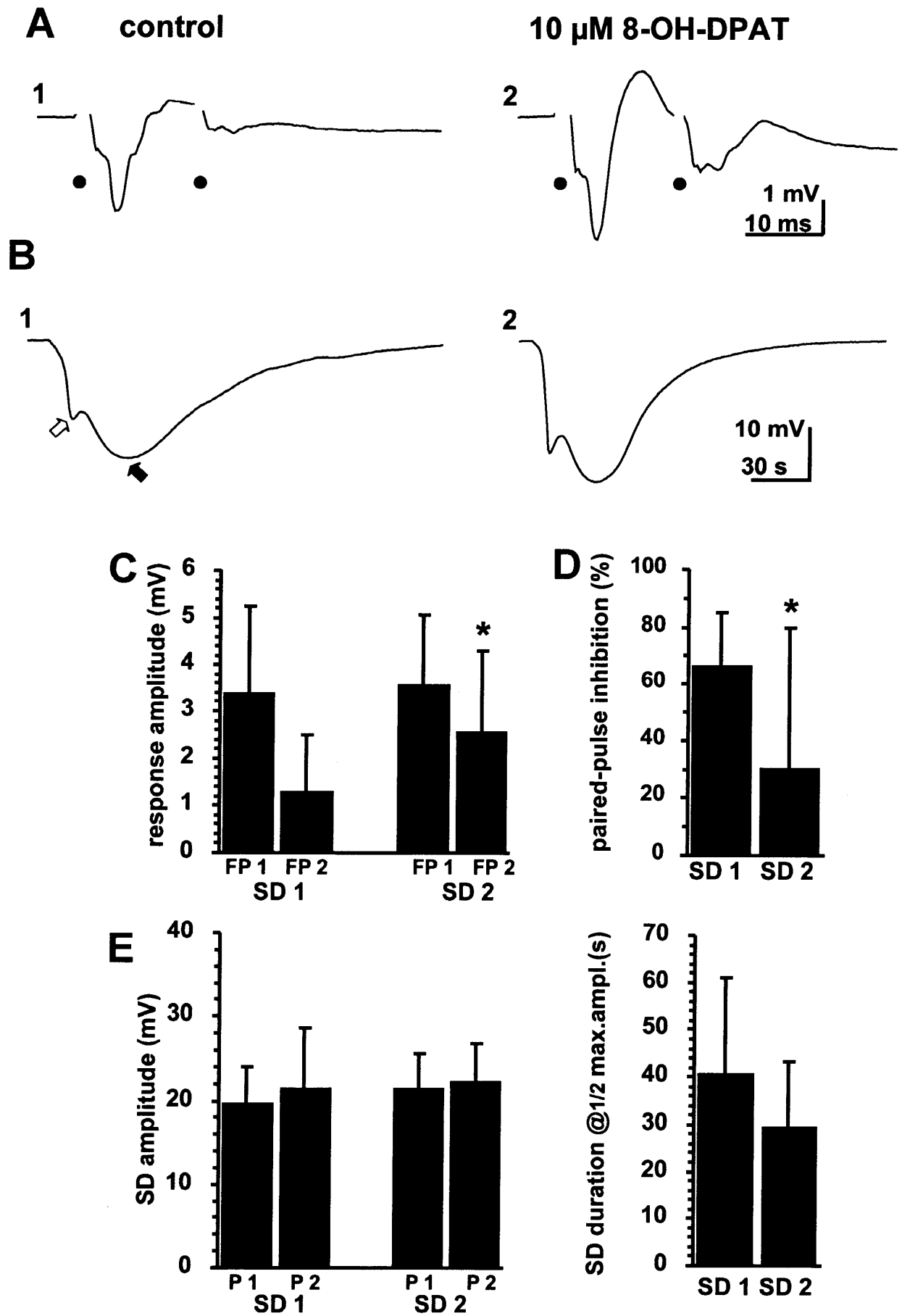


Abb. 19.

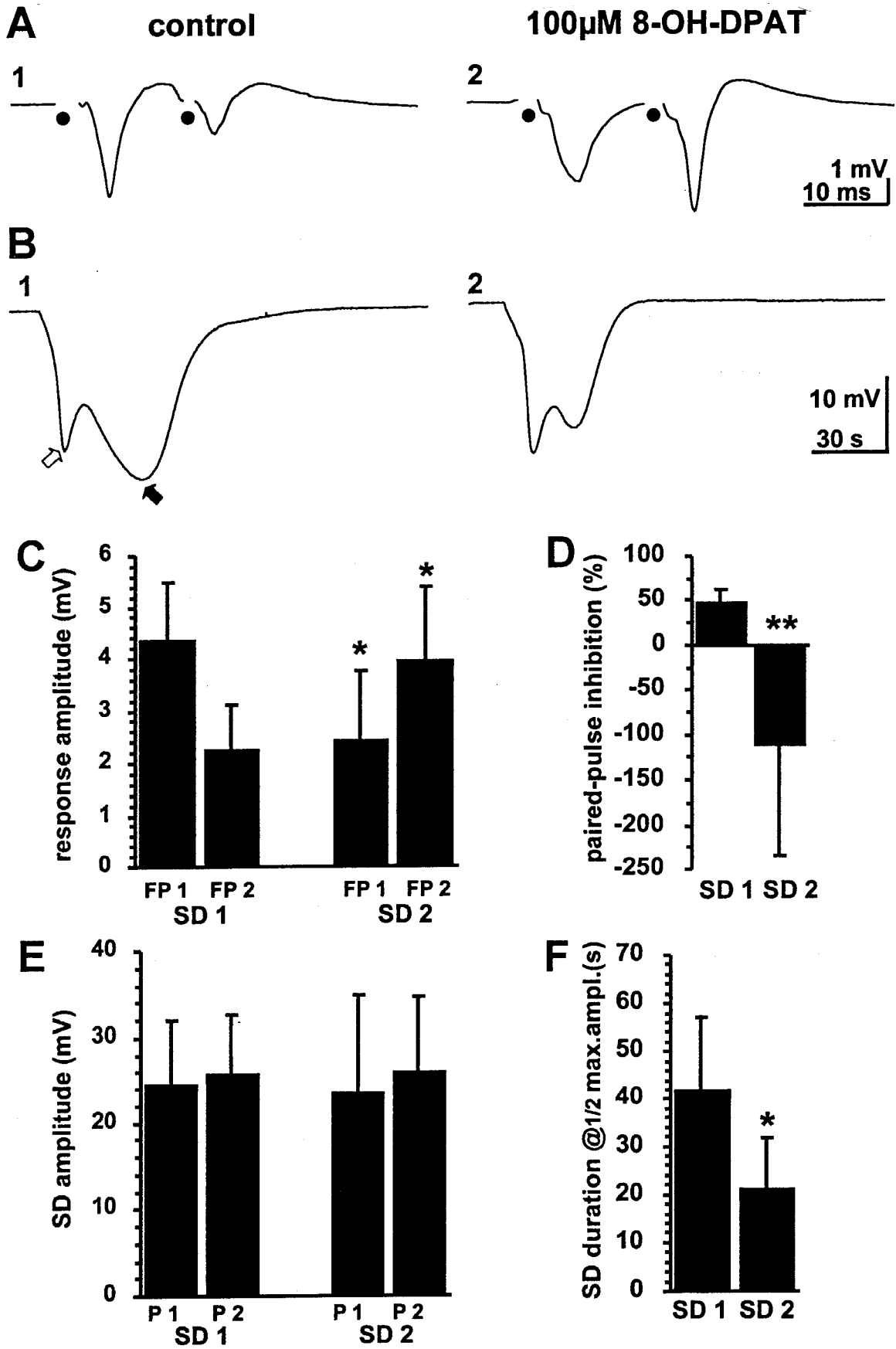


Abb. 20.

3.4.2 Effekte von BAY x 3702

Die Rolle des 5-HT_{1A}-Rezeptors für die synaptische Transmission und die elektrophysiologischen SD-Eigenschaften wurde weitergehend mit der Applikation des neuen, selektiven und potenten 5-HT_{1A}-Agonisten BAY x 3702 ((-)-(R)-2-[4-[(Chroman-2-ylmethyl)amino]butyl]-1,1-dioxo-1,2-benzisothiazol-3(2H)-onmonohydrochlorid) analysiert (De Vry et al. 1997). *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten eine hohe Affinität dieser Substanz zu humanen und Ratten 5-HT_{1A}-Rezeptoren, wobei eintretende Effekte durch den selektiven 5-HT_{1A}-Antagonisten WAY-100635 antagonisierbar waren (De Vry et al. 1997). Auch bei diesen Versuchen (1 µM: n = 9; 10 µM: n = 8, 100 µM: n = 10) wurden die synaptischen Feldantworten sowie die SD-Amplitude, SD-Dauer und das SD-Integral gemessen und der untersuchte Wirkstoff zwischen zwei spreading depression 30 min per Badapplikation in den jeweiligen Hirnschnitt eingewaschen. Im Einzelnen sahen die Ergebnisse wie folgt aus:

In der Versuchsgruppe **1 µM BAY x 3702** betrug die gemittelte Amplitude der evozierten Feldpotentiale unter Kontrollbedingungen $2,79 \pm 0,89$ mV (FP1, n = 9) und $0,63 \pm 0,39$ mV (FP2, n = 9) (Abb. 21 A1; C linke Säulen). Daraus konnte eine Doppelpulshemmung von $76,8 \pm 13,5$ % (n = 9) errechnet werden. (Abb. 21 D linke Säule). Unter dem Einfluß von 1 µM BAY x 3702 erhöhte sich die evozierte Feldpotentialantwort auf den ersten Reiz auf $3,11 \pm 1,06$ mV (nicht signifikant, n = 9) und die Feldpotentialantwort auf den zweiten Reiz signifikant ($p < 0,05$; n = 9) auf $1,08 \pm 0,78$ mV (Abb. 21 A2; C rechte Säulen). Daraus resultierte ein ebenfalls signifikanter ($p < 0,05$; n = 9) Abfall der intrakortikalen Inhibition auf $59,6 \pm 39,8$ % (n = 9) (Abb. 21 D rechte Säule). Von den elektrophysiologischen SD-Parametern (Abb. 21 B1, 2) wurde die SD-Dauer bereits in einer Konzentration von 1 µM leicht von $48,0 \pm 12,9$ s auf $44,5 \pm 13,2$ s signifikant ($p < 0,05$; n = 9) verkürzt (Abb. 21 F), während sich das SD-Integral sich nicht signifikant (n = 9) von 1016 ± 405 mVs auf 948 ± 379 mVs verringerte (nicht gezeigt). Die SD-Amplitude vergrößerte sich von $16,7 \pm 4,2$ mV (peak1; n = 9) bzw. $19,5 \pm 4,5$ mV (peak2; n = 9) auf $17,8 \pm 5,9$ mV (peak1; n = 9) bzw. $21,1 \pm 5,29$ mV (peak2; $p < 0,05$; n = 8) unter 1 µM BAY x 3702 (Abb. 21 E).

Auch in der Versuchsreihe mit einer Konzentration von **10 µM BAY x 3702** trat eine deutliche kortikale Disinhibition auf, wie sie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde und auch unter 5-HT_{1A}-Rezeptor Aktivierung durch 8-OH-DPAT in allen Konzentration auftrat (Abb. 22 A2). Dabei verringerte sich die Effizienz der intrakortikalen GABAergen Inhibition signifikant ($p < 0,05$; n=8) von $68,5 \pm 21,0$ % auf $47,3 \pm 42,1$ % (Abb. 22D). Sie resultierte aus einer signifikanten ($p < 0,05$; n=8) Zunahme der Feldpotentialantwort auf den zweiten Stimulus (FP2) von $0,65 \pm 0,5$ mV auf $0,89 \pm 0,66$ mV, während die Antwort auf den ersten Stimulus (FP1; n = 8) sich von $2,04 \pm 0,8$ mV auf $2,32 \pm 1,71$ mV erhöhte (Abb. 22 C). Der statistische Vergleich erwies sich jedoch bei FP1 als nicht signifikant.

Die Wirkungen von 10 μM BAY x 3702 auf die Eigenschaften der SD ergaben eine signifikante ($p < 0,05$; $n = 8$) Verminderung der durchschnittlichen SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude von $43,3 \pm 14,5$ s (Kontrollmessungen) auf $35,4 \pm 14,0$ s (Abb. 22 B1, 2; F). Da sich jedoch die gemittelte SD-Amplitude von $17,2 \pm 3,9$ mV (peak1) bzw. $20,5 \pm 6,3$ mV (peak2; jeweils in aCSF) auf $21,2 \pm 6,3$ mV (peak1; $n = 8$) bzw. $23 \pm 6,5$ mV (peak2; $n = 5$; jeweils in 10 μM BAY x 3702) erhöhte (nicht signifikant, Abb. 22 E), verringerte sich das SD-Integral ($n = 8$; nicht gezeigt) nur geringfügig von 980 ± 486 mVs (SD1) auf 900 ± 487 mVs (SD2).

Die Wirkungen von **100 μM BAY x 3702** (Abb. 23) waren deutlicher ausgeprägt, als in den vorhergehenden Konzentrationen. Die Substanz wurde in dieser Versuchsreihe an 10 Hirnschnitten untersucht. Auch hier war der Verlust der intrakortikalen Inhibition wie unter 10 μM 8-OH-DPAT von einer Doppelpulsfaszilation gekennzeichnet. Das arithmetische Mittel der Feldpotentialantwort unter Kontrollbedingungen betrug $3,15 \pm 0,92$ mV (FP1) sowie $0,59 \pm 0,51$ mV (FP2; $n = 10$; Abb. 23 A1, linke Säulen C). Nach der Badapplikation von 100 μM BAY x 3702 über 30 Minuten (Abb. 23 A2) verringerte sich die durchschnittliche Amplitude der ersten Reizantwort signifikant ($p = 0,0051$) auf $1,22 \pm 0,99$ mV; $n = 10$) bei gleichzeitig signifikant ($p = 0,0218$) auf $1,89 \pm 1,59$ mV erhöhter Amplitude der zweiten Feldpotentialantwort ($n=10$; Abb. 23 rechte Säulen C). Dies bewirkte auch einen Verlust der GABAergen Doppelpulshemmung von $79,9 \pm 16,8$ % auf $-187 \pm 282,5$ % ($p < 0,05$; $n = 10$; Abb. 23 D).

Deutlich verkürzt war bei den SD-Parametern nach der 5-HT_{1A}-Rezeptoraktivierung durch 100 μM BAY x 3702 die SD-Dauer (Abb. 23; B1, 2). So betrug die bei halbmaximaler Amplitude gemessene durchschnittliche SD-Dauer unter Kontrollbedingungen $34,7 \pm 12,3$ s und war in 100 μM BAY x 3702 signifikant ($p = 0,0093$; $n = 10$) auf $23,5 \pm 10,5$ s (d.h. auf ca. 68 %) verkürzt (Abb. 23 F). Auch das SD-Integral verringerte sich signifikant ($p = 0,0051$) von 843 ± 323 mVs auf 541 ± 193 mVs (auf 64%; $n = 10$; [nicht gezeigt]), da sich auch die gemittelte SD-Amplitude von P1 bzw. P2 der SD von $20,2 \pm 6,1$ mV ($n = 10$) bzw. $22,7 \pm 8,4$ mV ($n = 5$) auf $19,6 \pm 5,4$ mV ($n = 10$) bzw. $19,0 \pm 5,2$ mV ($n = 7$; nicht signifikant) verringerte (Abb. 23 E).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors durch BAY x 3702 konzentrationsabhängig neben dem Verlust der GABAergen Doppelpulshemmung zu einer zunehmenden Verkürzung der SD-Dauer führt, wobei ab einer Konzentration von 100 μM auch das SD-Integral signifikant verkleinert ist, d.h. die Verkürzung der SD-Dauer nicht mehr durch eine Anstieg der SD-Amplitude kompensiert wird. Da die mit BAY x 3702 beobachteten Wirkungen mit denen von 8-OH-DPAT vergleichbar waren, ist es hochwahrscheinlich, daß die beobachteten Effekte tatsächlich auf einer Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors beruhen.

Abb. 21,22,23. In diesen Abbildungen werden die Veränderungen der synaptischen Transmission (jeweils A) als auch die der spreading depression (SD, jeweils B) durch die Wirkung des selektiven 5-HT_{1A}-Agonisten BAY x 3702 in unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 19: 1 μ M; Abb. 20: 10 μ M; Abb. 21: 100 μ M) dargestellt. Die Applikation der genannten Substanz bewirkte in allen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen eine deutliche Verminderung der intrakortikalen GABAergen Doppelpulshemmung (jeweils A2). Dargestellt wird weiterhin die mit steigender Konzentration des 5-HT_{1A}-Agonisten zunehmende Verkürzung der SD-Dauer (jeweils B2). Die Pfeile unter der ersten SD (B1) kennzeichnen die beiden SD-Komponenten (nicht gefüllter Pfeil weist auf P1, gefüllter Pfeil zeigt zu P2).

In den Diagrammen (jeweils C,D,E,F) werden die quantitativen Ergebnisse der Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors unter BAY x 3702 mit den Ausgangswerten von Kontrollgruppen verglichen. Die Säulen stellen arithmetische Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung (T-Balken) dar. In C: der exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Transmission, in D: der Doppelpulshemmung der synaptischen Antwort (jeweils n = 9, n = 8 bzw. n = 10), in E: der SD-Amplitude, getrennt nach Peak 1 (n = 9, n = 8 bzw. n = 10) und Peak 2 (n = 9, n = 5 bzw. n = 5) sowie in F: der SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude (n = 9, n = 8 bzw. n = 10), jeweils unter Kontrollbedingungen in aCSF (linke Säulen in C, D, E, F) sowie mit 1, 10, oder 100 μ M BAY x 3702 als Badapplikation (rechte Säulen in C, D, E, F). * markiert die Signifikanz p < 0,05; ** stellt eine Signifikanz p < 0,01 dar (Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test).

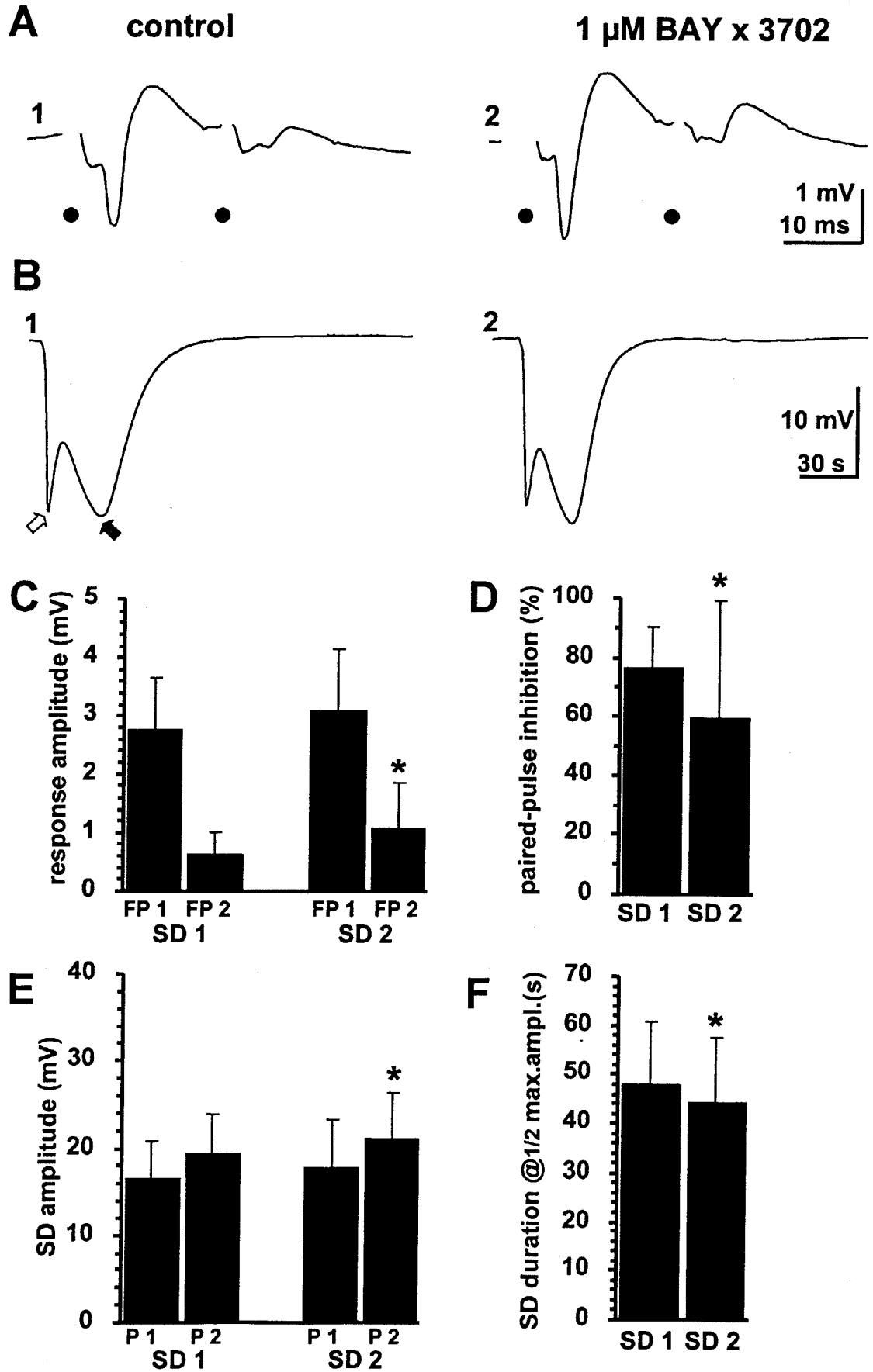


Abb. 21.

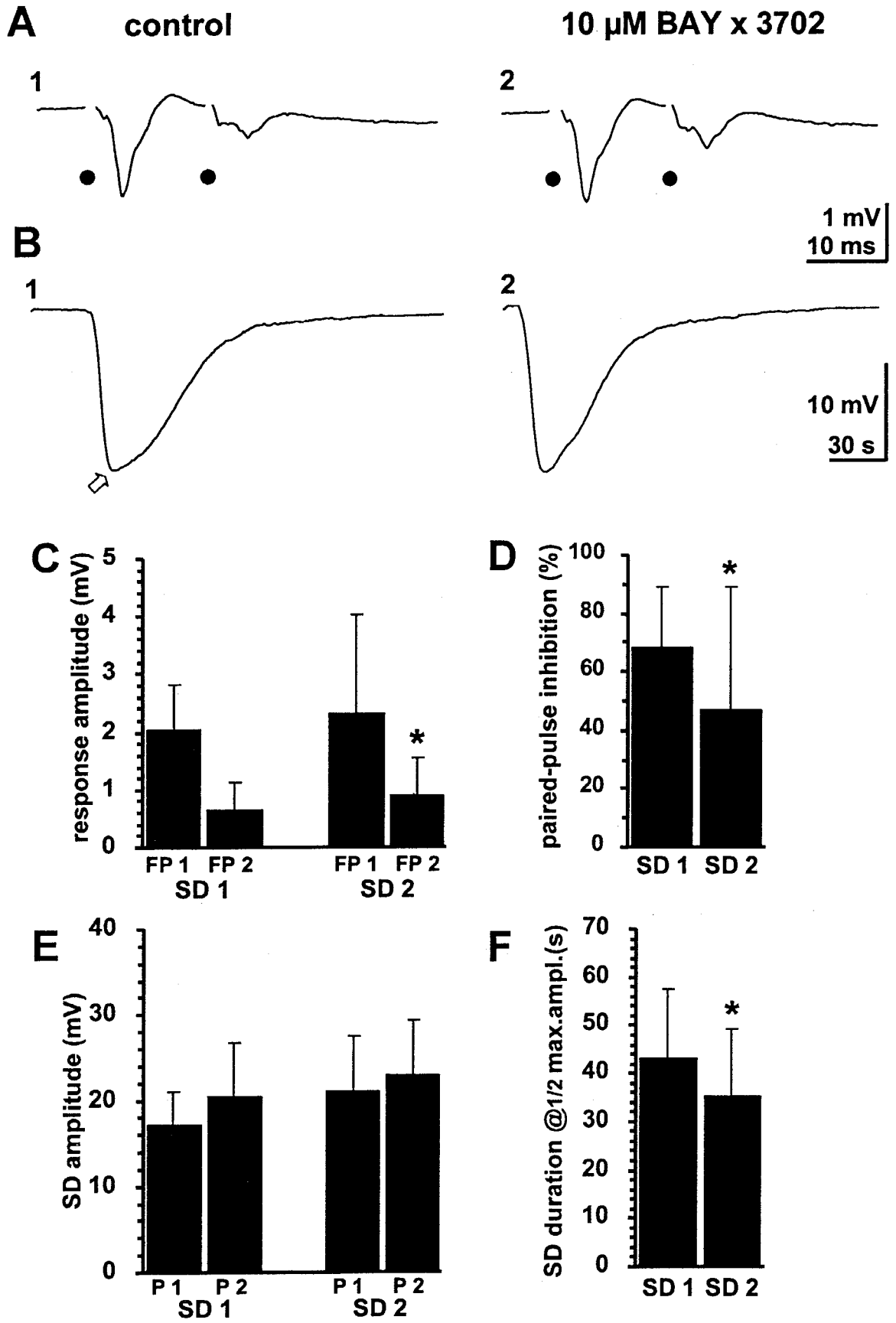


Abb. 22.

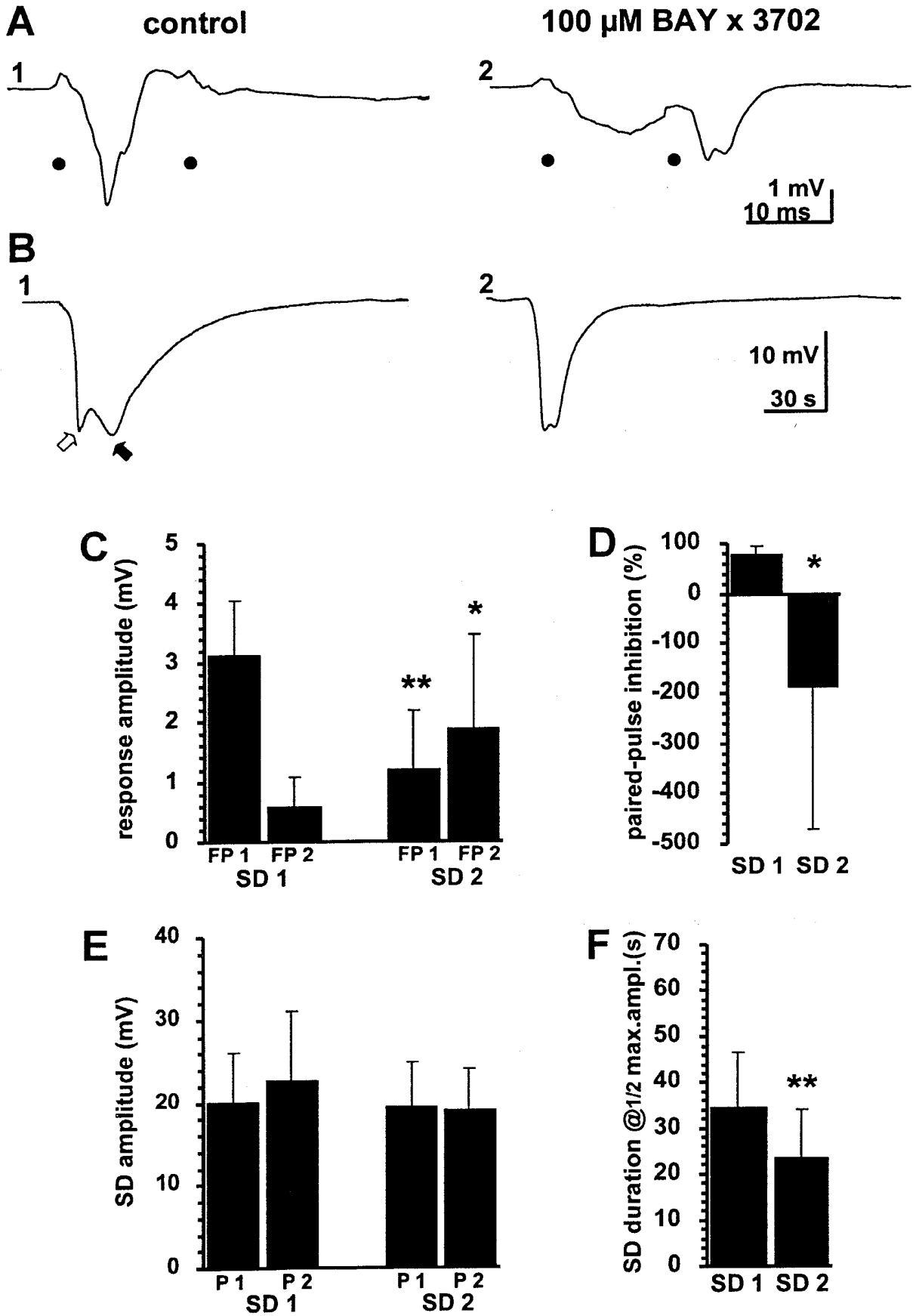


Abb. 23.

4. DISKUSSION

Die wichtigsten Ergebnisse der hier vorgestellten Daten sind:

- Die etwa gleichförmige Ausbreitungsgeschwindigkeit einer KCl-induzierten SD im Neokortex beträgt unter *in vitro* Bedingungen $3,77 \pm 1,85$ mm/min und kann dabei in mediolateraler Richtung eine Strecke von mindestens 3,5 mm zurücklegen.
- Jede einzelne SD einer repetitiven, d.h. vierfachen SD, verursacht auch unter normoxischen Bedingungen im gewählten *in vitro* SD-Modell der adulten Ratte eine Abnahme der Effizienz der intrakortikalen GABAergen synaptischen Inhibition um ca. 10 %.
- Elektrophysiologische Parameter einer SD wie SD-Amplitude, SD-Dauer oder -Integral sind bei einer repetitiven SD relativ konstant, wenn die SD im Abstand von 30 min an der gleichen Stelle im Neokortex ausgelöst wird.
- Die Applikation des selektiven AMPA-Antagonisten NBQX ist ohne Wirkung auf die funktionellen Eigenschaften einer KCl-induzierten SD *in vitro*.
- Der nicht-kompetitive, selektive NMDA-Antagonist Ketamin führt zu einer signifikanten Verringerung einer SD-Amplitude, SD-Dauer und SD-Integral.
- Eine kombinierte Applikation von NBQX und Ketamin führt ebenfalls zu einer drastischen Reduktion der SD.
- Die 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT und BAY x 3702 bewirken konzentrationsabhängig die Verringerung einer SD hauptsächlich über die Verkürzung der SD-Dauer.
- Die Applikation beider 5-HT_{1A}-Agonisten führte darüber hinaus zu einer deutlichen Disinhibition der kortikalen Funktion, die sich in der höchsten getesteten Konzentration zu einer Doppelpulsfaszilation ausweitete.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Antagonisten am NMDA-Glutamatrezeptor als auch Agonisten am 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptor zu einer Verminderung von SD-Depolarisationen führen und somit die Behandlung der akuten, fokalen zerebralen Ischämie verbessern können. Diese Schlußfolgerung soll im folgenden diskutiert werden.

4.1 Spreading depression *in vitro* und *in vivo*

Die Applikation eines Mikrotropfen konzentrierter 3 M Kaliumchloridlösung auf die Oberfläche eines neokortikalen Hirnschnitts gestattete die reproduzierbare Auslösung einer typischen SD-Welle, die in ihrer Amplitude, Dauer als auch Ausbreitungsgeschwindigkeit sehr gut mit Daten aus *in vivo* Experimenten anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt. Frühere *in vivo* Experimente bestimmten unter Kontrollbedingungen die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer SD im Kortex mit rund 3 - 3,8 mm/ min (Leao, 1944; Leao, 1947; Lauritzen, Hansen, 1992), die SD-Amplitude mit 23 - 26 mV (Lauritzen, Hansen, 1992; Marrannes et al. 1988) und die SD-Dauer mit ca. 1 -

2,8 min (Mies, Paschen, 1984; Gardner-Medwin et al. 1994; Nedergaard, Hansen, 1993) bzw. 0,36 min bei halbmaximaler Amplitude (Marrannes et al. 1988). Da die SD-Dauer, d.h. die Zeit, nach der die DC-Negativierung vollständig zur Ausgangslinie zurückgekehrt ist, nur ungenau zu bestimmen ist, wurde auch bei den hier vorgestellten Experimenten die SD-Dauer bei halbmaximaler Amplitude bestimmt. Die SD-Amplitude im Hippocampus wird - abhängig von der untersuchten Region - mit 20 - 40 mV und die SD-Dauer mit 35 - 90s angegeben (Herreras, Somjen, 1993). Insbesondere das Auftreten der Änderung des DC-Potentials in einem mono- oder biphasischen Verlauf ist für eine Kaliumchlorid-induzierte spreading depression typisch (Obrenovitch et al. 1996). Im Falle des biphasischen Verlaufs, der bei den hier vorgestellten Experimenten etwa 2/3 der SD ausmachte, wurde die frühe, schnelle Komponente bzw. späte, langsamere Komponente von anderen Autoren (Herreras, Somjen, 1993) als „Phase I“ bzw. „Phase II“ bezeichnet, während in dieser Arbeit die Begriffe „peak1 (P1)“ bzw. „peak2 (P2)“ verwendet werden (vgl. Abb. 8). Peak 1 beschreibt dabei das erste negative Maximum der DC-Potential Negativierung, welches vom zweiten negativen Maximum (Peak 2) durch eine Phase vorübergehender, konvexförmiger, relativer Positivierung separiert ist. Uneinheitlich war der Verlauf, ob Peak 1 oder Peak 2 einer neokortikalen SD das negativere Maximum darstellte, während bei hippocampalen SD Herreras & Somjen (1993) von einer grundsätzlich negativeren Phase II berichteten. Diese Vergleiche legen nahe, daß die in dem hier vorgestellten *in vitro* Modell etablierte reproduzierbare Auslösung einer SD in den Parametern Amplitude, Dauer oder Ausbreitungsgeschwindigkeit durchaus mit SD-Depolarisationen in der gleichen Hirnregion unter *in vivo* Bedingungen vergleichbar ist und SD-Wellen sowohl unter *in vitro* als auch *in vivo* Bedingungen einen ähnlichen, wenn nicht identischen Verlauf offenbaren.

Die Versuchsgruppe der repetitiven, d.h. vierfachen SD, wobei jede einzelne SD im Abstand von 30 min ausgelöst wurde, zeigte eine relative Konstanz der elektrophysiologischen Merkmale SD-Amplitude, SD-Dauer und SD-Integral. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von einer repetitiven SD im Hippocampus, in dem sich die SD-Dauer mit zunehmender SD-Anzahl verlängert (siehe Abb. 1 in (Herreras, Somjen, 1993)). Dem zu Grunde liegt möglicherweise die unterschiedliche zelluläre Konnektivität im Hippocampus oder methodische Unterschiede, da in der zitierten Arbeit die Kaliumionenlösung konstant über 100 min appliziert wurde und so zur Auslösung von SD-Depolarisationen im Abstand von wenigen Minuten führte.

SD-ähnliche Depolarisationen werden auch in der Umgebungszone (Penumbra) einer fokalen, ischämischen Läsion nach experimentellem Verschuß der A. cerebri media beobachtet (Nedergaard, Astrup, 1986; Back et al. 1994), jedoch ist die unter normoxischen Bedingungen SD-assoziierte Erhöhung des zerebralen Blutflusses und Sauerstoffpartialdruckes nicht möglich - es kommt durch SD-ähnliche Depolarisationen und assoziierten energiekonsumierenden Prozessen im Penumbrawebe zu transienten Hypoxien (Back et al. 1994). Diese transienten, SD-ähnlichen („SD-like“) Depolarisationen um eine ischämischen Gewebekern („ischemic core“) werden deshalb auch als Periinfarktdepolarisationen (Hossmann, 1996) bezeichnet. Sog. „Periin-

farktdepolarisationen“ unterscheiden sich von „echten“ SD-Wellen im intakten, normoxischen Kortex in ihrer Dauer, die um den Faktor 2,5 (Back et al. 1996) oder ca. 4 (Back et al. 1994) auf etwa 8 min (Nedergaard, Astrup, 1986) verlängert sein kann. Desweiteren hängt die Frequenz der experimentellen Periinfarktdepolarisationen stark vom verwendeten Narkosemittel ab. Ein weiterer Unterschied zu einer genuinen SD besteht in ihrer Registrierbarkeit nach Gefäßverschuß *ohne* zusätzliche externe Stimuli über mehrere Stunden. Sie sind nicht mit einer anderen Art von kortikalen Depolarisation, der „plötzlichen anoxischen Depolarisation“ gleichzusetzen, die durch Hypoxien auch in der Randzone eines Hirninfarktes auftreten (Nedergaard, Hansen, 1993), da diese im Gegensatz zur SD von einer Latenzzeit nach Einsetzen einer Hypoxie gekennzeichnet sind (vgl. Abb. 1 vs. Abb. 5 in Jing et al. 1993), die sich mit repetitiven Hypoxien verkürzt (Kral et al. 1993). Darüber hinaus werden anoxische Depolarisationen *nicht* durch NMDA-Antagonisten im Sinne einer Amplitudenverringerung beeinflusst. Eine Latenzzeit kann bei einer SD nicht beobachtet werden - die Negativierung des DC-Potentials erfolgt unmittelbar nach Applikation einer Kaliumionenlösung. In der Zentralregion einer ischämischen Läsion oder aber nach mehreren SD-Wellen kann eine weitere Depolarisation hinzukommen - die „terminale Depolarisation“ (Saito et al. 1997), eine Depolarisation, die überhaupt nicht mehr zur Ausgangsline neuronaler Aktivität zurückkehrt, sondern in ihrer permanenten Negativierung einem Ausgleich elektrochemischer Gradienten um damit dem Zelltod entspricht. Dennoch wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD-ähnlichen (Periinfarkt)-Depolarisationen in der ischämischen Penumbra *in vivo* auch mit rund 3 mm/min bestimmt (Hasegawa et al. 1995) und ist damit im Bereich der hier ermittelten SD-Ausbreitungsgeschwindigkeit von $3,77 \pm 1,85$ mm/min.

Was ist die pathophysiologische Relevanz der hier diskutierten, unterschiedlichen Formen von (transienten) kortikalen DC-Depolarisationen? Der Zusammenbruch der Ionenhomöostase während einer SD, gekennzeichnet durch einen starken Abfall der extrazellulären Ca^{2+} -, Na^+ - und Chloridionenkonzentration und Verkleinerung des Extrazellulärraums auf 50 % (Hansen, 1985), führt zwecks Wiederherstellung physiologischer Ionengradienten (= Repolarisation) zu einer Aktivierung energieabhängiger Ionenpumpen der depolarisierten Zelle, zu einem erhöhten O_2 , Glukose und ATP-Verbrauch sowie zu einem Anstieg des zerebralen Blutflusses (Kocher, 1990; Mayevsky, Weiss, 1991). Werden jedoch MRT-gestützt die ionenabhängigen Wasserbewegungen infolge einer Periinfarkt-SD registriert, so zeigt sich, daß ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der gestörten Hirndurchblutung und der Zeitdauer der Wiederherstellung der ursprünglichen Diffusionskoeffizienten besteht: bei der gestörten Gewebsoxygenierung und der begrenzten Kompensationskapazität der bereits dilatierten Hirngefäße wird die benötigte Rückbildungszeit von Depolarisationen immer länger, je stärker die Hirnperfusion gestört ist (Röther et al. 1996a; 1996b). Dies läßt den Schluß zu, daß die Zeitdauer, die zur SD-Repolarisation benötigt wird, durch einen Energiemangel verlängert wird, der die Wiederherstellung eines physiologischen Membranpotentials stört (Gido et al. 1993). Dies wird indirekt dadurch bestätigt, daß eine Hyperglykämie die Repolarisation nach SD-Depolarisationen beschleunigt und das Auftreten von

fatalen „terminalen“ Depolarisationen verzögert (Els et al. 1997). Dementsprechend kann die graduelle Zunahme der Zeitdauer der kortikalen Depolarisationen - von „echten“ SD-Wellen, anoxischen Depolarisationen, SD-ähnlichen (Periinfarkt-) Depolarisation zu terminalen Depolarisationen - als abnehmende Fähigkeit des Hirnparenchyms interpretiert werden, dem metabolischen Stress einer kortikalen Depolarisation zu entsprechen. Unter ischämischen Bedingungen kann ein zerebraler Blutfluß, der unterhalb einer kritischen, für den Energiemetabolismus der Ionenhomöostase benötigten Rate liegt, zu einem Zusammenbruch der energieabhängigen transmembranalen Gradienten führen. Somit stellen in der Penumbra als ohnehin O₂ und Energie-kompromitiertes Gewebe die energiekonsumierenden Prozesse zur Repolarisation von SD-(ähnlichen)Depolarisationen einen zusätzlichen metabolischen Stress dar. SDs im Randgebiets eines Hirninfarkt können damit zu einem Umschlagen des kritischen Penumbra-Gleichgewichts von Aufrechterhaltung eines basalen zellulären Membranpotentials und einem irreversiblen ischämischen Zellschaden hin zu einer Hirninfarzierung beitragen (Hossmann, 1994). Deshalb korreliert die Zeitdauer und Anzahl von SD-(ähnlichen)Depolarisationen direkt mit dem Auftreten aber auch mit dem Ausmaß postischämischer Zellläsionen und bestimmt den zu erwartenden Hirnschaden nach fokaler zerebraler Ischämie mit (Koroleva, Bures, 1996). Darüber hinaus induzieren SD-Wellen, die sich im Kortex wahrscheinlich radiär ausbreiten, umfangreiche Veränderungen in Zellen, die *nicht* direkt von der Ischämie betroffen und auch *nicht* im Penumbra-gebiet liegen (Dietrich et al. 1994).

Die hier vorgestellten Daten wurden unter normoxischen und unter *in vitro* Bedingungen gewonnen und unterscheiden sich demzufolge in wichtigen Faktoren von den sehr komplexen ischämischen *in vivo* Bedingungen, unter denen z.T. die anderen diskutierten Daten gewonnen wurden. Dennoch scheint ein Vergleich von normoxischen SDs und SD-ähnlichen Depolarisationen in der Penumbra zulässig, da sich die untersuchten kortikalen Depolarisationen hauptsächlich in ihrer Zeitdauer unterscheiden. Weitere, wichtige Vorteile sprechen darüber hinaus für die *in vitro* Präparation. Um eine Substanz auf potentielle neuroprotektive Eigenschaften, die hier als eine Verkürzung der SD-Dauer oder als Verminderung der SD-Amplitude interpretiert werden, zu untersuchen, ist es von entscheidender Bedeutung, ein Standardmodell zu entwickeln, das für nachfolgende Vergleiche eine Konstanz der untersuchten Parameter unter Kontrollbedingungen gewährleistet. Dies ist für das MCA-Okklusionsmodell nicht einfach, da interferierende Faktoren wie Körpertemperatur, Hyperglykämie, eine sehr unterschiedliche Dauer der kortikalen Depolarisationen, das Auftreten von spontanen SDs, bei systemischer Applikation der untersuchten Substanz noch ein Einfluß der Blut-Hirn-Schranke sowie Veränderungen des zerebralen Blutflusses hinzukommen und eine Beurteilung von Testsubstanzen auf potentielle neuroprotektive Einflüsse erschweren. Diese Faktoren werden beim *in vitro* Modell mit einer konstanten Temperatur, Begasung und Flußgeschwindigkeit der aCSF-Lösung auf Kosten des Verlustes eines Großteils der Konnektivität neuronaler und nicht-neuronaler Zellen, wie sie in der Komplexität eines biologischen *in vivo* System vorliegen, ausgeschaltet. Es soll betont werden, daß Hirnschnitte unter *in*

vitro Bedingungen zwar ohne Blut aber im funktionellen Sinne dennoch nicht ischämisch sind. Unter *in vivo* Bedingungen hat Blut für das Gehirn – vereinfacht - eine Vehikelfunktion und transportiert Glukose und Sauerstoff. Dieser Funktionen werden unter *in vitro* Bedingungen (nach Sistieren der zerebralen Blutperfusion während der ca. 1minütigen Präparation) in der Interfacekammer von einer permanenten Carbogenbegasung und aCSF-Perfusion übernommen. Die Skepsis, *in vitro* Präparationen von Hirngewebe dennoch als „physiologisch“ zu betrachten und für mehrere Stunden auch erhalten zu können, kann auf den Punkt reduziert werden, daß es sich bei elektrophysiologischen *in vitro* Ableitungen (z.B. evozierte Potentiale) zwar nicht um identische, aber um mit *in vivo* Messungen vergleichbare Ableitungen handelt (Richards, 1981). Das hier vorgestellte Modell gestattet eine gleichförmige, reproduzierbare SD Auslösung im neokortikalen Hirnschnitt und zeigte, daß sich zwei im Abstand von 30 min ausgelöste SDs nur geringfügig in ihren Amplituden, Dauer und Integral unterscheiden. Somit erschien der gewählte Versuchsaufbau als sehr geeignet, weitere pharmakologische Untersuchungen zur potentiellen Beeinflussung der charakterisierten quantitativen SD-Parameter durchzuführen.

4.2 Einfluß der repetitiven SD auf die synaptische Transmission

Im Gegensatz zu den gleichbleibenden elektrophysiologischen SD-Parametern war die synaptische Transmission nach jeder einzelnen SD signifikant verändert. Während die Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus nicht signifikant variierte, verursachte jede SD einen signifikanten Anstieg der Feldpotentialantwort auf den zweiten Stimulus - die Doppelpulshemmung nach mit jeder weiteren SD um ca. 10 % ab. Jede SD verursachte so eine signifikante und selektive Abnahme der intrakortikalen GABAergen inhibitorischen Mechanismen, da die exzitatorische Feldpotentialantwort relativ unverändert blieb und somit die verminderte Doppelpulshemmung nicht von einem verminderten exzitatorischen Eingang verursacht war (Luhmann et al. 1993). Nach 3 SDs war somit die Ausgangsdoppelpulshemmung von ca. 74 % auf ca. 43 % abgefallen.

Die hier vorgestellten Experimente, die eine SD-induzierte selektive Supprimierung der intrinsischen inhibitorischen GABAergen Funktion zeigten, unterstützen auch das Konzept der selektiven Vulnerabilität des neokortikalen inhibitorischen Systems (Rosen, Morris, 1993). Auch Experimente mit der z.T. SD-ähnlichen anoxischen Depolarisation belegen die besondere Sensitivität des neokortikalen inhibitorischen Systems (Luhmann, Heinemann, 1992). Des weiteren wurde auch in hippocampalen Hirnschnitten nach SD-Depolarisationen eine ausgeprägte neuronale Hyperexzitabilität beobachtet, die zu Burstentladungen, d.h. rasch aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen von Neuronen führte (Kawasaki et al. 1988). Für eine schlüssige Erklärung der Daten wären zusätzliche intrazelluläre Messungen notwendig, aber es scheint sehr wahrscheinlich, daß der unterdrückten GABAergen Funktion nach repetitiver SD prä- oder post-

synaptische funktionelle Störungen auf zellulärer Ebene zu Grunde zu liegen. Möglicherweise werden durch repetitive SDs präsynaptisch die GABA-Synthese oder aber die vesikuläre GABA-Freisetzung beeinträchtigt. Postsynaptisch kann die Sensitivität von GABA-Rezeptoren oder die Funktion des GABA-Rezeptor-assoziierten Ionenkanals gestört sein. Ob sich die unterdrückte GABAerge Funktion nach einer längeren Zeitraum wieder auf Ausgangsniveau erholt oder es sich um eine irreversible Schädigung handelt, kann nicht eingeschätzt werden, da sich die Messungen an einem Hirnschnitt über einen Zeitraum von 1,5 Stunden erstreckten. Unabhängig von der exakten Lokalisation der gestörten Funktion inhibitorischer GABAerger Kontrollmechanismen ist der beobachtete Abfall der inhibitorischen Effizienz ausreichend, daß die SD-induzierte Disinhibition auch unter normoxischen Bedingungen zu einer kortikalen Dysfunktion beiträgt. Frühere *in vitro* Studien haben gezeigt, daß bereits eine um 10 - 20 % verminderte Effizienz der inhibitorischen synaptischen Transmission zur Generierung pathophysiologischer synchronisierter neuronaler Aktivität beiträgt (Chagnac-Amitai, Connors, 1989). Auch *in vivo* wurden nach photothrombotischen Infarkt elektrophysiologische Veränderungen im Sinne einer gestörten neuronalen Inhibition beschrieben, die in kortikalen Regionen 5 mm vom ursprünglich infarzierten Gebiet *entfernt* auftraten (Domann et al. 1993) und möglicherweise auch Folge der Ausbreitung von SD-Depolarisationen in primär nicht infarziertes Hirngewebe ist.

Obwohl SD-Depolarisationen unter normoxischen Bedingungen keine morphologischen Schäden verursachen (Nedergaard, Hansen, 1988) und von anderen Autoren als „pathologisches Ereignis ohne Pathologie“ (Siesjö, Bengtsson, 1989) bezeichnet wurden, konnte mit verfeinerten molekularbiologischen Techniken gezeigt werden, daß SD-Episoden auch unter ausreichender Energie- und Sauerstoffversorgung durchweg tiefgreifende zelluläre Veränderungen verursachen: es kommt NMDA-Rezeptor und Phospholipase A₂ abhängig zu einer veränderten neuronalen Genexpression und die Bildung neuer Proteine, die unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar sind, wie z.B. der induzierbaren Cyclooxygenase II (COX II), einem Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese und Entzündungsreaktion (Miettinen et al. 1997). Die neuen Genprodukte könnten zu einer neuronalen Dysfunktion beitragen und die Empfindlichkeit für ischämische Folgeschäden erhöhen. Möglicherweise stellt eine SD-induzierte neuronale COX-II Expression auch eine Verbindung zur von anderen Autoren beobachtete SD-induzierten Aktivierung von Mikroglia (Gehrmann et al. 1993) und Astrozyten (Kraig et al. 1991) dar, die insgesamt die Beteiligung von SD-Wellen an einer Entzündungsreaktion nahelegen. Weitergehende Untersuchungen, ob SDs an einer verstärkten Produktion von IL-1 oder TNF- α beteiligt sind, sind bisher noch nicht beschrieben worden. Eine SD-induzierte gesteigerte Zellexzitation kann weiterhin Trigger für genetische Veränderungen wie die Induktion von immediate early genes oder neurotrophen Wachstumsfaktoren darstellen, wie sie auch nach kindling-induzierten Krampfanfällen (Saffen et al. 1988) oder generell im postischämischen Hirnparenchym auftreten und teilweise als Transkriptionsfaktoren für weitere Gene wirken. Diese Beobachtungen anderer Autoren und die hier vorgestellten Untersuchungen legen nahe, daß SD-Wellen auch im intakten Kortex einen

„zellulären Stress“ darstellen, der z.B. über veränderte zelluläre Syntheseleistungen zu einer (transienten) funktionellen Störung von Neuronen beitragen kann. Dennoch unterscheidet sich sicher das Ausmaß einer pathogenetischen Rolle von SDs unter normoxischen und hypoxisch-ischämischen Bedingungen, da SD-Episoden stark energieverbrauchende Prozesse darstellen, so daß ein schädigender Einfluß von rekurrenten SDs unter Bedingungen einer gestörten Energie- und Sauerstoffversorgung entscheidend verstärkt ist.

Die hier *in vitro* gefundene SD-induzierte Unterdrückung der GABAergen Inhibition und SD-generierte zelluläre Hyperexzitabilität kann eine pathophysiologische Relevanz bei verschiedenen Konditionen entfalten. Da Migränepatienten mit Aurasymptomatik eine geringere Exzitatio- onsschwelle des okzipitalen Kortex für visuelle Phänomene aufweisen (Aurora et al. 1998), könnte unter normoxischen Bedingungen die SD-induzierte Disinhibition kortikaler Neurone zur Generierung oder Ausbreitung der Aurasymptomatik beitragen. Allerdings bedarf dies einer Be- stätigung der Einzelbefunde (Mayevsky et al. 1996) zur tatsächlichen Existenz SD-ähnlicher Er- eignisse beim Menschen. Sollte dies mit verbesserten optischen Methoden möglich sein, sind SD-Depolarisationen und eine „spreading oligemia“ zusammen mit einer SD-induzierten neuro- nalen Hyperexzitabilität ein pathophysiologischer Erklärungsansatz zur Migräne (Olesen et al. 1981; Lauritzen, 1994; Welch, 1997). Interessanterweise haben andere Autoren gezeigt, daß Mi- gräneanfälle zu einem höheren Risiko für ischämische, aber nicht für hämorrhagische Schlagan- fälle prädisponieren. Insbesondere prämenopausale Frauen entwickeln einen Schlaganfall in bis zu 40 % direkt aus einer Migräneattacke - der migränöse Schlaganfall (Chang et al. 1999). Vorallem die klassische Migräne (mit Aura) ist mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko verbunden (Carolei et al. 1996). Möglicherweise kann die hier gezeigte SD-induzierte neuronale Hyperex- zitabilität zusammen mit persönlichen Risikofaktoren zu einer erhöhten kortikalen Sensibilität gegenüber einer Perfusionsreduktion prädisponieren, wie sie nach einer SD auf 75 % des rCBF als „spreading oligemia“ für ca. 1 Stunde auftritt (Olesen et al. 1981; Lauritzen et al. 1982) und so zu einem fokalen neurologischen Defizit beitragen.

Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen könnte die beobachtete SD-induzierte neuronale Disinhibition ein weiterer Faktor sein, mit denen SD-Depolarisation zu irreversiblen zellulären Schäden beitragen, da neuronale Übererregbarkeit beispielsweise über eine Kalziumüberladung der Zelle ein weiteres Glied in der Schädigungskaskade Ischämie-induzierter Zelltoxizität ist (Meyer, 1989). Darüber hinaus kann im ischämischen Hirnparenchym die SD-induzierte korti- kale Hyperexzitabilität andere kortikale Depolarisationen in der Penumbra wie die anoxische Depolarisation bahnen, da einer Inaktivierung des inhibitorischen Systems und gesteigerten Ex- zitabilität sowie erhöhten neuronalen Spontanaktivität eine wichtige Rolle in der Einleitung der anoxischen Depolarisation zugeschrieben wird (Aitken et al. 1991; Rosen, Morris, 1993).

4.3 Rolle des AMPA-Glutamaterezeptors

Die Blockade des AMPA-Glutamaterezeptors mittels 30minütiger Badapplikation des selektiven AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX zeigte keine signifikante Wirkung auf die SD-Amplitude, SD-Dauer oder SD-Integral, wenn die SD unter *in vitro* Bedingungen im neokortikalen Hirnschnitt mittels KCl ausgelöst wurde. Diese Ergebnisse können mit einer eher untergeordneten Funktion von isolierten Ionenströmen über den AMPA-Rezeptor für die Initiierung und Ausbreitung der SD unter *in vitro* Bedingungen interpretiert werden und sind ein weiterer Beitrag zur eher kontroversen Diskussion (siehe Übersichtsartikel Luhmann, 1996) über die potentielle neuroprotektive Rolle einer AMPA-Rezeptorblockade. Auch in anderen Studien hatte eine Applikation von NBQX keinen Einfluß auf die Ausbreitung der SD im nicht-ischämischen Kortex oder in der Retina (Lauritzen, Hansen, 1992; Nellgård, Wieloch, 1992; Sheardown, 1993). In einer Linie mit diesen Ergebnissen sind Befunde, daß sich die SD-induzierte c-fos Expression (Christensen et al. 1993) als auch COX-II (Miettinen et al. 1997) Expression nach fokaler zerebraler Ischämie durch NBQX nicht beeinflussen läßt. Dies widerspricht jedoch nicht prinzipiell einer potentiellen neuroprotektiven Wirksamkeit des kompetitiven AMPA-Antagonisten auf die Infarktgröße unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen *in vivo* (Buchan et al. 1991), da eine unspezifische Verminderung des ischämischen Schadens sekundär über eine verminderten Na⁺-Einstrom am blockierten AMPA-Rezeptor, verminderter Zellschwellung und verringerter Kompression umgebender Kollateralgefäße oder postsynaptisch blockierter exzitatorischer synaptischer Transmission vermittelt werden kann. Ob dies jedoch tatsächlich über eine NBQX vermittelte Blockierung von SD-ähnlichen transienten DC-Depolarisationen erfolgt, bedarf weiterer Bestätigungen eines Einzelberichtes (Mies et al. 1994), da auch in anderen Untersuchungen die Blockade von nicht-NMDA-Rezeptoren mit NBQX weder die Latenzzeit noch das Auftreten generell der zum Teil ähnlichen anoxischen Depolarisation beeinflusste (Lauritzen, Hansen, 1992). Möglicherweise ist dies jedoch Ausdruck dessen, daß sich KCl-induzierte normoxische SD-Wellen *in vitro* von den zeitlich verlängerten hypoxisch-ischämischen DC-Depolarisationen (Periinfarktdepolarisationen) *in vivo*, die ohne externe Stimuli nach MCA-Okklusion auftreten, beispielsweise in ihrer Glutamaterezeptorsensitivität während einer gestörten Energie- und Sauerstoffversorgung unterscheiden. Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen und limitierter Energiezufuhr können die verlängerten DC-Depolarisationen möglicherweise mehr Glutamat aus der Depolarisation präsynaptischer Terminalen freisetzen und zu einer NMDA-Rezeptordesensibilisierung beitragen (Clark et al. 1990). Darüber hinaus könnte eine milde Ischämie-induzierte Azidose der Penumbra (Obrenovitch, 1995) den pH-sensitiven NMDA-Rezeptor in seiner Aktivität herunterregulieren (Giffard et al. 1990), so daß möglicherweise unter diesen Bedingungen von Azidose, Hypoxie und limitierter Energiezufuhr Zelldepolarisationen durch den AMPA-Rezeptor vermittelten Kationeneinstrom eine größere Bedeutung und ebenfalls kritische, neurotoxische Rolle zukommt.

Zur Klärung dieser Frage wären weiterführenden Messungen zur Wirksamkeit von AMPA-Antagonisten auf die KCl-induzierte SD unter hypoxischen Bedingungen nötig.

Die ebenfalls nach der NBQX-Applikation zu erwartenden stark verringerten extrazellulären Feldpotentialantworten supragranulärer Neurone der Schicht II/III sind Ausdruck der fast vollständig postsynaptisch blockierten schnellen synaptischen Transmission (Sutor, Luhmann, 1995) durch die Wirkung des AMPA-Rezeptor Antagonisten NBQX, da das EPSP der postsynaptischen Zelle durch eine präsynaptische Glutamat- oder Aspartatfreisetzung (Hwa, Avoli, 1992) in den synaptischen Spalt und nachfolgenden Diffusion dieser exzitatorischen Neurotransmitter hauptsächlich an den AMPA-Rezeptor an der postsynaptischen Membran ausgelöst wird. Unter NBQX Blockade ist die Agonist-Rezeptor Wechselwirkung von Glutamat oder Aspartat mit dem AMPA-Rezeptor nicht mehr möglich - die Depolarisation der postsynaptischen Zelle bleibt aus.

4.4 Zur Funktion des NMDA- Glutamatrezeptors

In der Versuchsgruppe der Applikation des nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten Ketamin gefundene Amplitudenreduktion der ersten SD-Komponente und völlige Auslösung der zweiten SD-Komponente bei deutlicher Verringerung der SD-Dauer befindet sich in Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Untersuchungen im intakten Kortex, in denen NMDA-Antagonisten wie Ketamin, PCP, MK-801 verwendet und eine Blockade oder Reduktion der SD-Amplitude und SD-Dauer sowie Erhöhung der Schwelle zur SD-Auslösung beschrieben wurde (Hernández-Caceres et al. 1987; Gorelova et al. 1987; Marrannes et al. 1988; Nellgard, Wieloch, 1992; McLachlan, 1992). Insbesondere die veränderte SD-Form unter Administration eines NMDA-Antagonisten wurde auch von anderen Autoren beschrieben. Herreras und Somjen berichteten (Herreras, Somjen, 1993), daß nach Applikation des NMDA-Antagonisten CPP sich SD-Dauer im Hippocampus vor allem über eine Auslöschung der „Phase II“ (hier SD-Komponente [peak] 2) deutlich verkürzte. Dieser Effekt konnte auch in den hier diskutierten Experimenten festgestellt werden. Die hier dargestellte *in vitro* Wirksamkeit des NMDA-Antagonisten Ketamin decken sich auch mit Berichten, daß der NMDA-Antagonist MK-801 unter *in vivo* Bedingungen SD-ähnliche Periinfarktdepolarisationen in der Penumbrazone nach fokaler zerebraler Ischämie unterdrückt oder verkürzt (Gill et al. 1992; Iijima et al. 1992) und unterstreichen die Zulässigkeit, daß hier vorgestellte *in vitro* Modell der SD-Auslösung mit *in vivo* Befunden zu vergleichen. Die hier diskutierten Daten legen eine herausragende Rolle des NMDA-Rezeptors, möglicherweise speziell des Kalziumioneneinstroms über diesen Rezeptor, für die SD nahe. Vor allem die Permeabilität für Kalziumionen unterscheidet die ionotropen AMPA- und NMDA-Glutamatrezeptoren. Da es während einer SD zu einer starken Abnahme der extrazellulären Kalziumkonzentration kommt (Hablitz, Heinemann, 1989), ein signifikanter Anteil der Kalziumionen in die Zelle während einer SD nicht über spannungsaktivierte Kalziumkanäle fließt (Jing et

al. 1993), ist es sehr wahrscheinlich, daß ein Großteil der SD-assoziierten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung über den für Kalziumionen hochpermeablen NMDA-Rezeptor zustande kommt. Insbesondere die vollständig blockierte langsamere zweite SD-Komponente (peak2) scheint ausgesprochen sensitiv auf eine NMDA-Rezeptoraktivierung angewiesen zu sein, während an der ersten schnelleren SD-Komponente (peak1) aufgrund der nur partiellen Reduktion auch andere Rezeptorsysteme oder Ionenkanäle beteiligt sein können. Durch den verhältnismäßig langsamen Zeitverlauf einer SD können nur Rezeptorsysteme mit einer geringen Desensitisierungskinetik daran beteiligt sein. Der auch unter NMDA-Rezeptorblockade nicht vollständig verhinderte depolarisationsbedingte Einstrom von Na^+ , Cl^- und osmotisch gebundenem Wasser läßt die Neurone schwellen und bewirkt über die Zelldehnung zusätzliche Membranlecks für den Eintritt von Ca^{2+} - Ionen sowie eine Aktivierung von dehnungssensitiven Kalziumkanälen (Sackin, 1995). Die so erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ kann zu einer weiteren Aktivierung von Kalzium-abhängigen, unspezifischen Kationenkanälen führen (Partridge, Swandulla, 1988).

Die hier dargestellte Verkürzung des SD-Amplitude und SD-Dauer hat aus verschiedener Sicht pathophysiologische Relevanz. Da die Anzahl der kortikalen DC-Depolarisationen direkt mit dem finalen Infarkt volumen korreliert (Mies et al. 1993), wird einer Verkürzung der SD-Dauer und SD-Amplitude ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben, da sich die Neurone kürzer in einem depolarisierten Zustand befinden, weniger Kationen in die Zelle strömen, eine Kompression umgebender Kollateralgefäße durch geschwollene Zellsomata weniger und der benötigte Energieaufwand nach einer SD (Mies, Paschen, 1984) für energieabhängige Ionenpumpen, die die Zelle repolarisieren, reduziert wird. In der Folge wird das Mißverhältnis von erhöhtem Energiebedarf in der Penumbra bei eingeschränkter Perfusion und Sauerstoffversorgung geringer und der Anteil von viablem Gewebe an der ursprünglichen Penumbrazone größer. Parallel dazu werden SD-induzierte genetische Veränderungen wie die Induktion von c-fos oder der COX-II unter NMDA-Rezeptorblockade verhindert (Miettinen et al. 1997). Dennoch ist der klinische Nutzen von NMDA-Antagonisten für die Indikation der akuten zerebralen Ischämie limitiert. Bei klinischen Versuchen zeigte die therapeutische Anwendung bisher verfügbarer nicht-kompetitiver als auch kompetitiver NMDA-Glutamatantagonisten wie Ketamin oder Selfotel durch ihre Interferenz mit physiologischen Funktionen des Neurotransmitters Glutamat verschiedene kardiovaskuläre als auch psychomimetische Nebenwirkungen, da Hypo- oder Hypertonien als auch Psychosen ausgelöst wurden (Muir, Lees, 1995; Davis et al. 1997). Unter dieser Nutzen-/Risikoabwägung ist eine breite klinische Anwendung von gegenwärtig zur Verfügung stehenden Vertretern dieser Substanzgruppe nicht möglich.

Durch die Applikation des NMDA-Glutamatrezeptorantagonisten wurden die extrazellulären Feldpotentialantworten auf den ersten Stimulus leicht, die auf den zweiten Stimulus signifikant erhöht. Dies ist durch die bekannten Innervationsmuster des Neokortex erklärbar. Pyramidenzellen der Schicht II/III sind zur Generierung ihres EPSP partiell von einer NMDA-Rezeptoraktivierung abhängig (Sutor, Luhmann, 1995). Unter NMDA-Rezeptorblockade ist des-

halb die FP1 Antwort geringfügig vermindert. Die zuvor gezeigte bereits durch eine SD auslösbare signifikante Abnahme der intrakortikalen GABAergen Effizienz wurde durch den NMDA-Antagonisten nicht verhindert und weist auch auf eine prä- oder postsynaptische Dysfunktion der GABAergen synaptischen Transmission hin.

Die kombinierte Applikation des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX und des NMDA-Rezeptorantagonisten Ketamin verursachte auch die erwartete Blockierung der synaptischen Transmission, so daß außer Reizartefakten keine extrazellulären Feldpotentialantworten auslösbar waren. Interessanterweise war hier das Ausmaß der SD-Reduktion unter gleichzeitiger Blockierung der ionotropen NMDA- und AMPA-Glutamatrezeptoren beim SD-Integral stärker ($p < 0,05$) als die SD-Verringerung unter alleiniger NMDA-Rezeptorblockade mit Ketamin. Dieser additive oder synergistische Effekt beider Substanzen ist unter Berücksichtigung der zuvor gezeigten Wirkungslosigkeit einer alleinigen NBQX-Applikation nur unbefriedigend zu erklären. Es kann spekuliert werden, daß sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter AMPA-Rezeptor Blockade die SD hauptsächlich durch einen Na^+ - und Ca^{2+} - Einstrom am hochpermeablen Kationenkanal des NMDA-Rezeptorkomplexes zustande kommt, unter NMDA-Rezeptorblockade eine SD durch den verringerten Kalziumeinstrom wesentlich kleiner ausfällt, aber eine verkleinerte SD immer noch über den Kalziumioneneinstrom an dehnungssensitiven Kalziumkanälen und Kalzium-abhängigen unspezifischen Kationenkanälen getriggert wird. Unter NMDA- und AMPA-Rezeptorblockade wird auf der einen Seite der Kationeneinstrom am NMDA-Rezeptor blockiert, zum anderen wird die Zellschwellung durch den verhinderten Ioneneinstrom am AMPA-Rezeptor zusätzlich deutlich verkleinert. In der Folge werden dehnungssensitive Kalziumkanälen und Kalzium-abhängige, unspezifische Kationenkanäle weniger aktiviert, die SD wird noch einmal deutlich kleiner als bei alleiniger NMDA-Rezeptorblockade mit Ketamin. Zur Bestätigung dieser Hypothese wären jedoch detaillierte Messungen der extrazellulären und intrazellulären Kalziumionenkonzentration unter sequenzieller Glutamatrezeptorblockade am gleichen SD-Modell notwendig.

4.5 Rolle des 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptors

Ein neuer neuroprotektiver Ansatz scheint seit Anfang der neunziger Jahre die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptors mit immer selektiveren Agonisten zu sein. Ipsapiron und BAY R 1531 zeigten als Wirkstoffe mit relativer Selektivität für den 5-HT_{1A}-Rezeptor einen Schutz von hippocampalen Zellen der CA1 Region nach Induktion einer globalen Ischämie (Bode-Greuel et al. 1990). Weitere 5-HT_{1A}-Agonisten erwiesen sich in der Ratte nach fokaler zerebraler Ischämie als neuroprotektiv (Bielenberg, Burkhardt, 1990). Schließlich wurde gezeigt, daß die Applikation verschiedener 5-HT_{1A}-Agonisten die finale Infarktgröße nach Verschuß der A. cerebri media verringern kann (Pohn et al. 1991). Die hier an einem *in vitro* Modell der SD-Auslösung unter-

suchten selektiven 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT und BAY x 3702 zeigten Wirkungen, die potentielle neuroprotektive Effekte von 5-HT_{1A}-Agonisten besser erklären können. Sowohl 8-OH-DPAT als auch BAY x 3702 bewirkten eine in den verschiedenen Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM eine zunehmende Verkürzung der SD-Dauer auf ca. 52 % bzw. 68 % in einer jeweiligen Konzentration von 100 µM. Im Gegensatz zur Ketaminapplikation waren beide SD-Komponenten unterscheidbar, was indirekt auch für eine Abhängigkeit der langsameren zweiten SD-Komponente von einer relativ erhaltenen NMDA-Rezeptoraktivierung spricht, die unter Ketamingabe blockiert war. Die konzentrationsabhängige Reduktion der SD-Dauer durch zwei verschiedenen 5-HT_{1A}-Agonisten kann durch die Konsequenzen der selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptoraktivierung erklärt werden. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Serpentinrezeptor, dessen Aktivierung durch Agonisten an der postsynaptischen Membran zu einer Aktivierung von membranständigen K⁺-Kanälen führt (Andrade et al. 1986). Der über die zunehmende K⁺-Leitfähigkeit bewirkte K⁺-Ausstrom bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Da die Aktivierung des NMDA-Rezeptor von einer depolarisationsbedingten Aufhebung des spannungsabhängigen Mg²⁺- Blocks abhängig ist, ist im hyperpolarisierten Membranzustand die Wahrscheinlichkeit einer NMDA-Rezeptor Aktivierung geringer oder es werden weniger NMDA-Rezeptoren aktiviert. Unter Berücksichtigung der Bedeutung des NMDA-Rezeptors für die Initiierung und Ausbreitung einer SD ist folglich der Kationeneinstrom über diesen Rezeptor geringer, die Zeit zur Repolarisation wird kürzer, die SD-Dauer wird kleiner. Desweiteren verringert sich der Kationeneinstrom in die Zelle über die mit der Membranhypolarisierung verbundene Herabsetzung des Eingangswiderstand (Araneda, Andrade, 1991) und der verringerten Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺- und Na⁺- Kanäle (Segal, 1990). Die Summe dieser Wirkungen verringert den Einstrom von Kalzium und anderer Kationen in die Zelle und verkürzt die SD.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Feldpotentiale weiterhin gezeigt werden, daß die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors zu einer deutlichen Disinhibition supragranulärer Neurone führt. In allen Konzentrationen beider 5-HT_{1A}-Agonisten kam es zu einer signifikanten Reduktion der Doppelpulshemmung. Die verminderte exzitatorische als auch inhibitorische synaptische Transmission spiegelt bei beiden Substanzen beispielsweise in der Konzentration von 100 µM anhand der signifikant verminderten Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus (FP1) sowie der signifikant erhöhten Feldpotentialantwort auf den zweiten Stimulus (FP2) wider. Sie kann mit einem verminderten exzitatorischen Input (Tanaka, North, 1993) durch die zusätzliche präsynaptische Wirkung der 5-HT_{1A}-Agonisten erklärt werden, die zu einer verminderten Erregung hemmenden „feed-forward“-Interneurone führt (Segal, 1990). An Neuronen des Ncl. abducens konnte gezeigt werden, daß die glutamaterge Erregung von Neuronen über eine Serotoninwirkung am 5-HT_{1A}-Rezeptor gehemmt werden kann (Kishimoto et al. 1994). Spätere Experimente zeigten, daß 5-HT_{1A}-Agonisten die exzitatorische synaptische Transmission durch eine Verminderung der postsynaptischen AMPA- und NMDA-Glutamaterezeptor vermittelten EPSPs

verringern (Schmitz et al. 1995a). Ursache dieser verringerten glutamatergen Neurotransmission ist wahrscheinlich die hyperpolarisierende Wirkung der 5-HT_{1A}-Rezeptoraktivierung an der präsynaptischen Membran glutamaterger Synapsen (Schmitz et al. 1995b). Die dadurch verringerte Aktivierung präsynaptischer spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt über einen verminderten Kalziumeinstrom zu einer geringeren exozytotischen Freisetzung von Glutamatvesikeln. Da die Erregung von Pyramidenzellen der neokortikalen Schicht II/III als auch die Erregung von intrinsischen hemmenden GABAergen Interneuronen einer glutamatergen Aktivierung ihrer AMPA-Rezeptoren bedarf (Sutor, Luhmann, 1995), führt eine verminderte präsynaptische Glutamatfreisetzung zu einer verringerten Erregung von Pyramidenzellen als auch von inhibitorischen Interneuronen. Die unter Applikation von 5-HT_{1A}-Agonisten zu registrierende Disinhibition extrazellulärer Feldpotentialantworten ist Ausdruck der verminderten exzitatorischen synaptischen Funktion bei gleichzeitig verringerter Effizienz der GABAergen Kontrolle.

Daneben kann eine verminderte Glutamatfreisetzung durch 5-HT_{1A}-Agonisten über eine verringerte postsynaptische NMDA-Rezeptoraktivierung SD-Episoden zusätzlich zu anderen anti-exzitotoxischen Effekten verringern und so neuronale Schäden mildern (Choi, 1992).

Paradoxerweise konnte bei beiden 5-HT_{1A}-Agonisten in der Konzentration von 1 µM eine marginale aber dennoch signifikante Amplitudenerhöhung jeweils einer SD-Komponente festgestellt werden. Wie anhand der Feldpotentialantworten erkennbar ist, überwiegt in dieser kleinsten untersuchten Wirkstoffkonzentration die Inaktivierung des GABAergen Systems, da sich nur die Feldpotentialantwort auf den zweiten Stimulus signifikant erhöht (Segal, 1990). Erst bei 100 µM tritt bei beiden Substanzen auch eine signifikante Verringerung der exzitatorischen synaptischen Transmission ein, so daß sich in dieser Wirkstoffkonzentration auch die Feldpotentialantwort auf den ersten Stimulus verringert. Möglicherweise führt die Hemmung GABAerger Interneurone (Schmitz et al. 1995c) in der kleinsten Konzentration des 5-HT_{1A}-Agonisten zu einer gesteigerten Exzitabilität nachgeschalteter Pyramidenzellen über den verringerten inhibitorischen Input. Während einer SD wäre es möglich, daß sich diese Zellen stärker depolarisieren, als unter Kontrollbedingungen. Mit zunehmender Wirkstoffkonzentration kommt es auch zu einer Inaktivierung der direkten exzitatorischen synaptischen Transmission und zu einem Überwiegen der Membranhyperpolarisation an der Mehrzahl der Neurone und der beobachteten Verkürzung der SD-Dauer.

Im Hinblick auf die Pathophysiologie der Migräne kann postuliert werden, daß eine Verkürzung der SD-Dauer durch 5-HT_{1A}-Agonisten zu einer geringeren Aktivierung von Neuronen der pontinen Hirnnervenkerne des N. trigeminus führt (Moskowitz et al. 1993) und so möglicherweise eine im Hirnstamm generierte migränöse neuronale Dysfunktion und vasale Dysregulation abschwächt oder verkürzt.

Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen könnte die Reduktion der Dauer von SD-Episoden mit 5-HT_{1A}-Agonisten ein attraktiver neuer neuroprotektiver Ansatz darstellen, da möglicherweise zeitlich kürzere SD-Wellen vor dem Hintergrund der begrenzten Energieversorgung der

Penumbra einen weniger energieverbrauchenden Prozeß darstellen und zusätzlich mit einer geringeren Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter verbunden sein könnten. Andererseits, unter Berücksichtigung der dargestellten deutlichen Disinhibition kortikaler Neurone nach der Applikation von 5-HT_{1A}-Agonisten, muß sich in klinischen Versuchen noch zeigen, inwieweit die konzentrationsabhängige starke Wechselwirkung des serotonergen Systems mit der glutamatergen Neurotransmission zu unerwünschten Wirkungen führt, da physiologische Funktionen wie das Lernen durch 5-HT_{1A}-Agonisten beeinträchtigt werden (Winsauer et al. 1999).

4.6 Zum Ausbreitungsmechanismus der spreading depression

Die durchgeführten Untersuchungen gestatten es auch, verschiedene Theorien zur Auslösung und Ausbreitung der SD („Kalium-Theorie“ (Grafstein, 1956), „Glutamat-Theorie“ (van Harreveld, 1959), „gap junctions-Theorie“ (Nedergaard et al. 1995) zu diskutieren. Unter Berücksichtigung der gezeigten Bedeutung des NMDA-Rezeptors für die SD lassen sich verschiedene bekannte Methoden der SD-Auslösung mit einer NMDA-Rezeptoraktivierung in Verbindung bringen: eine (1) verminderte extrazelluläre Mg²⁺-Konzentration könnte durch eine konzentrationsabhängige Diffusion den Mg²⁺-Block des NMDA-Rezeptor entfernen und nachfolgend den NMDA-Rezeptor aktivieren, (2) eine mechanische Stimulation könnte über eine transiente traumatische Entfernung des Mg²⁺-Blocks den NMDA-Rezeptor aktivieren (Zhang et al. 1996), (3) eine extrazelluläre K⁺-Applikation führt über eine Membrandepolarisation zur Entfernung des spannungsabhängigen Mg²⁺-Block am NMDA-Rezeptor und nachfolgenden SD-Induktion, (4) die Applikation von 4-Aminopyridin (4-AP) kann eine SD auslösen, da 4-AP einen Teil der spannungsensitiven K⁺-Kanäle blockiert und über die relative Positivierung des Ruhemembranpotentials bei ca. -50 - -40 mV zur Entfernung des spannungsabhängigen Mg²⁺-Block am NMDA-Rezeptor führt und schließlich (5) unter ischämisch-hypoxischen Bedingungen kommt es ohne weitere externe Stimuli durch die Lyse nekrotischer Zellen zur Freisetzung intrazellulären Kaliums und infolge Diffusion zur beschriebenen wellenförmigen Erhöhungen des extrazellulären Kaliums (Branstetter et al. 1977), die auch über Membrandepolarisationen den NMDA-Rezeptor aktivieren. Allen Triggermechanismen ist gemeinsam, daß es wahrscheinlich nach der NMDA-Rezeptoraktivierung zu dem bekannten massiven Na⁺-, Ca²⁺-, Cl⁻- und Wassereinstrom und einem zusätzlichen K⁺-Ausstrom gemäß dem elektrochemischen Gradienten kommt. Diese Hypothese fügt sich in Beobachtungen ein, daß erst nach dem beginnenden Anstieg der [K⁺]_e und beginnender DC-Potentialnegativierung ein Abfall der [Ca²⁺]_e messbar ist (Kraig, Nicholson, 1978). Elektrische Ausgleichsströme über geöffnete gap junctions (Nedergaard et al. 1995) koppeln und synchronisieren Neurone in der Ausbreitung dieser elektrischen Aktivität, während Gliazellen durch die erhöhte [K⁺]_e passiv depolarisiert werden. Die elektrische „depression“ einer Zelle kommt durch energieabhängige Repolarisation zum Ende, die räumliche Ausbreitung

(„spread“) kann gestoppt werden, wenn strukturelle Unterbrechungen der Zellverbindungen vorliegen (Koroleva, Bures, 1996) oder Gliazellen extrazelluläre Kaliumionen abpumpen. Darüber hinaus könnte die ephatische Transmission bei geschwollenen Zellen (Traub et al. 1985), die Aktivierung dehnungssensitiver Kanäle und die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle während einer SD zur Ausbreitung und Synchronisierung von Zellaktivität beitragen. Demnach wäre die extrazellulär meßbare erhöhte Glutamatkonzentration nur ein Epiphänomen der sich ausbreitenden SD (Obrenovitch et al. 1996), aber kein essentieller kausaler Faktor der SD-Auslösung. Möglicherweise breitet sich die SD nicht auf Grund einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration oder einfachen Umkehr des Glutamattransporters aus, sondern Glutamat wird nur depolarisationsbedingt infolge der erhöhten $[K^+]_e$ aus präsynaptischen glutamatergen Terminalen freigesetzt (Obrenovitch, 1995; Obrenovitch, Zilkha, 1995). Dennoch fördert freigesetztes Glutamat durch nachfolgende Depolarisation postsynaptischer ionotroper Glutamatrezeptoren die SD-Ausbreitung weiter.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die kortikale spreading depression (SD), wie sie von Leão 1944 zuerst beschrieben wurde, ist ein elektrophysiologisches Phänomen, das in der Pathophysiologie der Aurasymptomatik einer Migräneattacke und Ischämie-induzierter Zellschäden diskutiert wird. Während der akuten fokalen zerebralen Ischämie treten eine Reihe von Ereignissen wie eine massive Entzündungsreaktion und die allmähliche Einbeziehung einer zunächst viablen ischämischen Randzone - der Penumbra - in das infarzierte Hirngewebe auf. Da an diesen Ereignissen SD-ähnliche Depolarisationen kausal beteiligt sind, ist die pharmakologische Verringerung von SD-Episoden bzw. eine Verkleinerung ihrer Amplitude und Dauer unter *in vitro* als auch tierexperimentellen *in vivo* Bedingungen eine mögliche neuroprotektive Strategie.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* Modell beschrieben, das am Hirnschnittpräparat des Neokortex der adulten Ratte eine reproduzierbare Auslösung von SD-Wellen unter normoxischen Bedingungen gestattet. Anhand von charakteristischen elektrophysiologischen Parametern einer SD wie Amplitude, Dauer und Ausbreitungsgeschwindigkeit wurden die gute Übereinstimmungen dieses *in vitro* Modells mit *in vivo* Modellen gezeigt. Obwohl SD Wellen am nicht-ischämischen Kortex keine morphologischen Schäden verursachen, zeigte sich in den hier vorgestellten Experimenten eine funktionelle Unterdrückung der GABAergen hemmenden Mechanismen des Neokortex nach repetitiven SDs auch bei ausreichender Energie- und Sauerstoffversorgung. Die hier diskutierten Ergebnisse demonstrierten, daß unter *in vitro* Bedingungen der AMPA-Glutamatrezeptor für die Auslösung und Ausbreitung einer SD eine untergeordnete Rolle spielt. Demgegenüber erwies sich die NMDA-Rezeptoraktivierung als herausragend für eine SD, da die Blockade dieses Rezeptors mit dem nicht-kompetitiven Antagonisten Ketamin die SD-Amplitude und SD-Dauer signifikant verringerte. Die Anwendung der selektiven 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT und BAY x 3702 erwies sich als eine neue Möglichkeit, die Zeitdauer einer SD zu verringern.

Die aufgezeigte SD-induzierte neuronale Hyperexzitabilität kann unter normoxischen Bedingungen zelluläre Dysfunktionen verursachen und auch an einer Generierung der Aura eines Migräneanfalls beteiligt sein. Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen könnte eine SD-induzierte Dysfunktion GABAerger Kontrollmechanismen die Ausweitung ischämischer Zellschäden bewirken.

Die Hoffnungen auf eine effektive Schlaganfalltherapie haben sich mit den bisherigen NMDA-Antagonisten trotz ihrer hier bestätigten guten *in vitro* Wirksamkeit aufgrund der Interferenz mit physiologischen Glutamatfunktionen im Kortex nicht erfüllt. Die hier gezeigte konzentrationsabhängige Verkürzung der SD-Dauer durch die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Serotoninrezeptors unter *in vitro* Bedingungen kann bei der bekannten hohen 5-HT_{1A}-Rezeptor-mRNA-dichte an besonders ischämievulnerablen Neuronen einen neuen neuroprotektiven Ansatz auch beim Menschen darstellen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die hier beschriebene enge Verflechtung

des serotonergen Systems mit der glutamatergen Neurotransmission eventuell auch zu unerwünschte Wirkungen unter *in vivo* Bedingungen führt.

Schlagworte: Spreading depression, Extrazelluläre Messung, GABAerge Hemmung; AMPA-Rezeptorantagonist; NMDA-Rezeptorantagonist; 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist; *in vitro*; Ratte; Migräne; Zerebrale Ischämie

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbraccio MP, Ongini E, Memo M (1999) Disclosing apoptosis in the CNS. *Trends Pharmacol Sci* 20:129-131.
- Aitken PG, Jing J, Young J, Somjen GG (1991) Ion channel involvement in hypoxia-induced spreading depression in hippocampal slices. *Brain Res* 541:7-11.
- Alexander SPH, Peters JA (1999) 1999 Receptor & ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol Sci Suppl*:1-106.
- Amemori T, Gorelova NA, Bures J (1987) Spreading depression in the olfactory bulb of rats: reliable initiation and boundaries of propagation. *Neuroscience* 22:29-36.
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA (1986) A G protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261-1265.
- Andrade R, Nicoll RA (1987) Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 394:99-124.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-973.
- Araneda R, Andrade R (1991) 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40:399-412.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723
- Auer LM, Leber K, Sayama I (1985) Effect of serotonin and its antagonist ketanserin on pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:517-522.
- Aurora SK, Ahmad BK, Welch KM, Bhardhwaj P, Ramadan NM (1998) Transcranial magnetic stimulation confirms hyperexcitability of occipital cortex in migraine. *Neurol* 50:1111-1114.
- Avoli M, Louvel J, Drapeau C, Pumain R, Kurcewicz I (1995) GABA_A-mediated inhibition and *in vitro* epileptogenesis in the human neocortex. *J Neurophysiol* 73:468-484.
- Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD (1996) Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: Effect on infarct morphology. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:202-213.
- Back T, Kohno K, Hossmann K-A (1994) Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:12-19.
- Barres BA (1991) New roles for glia. *J Neurosci* 11:3685-3694.
- Bazan NG, Allan G (1996) Platelet-activating factor is both a modulator of synaptic function and a mediator of cerebral injury and inflammation. *Adv Neurol* 71:475-82; discussion 482-4.
- Bear MF, Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4:389-399.
- Berger K, Schulte H, Stogbauer F, Assmann G (1998) Incidence and risk factors for stroke in an occupational cohort: the PROCAM Study. Prospective Cardiovascular Muenster Study. *Stroke* 29:1562-1566.
- Bickler PE, Hansen BM (1994) Causes of calcium accumulation in rat cortical brain slices during hypoxia and ischemia: Role of ion channels and membrane damage. *Brain Res* 665:269-276.
- Bielenberg GW, Burkhardt M (1990) 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists. A new therapeutic principle for stroke treatment. *Stroke* 21:IV161-3.
- Blau JN (1992) Migraine: Theories of pathogenesis. *Lancet* 339:1202-1204.

- Bode-Greuel KM, Klisch J, Horváth E, Glaser T, Traber J (1990) Effects of 5-hydroxytryptamine_{1A}-receptor agonists on hippocampal damage after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Stroke* 21 Suppl.IV164-IV166.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7162-7166.
- Brand S, Fernandes de Lima VM, Hanke W (1998) Pharmacological modulation of the refractory period of retinal spreading depression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:419-425.
- Branston NM, Strong A, Symon L (1977) Extracellular potassium, evoked potential and tissue blood flow. *J Neurol Sci* 32:305-321.
- Buchan AM, Lesiuk H, Barnes KA, Li H, Huang Z-G, Smith KE, Xue D (1993) AMPA antagonists: do they hold more promise for clinical stroke trials than NMDA- antagonists ? *Stroke* 24:I-148-I-152.
- Buchan AM, Xue D, Huang ZG, Smith KH, Lesiuk H (1991) Delayed AMPA receptor blockade reduces cerebral infarction induced by focal ischemia. *Neuroreport* 2:473-476.
- Burnet PWJ, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ (1995) The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res* 676:157-168.
- Carolei A, Marini C, De Matteis G (1996) History of migraine and risk of cerebral ischaemia in young adults. The Italian National Research Council Study Group on Stroke in the Young. *Lancet* 347:1503-6X.
- Chagnac-Amitai Y, Connors BW (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 61:747-758.
- Chang CL, Donaghy M, Poulter N (1999) Migraine and stroke in young women: case-control study. *BMJ* 318:13-18X.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914-4928.
- Chen L, Huang L-YM (1992) Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA--receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356:521-523.
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Kottirsch G, Pinsky DJ (1998) Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest* 102:1301-1310.
- Christensen T, Jorgensen MB, Diemer NH (1993) Impairment of Fos protein formation in the rat infarct borderzone by MK-801, but not by NBQX. *Acta Neurol Scand* 87:510-515.
- Clark GD, Clifford DB, Zorumski CF (1990) The effect of agonist concentration, membrane voltage and calcium on N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuroscience* 39:787-797.
- Clarke VR, Ballyk BA, Hoo KH, Mandelzys A, Pellizzari A, Bath CP, Thomas J, Sharpe EF, Davies CH, Ornstein PL, Schoepp DD, Kamboj RK, Collingridge GL, Lodge D, Bleakman D (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* 389:599-603.
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16.
- Collingridge GL, Bliss TVP (1987) NMDA- receptors - their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 10:288-293.
- Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97:209-216.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci* 10:273-280.

- Cousin MA, Hurst H, Nicholls DG (1997) Presynaptic calcium channels and field-evoked transmitter exocytosis from cultured cerebellar granule cells. *Neuroscience* 81:151-161.
- Creutzfeldt OD, Kuhnt U (1973) Electrophysiology and topographical distribution of visual evoked potentials in animals. In: *Handbook of sensory physiology* (Autrum H, Jung R, Loewenstein WR, Mac Kay DM, Teuber HL eds), pp 595-646. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Csiba L, Paschen W, Mies G (1985) Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading in rat brain. *Brain Res* 336:167-170.
- Davis M, Whitely T, Turnbull DM, Mendelow AD (1997) Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 70:56-58.
- Davis SM, Albers GW, Diener HC, Lees KR, Norris J (1997) Termination of Acute Stroke Studies Involving Selfotel Treatment. ASSIST Steering Committed. *Lancet* 349:32
- Dawson VL, Dawson TM (1996) Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* 10:179-190.
- De Vry J, Dietrich H, Glaser T, Heine HG, Horváth E, Jork R, Maertins T, Mauler F, Opitz W, Scherling D, Schoe-loop R, Schwarz T (1997) Bay x 3702. *Drugs Fut* 22:341-349.
- del Olmo E, Lopez-Gimenez JF, Vilaros MT, Mengod G, Palacios JM, Pazos A (1998) Early localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptors in human brain during development. *Brain Res Mol Brain Res* 60:123-126.
- Del Zoppo GJ (1996) The role of adhesion molecules in acute cerebral ischemia. In: *Pharmacology of cerebral ischemia 1996* (Kriegelstein J ed), pp 393-404. Stuttgart: medpharm Scientific Publishers.
- Dermietzel R, Spray DC (1993) Gap junctions in the brain: Where, what type, how many and why. *Trends Neurosci* 16:186-192.
- Dietrich WD, Feng ZC, Leistra H, Watson BD, Rosenthal M (1994) Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:20-28.
- Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD (1980) Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res* 40:432-439.
- Domann R, Hagemann G, Kraemer M, Freund H-J, Witte OW (1993) Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett* 155:69-72.
- Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW (1996) Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16:195-201.
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89-98.
- Ekhholm A, Asplund B, Siesjö BK (1992) Perturbation of cellular energy state in complete ischemia: Relationship to dissipative ion fluxes. *Exp Brain Res* 90:47-53.
- Els T, Röther J, Beaulieu C, De Crespigny A, Moseley M (1997) Hyperglycemia delays terminal depolarization and enhances repolarization after peri-infarct spreading depression as measured by serial diffusion MR mapping. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:591-595.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:238-247.
- Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43:37-71.
- Feldman ML (1984) Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In: *Cerebral Cortex* (Peters A, Jones EG eds), pp 123-253. New York and London: Plenum Press.
- Ferro-Novick S, Jahn R (1994) Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370:191-193.

- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1996) Inflammation related gene expression and stroke: implications for new therapeutic targets. In: *Pharmacology of cerebral ischemia 1986* (Kriegelstein J ed), pp 405-420. Stuttgart: medpharm Scientific publisher.
- Fieschi C, Argentino C, Lenzi GL, Sacchetti ML, Toni D, Bozzao L (1989) Clinical and instrumental evaluation of patients with ischemic stroke within the first six hours. *J Neurol Sci* 91:311-321.
- Fletcher A, Cliffe IA, Dourish CT (1993) Silent 5-HT_{1A} receptor antagonists: Utility as research tools and therapeutic agents. *Trends Pharmacol Sci* 14:441-448.
- Furlan M, Marchal G, Viader F, Derlon JM, Baron JC (1996) Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol* 40:216-226.
- Ganong WF (1997) Cerebral Circulation. In: *Review of Medical Physiology* (pp 567-575. Stamford,CT: Appleton & Lange.
- Gardner-Medwin AR, Van Bruggen N, Williams SR, Ahier RG (1994) Magnetic resonance imaging of propagating waves of spreading depression in the anaesthetised rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:7-11.
- Gehrmann J, Mies G, Bonnekoh P, Banati R, Iijima T, Kreutzberg GW, Hossmann KA (1993) Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathol* 3:11-17.
- Gido G, Katsura K, Kristian T, Siesjö BK (1993) Influence of plasma glucose concentration on rat brain extracellular calcium transients during spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:179-182.
- Giffard RG, Monyer H, Christine CW, Choi DW (1990) Acidosis reduces NMDA- receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* 506:339-342.
- Gill R, Andine P, Hillered L, Persson L, Hagberg H (1992) The effect of MK-801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:371-379.
- Gill R, Nordholm L, Lodge D (1992) The neuroprotective actions of 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(F)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemia model. *Brain Res* 580:35-43.
- Gorelova NA, Koroleva VI, Amemori T, Pavlik V, Bures J (1987) Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 66:440-447.
- Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M (1983) Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 305:140-142.
- Grafstein B (1956) Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 19:154-171.
- Grandati M, Verrecchia C, Allix M, Boulu RG, Plotkine M (1996) NO-Synthase activities in mice following transient focal cerebral ischemia. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia 1996* (Kriegelstein J ed), pp 217-224. Stuttgart: medpharm Scientific Publishers.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780-785.
- Guglielmo MA, Chan PT, Cortez S, Stopa EG, McMillan P, Johanson CE, Epstein M, Doberstein CE (1998) The temporal profile and morphologic features of neuronal death in human stroke resemble those observed in experimental forebrain ischemia: the potential role of apoptosis. *Neurol Res* 20:283-296.
- Hablitz JJ, Heinemann U (1989) Alterations in the microenvironment during spreading depression associated with epileptiform activity in the immature neocortex. *Dev Brain Res* 46:243-252.
- Hall JM, Smith DM (1998) Calcitonin gene-related peptide - a new concept in receptor-ligand specificity? *Trends Pharmacol Sci* 19:303-305.
- Hansen AJ (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65:101-148.
- Hasegawa Y, Latour LL, Formato JE, Sotak CH, Fisher M (1995) Spreading waves of a reduced diffusion coefficient of water in normal and ischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:179-187.

- Haselgrove JC, Bashford CL, Barlow CH, Quistorff B, Chance B, Mayevsky A (1990) Time resolved 3-dimensional recording of redox ratio during spreading depression in gerbil brain. *Brain Res* 506:109-114.
- Hatashita T, Ito M, Miyaoka M, Ishii S (1990) Chronological alterations of regional cerebral blood flow, glucose utilization, and edema formation after focal ischemia in hypertensive and normotensive rats. Significance of hypertension. *Adv Neurol* 52:29-37X.
- Heiss WD, Thiel A, Grond M, Graf R (1999) Contribution of immediate and delayed ischaemic damage to the volume of final infarcts. *Lancet* 353:1677-1678.
- Hernández-Caceres J, Macias-Gonzalez R, Brozek G, Bures J (1987) Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res* 437:360-364.
- Herrera DG, Maysinger D, Gadiant R, Boeckh C, Otten U, Cuello AC (1993) Spreading depression induces *c-fos*-like immunoreactivity and NGF mRNA in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 602:99-103.
- Herreras O, Somjen GG (1993) Analysis of potential shifts associated with recurrent spreading depression and prolonged unstable spreading depression induced by microdialysis of elevated K^+ in hippocampus of anesthetized rats. *Brain Res* 610:283-294.
- Herreras O, Somjen GG (1993) Propagation of spreading depression among dendrites and somata of the same cell population. *Brain Res* 610:276-282.
- Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C (1993) Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40:319-384.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
- Hossmann KA (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:195-208.
- Houser CR, Vaughn JE, Hendry SHC, Jones EG, Peters A (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. In: *Cerebral Cortex*, Vol. 2 (Jones EG, Peters A eds), pp 63-89. New York and London: Plenum Press.
- Hubel DH, Wiesel TN (1959) Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol (Lond)* 148:574-591.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol (Lond)* 160:106-154.
- Hwa GGC, Avoli M (1992) Excitatory postsynaptic potentials recorded from regular-spiking cells in layers II/III of rat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 67:728-737.
- Iijima T, Mies G, Hossmann K-A (1992) Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:727-733.
- Iijima T, Shimase C, Sawa H, Sankawa H (1998) Spreading depression induces depletion of MAP2 in area CA3 of the hippocampus in a rat unilateral carotid artery occlusion model. *J Neurotrauma* 15:277-284.
- Jansen I, Edvinsson L, Mortensen A, Olesen J (1992) Sumatriptan is a potent vasoconstrictor of human dural arteries via a 5-HT₁-like receptor. *Cephalalgia* 12:202-205.
- Jellinger K, Riederer P, Kothbauer P (1978) Changes of some putative neurotransmitters in human cerebral infarction. *J Neural Transm Suppl* 31-44.
- Jing J, Aitken PG, Somjen GG (1993) Role of calcium channels in spreading depression in rat hippocampal slices. *Brain Res* 604:251-259.
- Kariko K, Harris VA, Rangel Y, Duvall ME, Welsh FA (1998) Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1308-1315.

- Katsuki H, Okuda S (1995) Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog Neurobiol* 46:607-636.
- Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrova J, Bazan NG, Siesjö BK (1993) Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J Neurochem* 61:1677-1684.
- Kawahara N, Croll SD, Wiegand SJ, Klatzo I (1997) Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance. *Neurosci Res* 29:37-47.
- Kawasaki K, Czeh G, Somjen GG (1988) Prolonged exposure to high potassium concentration results in irreversible loss of synaptic transmission in hippocampal tissue slices. *Brain Res* 457:322-329.
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP (1998) Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 18:687-97X.
- Kishimoto T, Yamanaka T, Amano T, Todo N, Sasa M (1994) 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of lateral vestibular nucleus neurons projecting to the abducens nucleus. *Brain Res* 644:47-51.
- Kocher M (1990) Metabolic and hemodynamic activation of postischemic rat brain by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:564-571.
- Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmer E, Metsis M, Smith ML, Siesjö BK, Lindvall O (1995) Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* 136:73-88.
- Koroleva VI, Bures J (1996) The use of spreading depression waves for acute and long-term monitoring of the penumbra zone of focal ischemic damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3710-3714.
- Kraig RP, Dong L, Thisted R, Jaeger CB (1991) Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosci* 11:2187-2198.
- Kraig RP, Nicholson C (1978) Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3:1045-1059.
- Kral T, Luhmann HJ, Mittmann T, Heinemann U (1993) Role of NMDA- receptors and voltage-activated calcium channels in an *in vitro* model of cerebral ischemia. *Brain Res* 612:278-288.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 8:312-318.
- Kristian T, Siesjö BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29:705-718.
- Krivanek J, Koroleva VI (1996) Protein kinase C in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Neurosci Lett* 210:79-82.
- Lambert JDC, Jones RSG, Andreassen M, Jensen MS, Heinemann U (1989) The role of excitatory amino acids in synaptic transmission in the hippocampus. *Comp Biochem Physiol [A]* 93A:195-201.
- Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117:199-210.
- Lauritzen M, Hansen AJ (1992) The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:223-229.
- Lauritzen M, Jorgensen MB, Diemer NH, Gjedde A, Hansen AJ (1982) Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression. *Ann Neurol* 12:469-474.
- Lauritzen M, Olesen J (1984) Regional cerebral blood flow during migraine attacks by xenon-133 inhalation and emission tomography. *Brain* 107:447-461.
- Leão AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390.
- Leão AAP (1947) Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 10:409-414.

- Lin B, Ginsberg MD, Busto R, Dietrich WD (1998) Sequential analysis of subacute and chronic neuronal, astrocytic and microglial alterations after transient global ischemia in rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 95:511-523.
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK, Persson H (1992) Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:648-652.
- Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Liu YF, Albert PR (1991) Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J Biol Chem* 266:23689-97X.
- Lo EH, Bosque-Hamilton P, Meng W (1998) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase: reduction of ischemic injury and attenuation of N-methyl-D-aspartate-induced neurotransmitter dysregulation. *Stroke* 29:830-836.
- Luhmann HJ (1993): *Ontogenese und Pathophysiologie des GABAergen Systems im Neokortex*. Habilitationsschrift Universität zu Köln.
- Luhmann HJ (1996) Ischemia and lesion induced imbalances in cortical function. *Prog Neurobiol* 48:131-166.
- Luhmann HJ, Heinemann U (1992) Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *J Neurophysiol* 67:798-811.
- Luhmann HJ, Kral T, Heinemann U (1993) Influence of hypoxia on excitation and GABAergic inhibition in mature and developing rat neocortex. *Exp Brain Res* 97:209-224.
- Madl JE, Burgesser K (1993) Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429-4444.
- Marchal G, Beaudouin V, Rioux P, de la Sayette V, Viader F, Derlon JM, Baron JC (1996) Prolonged persistence of substantial volumes of potentially viable brain tissue after stroke: a correlative PET-CT study with voxel-based data analysis. *Stroke* 27:599-606.
- Margaill I, Parmentier S, Callebert J, Allix M, Boulu RG, Plotkine M (1996) Short therapeutic window for MK-801 in transient focal cerebral ischemia in normotensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:107-113.
- Marler JR (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. For the National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333:1581-1587.
- Marrannes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A (1988) Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA-) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res* 457:226-240.
- Matsumoto RR (1989) GABA receptors: Are cellular differences reflected in function. *Brain Res Rev* 14:203-225.
- Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM (1996) Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:221-226.
- Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, Sugita M (1998) Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 83:439-448.
- Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE (1996) Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res* 740:268-274.
- Mayevsky A, Weiss HR (1991) Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:829-836.
- McLachlan RS (1992) Suppression of spreading depression of Leao in neocortex by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Can J Neurol Sci* 19:487-491.
- Meyer FB (1989) Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res Rev* 14:227-243.

- Mies G (1993) Inhibition of protein synthesis during repetitive cortical spreading depression. *J Neurochem* 60:360-363.
- Mies G, Iijima T, Hossmann K-A (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4:709-711.
- Mies G, Kohno K, Hossmann K-A (1994) Prevention of periinfarct direct current shifts with glutamate antagonist NBQX following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:802-807.
- Mies G, Paschen W (1984) Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. *Eur Neurol* 84:249-258.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, Keinänen R, Hirovonen T, Roivainen R, Närhi M, Hökfelt T, Koistinaho J (1997) Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through *N*-methyl-D-aspartic acid- receptors and phospholipase A₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6500-6505.
- Mittmann T (1994) Läsions- und Ischämie-induzierte Änderungen in der Funktion des Neokortex bei der Ratte und Maus. Dissertation Philipps-Universität Marburg 13-14.
- Mody I, Lambert JDC, Heinemann U (1987) Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 57:869-888.
- Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA- receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.
- Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP (1993) Neocortical spreading depression provokes the expression of *C-fos* protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci* 13:1167-1177.
- Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408-434.
- Muir KW, Lees KR (1995) Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26:503-513.
- Nakanishi S (1994) Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031-1037.
- Nedergaard M (1996) Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol* 71:75-83.
- Nedergaard M, Astrup J (1986) Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [¹⁴C]-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:607-615.
- Nedergaard M, Cooper AJL, Goldman SA (1995) Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *J Neurobiol* 28:433-444.
- Nedergaard M, Diemer NH (1987) Focal ischemia of the rat brain, with special reference to the influence of plasma glucose concentration. *Acta Neuropathol (Berl)* 73:131-137.
- Nedergaard M, Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449:395-398.
- Nedergaard M, Hansen AJ (1993) Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:568-574.
- Nellgard B, Wieloch T (1992) NMDA--receptor blockers but not NBQX, an AMPA-receptor antagonist, inhibit spreading depression in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 146:497-503.
- Nenonene EK, Radja F, Carli M, Grondin L, Reader TA (1994) Heterogeneity of cortical and hippocampal 5-HT_{1A} receptors: a reappraisal of homogenate binding with 8-[³H]hydroxydipropylaminotetralin. *J Neurochem* 62:1822-1834.
- Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-467.
- Nicholls DG (1993) Ion channels and the regulation of neurotransmitter glutamate release. *Biochem Soc Trans* 21:53-58.

- Nikolics K, Hefti F, Thomas GR, Gluckman PD (1996) Trophic factors and their role in the postischemic brain. *Adv Neurol* 71:389-402; discussion 402-.
- Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C (1998) Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10966-10971.
- Obrenovitch TP (1995) The Ischaemic Penumbra: Twenty Years On. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7:297-323.
- Obrenovitch TP, Urenjak J, Richards DA, Ueda Y, Curzon G, Symon L (1993) Extracellular neuroactive amino acids in the rat striatum during ischaemia: comparison between penumbral conditions and ischaemia with sustained anoxic depolarisation. *J Neurochem* 61:178-186.
- Obrenovitch TP, Zilkha E (1995) High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression. *J Neurophysiol* 73:2107-2114.
- Obrenovitch TP, Zilkha E, Urenjak J (1996) Evidence against high extracellular glutamate promoting the elicitation of spreading depression by potassium. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:923-931.
- Olesen J (1994) Understanding the biologic basis of migraine. *N Engl J Med* 331:1713-1714.
- Olesen J, Larsen B, Lauritzen M (1981) Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol* 9:344-352.
- Olney JW, Sharpe LG (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166:386-388.
- Parsons AA (1998) Recent advances in mechanisms of spreading depression. *Curr Opin Neurol* 11:227-231.
- Partridge LD, Swandulla D (1988) Calcium-activated non-specific cation channels. *Trends Neurosci* 11:69-72.
- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20: 171-181.
- Piera MJ, Beaughard M, Michelin MT, Winslow E, Massingham R (1995) Lack of efficacy of 5-HT_{2A} receptor antagonists to reduce brain damage after 3 minutes of transient global cerebral ischaemia in gerbils. *Fundam Clin Pharmacol* 9:562-568.
- Pin J-P, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Prehn JH, Backhauss C, Karkoutly C, Nuglisch J, Peruche B, Rossberg C, Krieglstein J (1991) Neuroprotective properties of 5-HT_{1A} receptor agonists in rodent models of focal and global cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 203:213-222.
- Psarropoulou C, Avoli M (1993) 4-aminopyridine-induced spreading depression episodes in immature hippocampus: Developmental and pharmacological characteristics. *Neuroscience* 55:57-68.
- Raiteri M, Maura G, Barzizza A (1991) Activation of presynaptic 5-hydroxytryptamine₁-like receptors on glutamatergic terminals inhibits N-methyl-D- aspartate-induced cyclic GMP production in rat cerebellar slices. *J Pharmacol Exp Ther* 257:1184-1188.
- Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U (1998) Perivascular nerves contribute to cortical spreading depression-associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* 274:H1979-87.
- Richards CD (1981) The preparation of brain tissue slices for electrophysiological studies. In: *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*. (Kerkut GA, Wheal HV eds), pp 107-132. London: Academic Press London.
- Riepe MW, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO (1995) Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation, causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neuroscience* 64:91-97.
- Rogawski MA (1993) Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: Channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* 14:325-331.

- Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020-1030.
- Romijn HJ, Ruijter JM, Wolters PS (1988) Hypoxia preferentially destroys GABAergic neurons in developing rat neocortex explants in culture. *Exp Neurol* 100:332-340.
- Rosen AS, Morris ME (1993) Anoxic depression of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical slices. *J Neurophysiol* 69:109-117.
- Rosner G, Graf R, Kataoka K, Heiss W-D (1986) Selective functional vulnerability of cortical neurons following transient MCA-occlusion in the cat. *Stroke* 17:76-82.
- Röther J, De Crespigny AJ, D'Arceuil H, Iwai K, Moseley ME (1996a) Recovery of apparent diffusion coefficient after ischemia-induced spreading depression relates to cerebral perfusion gradient. *Stroke* 27:980-986.
- Röther J, De Crespigny AJ, D'Arceuil H, Moseley ME (1996b) MR detection of cortical spreading depression immediately after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:214-220.
- Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C (1998) Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 96:172-178.
- Sackin H (1995) Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol* 57:333-353.
- Saito R, Graf R, Hubel K, Fujita T, Rosner G, Heiss WD (1997) Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 857-864
- Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM (1988) Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7795-9X.
- Saunders DE, Howe FA, van den Boogaart A, McLean MA, Griffiths JR, Brown MM (1995) Continuing ischemic damage after acute middle cerebral artery infarction in humans demonstrated by short-echo proton spectroscopy. *Stroke* 26:1007-1013.
- Scharfman HE (1997) Hyperexcitability in combined entorhinal/hippocampal slices of adult rat after exposure to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol* 78:1082-1095.
- Schmitz D, Empson RM, Gloveli T, Heinemann U (1995a) Serotonin reduces synaptic excitation of principal cells in the superficial layers of rat hippocampal-entorhinal cortex combined slices. *Neurosci Lett* 190:37-40.
- Schmitz D, Empson RM, Heinemann U (1995b) Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca^{2+} entry. *Brain Res* 701:249-254.
- Schmitz D, Empson RM, Heinemann U (1995c) Serotonin reduces inhibition via 5-HT_{1A} receptors in area CA1 of rat hippocampal slices *in vitro*. *J Neurosci* 15:7217-7225.
- Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14:13-20.
- Segal M (1990) Serotonin attenuates a slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 36:631-641.
- Segal M (1990) Serotonin and local circuits in rat hippocampus. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1:77-86X.
- Semkova I, Wolz P, Kriegelstein J (1998) Neuroprotective effect of 5-HT_{1A} receptor agonist, Bay X 3702, demonstrated *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 359:251-260.
- Sensi SL, Canzoniero LM, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA, Choi DW (1997) Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J Neurosci* 17:9554-9564.
- Sheardown MJ (1993) The triggering of spreading depression in the chicken retina: a pharmacological study. *Brain Res* 607:189-194.
- Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honoré T (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247:571-574.

- Sheardown MJ, Suzdak PD, Nordholm L (1993) AMPA, but not NMDA-, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil global ischaemia, even when delayed 24 h. *Eur J Pharmacol* 236:347-353.
- Shimizu-Sasamata M, Bosque-Hamilton P, Huang PL, Moskowitz MA, Lo EH (1998) Attenuated Neurotransmitter Release and Spreading Depression-Like Depolarizations after Focal Ischemia in Mutant Mice with Disrupted Type I Nitric Oxide Synthase Gene. *J Neurosci* 18:9564-9571.
- Shinohara M, Dollinger B, Brown G, Rapoport S, Sokoloff L (1979) Cerebral glucose utilization: local changes during and after recovery from spreading cortical depression. *Science* 203:188-190.
- Siesjö BK, Bengtsson F (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:127-140.
- Siesjö BK, Katsura K, Kristian T (1995) The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol* 7:47-52.
- Siesjö BK (1991) The role of calcium in cell death. In: *Neurodegenerative Disorders: Mechanisms and Prospects for Therapy* (Price DL, Thoenen H, Aguayo AJ eds), pp 35-59. John Wiley & Sons Ltd.
- Siman R, Noszek JC (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown *in vivo*. *Neuron* 1:279-287.
- Simoons ML, Deckers JW (1995) New directions in anticoagulant and antiplatelet treatment. *Br Heart J* 74:337-340.
- Smith MA, Doliszny KM, Shahar E, McGovern PG, Arnett DK, Luepker RV (1998) Delayed hospital arrival for acute stroke: the Minnesota Stroke Survey. *Ann Intern Med* 129:190-196.
- Sokoloff L, Takahashi S, Gotoh J, Driscoll BF, Law MJ (1996) Contribution of astroglia to functionally activated energy metabolism. *Dev Neurosci* 18:344-352.
- Somjen G (1979) Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Ann Rev Physiol* 41:159-177.
- Somjen GG (1975) Electrophysiology of neuroglia. *Annu Rev Physiol* 37:163-190.
- Sontheimer H, Minturn JE, Black JA, Waxman SG, Ransom BR (1990) Specificity of cell-cell coupling in rat optic nerve astrocytes *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9833-9837.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56:149-171.
- Sugaya E, Takato M, Noda Y (1975) Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 38:822-841.
- Sutor B, Hablitz JJ (1989) EPSPs in rat neocortical neurons *in vitro*. I. Electrophysiological evidence for two distinct EPSPs. *J Neurophysiol* 61:607-629.
- Sutor B, Luhmann HJ (1995) Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol* 2:409-419.
- Swan JH, Meldrum BS (1990) Protection by NMDA- antagonists against selective cell loss following transient ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:343-351.
- Tanaka E, North RA (1993) Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* 69:1749-1757.
- Tanaka R, Miyasaka Y, Yada K, Ohwada T, Kameya T (1995) Basic fibroblast growth factor increases regional cerebral blood flow and reduces infarct size after experimental ischemia in a rat model. *Stroke* 26:2154-2158.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Thompson SM, Gähwiler BH (1989) Activity-dependent disinhibition. III. Desensitization and GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in the hippocampus *in vitro*. *J Neurophysiol* 61:524-533.
- Thomson AW, West DC, Lodge D (1985) An N-methylaspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* 313:479-481.

- Traub RD, Dudek FE, Taylor CP, Knowles WD (1985) Simulation of hippocampal afterdischarges synchronized by electrical interactions. *Neuroscience* 14:1033-1038.
- van Essen DC, Anderson CH, Felleman DJ (1992) Information processing in the primate visual system: An integrated systems perspective. *Science* 255:419-423.
- van Harreveld A (1959) Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem* 3:300-315.
- Van Lookeren Campagne M, Gill R (1996) Ultrastructural morphological changes are not characteristic of apoptotic cell death following focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett* 213:111-114.
- Verrecchia C, Boulu RG, Plotkine M (1995) Neuroprotective and deleterious effects of nitric oxide on focal cerebral ischemia-induced neurone death. *Adv Neuroimmunol* 5:359-378.
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388:179-182.
- Walz W (1997) Role of astrocytes in the spreading depression signal between ischemic core and penumbra. *Neurosci Biobehav Rev* 21:135-142.
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 4:228-231.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:165-204.
- Waxman SG, Ransom BR, Stys PK (1991) Non-synaptic mechanisms of Ca²⁺-mediated injury in CNS white matter. *Trends Neurosci* 14:461-468.
- Weiler C (1999) Funktionelle Bildgebung in der Neurologie. *Deutsches Ärzteblatt* 96: 1772-1779.
- Welch KM (1997) Pathogenesis of migraine. *Semin Neurol* 17:335-341.
- Winsauer PJ, Rodriguez FH, Cha AE, Moerschbaecher JM (1999) Full and Partial 5-HT_{1A} Receptor Agonists Disrupt Learning and Performance in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 288:335-347.
- www.med.harvard.edu (1998) <http://www.med.harvard.edu/AANLIB/cases/case20/mr1/015.html>.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL (1996) Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6770-6774.
- Yoon RS, Tsang PW, Lenz FA, Kwan HC (1996) Characterization of cortical spreading depression by imaging of intrinsic optical signals. *Neuroreport* 7:2671-2674.
- Zhang L, Rzigalinski BA, Ellis EF, Satin LS (1996) Reduction of voltage-dependent Mg²⁺ blockade of NMDA-current in mechanically injured neurons. *Science* 274:1921-1923.
- Zilkha E, Obrenovitch TP, Koshy A, Kusakabe H, Bennetto HP (1995) Extracellular glutamate: on-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme-amperometric analysis. *J Neurosci Meth* 60:1-9.
- Zilles K, Wree A (1985) Cortex: areal and laminar structure. In: *The Rat Nervous System*. Vol. 1 (Paxinos G ed), pp 375-415. Sydney: Academic Press.

7. VERÖFFENTLICHUNGSNACHWEIS

Publikationen

Krüger, H., Luhmann, H.J. and Heinemann, U. Repetitive spreading depression causes selective suppression of GABAergic function. *NeuroReport*, 7 (15-17): 2733-2736, 1996.

Albrecht, D., Broser, M., Krüger, H. Excitatory action of angiotensins II and IV on hippocampal neuronal activity in urethane anesthetized rats. *Regul. Peptides*, 70 (2-3): 105-109, 1997.

Albrecht, D., Broser, M., Krüger, H. and Bader, M. Effects of angiotensin II and IV on geniculate activity in nontransgenic and transgenic rats. *Eur. J. Pharmacology*, 332 (1): 53-63, 1997.

Krüger, H., Heinemann, U. and Luhmann, H.J. Effects of ionotropic glutamate receptor blockade and 5-HT_{1A} receptor activation on spreading depression in rat neocortical slices. *NeuroReport*, 10(12): 2651-6, 1999.

Symposiumsbeiträge

Krüger, H. & Luhmann, H.J. Pharmacological profile of an *in vitro* model of cerebral ischemia. 6. European Students Conference at the Charité, 1995.

Krüger, H. & Luhmann, H.J. Functional and pharmacological properties of spreading depression in rat neocortical slices. 1. Kongreß der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft in Berlin, 1996.

Broser, M., Krüger, H. and Albrecht, D. Excitatory action of angiotensin II and IV on hippocampal neuronal activity in urethane anesthetized rats. 25. Göttinger Neurobiologentagung, 1997.

ABSTRACT

Spreading Depression (SD) induced Neocortical Hyperexcitability and Pharmacology of SD *in vitro*

Repetitive cortical spreading depression (SD) and SD-like events, associated with a massive depolarization of neuronal and glial cells, is thought to play a key role in the induction of neuronal damage in the peri-infarct zone following experimental focal cerebral ischemia. In addition, experimental and clinical data suggest that SD is the underlying mechanism of neurological disturbances during migraine auras as well. However, detailed analyses on the consequences of repetitive SDs on cortical function and involved receptors are lacking.

Using an *in vitro* rat model of SD I investigated in this thesis the electrophysiological properties of repetitive potassium chloride (KCl)-induced SDs, their influence on synaptic neurotransmission and the effects of ionotropic glutamate antagonists and 5-HT_{1A} agonists in neocortical slices obtained from adult rats. Whereas repetitive SDs revealed only non-significant variations in duration, amplitude and integral when elicited at intervals of 30 min, paired-pulse inhibition of extracellularly recorded field potential responses was significantly affected by repetitive SD even under normoxic conditions. Compared to the control recordings, each SD episode caused a significant decrease in the efficacy of intracortical GABAergic inhibition by approximately 10%. Since excitatory synaptic transmission was unaffected, these data indicate that repetitive SDs cause a selective suppression of GABAergic function even in the non-ischemic brain. None of the compounds tested prevented the SD-induced cortical disinhibition. However, the SD-associated negative shift in the extracellular DC potential was reduced by ketamine, a selective N-methyl-D-aspartic acid (NMDA-) receptor antagonist. Ketamine significantly ($p < 0.01$) reduced the amplitude of the first SD peak and blocked the second SD peak. Ketamine also decreased the SD duration at half maximal amplitude ($p < 0.05$). NBQX, a selective α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor antagonist did not affect the SD-accompanied cortical depolarization, whereas selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptor agonists 8-OH-DPAT and BAY x 3702 shortened concentration-dependently the duration of the SD up to 50 %. Nevertheless, both 5-HT_{1A} receptor agonists caused a strong disinhibition of neuronal function with a tendency towards paired-pulse facilitation as well. Thus, repetitive SD and SD-like events may induce neuronal hyperexcitability due to a selective suppression of intrinsic inhibitory GABAergic function.

Under normoxic conditions, SD-induced disinhibition may be involved in the generation and maintenance of migraine or associated neurological disturbances. Under hypoxic-ischemic con-

ditions, neuronal hyperexcitability may contribute to the gradual expansion of the ischemic core and the metabolic deterioration of the penumbral tissue after SD episodes. This underlines the deleterious effect of SD to the outcome of focal cerebral ischemia. Although the precise mechanisms of SD generation and propagation remains far from established, the present pharmacological profile of KCl-induced SD *in vitro* links the induction and propagation of SD in rat neocortical slices mainly to a local increase of $[K^+]_e$ and a subsequent activation of NMDA- receptors. This corroborates the neuroprotective effect of a NMDA- receptor blockade observed in various *in vitro* and *in vivo* models. However, as it has been demonstrated in clinical trials, NMDA- receptor antagonists in use today cause psychomimetic and cardiovascular side effects in humans and are therefore currently of low clinical benefit. The activation of 5-HT_{1A} receptors by selective agonists represents a new pharmacological strategy in the treatment of acute ischemic stroke, since shortened SD waves may represent a less energy-consuming process under conditions of limited energy supply and are probably associated with an efflux of excitatory neurotransmitters to a lesser extent. The potential clinical benefit of 5-HT_{1A} receptor agonists remains to be investigated in clinical trials, since systemic administration of these compounds after the onset of acute focal cerebral ischemia might interfere with normal functions of glutamatergic neurotransmission in the intact, non-ischemic brain.

Key Words: Spreading depression; Cerebral cortex; Extracellular recording; GABAergic inhibition; AMPA receptor antagonist; NMDA- receptor antagonist; 5-HT_{1A} receptor agonist; *in vitro*; Rat; migraine; Cerebral ischemia