

Aus dem Institut für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Effekte von Endothelin-1 auf die Blutgefäß-Hirn-Achse

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Frau Dê Vi Lê Jorks
aus Schmölln

Seite ii

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rudolf Graf
2. Prof. Dr. Arno Villringer
3. Prof. Dr. Jens P. Dreier

Datum der Promotion: 22. März 2013

Abstract

The blood-brain barrier (BBB) plays a critical role in the regulation of the brain microenvironment. The physiological mechanisms underlying the BBB and their changes during brain pathology are still largely unknown. In my thesis, I applied sodium-dehydrocholate (DHC) to the brain surface at a cranial window in rats, causing local BBB disruption. I was particularly interested in whether or not DHC-induced BBB disruption would lead to spreading depolarization (SD) because (i) endothelin-1₍₁₋₂₁₎ (ET-1), a potent inducer of SD, is known to open the BBB, and (ii) it recently was hypothesized that ET-1 induces SD via BBB disruption.

SD is characterized as a wave of massive ion translocation between the intra- and extracellular space of neurons, near-complete sustained depolarization of neurons, neuronal swelling, an abrupt, large, negative change of the direct current (DC) potential and silencing of brain electrical activity (spreading depression). Now unequivocal electrophysiological evidence exists in the clinic that SDs occur in abundance in traumatic brain injury and stroke where they are assumed to facilitate neuronal damage. The same conditions are also associated with BBB disruption, and BBB disruption is also assumed to contribute to neuronal damage.

Using intravenous administration of Evans Blue and a newly developed semi-quantitative Matlab[®] algorithm for evaluation, I was able to verify that DHC opened the BBB for the macromolecule albumin. Despite significant evidence of DHC-induced BBB disruption, I did not observe the occurrence of SDs using potassium-selective microelectrodes and laser-Doppler flowmetry. Moreover, I did not find that the small ion potassium increased in the extracellular space after DHC application although it is well known that there is a potassium gradient from the intravascular to the extracellular compartment. These results suggested that, under pathological conditions, the BBB can be permeable to macromolecules like albumin but, at the same time, it can be impassable for small molecules like potassium. A possible explanation for this paradox is that the transcellular pathway of the BBB, allowing the passage of macromolecules, can be disturbed before the paracellular pathway, that would allow small molecules to pass, is affected. Furthermore, my results suggested that ET-1 did not induce SD via BBB disruption.

I also investigated in parallel the hypercapnia-induced positive DC-shift and whether this DC-shift would disappear after BBB disruption. The background to this study was the previously hypothesized generation of hypercapnia-induced DC-shifts at the BBB in contrast to other DC-shifts

associated with ictal epileptic activity or SD, which are generated by glial cells or neurons. I found that DHC-induced BBB disruption did not change the hypercapnia-induced positive DC-shift which corresponds well with the hypothesis that DHC caused a disruption of the transcellular rather than the paracellular pathway of the BBB.

In a second study, I analyzed the pH- and potassium-signals associated with ET-1-induced SDs. My findings provided a further argument that SDs in response to ET-1 are mediated by ET-1-induced vasoconstriction and ischemia. In a third study, I found that endothelin-1₍₁₋₃₁₎ (ET-1₍₁₋₃₁₎), an alternate intermediate in the production of ET-1, induced SD in a similar fashion to ET-1 but with significantly less potency.

All three studies are related in a complex manner to the yet enigmatic and sometimes counterintuitive roles that both BBB and SD play in brain pathology. Most importantly, my findings provide arguments that BBB disruption for macromolecules can occur before BBB disruption for small molecules.

Keywords:

spreading depolarization, blood-brain barrier, endothelin-1, electrocorticography

Zusammenfassung

Die Bluthirnschranke (BBB) spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der zerebralen Mikroumgebung. Die physiologischen Mechanismen der BBB bzw. deren Änderungen während pathologischer Zustände sind bis heute unzureichend bekannt. In dieser Arbeit verwendete ich Natriumdehydrocholat (DHC) auf der Kortexoberfläche von Ratten in einem Modell der kranialen Fensterung, um die BBB zu öffnen. Dabei war ich insbesondere daran interessiert, ob die BBB-Öffnung durch DHC zu Spreading Depolarization (SD) führt, denn (i) Endothelin-1₍₁₋₂₁₎ (ET-1), welches sehr potent SD auslöst, ist bereits für seine Unterbrechung der BBB bekannt, und zudem (ii) wurde kürzlich vermutet, dass ET-1 SD durch eine BBB-Öffnung hervorruft.

SD ist durch eine massive Ionenverschiebung zwischen Intra- und Extrazellulärraum der Neurone sowie durch eine fast vollständige anhaltende Depolarisation der Nervenzellen charakterisiert, welche mit dem Erliegen der elektrischen Hirnaktivität (Spreading Depression), einer neuronalen Schwellung und einer großen negativen Veränderung des Gleichstrom (direct current; DC) -Potenzials einhergeht. Seit Kurzem gibt es auch in der Klinik eindeutige elektrophysiologische Nachweise dafür, dass multiple SDs während Hirntraumata und Schlaganfällen auftreten und vermutlich Nervenschädigung begünstigen, ähnlich wie auch BBB-Unterbrechungen für solche Schäden verantwortlich gemacht werden.

Nach intravenöser Evans-Blue-Applikation und mithilfe eines neu entwickelten semi-quantitativen Auswertungsprogramms in Matlab[®], konnte ich bestätigen, dass DHC die BBB für das Makromolekül Albumin öffnet. Trotz des signifikanten Nachweises der BBB-Öffnung durch DHC konnte ich mit kaliumselektiven Mikroelektroden und Laser-Doppler-Blutflussmessungen keine SDs detektieren. Weiterhin konnte ich keine Hinweise auf einen extrazellulären Kaliumanstieg nach DHC-Gabe beobachten, obwohl es bekannt ist, dass ein Kaliumkonzentrationsgefälle zwischen dem intra- und dem extrazellulären Kompartiment besteht.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die BBB unter pathologischen Bedingungen gleichzeitig durchlässig für Makromoleküle wie Albumin aber unpassierbar für kleine Moleküle, wie Kalium sein kann. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch wäre, dass der transzelluläre Austausch über die BBB, welcher Makromoleküle passieren lässt unterbrochen sein kann, bevor der parazelluläre Transport für kleine Moleküle beeinträchtigt wird. Weiterhin legen meine Ergebnisse nahe, dass ET-1 SD nicht über eine BBB-Öffnung verursacht.

Parallel dazu untersuchte ich, ob die Hyperkapnie-induzierten positiven DC-Shifts auch nach BBB-Öffnung auftreten. Der Hintergrund war hier die bestehende Behauptung, dass die Hyperkapnie-induzierten DC-Shifts an der intakten BBB generiert werden, im Gegensatz zu anderen DC-Potenzialänderungen bei epileptischer Aktivität oder SD, welche von Glia- und/oder Nervenzellen generiert werden. Die DHC-induzierte BBB-Öffnung verursachte jedoch keine Veränderung der positiven DC-Shifts. Dies passt sehr gut zu der Hypothese, dass DHC eher die transzellulären statt die parazellulären Passagewege beeinflusst.

In einer zweiten Teilstudie, analysierte ich die mit ET-1-induzierter SD assoziierten pH-Wert- und Kaliumkonzentrationsänderungen. Die Resultate stellten ein weiteres Argument für die Entstehung dieser SDs durch die ET-1-induzierte Vasokonstriktion und Ischämie dar. In einer dritten Teilstudie zeigte Endothelin-1₍₁₋₃₁₎ (ET-1₍₁₋₃₁₎), ein alternatives Zwischenprodukt des ET-1-Stoffwechsels, ähnliche Eigenschaften in der SD-Induktion wie ET-1, jedoch mit einer signifikant niedrigeren Potenz.

Alle drei Teilstudien sind auf eine komplexe Art und Weise mit den bis heute noch nicht vollständig entschlüsselten und teilweise sogar widersprüchlichen Rollen, welche die BBB und SD in Erkrankungen des Gehirns spielen, verbunden. Vor allem aber liefern meine Ergebnisse wichtige Hinweise auf eine BBB-Öffnung für Makromoleküle, welche noch vor der Permeabilität für kleine Moleküle auftreten kann.

Schlagwörter:

Spreading Depolarization, Blut-Hirn-Schranke, Endothelin-1, Elektrokortikographie

Widmung

Meiner lieben Mutter Dipl.-Ing. Martina Jorks.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen	1
1.1.1	Messung von Hirnelektrischen Potenzialen	1
1.1.2	Langsame Summenpotenziale – DC-Potenziale	3
1.1.3	(Cortical) Spreading Depolarization – SD	4
1.1.4	Endothelin – ET	12
1.1.5	Blut-Hirn-Schranke – BBB	15
1.2	Zielstellung	20
1.2.1	Hypothesen	20
1.2.2	Vorstellung der drei Versuchsserien	23
1.2.3	Herleitung der Fragestellung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Tiere	25
2.2	Material	25
2.2.1	Silberchlorid-Elektroden zur subduralen DC-Messung	25
2.2.2	Ionenselektive Mikroelektroden	26
2.3	Verwendete Substanzen	28
2.3.1	Künstlicher Liquor – aCSF	28
2.3.2	Gallensalz Natrium-Dehydrocholat – DHC	28
2.3.3	ET-1 und ein Zwischenprodukt seiner Biosynthese	29
2.3.4	Evans Blue	29
2.3.5	Paraformaldehyd-Lösung	30
2.4	Methoden	30
2.4.1	Zerebrales Multiparametermonitoring bei SD	30
2.4.2	Laser-Doppler-Blutflussmessung	30
2.4.3	Langsame Summenpotenziale – DC-Potenziale	33
2.4.4	Untersuchung der Blut-Hirn-Schranke	33
2.5	Präparation	34
2.5.1	Grundpräparation und technischer Aufbau	34
2.5.2	Präparation des offenen kranialen Fensters	35

2.6	Messung	36
2.6.1	Allgemeines Messprotokoll	36
2.6.2	Messprotokoll Serie 1 – DHC	37
2.6.3	Messprotokoll Serie 2 – Endothelin-1 und pH	38
2.6.4	Messprotokoll Serie 3 – Endothelin-1 _(1–31)	39
2.7	Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Physiologie	41
3.2	Datenanalyse	41
3.3	Blut-Hirn-Schranke – Serie 1	43
3.3.1	Langsamer rCBF-Anstieg und positiver DC-Shift nach BBB-Öffnung	43
3.3.2	Keine spontanen SDs nach BBB-Öffnung durch DHC	44
3.3.3	Stabile Hyperkapnie-Antwort des DC-ECoGs nach Öff- nung der BBB	45
3.3.4	Verringerte CO ₂ -Reaktivität des rCBFs nach SD	48
3.3.5	Neue vereinfachte Methode zur Quantifizierung der Evans- Blue-Extravasation	48
3.3.6	Frühe BBB-Öffnung durch DHC	50
3.3.7	Verminderte Nervenzellaktivität während Hyperkapnie- Antwort	50
3.4	pH-Wertveränderungen – Serie 2	53
3.4.1	Weitere Hinweise auf Ischämie	55
3.5	Endothelin-1 _(1–31) – Serie 3	56
3.5.1	Endothelin-1 _(1–31) induziert Spreading Depolarizations	56
3.5.2	ET-1 _(1–21) führt in nanomolaren Lösungen häufiger zu SDs als ET-1 _(1–31)	58
4	Diskussion	59
4.1	BBB-Auswertung	59
4.1.1	ET-1-induzierte SD und BBB-Integrität	59
4.1.2	DC-Potenzialänderungen und BBB-Integrität	60
4.1.3	Keine akute BBB-Öffnung nach SD-Induktion	63
4.2	DC-Potenzial- und pH-Wertänderungen während SD	64
4.2.1	ET-1-induzierte pH-Wert-Senkung vor SD liefert Hin- weise auf Ischämie	64
4.2.2	Weitere Hinweise auf Ischämie	65
4.3	ET-1 _(1–31)	65
4.3.1	ET-1 _(1–31) induziert SD	65
4.4	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	66

4.4.1	Multifaktorielle DC-Shift-Entstehung	66
4.4.2	PH-Wert unter Hyperkapnie	70
4.4.3	ET-1 und BBB	71
4.4.4	Spreading Depolarization unter ET-1	72
4.4.5	Evans-Blue-Quantifizierung	72
4.5	Ausblick	74
4.5.1	Klinischer Ausblick	74
Literaturverzeichnis		77
A Anhang		91
A.1	Publikationen	91
A.2	Abkürzungsverzeichnis	93
A.3	Source Code	95
A.4	Lebenslauf	101

Kapitel 1

Einleitung

In dieser Arbeit wird das Phänomen der Spreading Depolarization (SD) bei Ratten mit besonderem Augenmerk auf die Zusammenhänge zwischen messbaren vaskulären und neuronalen Veränderungen sowie der Einfluss der Blut-Hirn-Schranke (blood-brain-barrier; BBB) auf diese Messgrößen betrachtet. SD ist ein wichtiges pathophysiologisches Phänomen des Gehirns, welches vermutlich in mehr als 50 % der Fälle für die sekundären neurologischen Defizite in der Intensivmedizin verantwortlich ist und nun auch mithilfe neuer invasiver Messtechniken beim Menschen nachgewiesen werden kann (Strong et al., 2002; Dreier et al., 2007; Dohmen et al., 2008; Dreier et al., 2009).

Zudem wird der bekannte Vasokonstriktor Endothelin-1 (ET-1) verwendet, welcher sehr potent SD auslöst (Dreier et al., 2002a) und wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entstehung von Vasospasmen nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung (aSAB) spielt (Macdonald et al., 2008; Jorks et al., 2011a). Das Neuropeptid ET-1 wird hier eingesetzt, um die Effekte der SD auf den extrazellulären pH-Wert und die extrazelluläre Kaliumionenkonzentration ($[K^+]_o$) im zerebralen Kortex zu untersuchen. Diese Ionenkonzentrationsänderungen werden im Kontext der lokalen zerebralen Blutflussantwort (regional cerebral blood flow; rCBF) während SD interpretiert und ebenfalls auf eine mögliche Beeinflussung durch die BBB hin untersucht.

1.1 Grundlagen

1.1.1 Messung von Hirnelektrischen Potenzialen

Elektroenzephalografie und Elektrokortikografie

Die Elektroenzephalografie (EEG) ist eine nichtinvasive diagnostische Methode, welche Spannungsschwankungen an der Kopfhaut aufzeichnet und so die

summierte elektrische Aktivität des Gehirns darstellen kann. Die detektierten EEG-Signale basieren auf elektrischen Zustandsänderungen von Hirnzellen, z.B. bei der Informationsverarbeitung. Aufgrund der räumlichen neuronalen Anordnung addieren sich die Potenziale einzelner Nervenzellen zu über den gesamten Kopf verteilt messbaren Signalen.

Klinisch leitet man meist mehr als zwölf EEG-Kanäle ab und untersucht die resultierenden Daten manuell oder in der automatischen Signalanalyse auf pathologische Muster. Die räumliche Auflösung der EEG liegt dabei bei mehreren Zentimetern. Um eine höhere Auflösung (im Millimeterbereich) zu erhalten, müssen die Elektroden nach neurochirurgischer Öffnung des Schädels, in der sogenannten Elektrokortikografie (ECoG), direkt auf die Hirnrinde aufgelegt werden. Eine noch detailliertere Erfassung der Zellaktivität ist bisher nur im Tierexperiment möglich (siehe Abbildung 1.1).

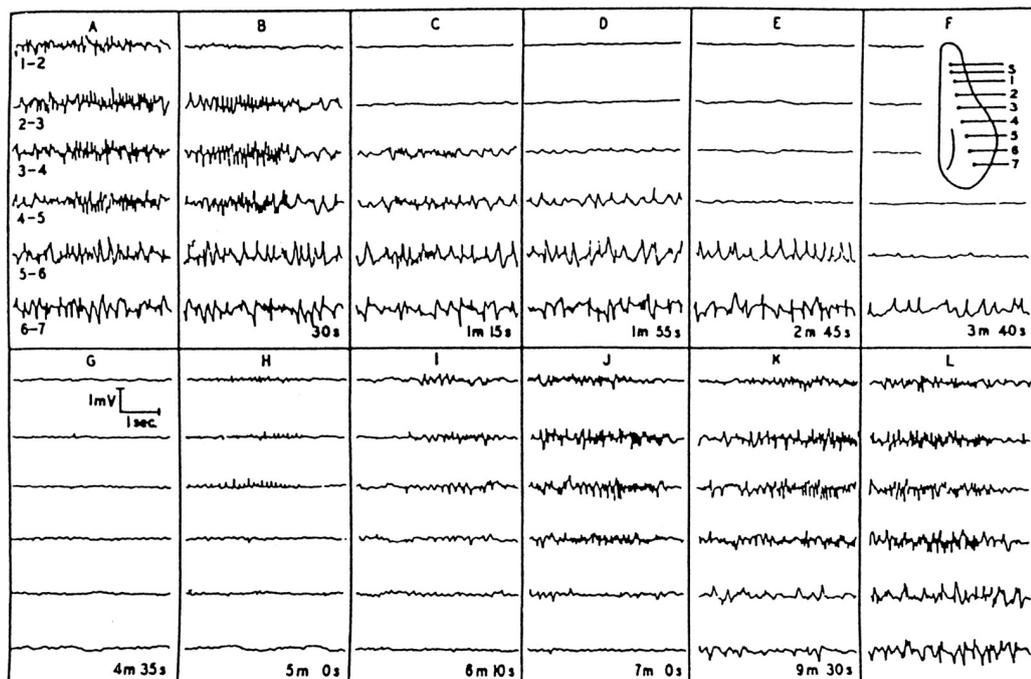


Abbildung 1.1: Leão Originalaufzeichnung der Spreading Depression (Abbildung von Leão (1944) aus Somjen (2001)) In A–L werden die aus Elektrodenpaaren berechneten ECoG-Ableitungen von der freipräparierten Hirnoberfläche eines Kaninchens dargestellt. Die Zeichnung in F zeigt die Positionen der Stimulations- (S) sowie der Messelektroden (1–7). Die Zeitdifferenz zur elektrischen Stimulation, welche zwischen A und B stattfand, ist am unteren Rand der einzelnen Bildabschnitte B–K vermerkt. Die Elektroden zeigen eine zeitversetzte Isoelektrizität als Ausdruck der Ausbreitung der Spreading Depression. Zur vollständigen Erholung der ECoG-Aktivität kommt es ca. 16,5 Minuten nach Stimulation (L).

Feldpotenziale

Nach Stimulation der Afferenzen eines Neurons, entsteht ein postsynaptisches Potenzial, welches bei exzitatorischen Synapsen EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potenzial) genannt wird. In der EEG werden hauptsächlich EPSPs gemessen, da diese wesentlich größere extrazelluläre Veränderungen im Vergleich zu den inhibitorischen Potenzialen hervorrufen.

Während eines EPSP kommt es über ligandengesteuerte Kanäle der postsynaptischen Membran zu einem Nettoeinstrom von Kationen, der die Membran depolarisiert. Dem Stimulus folgend, fließt also ein elektrischer Strom, welcher die Zelle nach Passage des Zellinneren über die Zellmembran wieder verlässt und, den Stromkreis schließend, im extrazellulären Medium zum synaptischen Bereich zurückkehrt. Canals et al. (2005) beschreiben, dass die Aktivierung einer exzitatorischen Synapse zu einer Stromsenke führt, d.h. es kommt im Medium außerhalb der Nervenzelle zu einem negativen Potenzial gegenüber einer Referenzelektrode. Das extrazelluläre Medium stellt dabei einen endlichen elektrischen Widerstand dar, sodass der extrazelluläre Stromfluss nach dem Ohmschen Gesetz eine negative Potenzialänderung verursacht (Canals et al., 2005).

Das extrazelluläre Signal eines einzelnen Neurons ist jedoch zu klein (Mikrovoltbereich), um es störungsfrei aufzeichnen zu können und die Messung des größeren, intrazellulären Signals (im Millivoltbereich) ist aufgrund des geringen Dendritendurchmessers ebenfalls schwer realisierbar. Praktischerweise sind die Pyramidenzellen im Kortex überwiegend senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet und in einigen Regionen, wie z.B. im Hippocampus, befinden sich ihre synaptischen Eingänge sogar hauptsächlich in der gleichen Schicht. Somit addieren sich viele extrazelluläre Signale zu dem mit Elektroden gut messbaren Feldpotenzial (Feld-EPSP).

Überschreitet die Summe der EPSPs bzw. das Feld-EPSP nun einen bestimmten Schwellenwert, feuert die Zelle ein Aktionspotenzial (AP), welches am Axonhügel (Basis des Axons) initiiert wird. Ein Stromkreis entsteht durch die intrazelluläre (axonale) Weiterleitung des AP und den extrazellulären Rückstrom zur Stromsenke, die sich nun am Zellkörper (Soma) befindet. Während des AP würde eine Elektrode in Dendritennähe eine Stromquelle detektieren und ein positives Signal zeigen, während am Soma (Stromsenke) ein negatives Signal messbar wäre.

1.1.2 Langsame Summenpotenziale – DC-Potenziale

Die in der ECoG direkt von der Kortexoberfläche abgeleiteten hochfrequenten Oszillationen mit Amplituden im Mikrovoltbereich überlagern gleichzeitig messbare, niederfrequente ($< 0,5$ Hz) Potenzialänderungen mit wesent-

lich höheren Amplituden (Millivoltbereich). Die langsamen Änderungen werden hier, obwohl physikalisch nicht ganz exakt, als Gleichspannungs- (**D**irect **C**urrent) bzw. DC-Shifts bezeichnet, während die hochfrequenten Anteile auch Wechsellspannungs- (**A**lternating **C**urrent) bzw. AC-Potenzialänderungen genannt werden.

An der Entstehung des DC-Potenzials sind vermutlich die Neurone bzw. bestimmte Abschnitte ihrer Dendriten entscheidend beteiligt (Canals et al., 2005). Die größte messbare DC-Potenzialänderung im zerebralen Extrazellulärraum tritt bei SD auf. Sie kann als eine kurzfristige, starke DC-Negativierung von bis zu -35 Millivolt beobachtet werden.

Somit besitzt die DC-Messung eine wichtige Bedeutung im Nachweis der SD sowie in der Identifikation der **S**prea**D**ing **I**schemia (SI), welche unter bestimmten Voraussetzungen als ein initiales Perfusionsdefizit mit SD über den Kortex wandert und durch eine länger andauernde DC-Negativierung gekennzeichnet ist (Dreier et al., 1998).

1.1.3 (Cortical) Spreading Depolarization – SD

Der Begriff der **S**prea**D**ing **D**epolarization (SD) beschreibt eine neuronale und gliale Massendepolarisation, die sich wellenähnlich, mit etwa $2-6 \frac{mm}{min}$ (Leão, 1944) im zerebralen Kortex ausbreitet („spreading“).

Zusammengefasst ist SD durch:

- (i) einen fast vollständigen Zusammenbruch der Ionengradienten (Kraig and Nicholson, 1978; Windmüller et al., 2005);
- (ii) die fast vollständige, anhaltende Depolarisation der Nervenzellen (Leão, 1944);
- (iii) das Herabsetzen des neuronalen Membranwiderstands (Canals et al., 2005);
- (iv) den Verlust elektrischer Hirnaktivität (Leão, 1944);
- (v) sowie durch Nervenzellschwellung und Deformation der dendritischen Dornenfortsätze (Takano et al., 2007) charakterisiert.

Im Moment besteht die Forderung, den Begriff der Spreading Depolarization zu präzisieren, um dieses spezielle Phänomen explizit von ähnlichen Vorgängen abgrenzen zu können. Eine aussagekräftige Beschreibung findet sich in dem englischen Terminus, „**near-complete sustained depolarization**“, der mit „anhaltender, nahezu vollständiger Depolarisation der Neurone“ übersetzt werden kann (Dreier, 2011).

Das Erliegen der elektrischen Hirnaktivität (**Spreading Depression**) lässt sich als vorübergehende Störung, sowohl der spontanen als auch der evozierten ECoG-Aktivität beobachten, insofern die Fähigkeit der AP-Generierung nicht bereits durch Sedativa, vorangegangene SDs oder einen schweren Energiemangel aufgehoben ist (Leão, 1944). Die Spreading Depression wurde vor mehr als 60 Jahren von dem brasilianischen Physiologen und Epilepsieforscher Aristides Leão als „spreading depression of cortical activity“ bei Kaninchen entdeckt (Leão, 1944). Später beschrieb Leão auch die große negative Gleichstrompotenzialveränderung (DC-Shift) des Extrazellulärums (Leão, 1947), die den Kernprozess der SD, die nahezu vollständige, anhaltende Nervenzelldepolarisation, extrazellulär markiert (Somjen, 2004). Eine seiner originalen Aufzeichnungen ist in Abbildung 1.1 auf Seite 2 dargestellt.

1.1.3.1 Mechanismus der SD

Ähnlich einer Batterie (Akkumulator), die wiederaufladbar elektrochemische Energie liefert, speichern Neurone ihre Energie in Form von Ionengradienten und Ladungsunterschieden zwischen der Innen- und der Außenseite ihrer Zellmembranen. Die aus einer Doppellipidschicht bestehende Membran agiert dabei als Kondensator, der die Ladungen am Ausgleich hindert. Außerdem tragen Na^+/K^+ -Pumpen aktiv zur Aufrechterhaltung der Gradienten bei.

Für die Entstehung und Weiterleitung von APs werden Ionenkanäle in der Membran geöffnet und ein kurzfristiger Austausch zwischen Intra- und Extrazellulärums ermöglicht. Der dabei entstehende Energieverlust kann normalerweise sehr schnell ausgeglichen bzw. „wiederaufgeladen“ werden, da er nur einen geringen Anteil der insgesamt gespeicherten Energie ausmacht. Die hohen, energiespeichernden Ionengradienten stellen so die Grundvoraussetzung für die Signalübertragung dar, werden jedoch im Gegensatz zu SD während APs kaum verändert.

Energie und Substrate während SD

SD könnte man, energetisch betrachtet, als letztes Stadium auf dem Weg zum pathologischen Zelltod einordnen, wobei der physiologische Ausgangszustand, der sogenannte **Resting State**, die höchste gespeicherte Energie besitzt und der Zelltod (Endzustand) den energetischen Nullpunkt darstellt. Um die während SD zusammengebrochene Homöostase wiederzuerlangen, müssen die Zellen eine hohe zusätzliche Energie für die Ionenpumpen aufwenden. Dieser Mehrbedarf spiegelt sich in einem 1,5-fach erhöhten Sauerstoff- (Mayevsky and Weiss, 1991) und einem 2–3-fach höheren Glukoseverbrauch (Nedergaard and Astrup, 1986; Gjedde et al., 1981) wider.

Durch SD verringert sich die Konzentration energiereicher intrazellulärer und extrazellulärer Substrate: ATP sinkt auf ca. 62 %, Phosphokreatin auf ca. 24 % und die interstitielle Glukosekonzentration auf etwa 50 % (Csiba et al., 1985). Gleichzeitig steigt durch die Zunahme der anaeroben Glykolyse die Laktatkonzentration auf ca. 200 % an, wodurch der pH-Wert auf ca. 6,9 pH-Einheiten abfällt (Kraig et al., 1983).

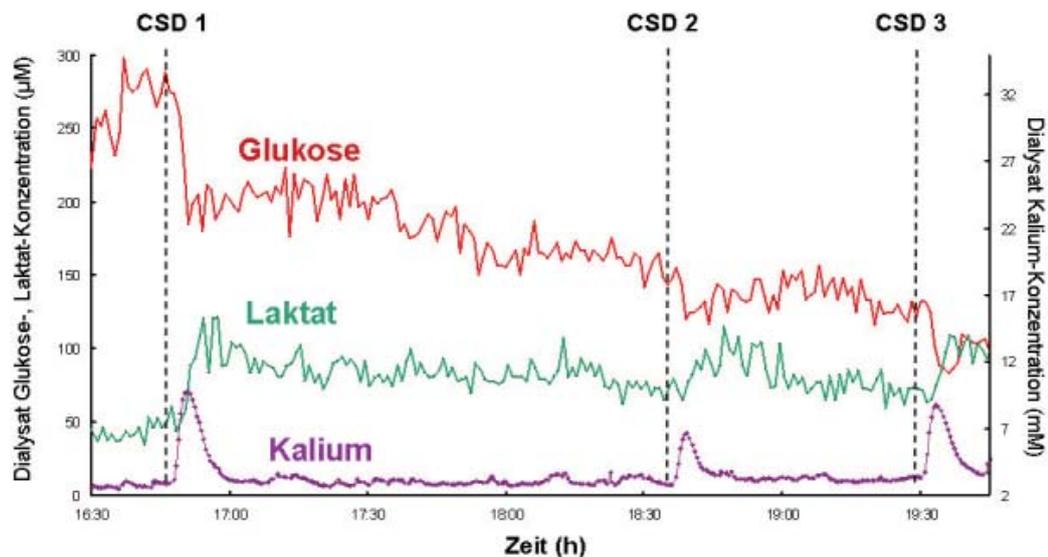


Abbildung 1.2: Extrazelluläre Konzentrationen von Kaliumionen, Glukose und Laktat während SD (Abbildung von Graf and Strong (2007)) Diese Abbildung veranschaulicht die schrittweise Verschlechterung der Energiebilanz im Gewebe nach wiederholter KCl-induzierter SD. Der Abfall der Glukose- bzw. der Anstieg der Laktatkonzentration zum Zeitpunkt des Kaliumionenkonzentrationsanstiegs kennzeichnet den Beginn der Ionengleichgewichtsstörung und somit auch der SD (hier als „CSD“ 1-3 bezeichnet).

Ionen und Transmitter während SD

SD beginnt mit einem über den dendritischen Zellmembranen entstehenden Ungleichgewicht zwischen zelleinwärts und -auswärts gerichteten Kationenströmen (Canals et al., 2005), welches zu einer positiven intrazellulären Bilanz führt. Einwärtsströme, welche beispielsweise von langsam inaktivierenden Na^+ -Kanälen sowie über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren gesteuert werden, übersteigen dabei den durch membranständige Ca^{2+} - und Na^+/K^+ -ATPasen beschleunigten Ionenausstrom.

Es folgt der Zusammenbruch der Ionenhomöostase, von Dreier (2011) als „fast vollständiger Kurzschluss zwischen neuronalem Intra- und Extrazellulärraum“ beschrieben, welcher zu einer gravierenden Umverteilung zwischen den Kompartimenten führt:

- (i) Kalium verlässt durch subsynaptische Kanäle die Zelle und seine extrazelluläre Konzentration ($[K^+]_o$) steigt von normal $3 \frac{mmol}{L}$ auf etwa $60 \frac{mmol}{L}$ an;
- (ii) freigesetzte inhibitorische Neurotransmitter öffnen Anionenkanäle, die zum Einstrom von Chlorid (Cl^-) in die Zelle führen und somit die extrazelluläre Konzentration $[Cl^-]_o$ senken;
- (iii) ebenso fällt die extrazelluläre Natriumkonzentration $[Na^+]_o$ von normal $130 \frac{mmol}{L}$ auf ca. $70 \frac{mmol}{L}$,
- (iv) die extrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_o$ sinkt von 1,3 auf $0,1 \frac{mmol}{L}$ ab (Kraig and Nicholson, 1978; Windmüller et al., 2005), während die intrazelluläre Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ von $60 \frac{nmol}{L}$ auf $25 \frac{\mu mol}{L}$ zunimmt (Dietz et al., 2007).

Osmotisch gebundenes Wasser folgt dem Kationeneinstrom in die Nervenzellen und führt zu deren starker Anschwellung, wodurch gleichzeitig der Extrazellulärraum um ca. 70 % schrumpft. Ein längeres Bestehen der Zellschwellung, das sogenannte zytotoxische Ödem, führt unter anderem durch verlängerte intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung zu einer irreversiblen Zellschädigung, während kurze SD-Episoden gut toleriert werden (Somjen, 2004).

Zudem sind mehrere Neurotransmitter an den Veränderungen während SD beteiligt. So konnten bis zu 20-fach erhöhte Werte der extrazellulären Glutamatkonzentration (Scheller et al., 1993), welche über NMDA-Rezeptoren zur Propagation der SD beiträgt (Lauritzen and Hansen, 1992), sowie Konzentrationsanstiege von Aspartat (Scheller et al., 1993) und Katecholaminen (Pavlassek et al., 1993) um ca. das 10-fache während SD gemessen werden.

1.1.3.2 Blutflussveränderungen während SD

Unter physiologischen Bedingungen

In gesundem Gewebe reagieren arterielle Widerstandsgefäße (hauptsächlich Arteriolen) mit einer Tonusänderung auf SD und führen lokal zu dem typischen, akuten Blutflussanstieg (**Spreading Hyperemia**). Dieser wird meist im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel betrachtet, denn das Parenchym des Gehirns verfügt, im Gegensatz zu anderen Organen, kaum über Energiereserven (Wolf et al., 1996). Beispielsweise kann die Ionenhomöostase im Kaninchenhirn höchstens 2–5 Minuten ohne Blutzufuhr aufrecht erhalten werden (Leão, 1947). Zur gesteigerten Substratbereitstellung während SD, welche eine akute metabolische Belastung darstellt, folgt deshalb unmittelbar

nach Beginn der Ionenverschiebungen eine schnelle, kurz anhaltende Hyperperfusion auf das 2–3-fache des Ruheblutflusses (Lauritzen, 1987; Duckrow, 1993) in der betroffenen Kortexregion. Als potentielle Auslöser der Vasodilatation wurden sowohl neurogene Ursachen als auch Protonen, Adenosin, die Substrate Sauerstoff und Glukose sowie Stickstoffmonoxid (*NO*) untersucht (Lou et al., 1987; Dirnagl et al., 1994; Duckrow et al., 1985; Zhang et al., 1994; Wolf et al., 1996, 1997). Nach Ablauf der SD folgt der lokalen Hyperperfusion eine lang anhaltende Hypoperfusion (**Spreading Oligemia**) von ca. 70 % des Normalwertes, welche durch eine intakte Autoregulation, jedoch eine eingeschränkte *CO*₂-Reaktivität (Lauritzen, 1984) gekennzeichnet ist.

Unter pathologischen Bedingungen

In gefährdetem bzw. bereits vorgeschädigtem Gewebe kann SD eine sogenannte „inverse hämodynamische Antwort“ hervorrufen. Das bedeutet, dass eine schwere Hypoperfusion (**Spreading Ischemia**) statt dem physiologischen, akuten Blutflussanstieg mit SD einhergeht (Dreier et al., 1998). SI, eine Sonderform der Ischämie, trägt vermutlich zur Entstehung und Progression der Gewebeschädigung nach ischämischen Schlaganfällen bei (Shin et al., 2006; Strong et al., 2007). Sie tritt außerdem nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung (aSAB) auf und scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung sogenannter verzögerter ischämischer Schlaganfälle nach aSAB zu spielen (Dreier et al., 2009; Jorks et al., 2011a).

1.1.3.3 Klinische Bedeutung der SD

SD als pathophysiologisches Korrelat der Migräneaura

Die Migräne mit einer Prävalenz von ca. 10 % in der Bevölkerung (Lipton et al., 2002) ist eine der häufigsten Kopfschmerzformen. Ihr vielgestaltiges Krankheitsbild ist bei Erwachsenen typischerweise durch einen pulsierenden, unilateralen, anfallsartigen und periodisch wiederkehrenden Schmerz gekennzeichnet. Zusätzliche kann eine Migräneattacke von Symptomen wie Appetitlosigkeit (fast immer), Übelkeit (80 %), Erbrechen (40–50 %), Überempfindlichkeit gegenüber Licht (60 %), Geräuschen (50 %) und bestimmten Gerüchen (10 %) begleitet werden (Olesen et al., 2004).

Bei ca. 10 % der Patienten geht der eigentlichen Migränesymptomatik eine Aura voraus, während der häufig optische oder sensible Wahrnehmungsstörungen sowie seltener auch motorische Defizite auftreten. Leão (1944) beschreibt die Migräneaura als ein vorübergehendes fokales neurologisches Defizit, das durch eine SD ausgelöst wird und zum reversiblen Ausfall der neuronalen Funktion führt (Leão, 1944).

Seine weithin anerkannte Hypothese wird auch als „neuronale Theorie“ bezeichnet und steht im Gegensatz zur „vaskulären Theorie“ von Wolff (1963), welcher postulierte, dass die Aura Folge einer intrazerebralen Vasokonstriktion sei. Tatsächlich liefert die SD mit ihrer typischen, langsamen Ausbreitung der neuronalen Depolarisation und dem zeitweiligen Zusammenbruch der spezifischen Nervenzellaktivität eine sehr passende Erklärung für z.B. das wandernde Flimmerskotom der visuellen Migräneaura (Lauritzen, 1994). Klinisch ist die Migräneaura auch als prognostischer Faktor für die selten auftretenden (jährlich etwa 2–3 pro 100.000 Personen) migränösen Infarkte von Bedeutung (Broderick and Swanson, 1987).

SDs von variierender Dauer während fokaler zerebraler Ischämie

In beeindruckender Weise beschrieb Leão bereits zwischen 1944 und 1947 die weitreichende Bedeutung der SD, unter anderem für Folgen von Sauerstoff- oder Glukosemangel bei Nervenzellen. Somjen (2001) nennt die SD zudem „den Prozess, der den Nervenzelltod bei verschiedenen Schlaganfallformen einleitet“ (Somjen, 2001).

Hirninfarkte entstehen infolge fokaler, zerebraler Ischämien unterschiedlicher Ursachen. In der Übergangszone (Penumbra) des Infarktareals zum umliegenden gesunden Gewebe entstehen Gradienten der Durchblutung, des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) sowie der Glukosekonzentration. Ob und welcher Anteil der Penumbra sich durch eine frühzeitige Wiederherstellung der Perfusion wieder vollständig erholen wird, hängt davon ab, wie gut das Gewebe mit schon eingeschränkten Ressourcen auf weitere energetische Belastungen, wie beispielsweise auf SD, reagieren kann (Mies and Paschen, 1984). Im Kontext dieser Energieabhängigkeit beginnen lang anhaltende, Pharmakaresistente und schädigende SDs im Zentrum des minderperfundierten Gewebes einer Ischämie und verändern sich während ihrer Ausbreitung in der Penumbra und dem umliegenden gesunden Kortextgewebe zu einer zunehmend kürzeren Pharmaka-sensitiven und gutartigen SD (Nedergaard and Hansen, 1993; Koroleva and Bureš, 1979; Busch et al., 1996; Takano et al., 1996). Die in der Penumbra auftretenden SDs intermediärer Dauer, in der Literatur häufig als Periinfarktdepolarisationen bezeichnet, stehen im Verdacht, das Infarktareal zu vergrößern und könnten somit in ihrer Dauer und Frequenz einen prognostischen Parameter für die endgültige Infarktgröße darstellen.

Vasospasmen und Infarkte nach aSAB

Die aSAB, mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 7 pro 100.000 Personen (van Gijn and Rinkel, 2001) tritt bevorzugt im Alter von 50 bis 60 Jahren auf. Die Patienten entwickeln in ca. 30 % (Sanchez and Pile-Spellman, 1990) sogenannte verzögerte ischämische neurologische Defizite („delayed ischemic

neurological deficits“; DINDs), die in 10–15 % der Patienten zu Infarkten im CT führen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) besitzt eine höhere Sensitivität und die Rate an nachgewiesenen Infarkten ist entsprechend höher.

Die verzögert auftretenden Ischämien nach aSAB, sind durch Bewusstseinsverschlechterung und neu auftretende fokale neurologische Ausfälle gekennzeichnet. Der in etwa 75 % der Patienten angiographisch nachweisbare Vasospasmus der großen Hirngefäße wird als ein pathogenetischer Faktor in der Entstehung von DINDs angesehen, wobei nicht bei allen Patienten mit DINDs auch Vasospasmen auftreten (Vergouwen et al., 2008; Hattingen et al., 2008; Dreier et al., 2002b). Im Gegensatz zu einer in Metaanalysen nachgewiesenen positiven Korrelation zwischen verzögerter zerebraler Ischämie und Patienten-Outcome (Etminan et al., 2011), konnte kein Zusammenhang zwischen proximalem Vasospasmus und Patienten-Outcome gefunden werden (Vergouwen et al., 2011).

Das Risiko, DINDs nach aSAB zu entwickeln, steigt mit zunehmender Größe der Blutung in der initialen computertomografischen (CT) Bildgebung (Kistler et al., 1983). Ihr verzögertes Auftreten, 4–14 Tage nach dem initialen Blutungsereignis, korreliert mit der subarachnoidalen Hämolyse (Pluta et al., 1998; Macdonald et al., 2007). Neben dem proximalen Vasospasmus werden proximale Thromben, Mikrothromben, SD und SI als pathogenetische Faktoren in der Entstehung von DINDs gesehen (Proust et al., 1995; Vergouwen et al., 2008; Dreier et al., 2006, 2009; Oliveira-Ferreira et al., 2010). ET-1 scheint in der Entstehung des proximalen Vasospasmus eine wichtige Rolle zu spielen (Zimmermann and Seifert, 1998; Macdonald et al., 2008).

1.1.3.4 Klinischer Nachweis der SD

Die SD lässt sich technisch relativ einfach in Tiermodellen zeigen (Dreier et al., 1998, 2002a). Ihr nichtinvasiver Nachweis beim Menschen ist jedoch bis heute eine Herausforderung, weshalb Leães wichtige Entdeckung lange keine klinische Bedeutung erlangte. Trotz der, im Vergleich zu epileptischer Aktivität 5-fach höheren DC-Amplitude, ist SD im EEG des Menschen bisher nicht sichtbar. Hirnhäute und Schädelknochen stellen hierbei scheinbar einen zu großen kapazitiven Widerstand für die sehr langsamen Potenzialänderungen (0–0,5 Hz) der SD dar. Die gleichzeitige Depression der schnellen (AC-) Frequenzkomponente ($> 0,5$ Hz) ist ebenfalls schwer erkennbar, da sich die EEG-Aktivität aus einem Kortexareal von mehreren Quadratzentimetern ergibt und es somit zur Überlagerung der lokalen Depression mit der noch vorhandenen Aktivität in angrenzenden Gebieten kommt.

Die ersten Messungen der SD beim Menschen wurden 1977 mithilfe von Tiefenelektroden durchgeführt (Sramka et al., 1977). Später konnten SD-typische rCBF-Änderungen nuklearmedizinisch sowie mithilfe der SPECT (single-photon-emission computed tomography) während Migräneaura nachgewiesen werden (Olesen et al., 1981). Zudem wurden für SD charakteristische Änderungen im BOLD (blood-oxygen-level-dependent) -Signal gefunden (Hadjikhani et al., 2001). Ein methodisch einfaches Verfahren, welches für das Patientenmonitoring praktikabel ist, wurde erst kürzlich von Strong et al. (2002) vorgestellt. Es beruht auf dem invasiven Nachweis der Spreading Depression der hochfrequenten ECoG-Aktivität mithilfe eines subduralen Elektrodenstreifens, der bei indizierten neurochirurgischen Eingriffen zusätzlich implantiert wird. Fabricius et al. (2006) zeigten, dass langsamere Frequenzkomponenten dieser subduralen Signale SDs auch in Hirnregionen ohne vorher messbare ECoG-Aktivität nachweisen können.

Daraus entwickelten Dreier et al. (2009) eine robuste Methode für die subdurale echte DC-Potenzialmessung, welche es ermöglicht, die Dauer der DC-Negativierung als indirektes Maß für den Energiestatus des Gewebes zu bestimmen. Seit einiger Zeit werden subdural implantierbare Opto-/Elektrodenstreifen, zur kombinierten Messung von ECoG und rCBF, von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der COSBID (Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations) -Studien (www.cosbid.org) eingesetzt, um die Erkennung von SDs und SIs in Zukunft für die Klinik nutzbar zu machen (Strong et al., 2002; Dreier et al., 2006, 2009). Mithilfe dieser neuen Methode sind SDs beim Menschen bei Schädel-Hirn-Traumata, spontanen intrazerebralen Blutungen (Fabricius et al., 2006), aSABs bzw. bei verzögerten ischämischen Schlaganfällen nach aSABs (Dreier et al., 2006) und bei malignen ischämischen Mediainfarkten (Dohmen et al., 2008) nachgewiesen worden.

1.1.4 Endothelin – ET

Endothelin allgemein

Endothelin (ET) ist ein Oberbegriff, unter dem eine Gruppe struktur- und wirkungsverwandter endogener Substanzen zusammengefasst wird. Die bioaktiven Isopeptide ET-1, ET-2 und ET-3 kommen weit verbreitet in den verschiedensten Organen vor, u.a. in Herz, Lunge, Niere und Gehirn. Aufgrund ihrer sehr kurzen Halbwertszeiten im Blut entfalten ETs ihre Wirkung hauptsächlich parakrin oder autokrin, d.h. eher lokal am Ort ihrer Produktion und weniger systemisch. Gleichzeitig zeigen ETs eine hohe Rezeptoraffinität, welche eine lange Halbwertszeit im Gewebe und somit langanhaltende Effekte bedingt. Beispielsweise führen ET-induzierte Gefäßmuskelkontraktionen zu einer länger andauernden Senkung des lokalen Blutflusses und einer Erhöhung des systemischen Blutdrucks (Forsslund and Metsarinne, 1992).

Auch im nicht-vaskulären Gewebe erfüllen ETs eine Vielzahl von Aufgaben, wie die Beschleunigung der Zellteilung, die Beeinflussung von Nervenfunktionen und die Stimulation der Hormonausschüttung von z.B. Katecholaminen. Neben den erwähnten physiologischen Funktionen wurde eine Beteiligung von ETs an der Entstehung mehrerer Erkrankungen nachgewiesen. Beispielsweise beschreibt Haynes (1995) erhöhte Plasmaspiegel von ETs, die im Zusammenhang mit essenzieller Hypertonie auftraten. Weitere Korrelationen mit erhöhten ET-Konzentrationen wurden zu pulmonalarteriellen Hochdruck, Atherosklerose, Diabetes mellitus, und Asthma bronchiale (Schneider et al., 2002; Gawlik et al., 2006) gefunden. Selbst im akuten Myokardinfarkt, bei akuter ischämischer Arrhythmie, bei Herzeninsuffizienz oder im akuten Nierenversagen wurden erhöhte ET-Level im Blutplasma beobachtet (Ren et al., 2006; Wada et al., 1999).

ET-1-Wirkung

Beim Menschen kommen drei 21-Aminosäuren-ETs (ET-1_(1–21), ET-2_(2–21) und ET-3_(3–21)) vor, wovon Endothelzellen überwiegend ET-1 zur kontinuierlichen Gefäßtonusregulation und als Antwort auf verschiedene Reize freisetzen (Forsslund and Metsarinne, 1992; Sakamoto et al., 1993). Diese Reize umfassen unter anderem vasoaktive Peptide, Thrombozytenprodukte, hämodynamische Stimuli oder allgemein Endothelreizungen unterschiedlichen Ursprungs. ET-1, die im Körper vorherrschende Isoform des Endothelins, wurde zuerst von Yanagisawa et al. (1988) aus Endothelzellen des Schweins isoliert. Später wurde ET-1 auch in einer Reihe von Zelltypen des Gehirns nachgewiesen, u.a. in Neuronen (Lee et al., 1990), Gliazellen, Zellen des Plexus choroidius (Ehrenreich et al., 1990) sowie in pathologisch eingewanderten Makrophagen (Ehrenreich et al., 1992).

ET-Rezeptoren

ET-Rezeptoren kommen ubiquitär im gesamten Körper vor. Sie sind beispielsweise in glatten Muskelzellen von Gefäßen sowie von nicht-vaskulärem Gewebe, in Zellen des Nervengewebes, in Endothelzellen und in epithelialen Zellen zu finden. Ihre Funktion und Verteilung weist dabei eine hohe Heterogenität zwischen unterschiedlichen Organen sowie zwischen verschiedenen Spezies auf.

Durch Aktivierung spezieller ET-Rezeptoren an der (vom Lumen abgewandten) Adventitia-Seite zerebraler Gefäße löst ET-1 intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen über G-Proteine aus. Diese beeinflussen sowohl die Erhaltung und Regulation des Gefäßtonus *in vitro* und *in vivo* als auch langfristige Gefäßveränderungen (Salom et al., 1995).

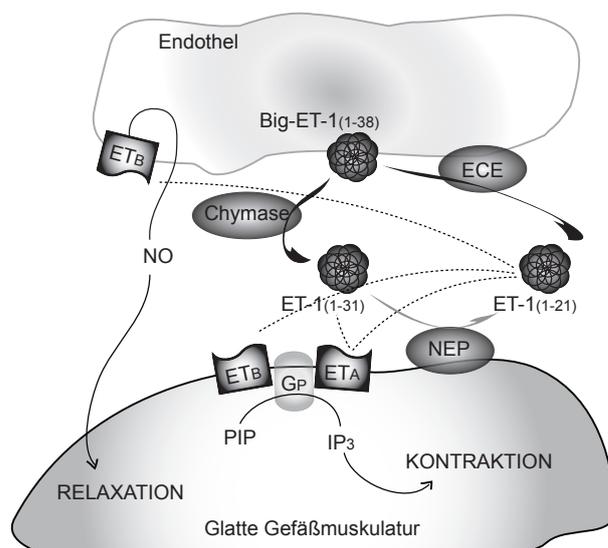


Abbildung 1.3: Endothelin-Rezeptoren Der ET_A-Rezeptor sitzt typischerweise auf glatten Gefäßmuskelzellen und bewirkt eine Kontraktion. ET_B kommt auf Endothelzellen vor und setzt Gefäßmuskulatur-relaxierendes NO frei. Die Existenz eines kontraktiven ET_B-Rezeptors im Gehirn wird vermutet, konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden (Vatter et al., 2007).

Die vasomotorischen Effekte von ET-1 werden durch zwei Rezeptorsubtypen vermittelt, welche kurz als ET_A und ET_B bezeichnet werden (siehe Abbildung 1.4). Der funktionell dominierende ET_A-Rezeptor befindet sich auf glatten Gefäßmuskelzellen und bewirkt eine Konstriktion der zerebralen Gefäße, während der meist gleichzeitig aktivierte, auf Endothelzellen sitzende ET_B-Rezeptor eine Vasodilatation durch NO-Freisetzung vermittelt. ET_A ist der vorherrschende Rezeptorsubtyp im Gehirn. Die parallele Aktivierung beider

Rezeptoren zeigt sich in der typischen systemischen ET-1-Antwort mit einer initialen Vasodilatation, die zu dem vorübergehenden Blutdruckabfall führt, gefolgt von einer langanhaltenden Vasokonstriktion und konsekutiver Blutdrucksteigerung.

ET-1 Biosynthese

Die drei ETs sind durch drei verschiedene Gene verschlüsselt und werden u.a. in den Endothelzellen der Blutgefäße produziert, welche spezielle Speichergranula (Weibel-Palade-Bodies) für ETs besitzen (Sakamoto et al., 1993). ET-1 wird von seinem Vorläufer Pro-ET-1 in zwei Stufen enzymatisch abgespalten. Zuerst entsteht durch eine Subtilisin-ähnliche Konvertase und eine Karboxypeptidase der inaktive 38-AS-Vorläufer Big-ET-1. ET-1 wird dann hauptsächlich durch Hydrolyse der Trp²¹-Val²² Bindung durch das Endothelin Converting-Enzym-1 (ECE-1) produziert. ECE-1 ist eine Metalloprotease der Endothelzellmembran, die im Menschen in vier Isoformen vorkommt. Es wurde gezeigt, dass Chymase, eine Serin-Protease, die u.a. in Mastzellen vorkommt, aus Big-ET-1 durch Hydrolyse der Trp³¹-Gly³² Bindung das Zwischenprodukt ET-1₍₁₋₃₁₎ herstellt (Nakano et al., 1997). Andere Chymotrypsin-Proteasen, wie Kathepsin G in menschlichen Granulozyten oder Mastzellchymase der Ratte produzieren ebenfalls ET-1₍₁₋₃₁₎. ET-1₍₁₋₃₁₎ wird dann, um wirksam zu werden, in einigen Geweben z.B. in der glatten Bronchialmuskulatur (Hayasaki-Kajiwara et al., 1999), in Herzmuskelzellen des Hasen (Fecteau et al., 2005) oder in der zentralen Kreislaufregulation der Ratte (Lu et al., 2007) durch die neutrale Endopeptidase NEP 24.11 oder seltener durch ECE-1 zu ET-1 gespalten.

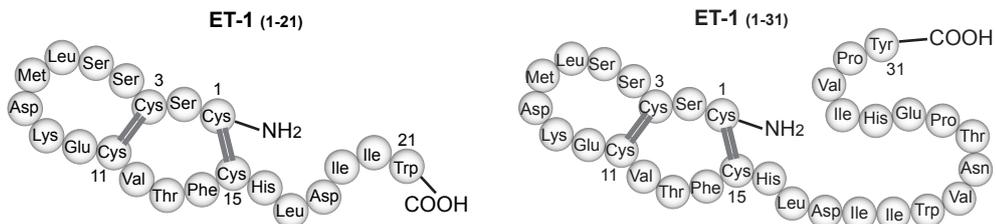


Abbildung 1.4: AS-Sequenz der beiden ET-1 Peptide Das links dargestellte ET-1₍₁₋₂₁₎, allgemein als ET-1 bezeichnet, besteht aus 21 Aminosäuren (AS). Rechts ist das aus 31 AS bestehende ET-1₍₁₋₃₁₎ abgebildet, welches ebenso wie ET-1 aus dem Vorläufer-Peptid, Big-ET-1₍₁₋₃₈₎ produziert wird. Ein wichtiges Strukturmerkmal beider Peptide sind die zwei Disulfidbrücken (graue Doppelbalken).

Endothelin-1₍₁₋₃₁₎

ET-1₍₁₋₃₁₎ wurde zum ersten Mal von Nakano et al. (1997) in der Rattentrachea beschrieben und seitdem auch aus verschiedenen Organen des Menschen isoliert, darunter Herz, Lunge und Haut. Suzaki et al. (2003) fanden Plasmakonzentrationen von ET-1₍₁₋₂₁₎ und ET-1₍₁₋₃₁₎ von $19,24 \pm 5,70 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ bzw. $15,54 \pm 4,45 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ in gesunden Probanden. ET-1₍₁₋₃₁₎ ist ebenfalls Substrat der ET-Rezeptoren mit einer so wesentlich höheren Affinität zu ET_A, dass es ursprünglich als reiner ET_A Agonist in physiologischen Konzentrationen betrachtet wurde. Durch die mögliche Spaltung zu ET-1, welches an ET_A und ET_B Rezeptoren bindet, wirkt ET-1₍₁₋₃₁₎ jedoch indirekt auch auf ET_B Rezeptoren. Im Vergleich zu ET-1, wird sowohl eine ähnlich potente als auch eine schwächere vasokonstriktive Wirkung für ET-1₍₁₋₃₁₎ in Abhängigkeit von Spezies, Gefäßart und -größe beschrieben. Studien an isolierten humanen Gefäßen und Zellkulturen zeigten eine Reihe von vergleichbaren ET_A vermittelten Gefäßeffekten von ET-1₍₁₋₃₁₎, u.a. Vasokonstriktion der Koronar- und Brustwandgefäße (Maguire et al., 2001) sowie intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung und Stimulation der Zellteilung von glatten Muskelzellen der Koronargefäße (Yoshizumi et al., 1998). Dagegen wurde in Hautgefäßen des Menschen (*in vivo*), bei gleicher Konzentration, eine 30-fach schwächere Vasokonstriktion für ET-1₍₁₋₃₁₎ im Vergleich zu ET-1 gefunden (Leslie et al., 2004). Obwohl die Existenz von ET-1₍₁₋₃₁₎ im menschlichen Gehirn noch nicht direkt nachgewiesen wurde, spielt das 31-AS-Peptid höchst wahrscheinlich eine Rolle im zentralen Nervensystems (ZNS). Hinweise darauf liefern der Nachweis relevanter Konzentrationen seines Schlüsselenzyms Chymase im Gehirn (Baltatu et al., 1997) sowie Beobachtungen erhöhter Chymasekonzentrationen im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen.

1.1.5 Blut-Hirn-Schranke – BBB

Der Begriff der Blut-Hirn-Schranke wird häufig verallgemeinernd für alle Limitierungen des Stoffaustauschs zwischen Blutkreislauf und ZNS verwendet. Im Speziellen bezeichnet er jedoch nur einen Teil dieser Grenzen. Arachnoidale Tight Junctions (TJs) bilden eine weitere Grenzschicht, ebenso wie TJs zwischen den Ependymzellen der Plexus chorioidei der Ventrikel. Diese sogenannte Blut-Liquor-Schranke, trägt zur Homöostase des Gehirns bei und versorgt es, über den Liquor cerebrospinalis, mit Vitaminen, Nukleotiden und Glukose. Die Austauschfläche des intrazerebralen Kapillarnetzwerkes der BBB ist jedoch etwa 5000-fach größer und übernimmt somit den Hauptteil der zerebralen Versorgung.

1.1.5.1 Konzept der Blut-Hirn-Schranke

Die BBB ist eine regulierte, sowohl physikalische als auch metabolische und enzymatische Barriere (Takakura et al., 1991) zwischen peripherer Zirkulation und dem ZNS, welches extrem empfindlich gegenüber einer Reihe von „alltäglichen“ Substanzen reagiert. Die normale Funktion des ZNS erfordert unter anderem ein in engen Grenzen gehaltenes extrazelluläres Ionenmilieu (Hodgkin, 1951), insbesondere der Ionenkonzentrationen von Na^+ , K^+ , H^+ und Ca^{2+} . Gleichzeitig besteht jedoch ein beträchtlicher Energiebedarf des Gehirns, hauptsächlich für aktive Transportprozesse, welcher eine gute Permeabilität für Energielieferanten und Metabolite erfordert.

1.1.5.2 Aufgaben der BBB

Die BBB existiert als selektive Diffusionsbarriere im Bereich des mikrovaskulären Endothels und sorgt unter anderem für

- die Erhaltung des dynamisches Ionengleichgewichts;
- den Nährstofftransport, z.B. Glukose, in das ZNS;
- die Metabolisierung zahlreicher Substanzen vor und während ihres Transports in die Zellen;
- den Schutz vor potentiell neurotoxischen Molekülen, wie z.B. zirkulierenden Hormonen oder extrinsischen Toxinen;
- sowie die Entsorgung von Abfallprodukten.

Der erste experimentelle Nachweis der BBB gelang Paul Ehrlich, der feststellte, dass systemisch applizierte wasserlösliche Farbstoffe alle Organe außer dem Gehirn anfärben (Ehrlich, 1885). Nachdem einer seiner Schüler, Edwin Goldmann (1913), fand, dass intrathekal injiziertes Trypanblau alle Zellarten des Gehirns anfärbt, jedoch nicht die Peripherie erreicht, nahm man eine physikalische Barriere zwischen ZNS und peripherer Zirkulation an. Für diese verwendete Lewandowsky (1900) als erster den Begriff „Blut-Hirn-Schranke“ (**B**lood-**B**rain **B**arrier; BBB), während zahlreiche Studien versuchten die physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie z.B. elektrische Ladung, Dissoziationskonstante, Fettlöslichkeit, Molekulargewicht und -größe (Tschirgi, 1962) der durchgelassenen Moleküle zu beschreiben. Erst mit der Einführung der Elektronenmikroskopie in den 1930er Jahren wurden detailliertere Untersuchungen zu den anatomischen Strukturen hinter der starken Selektivität der BBB möglich (Hawkins and Davis, 2005).

Trotz der stetigen Weiterentwicklung des BBB-Konzeptes, beruht das heutige Verständnis der BBB auf den Arbeiten von Reese, Karnovsky und Brightman aus den späten 1960er Jahren (Hawkins and Davis, 2005). Reese and Karnovsky (1967) zeigten in einer elektronenmikroskopischen Studie, dass venös applizierte Meerrettichperoxidase die zerebralen Gefäße nicht verlassen kann und berichteten von epithelähnlichen „tight junctions“ zwischen Endothelzellen. Sie vermuteten, dass diese das Kapillarlumen, ähnlich einer impermeablen Membran, dicht verschließen und so das eigentliche anatomische Korrelat der BBB darstellen (Reese and Karnovsky, 1967).

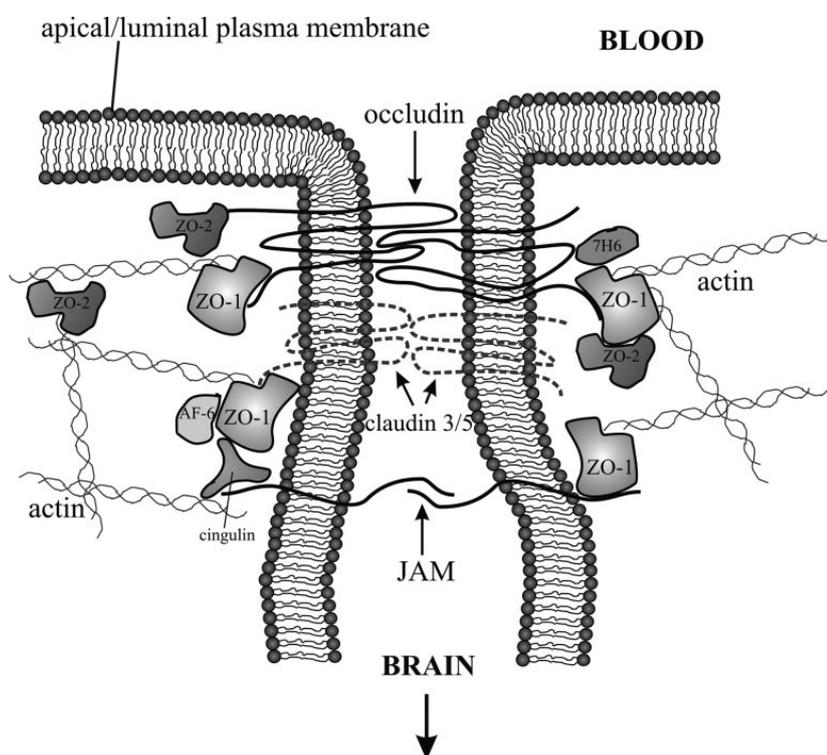


Abbildung 1.5: Endotheliale Tight Junctions (Abbildung von Hawkins and Davis (2005)) Endotheliale TJs befinden sich umlaufend im apikalen Bereich der lateralen Zellwände. In dieser Abbildung sind sehr schön die Transmembranproteine: Occludin, Claudin und Adhäsionsmoleküle (JAM) zu sehen, die intrazellulär ebenso wie die zyttoplasmatischen Zonulae occludentes (ZO-1 / ZO-2) im Aktin-Zytoskelett (actin) verankert sind.

1.1.5.3 Die Neurovaskuläre Einheit

Das kapilläre nicht fenestrierte Endothel mit TJs und minimaler Pinozytoseaktivität (Sedlakova et al., 1999) bildet zusammen mit Astrozyten, Perizyten, Neuronen und der extrazellulären Matrix die sogenannte „neurovaskuläre Einheit“, die essentiell für die Funktionalität des ZNS ist (Hawkins and Davis, 2005).

A. Mikrovaskuläres Endothel und Tight Junctions

Die aktiven Transportsysteme des Endothels bilden den aktiven Teil der BBB. Die nicht vorhandene Fenestrierung und der Mangel an pinozytischen Vesikeln der 0,3–0,5 μm dünnen Endothelzellen stellen den passiven Anteil dar, dessen Barrierewirkung bei einer gesunden adulten Ratte ca. 1,5–2 $\frac{\text{kOhm}}{\text{cm}^2}$ beträgt (Butt et al., 1990). TJs zwischen den Endothelzellen im Gehirn, sehr komplexe Verbände von Transmembranproteinen (z.B. Occludin, Claudine, Adhäsionsmoleküle) und zytoplasmatischen Proteinen (z.B. Zonulae occludentes), sind im apikalen Bereich der lateralen Zellwände umlaufend im endothelialen Aktin-Zytoskelett verankert (Matter and Balda, 2003; Cecchelli et al., 2007). Sie unterbinden die parazelluläre Diffusion von wasserlöslichen Substanzen weitgehend (Cecchelli et al., 2007) und lassen so nur einen von den Zellen besser regulierbaren transmembranen Stofftransport zu. Für die Regulation des zerebralen Wasserhaushaltes weisen die lokalen Endothelzellen eine Vielzahl von Aquaporinen auf ihrer Zellmembran auf.

B. Extrazelluläre Matrix (Basallamina) und Perizyten

Auf der abluminalen Seite der Endothelzellen befindet sich die 30–40 nm dicke Basalmembran. Sie besteht aus Kollagen Typ IV, Heparinsulfat-Proteoglykanen, Laminin, Fibronectin und anderen extrazellulären Matrixproteinen (Hawkins and Davis, 2005). Die Basalmembran umgibt zudem die in unregelmäßigen Abständen über den Endothelzellen liegenden Perizyten, welche der Stabilisierung der Gefäße dienen und mechanisch mit den Endothelzellen verbunden sind (Hawkins and Davis, 2005). Die Basallamina grenzt dann an die Plasmamembranen der Astrozyten-Endfüße, welche die zerebralen Kapillare umschließen (Hawkins and Davis, 2005).

C. Astrozyten

Astrozyten sind große, sternförmig verzweigte Gliazellen, welche helfen die TJs der Endothelzellen abzudichten. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Versorgung der Neurone mit Nährstoffen, sowie in der Regulation der extrazellulären Ionenkonzentrationen (Abbott et al., 2006). Die räumliche Nähe von Astrozytenfortsätzen zu Kapillaren und der hohe Flächenanteil (ca. 99 %) der

mit diesen Astrozytenfortsätzen bedeckten Kapillargefäße im Gehirn deuten auf eine hohe Beteiligung der Astrozyten an der BBB hin (Pardridge, 2005). Der größere Anteil der Astrozyten an der BBB ist vermutlich indirekt, über gegenseitige Wechselwirkungen mit den Endothelien, wie beispielsweise (i) der Induktion der BBB-Funktion in der Endothelzellreifung, (ii) der Ausschüttung von Botenstoffen zur sekundenschnellen Durchlässigkeitsmodulation der Endothelzellen und (iii) in der wiederum durch Endothelzellen angeregten Differenzierung der Astrozyten (Abbott et al., 2006).

D. Neurone

Die BBB realisiert eine flexible, aktivitätsabhängige Energieversorgung des Nervengewebes. Diese sogenannte „metabolische Kopplung“ wird in der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT) ausgenutzt (Buxton and Frank, 1997). Interessanter Weise sind gerade pathologische Blutflussveränderungen (z.B. Ischämie, Blutung, Trauma) mit einer erhöhten Durchlässigkeit der BBB verbunden, was eventuell auf einen neuronal vermittelten Kompensationsmechanismus statt nur auf eine mechanisch-physikalische Störung schließen lässt (Hatashita and Hoff, 1990; Lee et al., 1999; Hawkins and Davis, 2005).

1.2 Zielstellung

Nachfolgend werden die einzelnen Fragestellungen vorgestellt und kurz begründet. Im Kapitel 4 werden diese dann anhand der Versuchsergebnisse auf die Wahrscheinlichkeit ihres tatsächlichen Zutreffens hin bewertet und ausführlich diskutiert.

1.2.1 Hypothesen

Hypothese A ET-1 induziert SD über eine Öffnung der BBB, da die Neurone so in direkten Kontakt zu Serumkomponenten kommen.

Hintergrund: ET-1 löst sehr potent SD aus (Dreier et al., 2002a). Zudem wurde gezeigt, dass Blutbestandteile bzw. Blutabbauprodukte, wie z.B. Oxyhämoglobin, Vasospasmen induzieren und die SD-Entstehung begünstigen (Dreier et al., 2002c). In früheren Studien finden sich Hinweise auf eine ET-1-assoziierte Öffnung der BBB (Stanimirovic et al., 1993; Narushima et al., 1999; Matsuo et al., 2001). Sollte trotz nachweisbarer BBB-Öffnung durch Natrium-Dehydrocholat (DHC) keine SD auftreten, ist die SD-Induktion durch ET-1 eher als BBB-unabhängig anzusehen. Außerdem würde die Beobachtung einer ET-1-induzierten SD ohne nachweisbare BBB-Permeabilität gegen die Hypothese A sprechen.

Hypothesentest: Zunächst wird die BBB durch topische Applikation von DHC unterbrochen (Seiffert et al., 2004). Zum Nachweis von eventuell auftretenden SDs, werden die Veränderungen des DC-Potenzials sowie der $[K^+]_o$ mithilfe von subduralen und intrakortikalen Elektroden aufgezeichnet. In einer weiteren Versuchsserie wird im gleichen experimentellen Aufbau der Vasokonstriktor ET-1 topisch appliziert, um SDs zu induzieren (Dreier et al., 2002c). Die Öffnung der BBB wird anschließend histochemisch, anhand der Evans-Blue-Extravasation beurteilt.

Hypothese B Der Shift des zur Signalerfassung verwendeten DC-Potenzials entsteht, zumindest während Hyperkapnie, durch eine Potenzialänderung an der BBB.

Hintergrund: Sowohl SD als auch Hyperkapnie sind mit einem DC-Shift assoziiert (Leão, 1947; Lehmenkühler and Pöppelmann, 1989; Somjen, 2001). Sollte der DC-Shift tatsächlich von der BBB-Integrität abhängig sein, müsste eine Unterbrechung der BBB die DC-Antworten auf Hyperkapnie oder SD verändern bzw. verhindern, da dann kein Potenzialaufbau über die BBB mehr möglich wäre.

Hypothesentest: Vergleich der DC-Antworten auf SD und Hyperkapnie sowohl vor als auch nach topischer DHC-Applikation bzw. in einer Kontrollgruppe ohne DHC-Gabe.

Hypothese C SD induziert eine frühe BBB-Öffnung nach weniger als drei Stunden.

Hintergrund: In der Literatur finden sich sowohl Hinweise auf eine BBB-Öffnung durch ET-1 (Matsuo et al., 2001) als auch ein Artikel, welcher eine BBB-Öffnung allein durch die mechanische SD-Auslösung postuliert (Gursoy-Özdemir et al., 2004). Falls SD eine akute Öffnung der BBB induziert, müsste diese, unabhängig vom Auslösemechanismus der SD, frühzeitig nachweisbar sein.

Hypothesentest: Untersuchung von drei verschiedenen Gruppen (DHC, ET-1, elektrische SD-Stimulation) auf eine frühe BBB-Öffnung mittels histologischer Analyse der Evans-Blue-Extravasation nach drei Stunden. Das bereits etablierte DHC-Modell dient dabei als Positivkontrolle.

Hypothese D ET-1-induzierte SDs und Depolarisationen in der Penumbra fokaler zerebraler Ischämien entstehen durch einen ähnlichen Mechanismus.

Hintergrund: Es gibt verschiedene Auslöser der SD, wie z.B. Neurotransmitter (Glutamat oder Acetylcholin), chemische Faktoren (Kalium) oder Ischämie. Durch Ischämie ausgelöste SDs zeichnen sich durch eine langsame, vor der SD auftretende Azidifizierung aus (Taylor et al., 1996). Wenn ET-1 SDs über Vasokonstriktion und somit ebenfalls über die Induktion einer Ischämie auslöst, ist zu erwarten, dass eine Azidifizierung vor der ersten SD messbar ist.

Hypothesentest: ET-1-induzierte SDs werden mit SDs verglichen, welche mittels elektrischer Stimulation oder K^+ ausgelöst wurden. Die wichtigsten Parameter dabei sind kontinuierliche Aufzeichnung des kortikalen pH-Wertes mithilfe pH-sensitiver Mikroelektroden und Messungen des arteriellen pH-Wertes mittels arterieller Blutgasanalysen (aBGAs) in regelmäßigen Intervallen. Um die ET-1-bedingte Vasokonstriktion qualitativ nachzuweisen, werden die Veränderungen der Gefäßdurchmesser vor und während SD mit einer digitalen Kamera aufgenommen.

Hypothese E ET-1-induzierte SDs und durch K^+ ausgelöste SDs besitzen ähnliche Entstehungsmechanismen.

Hintergrund: Das K^+ -Modell ist die häufigste Methode der SD-Induktion in experimentellen Studien. Da vor ET-1-induzierten SDs ein $[K^+]_o$ -Anstieg auftritt (Dreier et al., 2002c), könnte man auch hier die $[K^+]_o$ -Erhöhung als Ursache für die SD-Induktion vermuten. Falls ein ähnlicher Entstehungsmechanismus für K^+ - und ET-1-induzierte SD besteht, sollten sich beide nicht grundsätzlich in ihrer pH-Antwort auf SD unterscheiden. Der pH-Wert wurde als wichtigster Vergleichsparameter gewählt, da eine Senkung des pH-Wertes als möglicher Indikator der Ischämie gilt. Wie oben erwähnt, gibt es Hinweise auf eine ischämische Entstehung der ET-1-induzierten SD, welche mit der $[K^+]_o$ -Erhöhung als Ursache für die ET-1-assoziierte SD-Induktion konkurriert.

Hypothesentest: Vergleich von SD nach topischer ET-1-Applikation und SD nach K^+ -Gabe bezüglich ihrer pH-Wert-Veränderungen.

Hypothese F Endothelin-1₍₁₋₃₁₎ induziert typische SDs *in vivo* in ähnlicher Weise wie ET-1₍₁₋₂₁₎ (ET-1).

Hintergrund: ET-1 löst SD über den ET_A -Rezeptor vermittelt aus (Kleeberg et al., 2004). ET-1₍₁₋₃₁₎, ein physiologisches alternatives Zwischenprodukt in der Biosynthese des ET-1, teilt viele Eigenschaften des ET-1 außerhalb des ZNS, zeigt jedoch auch zahlreiche Unterschiede.

Hypothesentest: Beide Peptide, ET-1₍₁₋₃₁₎ und ET-1, werden in den gleichen drei aufsteigenden Konzentrationen topisch appliziert und in ihrer Potenz der SD-Auslösung gegenübergestellt.

1.2.2 Vorstellung der drei Versuchsserien

Die Ergebnisse der drei experimentellen Serien fließen teilweise in mehrere Fragestellungen gleichzeitig ein. Deshalb werden hier die drei Verumgruppen zusammen mit ihren jeweilig zugeordneten Kontrollgruppen stichpunktartig in der Reihenfolge ihrer Durchführung vorgestellt.

Serie 1 Topische Applikation von DHC;
Hyperkapnie vor und nach DHC-Gabe und histochemische BBB-Analyse
(n = 8)

Kontrollgruppe ohne DHC-Gabe;
Hyperkapnie und histochemischer BBB-Analyse
(n = 8)

Serie 2 Topische Applikation von ET-1 in drei Konzentrationsstufen;
Hyperkapnie vor ET-1-Gabe und histochemische BBB-Analyse
(n = 19)

Kontrollgruppe ohne ET-1 mit K^+ -induzierten SDs;
Hyperkapnie vor SD-Induktion und histochemische BBB-Analyse
(n = 5)

Serie 3 Topische Applikation von ET-1₍₁₋₃₁₎ in drei Konzentrationen
(n = 7)

Kontrollgruppe ohne ET-1₍₁₋₃₁₎;
Gabe der drei ET-1₍₁₋₃₁₎- Lösungsmittelkonzentrationen in aCSF
(n = 3)

Studie *insgesamt* n = 50

1.2.3 Herleitung der Fragestellung

Um experimentelle und klinische EEG- bzw. ECoG-Daten besser deuten und nutzen zu können, sind Hinweise auf die bisher nicht genau verstandene Entstehung des DC-Shifts von enormer Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war somit eine kritische Betrachtung der DC-Shift-Entstehung, mit besonderem Augenmerk auf die Rolle der BBB.

Die Vermutung von Nita et al. (2004), dass ein durch die BBB aufrecht erhaltenes, elektrisches Potenzial an der Entstehung von CO_2 -abhängigen DC-Shifts beteiligt sei und die im Gegensatz dazu stehende Theorie eines neuronalen Ursprungs von DC-Shifts, weckten mein Interesse, diese näher zu untersuchen. Dabei sollte die CO_2 -Erhöhung (Hyperkapnie), welche zu einer Hyperpolarisation der Nervenzellen führt (Lehmenkühler and Pöppelmann, 1989), mit einem geeigneten Modell der BBB-Öffnung kombiniert werden, um DC-Veränderungen in Abhängigkeit von der BBB-Integrität zu untersuchen. Für die dazu erforderlichen histologischen Untersuchungen zur frühzeitigen BBB-Öffnung, sollte eine zeitlich und materiell wenig aufwändige Methode entwickelt werden.

Für das Verständnis der komplexen Entstehung von DC-Shifts auch während SD, waren mir die Fragen, ob (i) SD allein die BBB öffnen kann, ob (ii) eine BBB-Störung wiederum zur SD-Induktion und somit zu einem „Circulus vitiosus“ führen kann und ob (iii) ET-1 die BBB eventuell SD-abhängig öffnet, besonders wichtig.

Während der Projektplanung ergaben sich weitere Vernetzungen zwischen den experimentellen Serien, wovon einige ihrer wichtigen klinischen Bedeutung wegen in die Fragestellung aufgenommen wurden. So könnten z.B. Untersuchungen zu den Mechanismen der ET-1-induzierten SD auf verschiedenen Ebenen (Gefäße, BBB, Parenchym), differenziertere Therapieansätze in einer Vielzahl von Erkrankungen ermöglichen. Weiterhin wurden extrazelluläre pH-Wert-Messungen unter ET-1-Applikation in die Studie aufgenommen, da Hinweise auf eine ischämische Entstehung der ET-1-induzierten SD bestehen und eine Senkung des pH-Wertes als möglicher Indikator der Ischämie gilt. Über den ET-1-Stoffwechsel wurde ich auch auf ET-1₍₁₋₃₁₎ aufmerksam, welches systemisch eine eher schwächere vasokonstriktive Potenz als ET-1 zeigte (Leslie et al., 2004; Maguire et al., 2001) und eventuell sogar stärkere positive Eigenschaften in der Zellproliferation und Entzündungsregulation aufweist. Das 31-AS-Peptid sollte auf seine Fähigkeit und Potenz der SD-Induktion in topischer Applikation getestet und mit ET-1 verglichen werden. Es sollte so die mögliche Relevanz des alternativen Zwischenprodukts für die bisherigen Ansätze sowie für einen spekulativen neuen Ansatz in der Therapie des Vasospasmus aufgezeigt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Tiere

Die Untersuchungen für diese Arbeit wurden an männlichen, zwei bis drei Monate alten Wistar-Ratten ($n = 50$; 250–400 g) der Firma Charles River, Deutschland durchgeführt. Die Tierexperimente erfolgten unter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien und sind im Tierversuchsvorhaben Reg 0156/05 vom Berliner Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGetSi) genehmigt worden.

2.2 Material

2.2.1 Silberchlorid-Elektroden zur subduralen DC-Messung

Die subduralen Elektroden bestehen aus einem Silberdraht mit einer zu Silberchlorid ($AgCl$) oxidierten Spitze und sind an der Außenseite mit einem Plastikschauch isoliert. Sie wurden kurz vor jedem Experiment frisch hergestellt und während der Präparation, in den künstlichen Subduralraum des kranialen Fensters hineinreichend, fixiert. Zwei *in Reihe* geschaltete (Differenz-) Verstärker (Jens Meyer, München, Deutschland) amplifizierten dann die gegenüber einer flächigen Referenzelektrode im Nacken unter der Haut der Ratte gemessenen Potenzialunterschiede der Elektroden. Durch integrierte Filter wurden dabei hochfrequente Wechselspannungs-(AC) und langsame DC-Anteile des ECoG separiert, die hier als die Frequenzbereiche 1–45 Hz (AC) und 0–1 Hz (DC) definiert wurden. Aus der mehrfachen Verstärkung resultierten Signale im Mikro- bzw. Millivoltbereich, welche mit einer Frequenz von 200 kHz aufgezeichnet wurden.

2.2.2 Ionenselektive Mikroelektroden

Zur Messung der extrazellulären Konzentrationen von Kalium ($[K^+]_o$) und Protonen (pH-Wert als negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration) sowie des intrakortikalen DC-Potenzials wurden ionenselektive Mikroelektroden verwendet (im folgenden als K^+ - und pH-Elektroden bezeichnet). Diese stellen ein einfaches, zuverlässiges Messprinzip für Ionen dar und bestehen aus einer ionenselektiven Seite, einer Referenzseite und einem hochselektiven, hydrophoben Ionophor in der Spitze (siehe Abbildung 2.1).

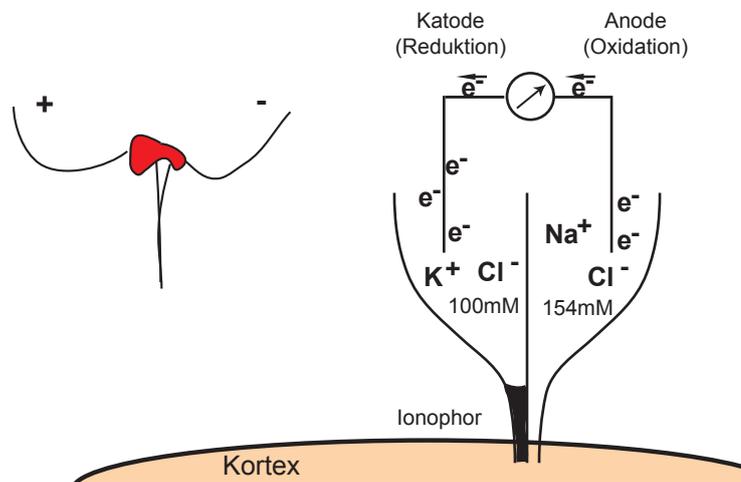


Abbildung 2.1: Mikroelektrode

Links ist eine typische Mikroelektrode mit Wachsverschluss (rot) und den beiden Kontaktwägen an der Oberseite zu sehen. Die rechte Seite der Abbildung schematisiert die Ionenverhältnisse in der vergrößerten Spitze einer K^+ -Elektrode, welche ein galvanisches Element darstellt.

Die hier verwendeten, flüssigen Kationen-Ionophore sind Substanzen, die aufgrund struktureller und elektrostatischer Wechselwirkungen mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität K^+ -Ionen oder Protonen binden. Ich verwendete in meiner Arbeit ausschließlich Ionophore, welche schon von Windmüller et al. (2005) eine umfangreiche Selektivitätsprüfung erfahren und unter Verwendung eines Selektivitätskoeffizienten für die intrazerebrale Messung *in vivo* in der Ratte validiert worden sind (Windmüller et al., 2005).

Der nachfolgend beschriebene Bau von ionenselektiven Mikroelektroden geht auf die Methode von Lux and Neher (1973) zurück und ist für K^+ - und pH-Elektroden ähnlich.

Bau der Mikroelektroden

Als Material diente zweilumiges Theta-Glas (Kugelstatter, Garching, Deutschland) (Windmüller et al., 2005), welches unter Hitze und Dehnung eine sehr dünne Spitze von ca. $3 \mu\text{m}$ Durchmesser bildet. Die Öffnung der Spitze sollte dabei groß genug sein, um eine schnelle Reaktion der Elektrode zu gewährleisten, und zugleich so klein wie möglich bleiben, um durch Kapillarkräfte den Ionophor in der Spitze zu halten.

Die Seite des Glasrohlings, welche der Messung des Referenz-Potenzials diente, wurde mit 0,9% iger NaCl -Lösung ($154 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) gefüllt. Die andere, ionenselektive Seite, wurde in K^+ -Elektroden mit $100 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ KCl -Lösung gefüllt, während pH-Elektroden analog eine Mischung aus KH_2PO_4 ($40 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$), NaOH ($23 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) und NaCl ($15 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) erhielten. Der Rohling wurde danach mit heißem Wachs am oberen Ende verschlossen, wobei ein dünner Plastikschauch mit Ventil das Erzeugen eines Unterdrucks in der ionenselektiven Seite ermöglichte. Mit diesem Mechanismus wurde die Elektrodenspitze zuerst hydrophobisiert und dann mit dem jeweiligen Ionophor gefüllt (*Potassium ionophore I* - cocktail A bzw. *Hydrogen ionophore I* - cocktail A von Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Nach Entfernung des Plastikschauchs erhielten die Referenz- und die ionenselektive Seite je einen Ag/AgCl -Draht und die fertige Elektrode wurde erneut mit flüssigem Wachs an der oberen Seite versiegelt.

Jede Elektrode wurde vor ihrem Einsatz in einem Spannungsmessgerät mit speziellen Kalibrationslösungen getestet. Die dabei erreichten Potenzialänderungen wurden mit Standardkurven der Elektrodensteigung verglichen. Zum Test der K^+ -Elektroden wurden $3 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ und $30 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ KCl in $154 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ NaCl verwendet. Die Kalibrationslösungen für die pH-Elektroden enthielten in $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$: NaCl 135, KCl 3 und *HEPES Puffer* 5 und wurden mit NaOH bzw. HCl auf die pH-Werte: 6,0 ; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0 titriert.

Während der experimentellen Messungen wurde dann das Referenzsignal der Elektroden, mittels des erwähnten Differenz-Verstärkers, vom Signal der ionenselektiven Seite subtrahiert. Die so aufgezeichnete Spannungsdifferenz ist die Folge von Ionenkonzentrationsanderungen und wurde für die Datenanalyse unter Verwendung der Nernst-Gleichung (siehe Gleichung 2.1) wieder in Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ bzw. des pH-Wertes umgerechnet.

$$E = E^\circ + \frac{RT}{z_e F} \ln \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}} \quad (2.1)$$

Die Nernst-Gleichung beschreibt die Konzentrationsabhängigkeit des Elektrodenpotenzials E eines Redox-Paares. Die Differenz aus E und dem Standardelektrodenpotenzial E° ergibt die gemessene Potenzialdifferenz ΔE .

R steht für die molare Gaskonstante ($8,31447 \frac{J \cdot mol}{L \cdot K}$), T für die absolute Temperatur in Kelvin und F für die Faraday-Konstante ($96485,34 \frac{C}{mol}$).

Die Variable z_e gibt die Anzahl der übertragenen Elektronen an, während a die Konzentration des betreffenden Redox-Partners darstellt. Daraus ergaben sich für meine Berechnungen der $[K^+]_o$ und des pH-Wertes mit $z_e = 1$, $T = 37^\circ C$ sowie der Umwandlung des natürlichen in den dekadischen Logarithmus zwei etwas abgewandelte Formeln (siehe Gleichung 2.2 und 2.3), die in die Auswerteprogramme integriert wurden. Hierbei wurden ΔE in mV, die Ionenkonzentrationen in $\frac{mmol}{L}$ und der pH-Wert in pH-Einheiten angegeben.

$$[K^+]_o = 10^{\Delta E/58 + \lg 3} \quad (2.2)$$

$$\text{pH} = -\lg 10^{\Delta E \cdot 10/55 + \lg(4,1687 \cdot e^{-8})} \quad (2.3)$$

2.3 Verwendete Substanzen

2.3.1 Künstlicher Liquor – aCSF

Die freigelegte Kortexoberfläche im kranialen Fenster wurde kontinuierlich mit künstlicher zerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF) überspült, welche physiologische Gasspannungen und Ionenkonzentrationen enthielt (Levasseur et al., 1975). Sie wurde vor jedem Experiment aus den folgenden Komponenten in $\frac{mmol}{L}$ zubereitet: K^+ 3; Na^+ 152; Ca^{2+} 1,5; Mg^{2+} 1,2; HCO_3^- 24,5; Cl^- 135; Glukose 3,7; Harnstoff 6,7. Mit einem Gasgemisch, bestehend aus 6,6% O_2 ; 5,9% CO_2 und 87,5% N_2 , wurden die Gaspartialdrücke der aCSF kurz vor der Verwendung den physiologischen Werten angeglichen (p O_2 von 110–125 mmHg, p CO_2 von 35–39 mmHg und pH-Wert von 7,38–7,4).

2.3.2 Gallensalz Natrium-Dehydrocholat – DHC

Die atraumatische Öffnung der BBB wurde mit Natrium-Dehydrocholat (DHC; $2 \frac{mmol}{L}$ in aCSF) durchgeführt. DHC ($C_{24}H_{34}O_5$) mit einer Molekülmasse von 402,52 Dalton (Da) ist ein synthetisches, durch Oxidation von Cholat gebildetes Gallensalz. In der Literatur wurde gezeigt, dass physiologische Gallensalze in topischer Applikation eine umschriebene Läsion der Blut-Hirn-Schranke, in allen kortikalen Schichten des überspülten Bereichs hervorrufen (Seiffert et al., 2004).

2.3.3 Endothelin-1 und ein alternatives Zwischenprodukt seiner Biosynthese

In der Versuchsserie zu intrazerebralen pH-Wert-Veränderungen während SD und Hyperkapnie wurde ET-1 (Endothelin-1₍₁₋₂₁₎ human porcine der Firma Sigma-Aldrich inc., Steinheim, Deutschland) in den Konzentrationen $10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ verwendet. Dazu wurde das 21-AS-Peptid, mit einer Molekülmasse von 1491,9 Da in destilliertem Wasser gelöst und mit aCSF zu einer 10^{-6} molaren Lösung verdünnt. Davon wurden je 0,5 mL entnommen, um durch weitere Zugabe von aCSF die nächsthöheren Verdünnungsstufen von $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ herzustellen.

Für die Untersuchung der SD-Induktion durch das aus 31 Aminosäuren bestehende alternative Zwischenprodukt der ET-1-Biosynthese wurde humanes Endothelin-1₍₁₋₃₁₎, der Firma Peptide Institute Inc. in Osaka, Japan mit einer Molekülmasse von 3628,2 Da verwendet. ET-1₍₁₋₃₁₎ wurde in 0,1 % iger Essigsäure gelöst und danach mit aCSF zu einer 10^{-5} molaren Lösung verdünnt. Ähnlich wie bei ET-1, wurden die nächsten Verdünnungsstufen unter weiterer Zugabe von aCSF hergestellt.

Beide Peptid-Lösungen wurden erst kurz vor der Verwendung auf Zimmertemperatur angewärmt und mithilfe des zuvor erwähnten Gasgemischs (siehe Abschnitt 2.3.1 auf der vorherigen Seite) auf einen physiologischen pH-Wert gebracht.

2.3.4 Evans Blue

T-1824 ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$; $960,81 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$) oder Evans Blue, welches nach dem amerikanischen Anatomie-Professor Herbert McLean Evans benannt wurde, ist ein Farbstoff mit einer sehr hohen Affinität für Serumalbumin. Albumin stellt den mengenmäßig größten Teil (60%) der Plasmaproteine dar und ist mit ca. 66000 Da ein recht großes Molekül.

Da fast das gesamte applizierte Evans Blue an Serumalbumin bindet, zeigt eine Anfärbung des neuronalen Gewebes eine Durchlässigkeit der BBB für Makromoleküle an. Neben seiner tiefblauen Farbe fluoresziert Evans Blue außerdem im roten Bereich mit einer Anregung bei 470 nm und 540 nm und einer Emission von 680 nm. In der Literatur findet man quantitative Auswertungen der Evans-Blue-Extravasation meist im Zusammenhang mit einer Perfusionsfixation des Gehirns und anschließender Absorptionsmessung nach chemischer Homogenisierung des Gewebes oder mithilfe von Fluoreszenzmessungen.

2.3.5 Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd (PFA; $(CH_2O)_n$) ist das unlösliche, kurzkettige Polymer des Formaldehyds. In einer wässrigen Pufferlösung zerfällt PFA wieder zu Formaldehyd, welches Proteine reversibel vernetzt. Diese Eigenschaft nutzt man zur Fixierung und Konservierung von Geweben, wobei meist 1–4% ige PFA-Lösungen, gepuffert auf einen neutralen pH-Wert, verwendet werden.

2.4 Methoden

2.4.1 Zerebrales Multiparametermonitoring bei SD

Der verwendete Versuchsaufbau (Dreier et al., 1995, 1998, 2006) ermöglichte es, die nachfolgend genannten Parameter parallel zueinander und kontinuierlich in ihrem zeitlichen Verlauf darzustellen. Dabei wurden gleichzeitig, in einem 7 x 4 mm großen Fenster in der Schädeldecke der Tiere (kraniales Fenster, siehe Abschnitt 2.5.2 auf Seite 35), der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) mittels Laser-Doppler-Flussmessung sowie die $[K^+]_o$, der extrazelluläre pH-Wert und das intrakortikale Feldpotenzial (Bandpass-Filter: 0–45 Hz) mithilfe von Mikroelektroden gemessen. Das subdurale Feldpotenzial (Bandpass-Filter: 0–45 Hz) wurde zusätzlich mit einer $Ag/AgCl$ -Elektrode im kranialen Fenster aufgezeichnet während das epidurale Potenzial mittels einer $Ag/AgCl$ -Elektrode in einer gesonderten Bohröffnung mit intakter Dura gemessen wurde. Die Messparameter wurden nach Analog-Digital- (AD) Umwandlung (Power 1401, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK), mithilfe eines PC und der Software Spike2[®] (Version 6, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK) aufgezeichnet.

2.4.2 Laser-Doppler-Blutflussmessung

Die Laser-Doppler-Flussmessung (LDF) ist eine etablierte experimentelle Methode (Dirnagl et al., 1989; Dreier et al., 1995, 1998, 2006; Petzold et al., 2003) zur nicht-invasiven, kontinuierlichen *in-vivo*-Messung von regionalen Blutflussveränderungen mit einer hohen zeitlichen Auflösung und wurde von Dirnagl et al. (1989) für die zerebrale Mikrozirkulation validiert.

Nicht-invasive zerebrale Blutflussmessungen können heute recht genau mit der Positronenemissionstomografie (PET) oder der Magnetresonanztomografie (MRT) durchgeführt werden, welche jedoch beide keine kontinuierlichen Messungen ermöglichen. Die LDF ist ein wesentlich weniger aufwendiges, „mobiles“ Verfahren, das leicht in den allgemeinen Versuchsaufbau (siehe Abschnitte 2.5.1 und 2.5.2 auf Seite 35) integriert werden kann.

Das erstmals von Stern (1975) publizierte Prinzip der LDF kann durch den optischen Doppler-Effekt erklärt werden, einer Theorie, die von der Wellennatur des Lichts ausgeht.

Akustischer Doppler-Effekt

Der weitaus geläufigere akustische Doppler-Effekt nach Christian Doppler von 1842 beschreibt die Frequenzverschiebung von Longitudinalwellen (Schall) in Abhängigkeit von den Relativbewegungen von Schallquelle und/oder Empfänger zum Medium (z.B. Luft). Bewegt sich z.B. ein Krankenwagen auf einen an der Ampel stehenden Passanten zu, nimmt dieser einen immer höheren Ton wahr, der umso tiefer wird, je weiter sich das Auto wieder entfernt. Dieser akustische Doppler-Effekt wird in der Sonar-Technik (Sound Navigation and Ranging) und vor allem in der Ultraschall-Diagnostik genutzt, in welcher man Schall mit Frequenzen zwischen 1–40 MHz (die menschliche obere Hörgrenze liegt bei nur 20 kHz) verwendet, der besonders stark an Grenzflächen unterschiedlicher Gewebe reflektiert wird.

Optischer Doppler-Effekt

Armand Hippolyte Fizeau übertrug diese Theorie 1848 auf elektromagnetische Wellen (Licht). Er demonstrierte, dass sich das Spektrum bei einer Bewegung der Lichtquelle vom Beobachter weg in den roten Bereich und zum Beobachter hin in den violetten Bereich verschiebt. Auf diesem Effekt beruht auch die Bestimmung der Relativbewegungen von Sternen und das Phänomen der Rotverschiebung von Himmelskörpern in der Astrophysik.

Beim Doppler-Effekt elektromagnetischer Wellen (optischer Doppler-Effekt) hängt die Höhe der Frequenzänderung nur von der Relativgeschwindigkeit v von Quelle und Beobachter zueinander ab, d.h. also nicht von der Geschwindigkeit beider relativ zum Medium. Deshalb hat es, im Gegensatz zum akustischen Doppler-Effekt, keinen Einfluss, ob sich dabei Quelle oder Beobachter oder beide zugleich bewegen. Allerdings ändert sich die Lichtgeschwindigkeit c zu $c' < c$ wenn sich die Lichtquelle durch ein Medium mit einer Brechzahl $n > 1$ (z.B. durch Wasser) bewegt. In Gleichung 2.4 ist, zum besseren Verständnis, das Verhältnis zwischen der beobachteten (f_B) und der gesendeten (f_{Qu}) Frequenz dargestellt.

$$f_B = f_{Qu} \frac{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}}{1 - \frac{v}{c}} \quad (2.4)$$

Blutflussmessung

Bei der LDF wird ein Laser als Lichtquelle verwendet. Laserstrahlen besitzen, im Gegensatz zu Licht aus normalen Lichtquellen, ein sehr enges Frequenzspektrum (monochromatisch), sind über eine weite Strecke kohärent (feste räumliche und zeitliche Phasenbeziehung zwischen Teilwellen) und verlaufen parallel. Nach dem optischen Doppler-Effekt erfährt kohärentes Licht, das vom ungerichtet fließenden Blut der Mikrozirkulation gestreut wird, eine Frequenzverschiebung und verliert so seine Polarisation (einheitliche Schwingungsrichtung). Die Veränderung der Frequenz des Lichts durch Streuung an den bewegten roten Blutkörperchen, verhält sich proportional zu deren Geschwindigkeit und beträgt bei normaler durchschnittlicher Erythrozytengeschwindigkeit etwa 20 kHz (Wolf et al., 1996). Die Streuung an nicht bewegten Bestandteilen des Knochen- oder Hirngewebes führt zu keiner Frequenzverschiebung. Das LDF-System besitzt eine oder mehrere Glasfaser-Sonden.

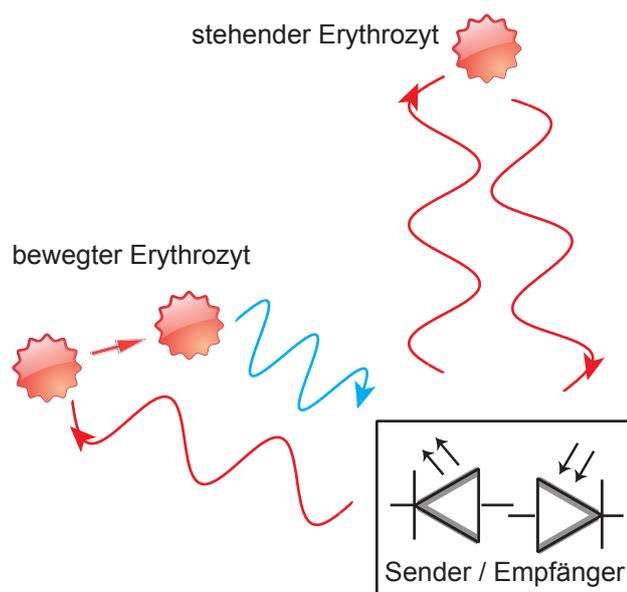


Abbildung 2.2: Blutflussmessung mit dem optischen Doppler-Effekt

Rechts oben wird eine elektromagnetische Welle (rot) an einem stehenden roten Blutkörperchen reflektiert. Links unten wird sie von einem, sich auf den Empfänger zu bewegenden Erythrozyten reflektiert und ihre Frequenz erhöht (in Richtung blau verschoben).

Eine Faser einer Sonde führt Licht der Laserdiode zum Gewebe, eine zweite Faser empfängt und leitet Streulicht zum Photodetektor des LDF-Systems. Doppler-verschobene und nicht-verschobene Lichtwellen produzieren ein dynamisches Interferenzmuster, welches ständige Stromänderungen im Photodetektor induziert. Das Spektrum dieser Stromänderungen bzw. das gemess-

sene Frequenzspektrum des Lichts wird analysiert, um Konzentration und Strömungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen zu bestimmen. Dabei ist die Menge des detektierten Lichts nicht maßgeblich.

Die LDF bestimmt den Gesamtfluss in einem umschriebenen Messvolumen. Die genaue Messtiefe und das exakte Messvolumen sind vom Abstand der Fasern zueinander und der Wellenlänge des Laserlichts abhängig. Das hier verwendete System besitzt Sonden mit einem Faserabstand von 0,25 mm und einen Laser mit der Wellenlänge $\alpha = 780$ nm. In dieser Konfiguration wird die Größe des Messvolumens auf 1 mm^3 geschätzt, wobei die Messtiefe ca. 1 mm beträgt. Der rCBF wird dann in systemeigenen Flusseinheiten (perfusion units, PU) angegeben, die sich proportional zur Anzahl und Geschwindigkeit der Erythrozyten im Messvolumen verhalten. Da die zu berechnende Größe Blutfluss in $\frac{\text{ml}}{\text{g}\cdot\text{min}}$ von sehr vielen weiteren Faktoren abhängig ist, werden LDF-Daten meist auf einen Ausgangswert am Anfang des Versuchs normalisiert und dann in Prozent dieses Ausgangswerts, als relativer Blutfluss angegeben.

Weiterhin musste bei der Positionierung der Sonde(n) beachtet werden, dass größerer Gefäße gemieden werden, da deren gerichtete (laminare) Strömung die Messungen verfälschen können.

2.4.3 Langsame Summenpotenziale – DC-Potenziale

Die Elektrokortikografische Gleichstrom- (DC-) Messung ist die am häufigsten verwendete Methode für den elektrophysiologischen Nachweis der SD im Tierexperiment. Diese recht einfach anzuwendende Messung des DC-Potenzials zur Beobachtung der SD wird seit vielen Jahren mit stabilen Ergebnissen in unserem Labor eingesetzt (Dreier et al., 1995, 1998, 2000, 2004; Petzold et al., 2003; Kleeberg et al., 2004; Wolf et al., 1996). Auf die bestehenden Theorien der DC-Potenzialentstehung wird in der Diskussion in Kapitel 4 noch genauer eingegangen.

2.4.4 Untersuchung der Blut-Hirn-Schranke

Um die Auswirkung einer BBB-Öffnung auf die zu untersuchenden Parameter zu testen, wurden die folgenden drei Modelle gewählt. Dabei ist nur das DHC-Modell eine etablierte Methode der BBB-Öffnung in der Literatur.

- DHC-Modell (Seiffert et al., 2004)
- BBB-Öffnung durch SD (Gursoy-Özdemir et al., 2004)
- BBB-Öffnung durch Endothelin-1 (Stanimirovic et al., 1993)

2.5 Präparation

2.5.1 Grundpräparation und technischer Aufbau

Die Narkose wurde bei allen Tieren mit Isofluran (4%) eingeleitet, gefolgt von intraperitoneal injiziertem Thiopental-Natrium ($100 \frac{mg}{kg}$ Körpergewicht; Trapanal® von BYK Pharmaceuticals, Konstanz, Deutschland), welches später bei Bedarf auch nachgegeben wurde. Hautschnitte wurden zusätzlich mit dem Lokalanästhetikum Lidocain behandelt.

Nach einer Tracheotomie wurden die Tiere maschinell, mit einem Gemisch aus Raumluft und Sauerstoff beatmet (Rodent Respirator, Effenberger Med.-Techn. Gerätebau, Pfaffing/Attel, Deutschland). Anschließend wurden die linke Arteria und Vena femoralis katheterisiert und nach einer ersten arteriellen Blutgasanalyse (aBGA) kontinuierlich mit $1 \frac{mL}{h}$ physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) infundiert. Danach wurde die Ratte in Bauchlage gebracht und ihr Kopf wurde in einem stereotaktischen Rahmen fixiert.



Abbildung 2.3: Photos während der OP

Links ist ein Ausschnitt des OP-Platzes mit Mikroskop und Perfusor für das kraniale Fenster sowie die Ratte selbst auf einer Heizunterlage zu sehen. Das rechte Bild zeigt das kraniale Fenster von Nahem mit zwei Laser-Doppler-Sonden.

Es erfolgte die Präparation des kranialen Fensters, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Für die epidurale DC-Elektrode wurde rostral des kranialen Fensters ein Bohrloch von ca. 2 mm Durchmesser mit intakter Dura angelegt. Eine weitere kleine Bohröffnung rechts temporal, mit geöffneter Dura, diente der Induktion von SDs durch lokale K^+ -Applikation oder elektrische Stimulation. Alle Manipulationen am Kopf der Ratte wurden unter einem Operationsmikroskop (Leica MZ16 FA, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) mit integrierter Kamera (Leica DFC300 FX Digital Color Camera, Leica Microsystems AG) in 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.5.2 Präparation des offenen kranialen Fensters

Ich verwendete ein etabliertes Modell der kranialen Fensterung (Lindauer et al., 1993; Dreier et al., 1995, 1998, 2002a, 2004). Mithilfe eines elektrischen, durch Kochsalzlösung gekühlten Dentalbohrers wurde ein ca. 7×4 mm großes Knochenstück über dem rechten parietalen Kortex entfernt (Dreier et al., 1998). Die darunter liegende Dura mater wurde, nach Verödung der sichtbaren duralen Gefäße per Elektrokoagulation, vorsichtig geöffnet und teilweise entfernt. Danach wurde ein schmaler Wachswall um das Fenster mit einem schnell aushärtenden Kunststoff (Palladur[®]) befestigt. Außerdem wurden eine *Ag/AgCl*-Elektrode für die subdurale ECoG-Messung und ein dünner Plastikschauch ($58 \mu\text{m}$) als Zufluss in den Fensterwall eingearbeitet. Anschließend wurden ein bzw. zwei Laser-Doppler-Sonden (Periflux 4001 von Perimed, Järfälla, Sweden) auf einem Messstativ, ca. 1 mm über der Hirnoberfläche, im kranialen Fenster befestigt und in den aCSF-Flüssigkeitsspiegel eingetaucht. Nun erfolgte, mithilfe von ferngesteuerten Mikrometerschrauben auf weiteren Messstativen, die Platzierung einer rostralen und einer kaudalen Mikroelektrode im kranialen Fenster. Sie wurden in einem Abstand von ca. 5 mm zueinander und einer Messtiefe von $300 \mu\text{m}$ unter der Kortexoberfläche fixiert.

Die Gesamtzeit der Operation betrug durchschnittlich 5 Stunden.

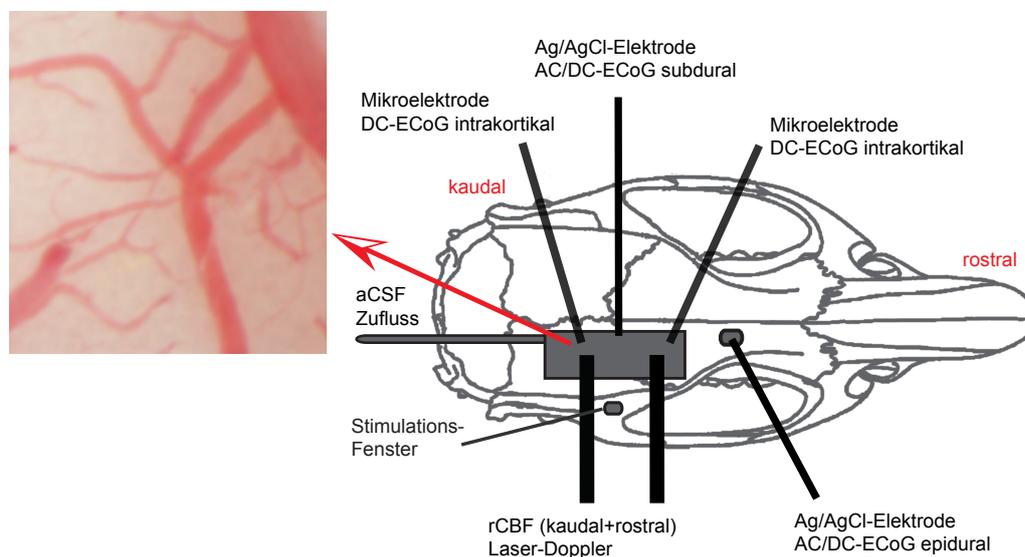


Abbildung 2.4: Versuchsaufbau – Kraniales Fenster

Das offene kraniale Fenster ermöglicht im Gegensatz zum geschlossenen, welches mit einem Glasplättchen abgedeckt wird, den Einsatz von ionenselektiven Mikroelektroden. Es begünstigt aber durch niedrigere Druckverhältnisse die Ödembildung.

2.6 Messung

2.6.1 Allgemeines Messprotokoll

Für jede der drei Verumgruppen (1. DHC, 2. ET-1, 3. ET-1₍₁₋₃₁₎) wurden Untersuchungen in Kontrollgruppen durchgeführt, die dem exakt gleichen Zeitplan der Verumgruppen folgten. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden auch die Messprotokolle der drei Versuchsserien aufeinander abgestimmt. Hier wird zunächst der allgemeine Ablauf einer Messung beschrieben: Zur Stabilisierung der Elektroden und späteren Bestimmung eines Ausgangswerts für relative Messgrößen erfolgten zu Beginn jeder Messung 30 Minuten Aufzeichnung unter reiner aCSF-Zufuhr ($3 \frac{mL}{h}$) im kranialen Fenster. Danach begann der für jede Serie unterschiedliche Hauptteil mit der topischen Applikation von Pharmaka, aCSF oder Lösungsmittel.

In der DHC- und der ET-1-Serie wurden außerdem Hyperkapnie-Manöver durchgeführt. Dabei wurde durch Beatmung mit einem Gemisch aus 5 % CO_2 und 95 % O_2 für 5 Minuten, ein Anstieg des $paCO_2$ auf 77,5 mmHg (74,5–80,5) und ein Abfall des arteriellen pH-Wertes von 7,38 (7,36–7,4) auf 7,17 (7,14–7,19) herbeigeführt. Während Hyperkapnie wurden jeweils eine aBGA nach Anstieg und eine aBGA nach Normalisierung der expiratorischen CO_2 -Konzentration (ca. 5 Minuten nach Beendigung des Manövers) durchgeführt. Die Tiere der DHC- und ET-1-Serien erhielten anschließend 1 mL des Farbstoffs Evans Blue (2%; 25 g in 1 mL 0,9 % $NaCl$). Am Ende jeder Messung wurden nochmals je 20–30 Minuten mit reinem aCSF-Zufluss aufgezeichnet. Anschließend wurden die Tiere der DHC- und ET-1-Serien noch in Narkose dekapitiert und das Gehirn wurde für eine spätere Evaluation der BBB vorsichtig aus dem knöchernen Schädel entnommen. Nach einer Spülung mit 0,9 % iger $NaCl$ -Lösung wurde das Hirn in 4 % PFA konserviert und kühl gelagert. Insgesamt betrug die Messzeit ca. 4–4,5 Stunden.

Die Körpertemperatur der Tiere wurde über die gesamte Versuchsdauer mithilfe einer Heizunterlage auf 37,5 °C konstant gehalten. Die systemischen Parameter, wie der mittlere arterielle Blutdruck (MAP; RFT Biomonitor, Zwönitz, Deutschland), der endexpiratorische CO_2 -Partialdruck, die Atemfrequenz (Heyer CO_2 Monitor EGM I, Bad Ems, Deutschland) und die Temperatur wurden mithilfe eines PC und eines Chart-Rekorders (DASH IV von Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA) kontinuierlich aufgezeichnet. Weiterhin wurden der pH-Wert, der O_2 - und der CO_2 -Partialdruck des arteriellen Blutes (paO_2 , $paCO_2$) in regelmäßigen Abständen durch aBGAs, mit einem Compact 1 blood gas analyser (AVL Medizintechnik GmbH, Bad Homburg, Deutschland) bestimmt (siehe Tabelle physiologische Parameter).

2.6.2 Messprotokoll Serie 1 – DHC

In dieser Serie wurden je zwei Laser-Doppler-Sonden (rostral + kaudal) im Abstand von ca. 4mm zueinander platziert und das epidurale AC-/DC-ECoG aufgezeichnet. Weiterhin wurden in der Verumgruppe (n = 7) zwei K^+ -Mikroelektroden eingesetzt, während in der Kontrollgruppe (n = 7) eine K^+ - (rostral) und eine pH-Elektrode¹ (kaudal) verwendet wurden. Um eventuelle Veränderungen der typischen DC-Antwort nach BBB-Öffnung zu untersuchen, wurden in beiden Gruppen je vier Hyperkapnie-Manöver durchgeführt und in der DHC-Gruppe zusätzlich eine SD elektrisch (mit 4–5 mV) ausgelöst. Der genaue zeitliche Ablauf ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

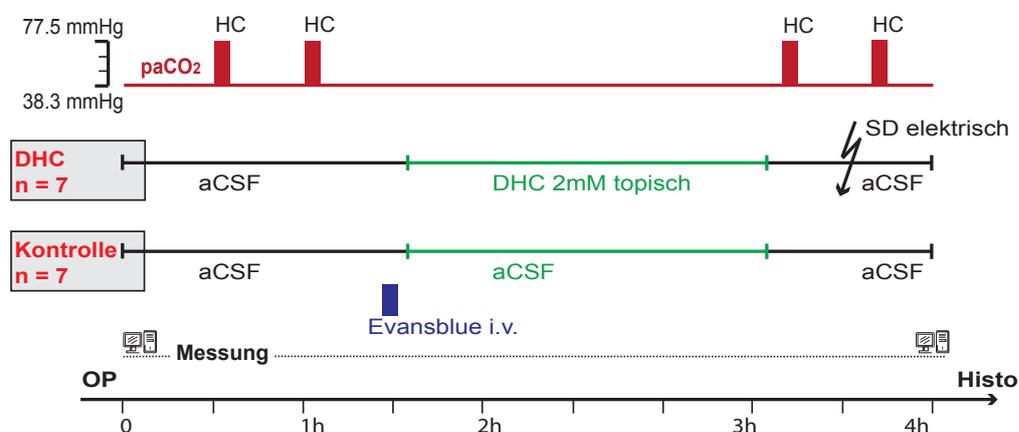


Abbildung 2.5: Messprotokoll Serie 1 – DHC

Nach der Stabilisierungsphase wurden zwei Hyperkapnie-Manöver (HC) im Abstand von 30 Minuten zueinander durchgeführt. Anschließend wurde Evans Blue injiziert. Zehn Minuten später begann in der Verumgruppe die zweistündige, topische DHC-Applikation ($3 \frac{mL}{h}$) zur lokalen Unterbrechung der BBB, die in der Kontrollgruppe durch aCSF ersetzt wurde. Danach erfolgten, unter kontinuierlicher Zufuhr von aCSF in beiden Gruppen, zwei weitere Hyperkapnie-Manöver im Abstand von 30 Minuten, wobei in der Verumgruppe eine SD vor der vierten Hyperkapnie ausgelöst wurde. Am Ende der Messungen wurden die Hirne aller Tiere, wie im Abschnitt 2.6.1 beschrieben, konserviert.

¹Die Verwendung der pH-Elektrode in der Kontrollgruppe basierte auf einer Protokolländerung. Idealerweise wäre auch eine zusätzliche pH-Elektrode in der Verumgruppe statt einer zweiten Kaliumelektrode eingesetzt worden. Wir betrachten den Informationsgewinn der pH-Messung in der Kontrollgruppe jedoch nicht als ausreichend, um die Wiederholung der Experimente dieser Gruppe tierschutzrechtlich zu rechtfertigen.

2.6.3 Messprotokoll Serie 2 – Endothelin-1 und pH

In dieser Serie wurde bei 11 Tieren der Verum-Gruppe (n = 23) und allen Kontrolltieren (n = 5) mit je zwei pH-Mikroelektroden gemessen. Auch hier wurden das subdurale und das epidurale AC-/DC-ECoG aufgezeichnet, aber nur eine Laserdoppler-Sonde eingesetzt. Während der Messungen wurden per Kameramikroskop Bildsequenzen des kranialen Fensters aufgenommen, um SDs später anhand der Gefäßdurchmesserveränderungen visualisieren zu können. Der zeitliche Ablauf ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

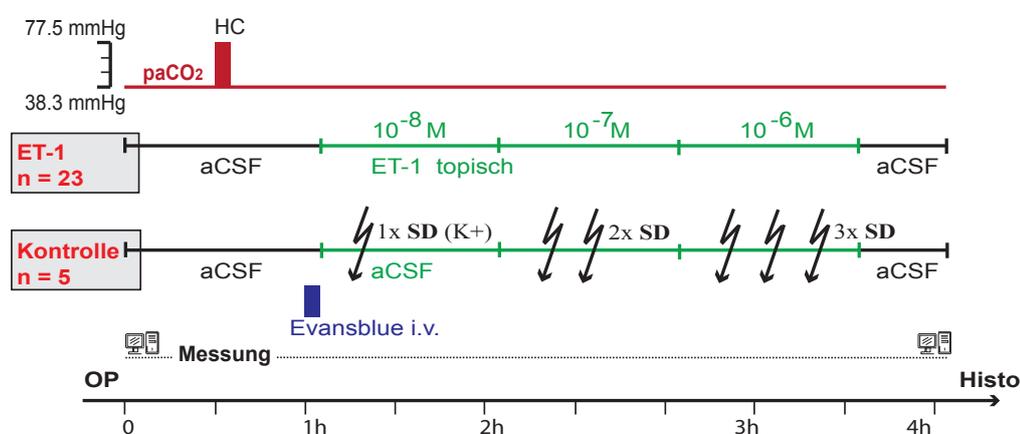


Abbildung 2.6: Messprotokoll Serie 2 – Endothelin-1 und pH

Nach der Stabilisierungsphase wurde Evansblue injiziert. Vorher wurde bei sechs von 23 Ratten der Verumgruppe und den fünf Kontrolltieren ein Hyperkapnie-Manöver (HC) im Rahmen der DC-Untersuchungen durchgeführt. In der Verumgruppe wurden drei aufsteigende Konzentrationen von ET-1 ($10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$) in ein-stündlichen Intervallen topisch appliziert ($3 \frac{\text{mL}}{\text{h}}$). Bei den Kontrolltieren wurden unter aCSF-Zufuhr SDs mit Tröpfchen von $300 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ KCl-Lösung im Stimulationsfenster ausgelöst. Die Anzahl und Zeitpunkte der ausgelösten SDs sollten ungefähr den SDs unter ET-1 entsprechen. Am Ende der Messungen wurden die Hirne aller Tiere konserviert.

2.6.4 Messprotokoll Serie 3 – Endothelin-1₍₁₋₃₁₎

In dieser Serie wurden zur Beobachtung von SDs unter ET-1₍₁₋₃₁₎ ($n = 7$) und in den Kontrollen ($n = 3$) zwei Laser-Doppler-Sonden und eine subdurale DC-Draht-Elektrode eingesetzt. Der zeitliche Ablauf ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

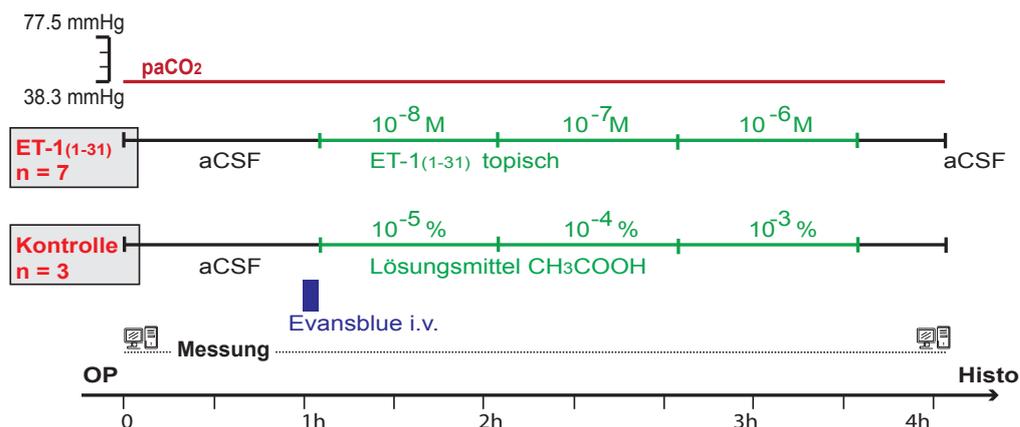


Abbildung 2.7: Messprotokoll Serie 3 – Endothelin-1₍₁₋₃₁₎

In Serie 3 erhielt die Verumgruppe, nach der Einwaschung von aCSF, drei aufsteigende Konzentrationen ($10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$) von Endothelin-1₍₁₋₃₁₎ in topischer Applikation. Diese wurden, wie in der ET-1-Serie, in (ein)stündlichen Intervallen kontinuierlich ($3 \frac{\text{mL}}{\text{h}}$) in das kraniale Fenster eingewaschen. Drei Tiere dieser Serie dienten als Lösungsmittelkontrollen und erhielten nach gleicher Präparation und unter dem gleichen Gerätesetup nur die drei unterschiedlichen Konzentrationen von Essigsäure ($10^{-5} \%$, $10^{-4} \%$ und $10^{-3} \%$) in aCSF, die zur Lösung des ET-1₍₁₋₃₁₎ verwendet wurden.

2.7 Statistik

Die aufgezeichneten Daten wurden mit den Programmen LabChart® (AD-Instruments, New South Wales, Australia), Matlab® (Mathworks, Aachen, Deutschland) weiterbearbeitet und statistische Tests mithilfe des Programms Sigma-Stat® (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Alle Werte wurden, aufgrund der zum Teil kleinen Gruppengrößen, als nicht normalverteilt angenommen und werden als Median sowie in den ersten und dritten Quartilen (Q1–Q3) in runden Klammern angegeben. Vergleiche zwischen den Gruppen und wiederholten Messungen wurden mit nonparametrischen Rangsummen-Tests vorgenommen, die im Kapitel 3 im Text benannt werden. Als statistisch signifikant wurde $P < 0,05$ angenommen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Physiologie

Alle systemischen Parameter der Versuchstiere blieben über die Dauer der Präparation und Messung innerhalb physiologischer Grenzen (siehe Tabelle 3.1). Eine Ausnahme davon bilden die reversiblen, Hyperkapnie-bedingten systemischen Veränderungen, welche in Tabelle 3.2 dargestellt sind.

	MAP in mmHg	paCO ₂ in kPa	paO ₂ in kPa	arterieller pH-Wert
DHC; n = 8	128,3 (127–138,3)	5 (4,7–5,2)	14,4 (13,9–15,8)	7,39 (7,37–7,43)
Kontrolle DHC; n = 8	122,3 (118,5–130)	6 (5,8–6,5)	15,9 (15,1–16,7)	7,34 (7,33–7,37)
ET-1; n = 19	99 (93,5–138,8)	4,7 (4,3–5,2)	15,7 (15,3–16,7)	7,4 (7,39–7,43)
Kontrolle ET-1; n = 5	127,5 (116–134)	5,7 (5,4–5,8)	17 (15–18,8)	7,38 (7,38–7,39)
ET-1 _(1–31) ; n = 7	122 (104,5–133)	5,1 (4,7–5,6)	12,1 (11,8–13,8)	7,42 (7,41–7,44)
Kontrolle ET-1 _(1–31) ; n = 3	131,5 (121,5–134)	5,5 (5,4–5,6)	14,4 (12,7–14,4)	7,41 (7,41–7,44)

Tabelle 3.1: Physiologische Parameter

Alle Werte sind in Median (fett) und Interquartilenbereich (Q1–Q3) angegeben. Die Daten der partiellen arteriellen Gasdrücke, paCO₂ und paO₂, wurden wegen der späteren CO₂-Reaktivitätsbestimmungen einheitlich in Kilopascal (1 kPa ≈ 7,5 mmHg) umgerechnet.

3.2 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte anhand von absoluten Veränderungen der Ionenkonzentrationen und des DC-ECoG sowie anhand von relativen rCBF-Verän-

derungen bezüglich eines Ausgangswerts vom Aufzeichnungsbeginn. Die $[K^+]_o$ und der pH-Wert wurden mithilfe der leicht abgewandelten Nernst-Gleichung (siehe Gleichungen 2.2 und 2.3 auf Seite 28) in millimolare Werte ($\frac{mmol}{L}$) bzw. pH-Einheiten umgerechnet. Für alle Parameter wurden dann jeweils der Startwert, die höchste Amplitude und die Zeit bis zur Normalisierung auf den Startwert während Hyperkapnie oder SD abgelesen.

Anschließend wurden aus den Daten der *Ag/AgCl*-Elektroden sowie aus dem intrakortikalen DC-Potenzial der Mikroelektroden jeweils die Amplituden der absoluten Potenzialveränderungen in Millivolt berechnet. Rostrale und kaudale Werte der Mikroelektroden wurden im Median zusammengefasst, wobei die zeitlichen Differenzen zwischen den Positionen der Mikroelektroden für die dynamische Darstellung der SD in Oliveira-Ferreira et al. (2010) verwendet wurden.

Nach Berechnung des $paCO_2$ -Anstiegs aus den aBGA-Werten vor und während Hyperkapnie wurde der rCBF-Anstieg in $\frac{\%}{kPa}$ des $paCO_2$ als Ausdruck der CO_2 -Reaktivität des rCBF ($rCBF_{CO_2}$) ermittelt. Für das intrakortikale DC-Potenzial wurde in ähnlicher Weise die CO_2 -Reaktivität (DC_{CO_2}) in $\frac{mV}{kPa}$ des $paCO_2$ berechnet.

Um die Dauer der Aktivitätssenkung in den hochfrequenten Anteilen des ECoG zu bestimmen, wurde das Integral des Quadrates (IoP; Integral of Power) der gefilterten Daten (Bandpass: 1–45 Hz) berechnet. Diese von Dreier et al. (2006) mit einem Integrationsbereich über 60 s eingeführte Umrechnung dient der sensitiveren Darstellung von Veränderungen der ECoG-Amplituden und wurde bisher nur zur Bestimmung der SD-Dauer verwendet. Die Quadrierung der Spannungskurve entspricht dabei einer mathematischen Gleichrichtung mit gleichzeitiger Verstärkung insbesondere der hohen absoluten Amplituden. Das Integral ist dann eine lineare Abbildung der Funktion des Potenzials über die Zeit, wobei mit dem „über die Kurve wandernden“ Integrationsbereich auch eine Glättung der Kurve erreicht wird. Die Verwendung kleinerer Intervalle von nur 10 s statt 60 s erzielten in meinen Berechnungen eine höhere zeitliche Auflösung des IoP, welche mir eine genauere Bestimmung der zeitlichen Korrelationen zwischen Beginn der zerebralen Aktivitätssenkung und anderen Parametern auch während Hyperkapnie ermöglichte.

Für die nachfolgende statistische Analyse wurden die Daten der einzelnen Gruppen sowohl (i) zwischen zeitlich unterschiedlichen Events in einem Tier (*Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks* für wiederholte Messungen), (ii) zwischen Verum- und Kontrollgruppe (*Wilcoxon Signed Rank Test* für paarweise Gruppenvergleiche) als auch (iii) untereinander (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks* für multiple Gruppenvergleiche) auf signifikante Unterschiede getestet.

3.3 Blut-Hirn-Schranke – Serie 1

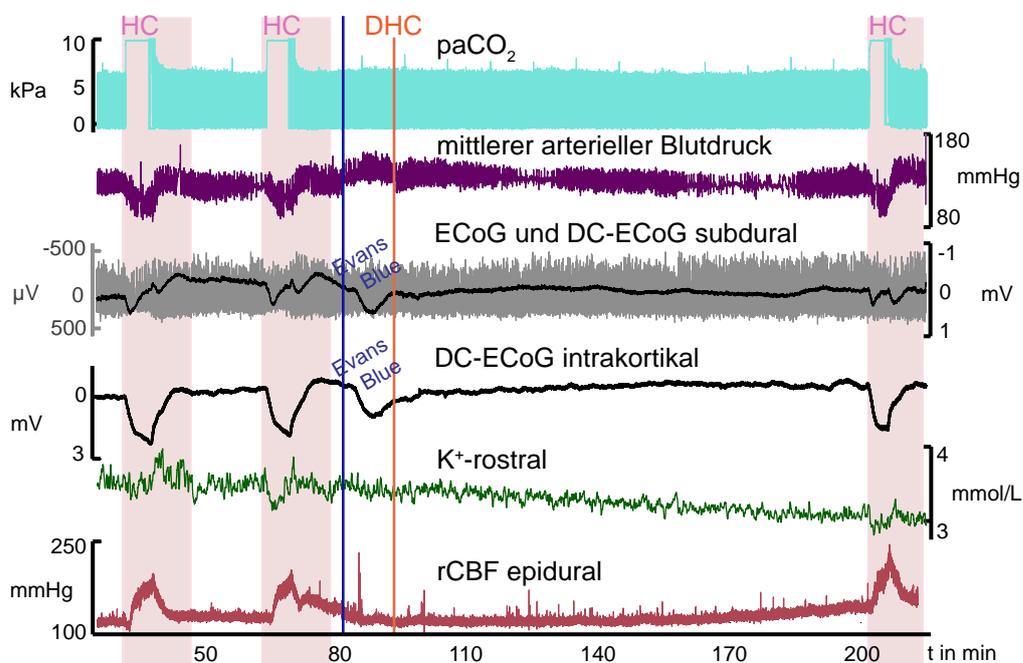


Abbildung 3.1: Hyperkapnie-Parameter der DHC-Gruppe

Die 5-minütigen Hyperkapnie-Manöver (rosa unterlegt) führten zu einer Senkung des systemischen Blutdrucks (lila), während gleichzeitig eine Erhöhung des rCBF (rot) stattfand. Die blaue Linie kennzeichnet die Evans-Blue-Gabe, auf die nach 10 min die DHC-Applikation (orange) folgte. Auffällig sind ein Evans-Blue-induzierter positiver DC-Shift sowie ein langsamer Anstieg des rCBF, der ebenfalls in der Kontrollgruppe zu beobachten war. In der dritten und vierten Spur dieses Original-Datensatzes ist gut zu erkennen, dass sich die positiven Hyperkapnie-assoziierten DC-Shifts (schwarz) auch nach BBB-Öffnung nicht in Form und Amplitude verändern.

3.3.1 Langsamer rCBF-Anstieg und positiver DC-Shift nach BBB-Öffnung

Unter Verwendung des DHC-Modells der BBB-Öffnung wurden in der ersten Versuchsserie die potentielle Beteiligung der BBB sowohl an der Entstehung von DC-Potenzialen als auch an der Generation von SDs untersucht. Um zu testen, ob eine alleinige Öffnung der BBB SDs generiert, erfolgte in der Verumgruppe dieser Serie eine zweistündige topische Applikation von 2 millimolarem DHC in aCSF. Während der gesamten DHC-Applikationszeit stieg in 8 von 8 Tieren der rCBF langsam von **109,1** (107,5–111) % auf

173,1 (144,8–184,1) % des Ausgangswertes an (siehe Abbildung 3.1 auf der vorherigen Seite), aber unterschied sich in diesem langsamen Anstieg nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Wilcoxon Signed Rank Test; $P = 0,279$). In 6 von 8 Tieren der Verumgruppe konnte 20 min nach Evans-Blue-Gabe bzw. 10 min nach DHC-Gabe ein anhaltender Anstieg des DC-Potenzials um **1,0** (0,9–1,6) mV beobachtet werden. Nach der Evans-Blue-Gabe wurde auch in 8 von 8 Kontrolltieren nach 20 min ein Anstieg des DC-Potenzials um **0,5** (0,4–0,6) mV gemessen, der jedoch signifikant kleiner war als in der Verumgruppe (Wilcoxon Signed Rank Test; $P < 0,001$).

Die $[K^+]_o$ änderte sich nicht signifikant im Vergleich von verschiedenen Zeitpunkten vor und nach DHC-Gabe. Es fand ebenfalls keine signifikante $[K^+]_o$ -Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe statt (Wilcoxon Signed Rank Test; $P = 0,505$).

3.3.2 Keine spontanen SDs nach Öffnung der BBB durch DHC

SDs wurden anhand von zeitlich leicht versetzt beginnenden Negativierungen der beiden intrakortikalen DC-Potenziale (rostrale und kaudale Mikroelektrode) und dem fast zeitgleich auftretenden rCBF-Anstieg identifiziert (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Die damit assoziierte Depression der hochfrequenten ECoG-Aktivität (Bandpass: 1–45 Hz) wurde als ein schnelles Absinken des Quadrates der ECoG-Amplitude bzw. als schnelle Abnahme der absoluten Fläche unter der quadrierten Spannungskurve (IoP) definiert. Die Dauer der jeweiligen Depressionsphase wurde dann aus den IoP-Kurven als das Intervall zwischen Anfang der Depression und beginnender Wiederherstellung der hochfrequenten ECoG-Aktivität bestimmt (Dreier et al., 2006).

In keinem der Verumtiere konnten während der Gesamtdauer der DHC-Perfusion SDs im Sinne dieser Kriterien beobachtet werden (siehe Abbildung 3.1 auf der vorherigen Seite). Jedoch ließen sich am Ende der Messungen in allen 8 Tieren, trotz geöffneter BBB, elektrisch SDs auslösen.

Diese führten in Übereinstimmung mit der Literatur (Dreier et al., 1998) zu den folgenden SD-typischen Veränderungen: Der rCBF stieg kurzzeitig, für **1,7** (1,5–1,8) min von **152,1** (139,3–164,5) % auf **287,6** (270–324,6) % an. In einer anschließenden relativen Oligämie in Bezug auf den Startwert sank der rCBF in 7 von 8 Tieren auf **118,9** (113,4–125) % des Ausgangswertes, um sich nach **2,2** (1,9–2,6) min wieder zu erholen. Nur die hier gemessene Dauer der Spreading Oligemia ist, im Vergleich zur Literatur (Piilgaard and Lauritzen, 2009), auffällig kurz und wird vermutlich von der von mir verwendeten Thiopental-Anästhesie beeinflusst.

Im DC-ECoG konnten negative Potenzialänderungen von **13,2** (9,8–16,5) mV intrakortikal und von **1,4** (0,8–2,2) mV subdural beobachtet werden, die mit einem starken $[K^+]_o$ -Anstieg von **2,9** (2,6–3,1) $\frac{mmol}{L}$ auf **50,7** (48,5–53) $\frac{mmol}{L}$ assoziiert waren. Das im Subduralraum gemessene DC-ECoG (DC_{sub}) zeigte dabei wesentlich kleinere Potenzialänderungen während SD als das intrakortikale DC-ECoG (DC_i) der Mikroelektroden ($DC_{sub} \approx \frac{1}{10} DC_i$). Zeitigere Studien zeigen jedoch trotz geringerer Amplituden eine gute Korrelation bei der Potenziale (Dreier et al., 2002a).

3.3.3 Stabile Hyperkapnie-Antwort des DC-ECoGs nach Öffnung der BBB

Zur mehrfach hintereinander durchführbaren, nicht-invasiven Generierung vergleichbarer DC-Ereignisse, die sich nicht durch langfristige Nachwirkungen gegenseitig beeinflussen, wurde das Hyperkapnie-Manöver nach einem Modell von Voipio et al. (2003) gewählt. Diese Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks im Gewebe bewirkt bei Ratten einen vorübergehenden Anstieg des rCBF und ist mit einer Hyperpolarisation der Nervenzellen assoziiert (Lehmenkühler and Pöppelmann, 1989). Die dabei messbaren DC-Potenzialänderungen wurden in dieser Arbeit auf Unterschiede vor und nach Öffnung der BBB untersucht um die Abhängigkeit der DC-Potenzialentstehung von der BBB zu prüfen.

In 6 von 8 Tieren der Verumgruppe und in 8 von 8 Kontrolltieren wurden je zwei Hyperkapnien vor und nach DHC- bzw. aCSF-Gabe ausgelöst. Zusätzlich wurde in insgesamt 11 Tieren der ET-1-Serie je ein Hyperkapnie-Manöver vor der ET-1- bzw. K^+ -Applikation durchgeführt und als weitere Kontrolle für Hyperkapnie unter Normalenbedingungen ausgewertet.

	MAP in mmHg	paCO ₂ in kPa	paO ₂ in kPa	arterieller pH-Wert
DHC; n = 6	99,0 (97,3–103,8)	9,9 (9,4–10,2)	10,7 (10,3–11,2)	7,14 (7,14–7,17)
Kontrolle DHC; n = 8	95,8 (84,9–98,0)	10,5 (10,1–10,6)	10,1 (8,9–10,5)	7,17 (7,16–7,17)
ET-1; n = 4	125,0 (124,3–128,8)	9,7 (9–10,4)	11,2 (10,1–12,4)	7,19 (7,15–7,19)
Kontrolle ET-1; n = 7	95,0 (82,5–106,0)	9,7 (8,8–10,6)	9,7 (8,5–10,5)	7,22 (7,19–7,23)

Tabelle 3.2: Systemische Parameter unter Hyperkapnie

Alle Werte sind in Median (fett) und Interquartilen-Bereich (Q1–Q3) angegeben. Die Daten für die partiellen arteriellen Gasdrücke, den arteriellen pH-Wert und den mittleren arteriellen Blutdruck wurden zeitgleich, ca. drei Minuten nach Beginn der Hyperkapnie gewonnen und unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Hyperkapnien zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die fünfminütigen Hyperkapnie-Manöver führten zu einem Anstieg des $paCO_2$ von **5** (4,7–5,2) kPa auf **9,9** (9,4–10,2) kPa, einer Senkung des paO_2 von **14,4** (13,9–15,8) kPa auf **10,7** (10,3–11,2) kPa, einer Abnahme des MAP von **128,3** (127–138,3) mmHg auf **99,0** (97,3–103,8) mmHg und einer Azidifizierung des arteriellen pH-Wertes von **7,39** (7,37–7,43) auf **7,14** (7,14–7,17) pH-Einheiten (siehe Tabelle 3.2 auf der vorherigen Seite).

Diese systemischen Daten während Hyperkapnie unterschieden sich in einer nonparametrischen Varianzanalyse weder signifikant zwischen den Hyperkapnien vor und nach DHC- bzw. aCSF-Applikation noch zwischen den Werten vor und nach der nur in der DHC-Gruppe ausgelösten SD (Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks).

	DHC-Gruppe			Kontrollgruppe		
	HC 1+2 n = 6	HC 3 n = 6	HC 4 n = 4	HC 1+2 n = 8	HC 3 n = 8	HC 4 n = 8
DC _i (mV)	3,1 (2,8–3,5)	3,0 (2,8–3,4)	3,3 (3,3–3,3)	2,8 (2,6–3,2)	2,8 (2,4–3,1)	3,2 (2,9–3,3)
DC _{sub} (μ V)	0,8 (0,7–1,0)	0,8 (0,5–0,9)	0,7 (0,5–0,9)	0,3 (0,2–0,6)	0,4 (0,3–0,7)	0,5 (0,4–0,6)
DC _{CO₂} ($\frac{mV}{kPa}$)	0,5 (0,5–0,6)	0,6 (0,6–0,7)	0,7 (0,5–0,8)	0,7 (0,6–0,8)	0,7 (0,6–0,8)	0,7 (0,6–0,8)
[K ⁺] _o ($\frac{mmol}{L}$)	0,56 (0,52–0,77)	0,84 (0,61–0,94)	0,83 (0,64–0,89)	0,49 (0,47–0,65)	0,64 (0,60–0,82)	0,58 (0,52–0,63)
pH n = 7/8				0,14 (0,10–0,19)	0,12 (0,07–0,18)	0,14 (0,08–0,14)
rCBF (%)	70,6 (52,6–94,6)	119,4* (112,0–154,9)	40,8* (35,5–49,2)	61,4 (50,0–88,4)	91,6 (86,0–153,0)	108,2 (78,4–127,1)
rCBF _{CO₂} ($\frac{\%}{kPa}$)	13,1 (7,8–19,7)	34,1* (25,9–42,4)	8,5* (8,1–9,2)	17,1 (14,5–20,6)	35,8 (25,7–48,8)	21,5 (17,4–28,5)
MAP (mmHg)	96 (94–99)	100 (100–110)	113 (95–125)	94 (89–95)	98 (98–100)	100 (90–100)

Tabelle 3.3: Zerebrale Hyperkapnie-Parameter

Alle Werte sind in Median (fett) und Interquartilen-Range (Q1–Q3) angegeben. Die CO_2 -Reaktivität des rCBF und des intrakortikalen DC sind hier mit rCBF_{CO₂} und DC_{CO₂} abgekürzt. Außerdem werden die intrakortikal und subdural gemessenen DC-Potenziale mit (DC_i) bzw. (DC_{sub}) bezeichnet. Signifikante Unterschiede der rCBF-Amplituden und der rCBF_{CO₂} konnten während der dritten und der vierten Hyperkapnie (rot; *) beobachtet werden. Die systemischen Blutdruckwerte (MAP) unterschieden sich im Gegensatz zum rCBF nicht signifikant zwischen den einzelnen Hyperkapnien.

Die erste Hyperkapnie wurde in der DHC-Gruppe von einem positiven intrakortikalen DC-Shift von **3,0** (2,7–3,6) mV für **10,5** (10,2–10,8) min und einem positiven subduralen DC-Shift von **0,9** (0,7–1) mV begleitet. Der rCBF zeigte unterdessen eine Hyperperfusion von **95,9** (89,9–97,6) % auf **155,0** (139,0–186,0) % des Ausgangswertes für **10,9** (10,1–11,3) min und eine CO_2 -Reaktivität von **1,6** (1,3–1,9) %/kPa. Außerdem konnten zeitlich korrelierend eine geringe Erhöhung der $[K^+]_o$ um **0,57** (0,43–0,72) $\frac{mmol}{L}$ und eine Senkung des pH-Wertes von **7,40** (7,40–7,42) auf **7,29** (7,25–7,30) pH-Einheiten gemessen werden (siehe auch Abbildung 3.7 auf Seite 54).

Diese Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den ersten zwei Hyperkapnien jeder Gruppe (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks), da sie unter gleichen Bedingungen stattfanden. Für die zerebralen Parameter wurden daraufhin jeweils der Median der ersten beide Hyperkapnien als Wert vor DHC- bzw. aCSF-Applikation weiterverwendet.

Auch die intrakortikalen bzw. subduralen DC-Werte der auf die DHC-Applikation folgenden dritten Hyperkapnie unterschieden sich nicht signifikant von den Daten vor der BBB-Unterbrechung (Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks) oder von den Werten der Kontrolltiere (Wilcoxon Signed Rank Test). Dieses Ergebnis wurde durch eine ebenfalls konstante CO_2 -Reaktivität des intrakortikalen DC-Potenzials für alle Hyperkapnien beider Gruppen bestätigt.

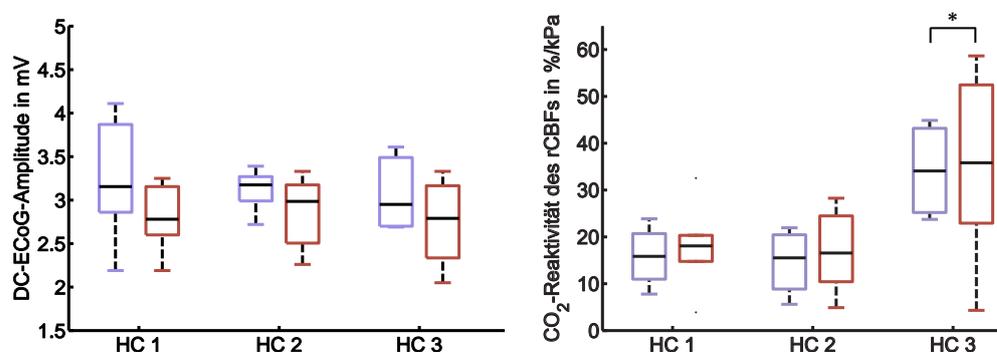


Abbildung 3.2: DHC – DC-Potenzial und CO_2 -Reaktivität des rCBFs

Das intrakortikale DC-Potenzial (linke Abbildung) unter Hyperkapnie zeigte keine signifikanten Unterschiede vor und nach DHC-Gabe (Wilcoxon Signed Rank Test). Die rCBF-Amplitude und die CO_2 -Reaktivität des rCBF (rechtes Bild) der dritten Hyperkapnie in der DHC-Gruppe (lila) unterschieden sich signifikant * von den ersten beiden Hyperkapnien vor BBB-Öffnung (Wilcoxon Signed Rank Test; $P = 0,031$) jedoch nicht von der dritten Hyperkapnie der Kontrollgruppe (braun).

Der rCBF-Anstieg in der Verum-Gruppe von **124,4** (122–129,7) % auf **242** (221,8–284,6) % des Ausgangswertes für **10,3** (9,5–11,2) min war jedoch si-

gnifikant höher (Wilcoxon Signed Rank Test; $P = 0,031$) als vor der BBB-Öffnung, und zeigte eine ebenfalls höhere CO_2 -Reaktivität von **34,1** (25,9–42,4) %/kPa (siehe Abbildung 3.2). Interessanter Weise unterschieden sich die rCBF-Amplituden der jeweils dritten Hyperkapnie nicht signifikant zwischen Verum- und Kontrolltieren (Wilcoxon Signed Rank Test), sodass dieser Effekt nicht auf die DHC-Gabe zurückgeführt werden kann. Alle Hyperkapnie-Parameter sind zur Übersicht noch einmal in Tabelle 3.2 dargestellt.

3.3.4 Verringerte CO_2 -Reaktivität des rCBFs nach SD

Nach der dritten Hyperkapnie-Phase wurde nur in der DHC-Gruppe eine SD ausgelöst. Anschließend wurde in 4 von 8 Tieren dieser Gruppe und allen Kontrolltieren ein viertes Hyperkapnie-Manöver durchgeführt, welches keine signifikanten Veränderungen der DC-ECoG- oder $[K^+]_o$ -Antworten im Vergleich zu den ersten drei Hyperkapnien beider Gruppen zeigte (Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks). Es fand jedoch in der DHC-Gruppe eine Reduktion der rCBF-Amplitude auf **40,8** (35,5–49,2) % statt, welche sich signifikant von den ersten drei Hyperkapnien beider Gruppen und von der vierten Hyperkapnie der Kontrollgruppe unterschied (Mann-Whitney-U-Test; $P = 0,048$). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in der auf **8,5** (8,1–9,2) $\frac{\%}{kPa}$ gesunkenen CO_2 -Reaktivität des rCBFs nach SD wider.

3.3.5 Neue vereinfachte Methode zur Quantifizierung der Evans-Blue-Extravasation

In einer nachfolgenden histologischen Untersuchung sollte nun die tatsächlich aufgetretene BBB-Öffnung gesichert werden. Das im folgenden beschriebene Verfahren zur Beurteilung der BBB-Integrität in histologischen Präparaten wurde während der Untersuchungen zu Serie 1 (DHC) entwickelt und konnte in dieser Form in der Literatur noch nicht gefunden werden. Es bedarf weder material- noch zeitintensiver Vorbehandlungen der Rattenhirne und ermöglicht durch Automatisierung eine sehr schnelle und für alle Gruppen exakt gleiche Kalkulation ohne subjektive Beeinflussung der Ergebnisse.

Nach Beendigung der Messungen und somit ca. 3 h nach intravenöser Evans-Blue-Injektion wurden die Hirne der Tiere aus den Serien 1 und 2 (ET-1 und DHC) entfernt und für mindestens 48 Stunden in PFA gekühlt gelagert. Später wurden daraus je fünf 2 mm-dicke Hirnschnitte (Koronschnitte) angefertigt, welche mit der digitalen Kamera des Präpariermikroskops in einer Vergrößerung von x10 und einer Auflösung von 96 dpi fotografiert wurden. Die Bilder wurden zunächst als 48 Bit-RGB-Bilder im „tiff“-Format gespeichert und dann in Matlab[®]-Variablen eingelesen. Pro Versuchstier wurde ein

repräsentativer Hirnschnitt auf Höhe des kranialen Fensters ausgewählt, welcher, wie im Folgenden beschrieben, mit einem eigenen Programm ausgewertet wurde.

Algorithmus

Die genaue Position des Hirnschnittes innerhalb des Bildes wird mithilfe von Filtern identifiziert und in einer binären Maske gespeichert. Die oberen 20% der Maske werden als ROI (**R**egion **O**f **I**nterest) definiert, welche grob das temporale Kortexareal repräsentiert, ohne die wesentlich signalreicheren Ventrikel einzuschließen. Innerhalb dieser ROI werden nach bestimmten farblichen und beidseits gleichen, räumlichen Kriterien jeweils zwei 50x50 Pixel-große (ca. $0,3\text{ mm}^2$) Quadrate in der Hemisphäre des kranialen Fensters (rechts) und in der kontralateralen Hemisphäre (links) ausgewählt. Zur visuellen Kontrolle zeichnet die Routine zusätzlich die gewählten Quadrate in das Bild jedes Schnittes ein (Abbildung 3.3).

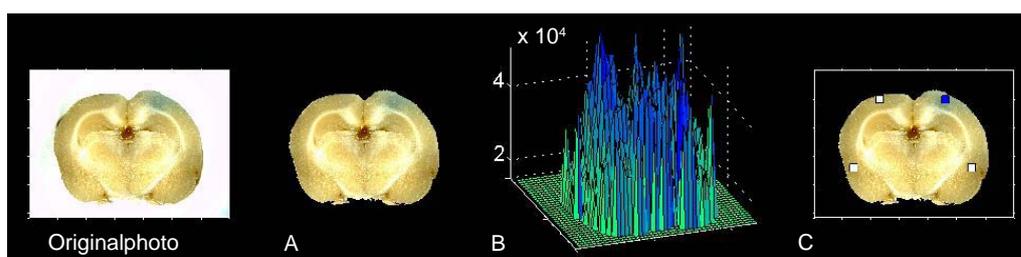


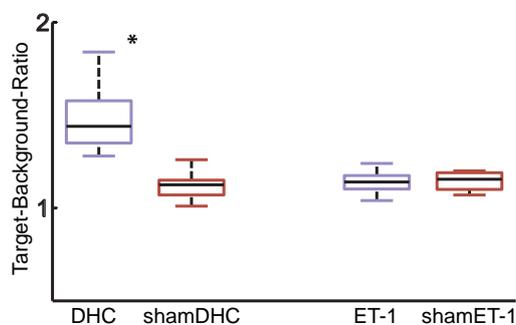
Abbildung 3.3: Matlab Routine

Am Beispiel eines Hirnschnitts aus der DHC-Gruppe: Aus dem Originalphoto wurde zuerst die Lokalisation des Hirnes (A) innerhalb des Bildes identifiziert. Die blaue Schicht (B) des RGB-Bildes wurde von den anderen beiden Farbschichten getrennt. Danach wurden die vier gleichgroßen Quadrate bestimmt (C). Dabei wurde ein Quadrat (blau) im Bereich des kranialen Fensters gewählt sowie ein ipsilaterales (weiß) und zwei kontralaterale (weiß) Quadrate außerhalb des Fensterbereiches.

Da das RGB-Farbmodell additiv ist, repräsentiert der blaue Kanal am besten die Menge des blauen Farbstoffes Evans Blue, deshalb werden die Mittelwerte der blauen Intensitäten zur weiteren Berechnung verwendet. Die Öffnung der BBB wurde dann mithilfe der in der Literatur häufiger zu findenden **T**arget-to-**B**ackground-**R**atio (TBR) beurteilt. Dabei wird der Austritt von Evans Blue aus den Gefäßen in die unmittelbare Umgebung des kranialen Fensters (Target) im Verhältnis (Ratio) zur kontralateralen Hemisphäre (Background) angegeben. Für die hier als „normalisiert“ bezeichnete TBR wurden die Werte der ROI zusätzlich auf einen ipsi- und einen kontralateralen Bereich außerhalb dieser Region bezogen. Anschließend wurde statistisch auf Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen getestet.

3.3.6 Frühe BBB-Öffnung durch DHC

Es wurden die Hirne von 8 (von 8) Verum- und 6 (von 8) Kontrolltieren der DHC-Serie sowie von 7 (von 19) Verum- und allen 5 Kontrolltieren der ET-1-Serie histologisch ausgewertet. Drei bis 3,5 Stunden nach Beginn des potentiell BBB-öffnenden Ereignisses unterschied sich die TBR der DHC-Verum-Gruppe mit **1,4** (1,3-1,6) signifikant (*) von allen drei anderen Gruppen (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks; $P = 0,001$). Die ET-1-Gruppe zeigt nach dieser kurzen Zeit jedoch weder einen Unterschied zur ET-1-Kontrollgruppe mit K^+ -induzierten SDs noch zu den nur Kontroll-operierten Tieren.



	TBR	TBR normalisiert
DHC; n=8	1,4 (1,3-1,6)	1,5 (1,4-1,7)
Kontrolle DHC; n=6	0,9 (0,8-1)	1,1 (1,1-1,2)
ET-1; n=7	1,0 (1,0-1,1)	1,2 (1,1-1,2)
Kontrolle ET-1; n=5	1,1 (1,0-1,1)	1,1 (1,1-1,2)

Abbildung 3.4: BBB-Öffnung

Drei Stunden nach DHC-Applikation zeigte die DHC-Gruppe (lila) eine signifikante (*) BBB-Öffnung im Gegensatz zu der ET-1-Gruppe (lila) und zu den beiden (sham-) Kontrollgruppen (braun).

Tabelle 3.4: Histologische Parameter

Alle Werte sind in Median (fett) und Interquartilen-Range (Q1–Q3) angegeben.

3.3.7 Verminderte Nervenzellaktivität während Hyperkapnie-Antwort

Bei der Auswertung der Hyperkapnie-Antworten fiel in den AC-Anteilen des ECoG eine verminderte Aktivität, das sogenannte Burst-Suppression-Muster auf. Zur Quantifizierung wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet:

1. Auszählen der einzelnen Bursts vor und während Hyperkapnie sowie
2. Berechnung der Amplitude der IoP-Veränderung während Hyperkapnie in Prozent der normalen Aktivität.

Die Quantifizierung dieser Beobachtung wurde in dieser Arbeit nur exemplarisch an der ersten bzw. an den ersten beiden Hyperkapnie-Antworten der ET-1-, der DHC- und deren Kontrollgruppen gezeigt (siehe Tabelle 3.5 sowie Abbildung 3.5). Die Werte der verschiedenen Gruppen konnten dabei zusammengefasst werden, da die ersten beiden Hyperkapnie-Phasen noch vor dem Zeitpunkt der topischen Applikationen stattfanden und somit unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

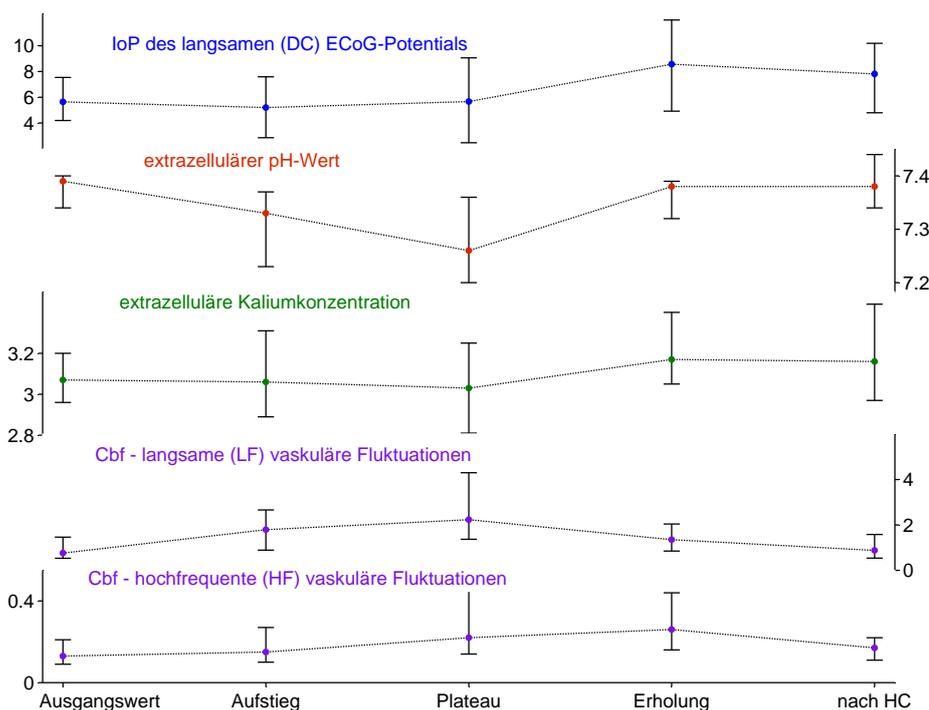


Abbildung 3.5: Neuronale und vaskuläre Hyperkapnie-Antwort im Verhältnis zu pH-Wert und Kaliumkonzentration

Hier wurden zu fünf Zeitpunkten der ersten und zweiten Hyperkapnie-Antwort Werte der jeweiligen Parameter von $n = 26$ Tieren im Median zusammengefasst und zusammen mit dem Interquartilenbereich dargestellt. In der ersten Spur ist die verminderte Nervenzellaktivität (Burst-Suppression) im subduralen ECoG mithilfe des berechneten IoP (blau) in $\frac{mV^2}{s}$ aufgezeigt. Es ist außerdem zu erkennen, wie der pH-Wert dem Verlauf des ECoG-IoP zeitlich folgt (rot in der zweiten Spur). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration ($\frac{mmol}{L}$) ändert sich dagegen kaum (grün in der dritten Spur). Die beiden unteren Reihen zeigen die vaskulären Fluktuationen der gleichen Zeitpunkte, die mithilfe des Quadrates aus den langsamen und den hochfrequenten Anteilen des rCBF (in LDF-Einheiten zum Quadrat) berechnet wurden.

Die IoP-Werte des subduralen ECoG und des hochfrequenten intrakortikalen ECoG betragen **0,39** (0,26–0,94) $\frac{\mu V^2}{s}$ und **3,03(2,54–3,34)** $\frac{mV^2}{s}$ und dauerten für **570** (491–618) s bzw. **630** (601–645) s an.

Das entspricht einer IoP-Änderung des intrakortikalen ECoG auf **91** (61–131) % des Ausgangswertes vor Hyperkapnie. Der extrazelluläre pH-Wert änderte sich dabei um **-0,06** (-0,13–0,00) pH-Einheiten für **407** (399–476) s und der arterielle pH-Wert zeigte ebenfalls eine Abnahme um (**-0,21** (-0,24–(-0,18)) pH-Einheiten). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration änderte sich mit **0,02** (-0,09–0,11) $\frac{mmol}{L}$ nicht signifikant während Hyperkapnie.

	Amplitude	Amplitude in %	Verzögerung in s	Dauer in s
IoP ECoG in $\frac{\mu V^2}{s}$; n = 22	0,39 (0,26–0,94)	85 (70–107)	17 (13–35)	570 (491–618)
IoP DC-ECoG in $\frac{mV^2}{s}$; n = 26	3,03 (2,54–3,34)	91 (61–131)	20 (13–35)	630 (601–645)
zerebraler pH; n = 14	-0,06 (-0,13–0)	99 (98–100)	0 (0–4)	407 (399–476)
art. pH; n = 19	-0,21 (-0,24–(-0,18))	97 (97–98)		
K^+ in $\frac{mmol}{L}$; n = 15	0,02 (-0,09–0,11)	101 (97–104)		
IoP rCBF-LF; in %; n = 26	1,21 (0,45–3,26)	149 (71–394)	12 (3–16)	579 (553–682)
IoP rCBF-HF; in %; n = 26	0,11 (0,04–0,37)	76 (36–219)	12 (3–16)	579 (553–682)

Tabelle 3.5: Amplitude und Dauer der IoP-Veränderung während HC

Alle Werte sind in Median (fett) und Interquartilen-Bereich (Q1–Q3) angegeben. Die IoP-Amplitude wurde außerdem prozentual zum Ausgangswert vor Hyperkapnie berechnet. Da sich die Gruppen der DHC- und der ET-1-Serie zum Zeitpunkt der ersten beiden Hyperkapnie-Phasen im Versuchsprotokoll nicht voneinander unterschieden, konnten die Werte hier zusammengefasst werden. Die Verzögerung gibt den Beginn der IoP-Veränderungen relativ zum Start des Hyperkapnie-Manövers an. In den IoPs der langsamen und den hochfrequenten Anteilen des rCBF (hier mit -HF und -LF bezeichnet) spiegeln sich vaskuläre Fluktuationen wider.

Aufgrund dieser interessanten Beobachtungen sollen im Anschluss an diese Arbeit weitere Untersuchungen zur Senkung der Nervenzellaktivität durch Erhöhung der CO_2 -Konzentration in der Atemluft und der Ursache dieses Effektes durchgeführt werden, sodass der Zusammenhang mit einer aussagekräftigen statistischen Power gezeigt werden kann.

3.4 pH-Wertveränderungen – Serie 2

In der Literatur wurden mehrfach durch ET-1 verursachte BBB-Störungen postuliert (Stanimirovic et al., 1993; Narushima et al., 1999; Matsuo et al., 2001). Diesen ET-1-Effekt konnte ich jedoch, in Voruntersuchungen zu dieser Arbeit, nicht für einen frühen Zeitpunkt (< 3 h) nach ET-1-Applikation nachvollziehen. Daher vermutete ich eine indirekte und somit spätere BBB-Öffnung durch ET-1.

Ein möglicher Mechanismus hierfür ist die Induktion einer Ischämie die durch ihren anaeroben Stoffwechsel mit nachfolgendem Laktatanstieg einen pH-Abfall und später alle Folgen eines Energiemangels im Gewebe verursacht. Da Hinweise auf eine ischämische BBB-Öffnung existieren, und ET-1 außerdem höchst wahrscheinlich Ischämien induziert (Dreier et al., 2009), untersuchte ich den potenten Vasokonstriktor ET-1 in dieser Serie in seiner Beeinflussung des intrazerebralen pH-Wertes und damit auf Nachweise einer Ischämie.

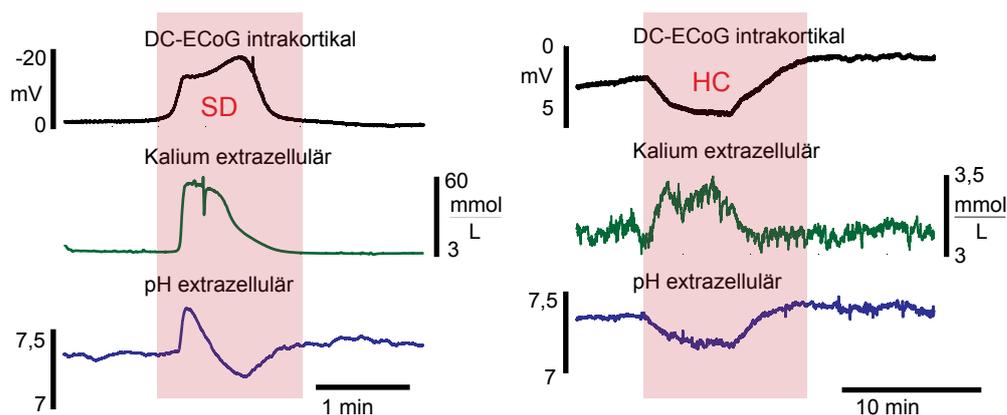


Abbildung 3.6: Ionenkonzentrationen während SD und Hyperkapnie

SDs (links) sind mit einem negativen DC-ECoG-Shift, einem kurzen steilen $[K^+]_o$ -Anstieg und einer Azidose, welche einem kurzen pH-Anstieg folgt, assoziiert. Die Antwort auf fünfminütige Hyperkapnie (rechts) beinhaltet einen positiven DC-ECoG-Shift, einen kleinen langsamen $[K^+]_o$ -Anstieg und eine Senkung des pH-Wertes.

Normalerweise, in physiologischem Gewebe, ist SD durch eine kurze alkalische pH-Wert-Verschiebung und eine nachfolgende länger andauernde Azidifizierung charakterisiert. Bestätigend hierzu, waren auch die durch K^+ induzierten SDs in naivem Kortexgewebe in der ET-1-Kontrollgruppe mit einer SD-typischen, kurzen schnellen Alkalisierung von **7,38** (7,37–7,42) auf **7,63** (7,56–7,64) pH-Einheiten assoziiert. Dieser folgte dann eine langsame Azidifizierung auf **7,12** (7,07–7,26) pH-Einheiten, welche für **84** (70–91) s andauerte.

In der ET-1-Verumgruppe war, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, eine initiale langsame Azidifizierung von **7,38** (7,28–7,39) pH-Einheiten zu Beginn der ET-1-Applikation auf **7,20** (7,16–7,24) pH-Einheiten vor der ersten SD zu beobachten, welche typisch für eine Ischämie-induzierte SD ist. Weiterhin ist in Abbildung 3.7 eine auffällige initiale rCBF-Senkung noch vor dem Auftreten der ersten SD zu erkennen, welche wahrscheinlich durch eine ET-1-induzierte Vasokonstriktion verursacht wird.

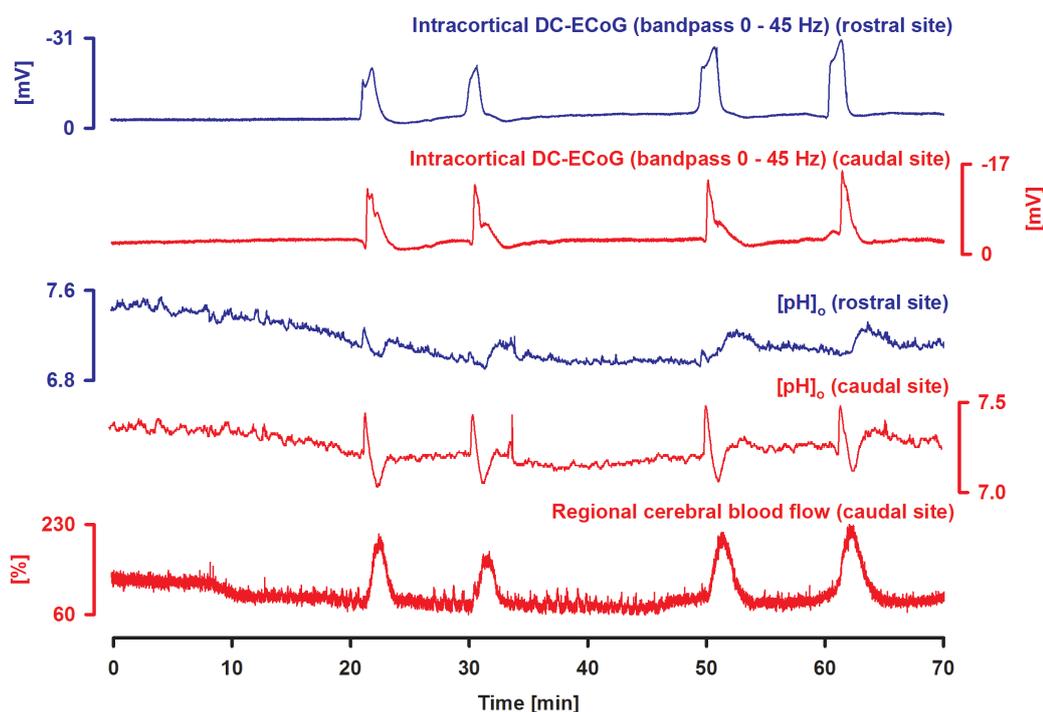


Abbildung 3.7: Atypische pH-Antwort auf ET-1-induzierte SD

In dieser Abbildung eines meiner Experimente aus Oliveira-Ferreira et al. (2010) ist die, mit einem Cluster von ET-1 ($1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$)-induzierten SDs assoziierte, extrazelluläre pH-Antwort (Zeilen 3 und 4) dargestellt. Das hier erstmals beschriebene, atypische pH-Muster in SD 3 und 4 der kaudalen pH-Wert-Aufzeichnung wird im nachfolgenden Abschnitt genauer betrachtet. Die Zeilen 1 und 2 enthalten die rostrale (blau) und die kaudale (rot) intrakortikale DC-ECoG, welche ebenso wie die pH-Werte mit pH-sensitiven Mikroelektroden aufgezeichnet wurden. Der kaudale rCBF in Zeile 5 sinkt noch vor der ersten SD und zeigt im Verlauf eine durch mehrfache, kurz nacheinander auftretende SDs (SD-Cluster) bedingte Hyperämie.

Der Beginn des negativen DC-Shifts wurde von einer kurzen schnellen Alkalisierung auf **7,37** (7,33–7,46) pH-Einheiten begleitet, gefolgt von einer langsamen pH-Wertsenkung auf **6,88** (6,79–6,95) pH-Einheiten, welche für **196** (103–311) s anhielt.

Die dritte und vierte SD der Abbildung 3.7 auf der vorherigen Seite zeigen kaudal einen schnellen pH-Wert-Anstieg, welcher zunächst von einer langsamen Azidifizierung und dann von einer zweiten, wesentlich langsameren Alkalisierung gefolgt wird, während rostral nur der schnelle alkalische Anstieg gefolgt von der langsamen Alkalisierung zu sehen ist. Diese langsame transiente Alkalisierung auf **7,32** (7,27–7,36) pH-Einheiten für **197** (167–211) s trat in sieben Tieren der ET-1-Gruppe auf wobei zu einigen Messzeitpunkten nur die zweite langsame Alkalisierung anstatt der langsamen Azidifizierung beobachtet werden konnte.

Die hier erstmals gezeigte, verzögerte, langsame Alkalisierung unter ET-1-Exposition stellt ein atypisches Muster der SD-induzierten pH-Antwort dar, welches möglicherweise auf der in Abbildung 3.7 dargestellten Hyperämie nach SD-Clustern basiert (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Dieser vorübergehende rCBF-Anstieg infolge des SD-Clusters könnte dabei kurzzeitig die Sauerstoff- bzw. Energiezufuhr steigern und so die anaerob gesteigerte Laktatproduktion in der Ischämie-region senken.

Interessanterweise ist in Abbildung 3.7 außerdem eine variierende Dauer der negativen DC-Shifts von aufeinander folgenden SDs zu sehen, während SDs in metabolisch nicht-beeinträchtigtem Gewebe eher uniform auftreten. Die stufenweise Erhöhung der ET-1-Konzentration von $10 \frac{\text{nmol}}{\text{L}}$ auf $1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ führte hier zu einer geringfügig verlängerten negativen DC-Verschiebung, die sich jedoch von den stark verlängerten DC-Shifts, welche bei sofortiger Applikation von $1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ (Oliveira-Ferreira et al., 2010) beobachtet werden können, unterscheiden.

3.4.1 Weitere Hinweise auf Ischämie

Die Kameraaufzeichnungen der Serie 2 wurden in dieser Arbeit nicht quantitativ ausgewertet. Sie lieferten jedoch Hinweise auf eine Vasokonstriktion der Arterien während ET-1-Gabe: In den Filmen und einzelnen Bildern der integrierten Kamera des OP-Mikroskops sind eindeutig mit SD assoziierte, starke Verengungen der Arterien beobachtbar, die bis zu nicht mehr sichtbaren (komplett kollabierten) Gefäßen unter der eingestellten 40-fachen Vergrößerung führten. Ein quantitativer Nachweis dieser Beobachtung erfolgte später im Rahmen der Studie von Oliveira-Ferreira et al. (2010) mithilfe eines neuen, extra für diesen Zweck entwickelten Auswerteprogramms für die Kamerabilddaten.

3.5 Endothelin-1_(1–31) – Serie 3

3.5.1 Endothelin-1_(1–31) induziert Spreading Depolarizations *in vivo*

In der Literatur wurde ich auf das theoretisch auch im Gehirn vorkommende ET-1_(1–31) (Baltatu et al., 1997) aufmerksam, welches eine Reihe von physiologischen und pathologischen Funktionen mit dem 21-AS-Peptid ET-1 in anderen Organen teilt. Ich vermutete, dass auch ET-1_(1–31) SDs auslösen kann und untersuchte drei aufsteigende Konzentrationen ($10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ in aCSF) des 31-AS-Peptids in topischer Applikation. Tatsächlich zeigten alle Tiere der ET-1_(1–31)-Gruppe (n = 7) der Serie 3 typische SDs mit den nachfolgenden Werten (siehe auch Tabelle 3.6 auf der nächsten Seite) und bestätigten somit die Gemeinsamkeit mit ET-1 in dieser Eigenschaft.

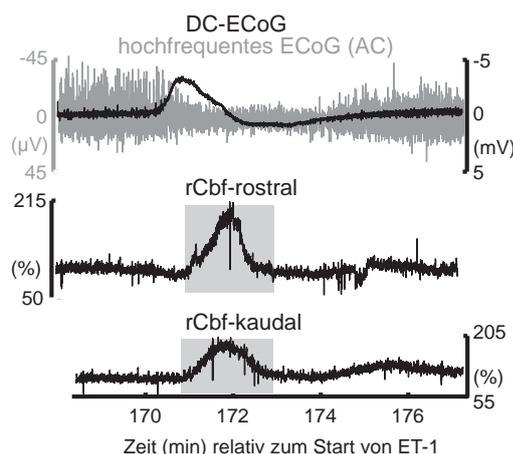


Abbildung 3.8: SD – Originalaufzeichnung einer ET-1_(1–31)-induzierten SD
 Die Negativierung des subduralen DC-ECoG (schwarz in der ersten Spur) und die simultane Depression der hochfrequenten (AC-) ECoG-Aktivität (grau) sind Kennzeichen der SD. Die beiden unteren Reihen zeigen den ebenfalls typischen Anstieg des rCBF (in % des Ausgangswertes) während SD mit einer kleinen Zeitverzögerung zwischen rostralem und kaudalem rCBF, einem Zeichen der SD-Ausbreitung.

ET-1_(1–31) bewirkte eine Abnahme des rCBF auf **91,2** (85,6–97,5) % des Ausgangswertes vor der ersten SD und führte anschließend während SD zu einer Hyperämie von maximal **179,1** (168,3–184,6) %, welche **93** (83,5–107,5) s andauerte. Gleichzeitig mit der Depression der hochfrequenten ECoG-Aktivität konnte eine Negativierung des langsamen Gleichstrompotenzials mit einer Amplitude von **3,8** (3–4,4) mV für **97** (83–139) s während SD beobachtet werden (siehe Abbildung 3.7 auf Seite 54).

Die genannten Parameter, DC-ECoG-Amplitude und Dauer sowie rCBF-Anstieg und Dauer, unterschieden sich nicht signifikant von denen der ET-1-induzierten SDs in Serie 2 (Wilcoxon Signed Rank Test).

Beide ETs lösten somit in allen Tieren typische SDs aus, deren DC-ECoG- und rCBF-Werte mit den Daten aus vorhergehenden Veröffentlichungen (Dreier et al., 2002a) vergleichbar sind. Erwartungsgemäß traten in der Kontrollgruppe (n=3) der Serie 3, in welcher nur das Lösungsmittel Essigsäure in den Konzentrationen $10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ in aCSF topisch appliziert wurde, keine SDs auf. Interessanter Weise zeigte auch die Senkung des rCBF durch die Endothelin-induzierte Vasokonstriktion vor der ersten SD keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden ETs (Wilcoxon Signed Rank Test; $P = 1,0$), jedoch unterschieden sich beide Peptide signifikant in der Dauer bis zum Auftreten der ersten SD (siehe Abschnitt 3.5.2 auf der nächsten Seite).

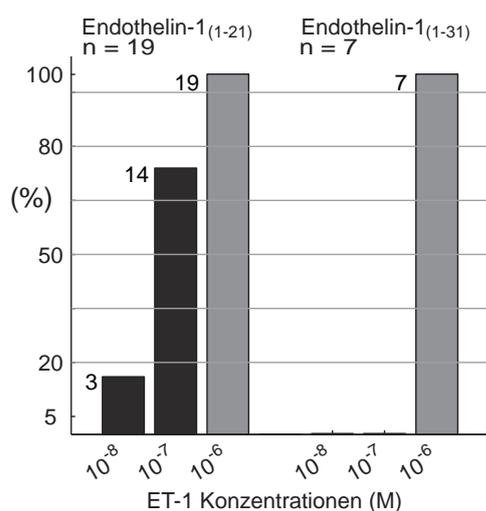


Abbildung 3.9: Potenz der ETs

Der Vergleich zwischen den Schwellenwert-Konzentrationen der SD-Induktion von ET-1₍₁₋₂₁₎ (Säulen rechts) und ET-1₍₁₋₃₁₎ (Säule links) deutet auf einen geringeren Effekt von ET-1₍₁₋₃₁₎ hin. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($P < 0,001$; zweiseitiger Fisher-Exakt-Test). Die Lösungsmittelkontrollen (n = 3) zeigten keine SDs.

	ET-1 ₍₁₋₂₁₎ n = 19	ET-1 ₍₁₋₃₁₎ n = 7
DC-ECoG (mV)	3,5 (2,8–5,3)	3,8 (3–4,4)
DC-ECoG-Dauer (s)	73 (64–95)	97 (83–139)
rCBF vor SD (%)	89,4 (77,5–113,5)	91,2 (85,6–97,5)
Hyperämie (%)	208 (143,5–233,9)	179,1 (168,3–184,6)
rCBF-Dauer (s)	86 (78–98)	93 (84–108)

Tabelle 3.6: Parameter der ersten SD unter ET

Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf DC-ECoG- und rCBF-Veränderungen sowie deren zeitlichen Verlauf (Wilcoxon Signed Rank Test) zwischen ET-1- und ET-1₍₁₋₃₁₎-induzierten SDs beobachtet werden. In beiden Gruppen traten ebenfalls Abnahmen (Depressionen) der hochfrequenten ECoG-Aktivitäten auf.

3.5.2 ET-1₍₁₋₂₁₎ führt in nanomolaren Lösungen häufiger zu SDs als ET-1₍₁₋₃₁₎

In der Literatur wurde gezeigt, dass ET-1₍₁₋₂₁₎ in einer Konzentration von $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ SDs auslöst (Dreier et al., 2002a). Ich untersuchte drei stufenweise ansteigende Konzentrationen von ET-1 ($10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ in aCSF) auf ihre Potenz in der Auslösung von SDs in der ET-1-Gruppe (n = 19) der Serie 2. Die aufeinander folgenden topischen Applikationen der drei ET-1-Lösungen für jeweils 1 h führten in allen Tieren zu SD. Dabei zeigten drei Tiere (15,8 %) dieser Gruppe SDs unter allen drei Konzentrationen wohingegen elf Tiere (57,9 %) erst unter der mittleren und fünf (26,3 %) nur unter der höchsten Dosis von $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ SDs entwickelten.

Im Gegensatz dazu löste ET-1₍₁₋₃₁₎, das in den gleichen drei Verdünnungsstufen und unter den gleichen Bedingungen appliziert wurde, nur in der höchsten Dosis von $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ SDs aus und ließ somit eine schwächere Potenz vermuten. Da insbesondere in kardiovaskulären Funktionen eine niedrigere Potenz für ET-1₍₁₋₃₁₎ beschrieben wurde (Suzaki et al., 2003), überprüfte ich diese Beobachtung statistisch. Dazu wurde eine nötige Schwellenwert-Konzentration der ETs von unter $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ zur Auslösung der ersten SD als kategorische Variable definiert, die den Wahrheitswert „1“ annimmt, wenn die erste SD unter den Verdünnungen $10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und/oder $10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ auftrat. Die Testung ergab einen signifikanten Unterschied ($P < 0,001$; zweiseitiger Fisher-Exakt-Test) zwischen den Verteilungen und unterstützt somit die Möglichkeit einer tatsächlich unterschiedlichen Potenz beider strukturell verwandter Peptide in der Induktion von SDs.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 BBB-Auswertung

4.1.1 Abhängigkeit ET-1-induzierter SDs von der BBB-Integrität

Hypothese A, dass ET-1 SDs über eine BBB-Öffnung induziert, welche Serumkomponenten den direkten Kontakt zu Neuronen ermöglicht, wird von den Ergebnissen meiner Arbeit nicht unterstützt: Die topische Applikation von $2 \frac{mmol}{L}$ DHC führt zu einer frühzeitigen, lokalen BBB-Öffnung (Seiffert et al., 2004). Dies konnte ich anhand der lokalen Evans-Blue-Extravasation in das Hirngewebe, mithilfe des von mir entwickelten Algorithmus zeigen. Jedoch traten, trotz der signifikanten lokalen BBB-Öffnung in Serie 1, keine SDs auf. Eine BBB-Öffnung allein führt somit nicht unbedingt zu SD-Entstehung. Gemeinsam mit meinen Beobachtungen aus Serie 2, dass ET-1 keine frühzeitige Evans-Blue-Permeabilität der BBB verursacht, bzw. dass ET-1-induzierte SD ohne nachweisbare BBB-Öffnung auftreten kann, ist die Hypothese A eher unwahrscheinlich.

Es gibt verschiedene Hinweise in der Literatur, die eine SD-Entstehung an der BBB befürworten: Beispielsweise kann ET-1 in akuten Hirnschnitten, welche keine intakte BBB aufweisen, keine SDs induzieren. Diese Beobachtung stellt jedoch keinen indirekten Nachweis für die Beteiligung der BBB dar, denn ein wesentlicher Aspekt von Hirnschnitt-Experimenten ist die fehlende Blutzirkulation, wodurch anderen Eigenschaften von vaskularisiertem Gewebe *in vivo*, wie die physikalischen Auswirkungen von Scherkräften auf das Endothel oder Vasokonstriktion, ebenso fehlen. Eine weitere Studie zeigt, dass ET-1-induzierte SDs über den ET_A -Rezeptor ausgelöst werden (Kleeberg et al., 2004).

Dieser Fakt schließt die SD-Vermittlung über die BBB nicht aus, es gewinnt jedoch die vasokonstriktorische Wirkung des ET_A -Rezeptors im Kontext meiner Ergebnisse mehr an Bedeutung in der SD-Auslösung durch ET-1. Es ist somit wesentlich wahrscheinlicher, dass ET-1 SD ischämiebedingt auslöst und die BBB-Störung als spätere Folge der Ischämie und/oder der SD auftritt.

4.1.2 DC-Potenzialänderungen und BBB-Integrität

Hypothese B, dass die mit Hyperkapnie assoziierten DC-Shifts durch Potenzialänderungen an der intakten BBB entstehen, konnte in dieser Arbeit nicht verifiziert werden: Die DC-Antworten auf wiederholte Hyperkapnie-Manöver in meinen Experimenten sind mit Daten aus der Literatur (Lehmenkühler et al., 1999) vergleichbar, und entwickelten auch nach der BBB-Öffnung durch topisch appliziertes DHC in Serie 1 keine signifikanten Unterschiede hierzu. Würde der DC-Shift während Hyperkapnie tatsächlich, wie von Lehmenkühler et al. (1999) vermutet, von der BBB-Integrität abhängig sein, müsste eine Unterbrechung der BBB die DC-Antwort auf Hyperkapnie verhindern oder zumindest verändern, da dann der Potenzialaufbau über die BBB nicht mehr möglich wäre. Da jedoch keine Veränderungen der Hyperkapnie-Antworten nach BBB-Öffnung in meinen Experimenten stattfanden, scheint es höchst unwahrscheinlich, dass die positiven DC-Shifts während Hyperkapnie in der Ratte eine Potenzialänderungen an der intakten BBB repräsentieren.

Es wäre jedoch möglich, dass trotz Permeabilität der BBB für Makromoleküle, wie dem Evans-Blue-Albumin-Komplex, noch immer eine Selektivität für kleine Ionen (z.B. Na^+ , K^+) aufrecht erhalten werden kann und die BBB somit doch für die Entstehung des DC-Shifts bzw. der Potenzialänderungen während Hyperkapnie verantwortlich ist. Aus dieser Vermutung könnte man weiterhin die wichtige Erkenntnis schlussfolgern, dass eine BBB-Permeabilität für Makromoleküle nicht unbedingt eine Durchlässigkeit für kleinere Ionen bedeuten muss. Die Ursache dafür könnte in der unterschiedlichen Nutzung der para- und transzellulären Passagewege der BBB durch die Moleküle und Ionen liegen.

DC-Shifts durch DHC

Während der DHC-Applikation in der Verumgruppe der Serie 1 trat ein positiver DC-Shift auf. Zum gleichen Zeitpunkt (10 min nach Evans-Blue-Gabe) konnte in der Kontrollgruppe (ohne DHC) eine signifikant kleinere positive DC-Veränderung beobachtet werden, sodass der DC-Shift der Verumgruppe zumindest teilweise auf DHC zurückzuführen sein könnte. Dies lässt vermuten, dass eine BBB-Öffnung zu einer DC-Potenzialverschiebung führen kann.

Nita et al. (2004) berichteten sogar von einem starken, anhaltenden Anstieg des DC-Potenzials unter intrakarotidaler DHC-Applikation und schlussfolgerten daraus eine Beteiligung der BBB an der DC-Potenzialentstehung. Jedoch erinnert die von den Autoren in diesem Kontext veröffentlichte Abbildung in Form und Amplitude des DC-Potenzials an anoxische Depolarisationen (Dreier et al., 2006) und wäre somit nicht der BBB-Öffnung durch DHC sondern eher der konzentrierten intrakarotidalen Applikation des starken Detergenz in der Studie dieser Arbeitsgruppe zuzuschreiben.

Aufgrund der Beobachtung, dass der positive DC-Shift ebenfalls in der Kontrollgruppe auftrat, könnte dieser zunächst auf die BBB-Öffnung zurückgeführte Effekt auch andere Ursachen haben: Er könnte in meinen Experimenten z.B. als ein Artefakt durch das kurz zuvor applizierte Evans Blue interpretiert werden. Denn der blaue Farbstoff reagiert in Lösung sauer und senkte so wahrscheinlich kurzzeitig den intrakortikalen pH-Wert. (Der hier implizierte enge Zusammenhang zwischen DC-Potenzialen und dem extrazellulären pH-Wert wird in Abschnitt 4.2 auf Seite 64 noch ausführlicher diskutiert.) Die der Evans-Blue-Gabe nachfolgende DHC-Applikation und die dadurch bedingte BBB-Öffnung in der Verumgruppe könnten einen Evans-Blue-assoziierten DC-Shift dann noch etwas verstärkt haben, da sich der blaue Farbstoff nach der BBB-Öffnung zusätzlich auch extravasal ansammeln konnte. Der hier beobachtete positive DC-Shift könnte somit entweder auf eine tatsächliche Beteiligung der BBB an der Entstehung bestimmter DC-Shifts hinweisen oder er stellt eine Evans-Blue-induzierte Potenzialänderung dar, welche durch die BBB-Öffnung verstärkt wurde.

Beeinflussung des rCBF durch BBB-Öffnung

In der Verumgruppe trat ein langsamer persistierender rCBF-Anstieg auf, der zeitlich mit dem Beginn der DHC-Gabe zusammenzufallen schien. Jedoch stieg der rCBF auch in der Kontrollgruppe an und unterschied sich in diesem Anstieg nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Somit haben die Öffnung der BBB oder eine direkte DHC-Wirkung höchst wahrscheinlich keinen Einfluss auf diesen rCBF-Anstieg. Eventuell ist dieser langsame persistierende Anstieg einer durch Volumengabe (u.a. *NaCl* und Evans Blue) bedingten leichten systemischen Hypertonie zuzuschreiben.

Burst-Suppression-Muster

Das Burst-Suppression-Muster im EEG ist durch (i) Phasen ohne kortikale Aktivität (isoelektrische Linie im EEG), und (ii) dem periodischen Auftreten von hohen, spitzen Amplituden niedriger Frequenz charakterisiert (Swank and Watson, 1949). Burst Suppression tritt unter anderem während Koma, Anästhesie, Hypoxie und verschiedenen Intoxikationen auf.

Das während Hyperkapnie im DC-ECoG meiner Experimente zu beobachtende Burst-Suppression-Muster, stellt eine CO_2 -bedingte, verminderte Nervenzellaktivität dar. Sie entsteht vermutlich durch die schon von Lehmenkühler and Pöppelmann (1989) beschriebene Hyperpolarisation der Neurone während Hyperkapnie und durch die konsekutive pH-Wertsenkung.

Diese Beobachtung könnte wichtig für ein Kalibrierungsverfahren des BOLD (**B**lood-**O**xygenation-**L**evel-**D**ependent) -Kontrasts in der funktionellen MRT (fMRT) sein. In der fMRT nutzt man die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften von oxygeniertem und desoxygeniertem Blut, um regionale Blutflussänderungen sichtbar zu machen, welche auf einen erhöhten Stoffwechsel durch neuronale Aktivität zurückgeführt werden. Davis et al. (1998) führten eine Formel zur Berechnung von Änderungen der Rate des zerebralen Sauerstoffverbrauchs ($CMRO_2$; cerebral rate of oxygen consumption) aus CBF- und BOLD-Signaländerungen (δS) während Stimulation ein:

$$\delta S(\%) = A(1 - nCBV^{\alpha-\beta} \times nCMRO_2^\beta) \quad (4.1)$$

Der Exponent α setzt das zerebrales Blutvolumen (CBV) und den CBF im sogenannten „steady state“ in Beziehung zueinander und wurde experimentell mit $\alpha = 0,38$ in Rhesusaffen bestimmt (Grubb et al., 1974). Die Terme $nCBV$ und $nCMRO_2$ stehen für die zu ihren jeweiligen Ausgangswerten normalisierten CBV- bzw. $CMRO_2$ -Werten. Der Parameter β repräsentiert die Abhängigkeit der Transversalrelaxationsrate von der Konzentration des desoxygenierten Bluts und wurde mit $\beta = 1,5$ bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla berechnet (Davis et al., 1998). Die Konstante A stellt die maximale theoretisch mögliche BOLD-Signaländerung dar, für deren Festlegung (Kalibrierung) die CBF- und BOLD-Änderungen während eines Stimulus aufgenommen werden müssen, welcher trotz unbeeinflusster neuronaler Aktivität und Stoffwechsel die CBF- und BOLD-Signale ändert.

Zappe et al. (2008) vermuteten, dass die meist zur BOLD-Kalibrierung eingesetzte Hyperkapnie-Induktion kein solcher iso-metabolischer Stimulus ist. Die Autoren zeigten in ihrer Studie, dass die spontane neuronale Aktivität schon durch moderate Hyperkapnie signifikant reduziert wird. Diese Beobachtungen konnte ich anhand meiner Ergebnisse auch für Ratten bestätigen. Zappe et al. (2008) schlugen deshalb die alternative Induktion von Hyperoxie zur BOLD-Kalibrierung vor, da diese Methode nicht nur einen größeren Toleranzbereich im Vergleich zu Hyperkapnie aufweist, sondern auch unabhängig vom relativ niedrigen Signalrauschverhältnis von CBF-Messungen ist (Chiarelli et al., 2007).

4.1.3 Keine akute BBB-Öffnung nach SD-Induktion

Bei der Testung der drei Modelle zur frühen BBB-Öffnung, ließ sich die **Hypothese C**, dass SD allein eine frühe BBB-Öffnung nach weniger als drei Stunden induziert, nicht bestätigen: Es konnten weder bei den ET-1- noch bei den K^+ -induzierten SDs der Serien 1 und 2 akute BBB-Störungen mit der hier verwendeten histochemischen Methode detektiert werden. Als Positivkontrolle diente dabei die starke lokale BBB-Öffnung durch DHC (Seiffert et al., 2004), welche sich nach weniger als drei Stunden durch eine Evans-Blue-Extravasation zeigte. Dass SD ohne eine nachweisbare frühe Öffnung der BBB auftritt, lässt eine verzögerte und somit eher indirekte BBB-Störungen durch SD vermuten. In meinen Experimenten könnte jedoch auch eine BBB-Öffnung mit fehlender früher Permeabilität für Makromoleküle nach SD aufgetreten sein.

Keine akute BBB-Öffnung durch ET-1

Weiterhin konnte ich zeigen, dass ET-1 keine akute BBB-Öffnung verursacht. Es ist zu vermuten, dass die in der Literatur beschriebene BBB-Öffnung erst später als drei Stunden nach ET-1-Applikation auftritt und dann vermutlich eine Folge der induzierten Ischämie ist. In Übereinstimmung hierzu, beobachteten Narushima et al. (1999) eine BBB-Öffnung durch ET-1 in Hunden erst nach 48 Stunden. Stanimirovic et al. (1993) beschrieben, im Gegensatz dazu, eine Durchlässigkeit von humanen zerebralen Endothelzellkulturen für schweres Chrom (^{51}Cr) und Laktatdehydrogenase schon eine Stunde nach ET-1-Gabe. Jedoch verwendeten die Autoren dabei recht hohe Konzentrationen von bis zu $10 \frac{\mu mol}{L}$ ET-1 *in vitro*, sodass die Ursachen und Zeitangaben der endothelialen Permeabilitätserhöhung nicht unbedingt mit meinen *in vivo*-Experimenten vergleichbar sind.

Meine Ergebnisse stehen außerdem im Widerspruch zu einer weiteren Studie, in welcher gezeigt wurde, dass Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) zur Entstehung von BBB-Durchlässigkeit, Ödembildung und undichten Gefäßen nach mechanisch ausgelöster SD in Ratten beiträgt (Gursoy-Özdemir et al., 2004). Laut dieser Studie begann die MMP-9-Aktivierung schon 15–30 Minuten nach SD-Induktion in der Matrix kortikaler Blutgefäße und ca. drei Stunden später auch in den Nervenzellen. Die Autoren berichteten eine frühe BBB-Öffnung drei Stunden nach SD-Induktion, wobei die BBB-Permeabilität mithilfe der Evans-Blue-Extravasation nach der Methode von Katayama et al. (1978) quantifiziert wurde.

Es ist möglich, dass meine Methode der BBB-Auswertung nicht sensitiv genug ist, um zeitige, sehr geringfügige BBB-Durchlässigkeiten zu detektieren. Auf der anderen Seite verwendete ich eine wesentlich weniger invasive

Technik der SD-Induktion mit K^+ -Tropfen ($150 \frac{\mu\text{mol}}{L}$) in einem etwas entfernten Stimulationsfenster, sodass tatsächlich nur die Wirkung von SD auf die BBB in gesundem Gewebe getestet wurde. Die von Gursoy-Özdemir et al. (2004) gewählte Nadelstichverletzung (pin-prick) könnte das Auftreten sowie den zeitlichen Verlauf der BBB-Öffnung beeinflusst haben. Anhand meiner Ergebnisse würde ich darauf schließen, dass die frühzeitige BBB-Öffnung durch mechanisch ausgelöste SD *in vivo* in der Studie von Gursoy-Özdemir et al. (2004) eher durch die Kombination der Verletzung mit SD als durch SD allein bedingt wurde.

4.2 DC-Potenzial- und pH-Wertänderungen während SD

4.2.1 ET-1-induzierte pH-Wert-Senkung vor SD liefert Hinweise auf Ischämie

Hypothese D, dass vor ET-1-induzierter SD, ähnlich wie bei Depolarisationen in der Penumbra fokaler zerebraler Ischämien, ein langsamer pH-Abfall auftritt, konnte in der Serie 2 meiner Experimente bestätigt werden: Die kontinuierliche extrazelluläre pH-Wert-Aufzeichnung mithilfe pH-sensitiver Mikroelektroden während topischer ET-1-Applikation zeigte für Ischämie typische Veränderungen des kortikalen extrazellulären pH-Werts. Zusätzlich lieferten die Kameraaufzeichnungen der Serie 2 ebenfalls Hinweise auf eine Vasokonstriktion der Arterien während ET-1-Gabe.

Diese Beobachtung konnten wir in der Studie **Oliveira-Ferreira et al. (2010)**, mithilfe eines neuen Matlab[®]-Auswertungsprogramms für Kameraaufzeichnungen des OP-Mikroskops dann auch quantitativ bestätigen. Dabei wurden im gleichen Versuchsaufbau die Durchmesser von großen, mittleren und kleinen arteriellen Widerstandsgefäßen vor ET-1-Gabe mit Kamerabildern kurz vor der ersten SD verglichen. Wir zeigten in genannter Studie, dass signifikante Verengungen von mittleren und kleinen pialen Arteriolen den ET-1-induzierten SDs, gemeinsam mit einer kortikalen rCBF-Senkung im ET-1-überspülten Fenster vorausgehen (**Oliveira-Ferreira et al., 2010**). Im Zusammenhang mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass

- (i) vor den in der Penumbra fokaler zerebraler Ischämien auftretenden Depolarisationen (Nedergaard and Hansen, 1993) genau wie vor ET-1-induzierten SDs (Hansen and Olsen, 1980; Dreier et al., 2002c) eine Steigerung der $[K^+]_o$ auftritt;

- (ii) vor diesen Depolarisationen in der Penumbra ein stetiger, langsamer pH-Abfall stattfindet (Taylor et al., 1996) und
- (iii) die Gefäßmorphologie während ET-1-induzierter SD Vasokonstriktionen der Arterien zeigt (**Oliveira-Ferreira et al., 2010**);

entstehen ET-1-induzierte SDs vermutlich als Folge einer ET-1-induzierten Ischämie. Die in der Penumbra fokaler zerebraler Ischämien auftretenden Depolarisationen sollten demnach ebenfalls als SDs bezeichnet werden.

4.2.2 Weitere Hinweise auf Ischämie

Hypothese E, dass ET-1-induzierte und durch K^+ ausgelöste SDs ähnliche Entstehungsmechanismen besitzen, wurde von meinen Ergebnisse nicht unterstützt: ET-1 induzierte SDs in Serie 2 zeigten signifikant längere DC-Shifts als die durch K^+ ausgelösten SDs der Kontrollgruppe, welche in physiologischem Gewebe wanderten. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist, dass ET-1 über eine Ischämie zur Beeinträchtigung energieabhängiger Prozesse führt, die für die Repolarisation nach SD erforderlich sind. Zum Beispiel ist vermutlich die Funktion der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -Pumpe gestört, die eine herausragende Bedeutung für die Repolarisation besitzt (LaManna and Rosenthal, 1975).

Weiterhin fehlt bei K^+ -induzierten SDs der extrazelluläre pH-Wert-Abfall vor dem Auftreten der ersten SD, welcher in ET-1-Anwesenheit auf eine Laktatansammlung durch den anaeroben Stoffwechsel bei Ischämie hinweist. Interessanterweise konnte während des SD-induzierten rCBF-Anstiegs unter ET-1 eine vorübergehende, langsame Alkalisierung beobachtet werden, welche ebenfalls bei SD in physiologischem Gewebe fehlt. Die vorübergehende Alkalisierung entsteht vermutlich dadurch, dass die vorbestehende ischämische Laktatazidose durch den SD-induzierten rCBF-Anstieg kurzzeitig vermindert wird. Es konnte hier gezeigt werden, dass durch ET-1 und durch erhöhtes K^+ induzierte SDs sich grundsätzlich in ihren pH-Antworten und damit höchst wahrscheinlich auch in ihren Entstehungsmechanismen unterscheiden. Die Ergebnisse lieferten ebenfalls weitere Hinweise auf die ischämische Genese der ET-1-induzierten SD.

4.3 ET-1₍₁₋₃₁₎

4.3.1 ET-1₍₁₋₃₁₎ induziert SD

Hypothese F, dass ET-1₍₁₋₃₁₎ typische SDs *in vivo* in ähnlicher Weise wie ET-1 induziert, wird durch die Resultate der Serien 2 und 3 gezeigt:

Alle mit ET-1₍₁₋₃₁₎ behandelten Tiere entwickelten typische SDs, jedoch erst in signifikant höheren Konzentrationen als ET-1. Da ET-1₍₁₋₃₁₎ somit weniger potent SD auslöst als ET-1, könnten es eine Rolle für neue Behandlungsalternativen des Vasospasmus nach aSAB spielen. Möglicherweise besitzt ET-1₍₁₋₃₁₎, ähnlich wie ET-1, akute, prognostisch ungünstige Effekte, wie die vasokonstriktorische Wirkung, und subakute positive Auswirkungen auf z.B. Entzündung oder Angiogenese nach der akuten Ischämie (Cui et al., 2001).

Daher wäre es wichtig, in zukünftigen Studien zu untersuchen, ob positive und negative Effekte von ET-1 und ET-1₍₁₋₃₁₎ miteinander korrelieren oder ob ET-1₍₁₋₃₁₎ eventuell sogar eine relativ stärkere positive Wirkung aufweist. Falls diese Vermutung bestätigt würde, wäre es ein interessanter Ansatz, den ET-1-Stoffwechsel nach aSAB medikamentös, mithilfe von Inhibitoren der Enzyme ECE-1 und NEP 24.11 zu beeinflussen, um ungünstige ET-1-Effekte so gering wie möglich zu halten und gleichzeitig eine wahrscheinlich notwendige Grundaktivierung der ET_A-Rezeptoren durch ET-1₍₁₋₃₁₎ zu erhalten (Jorks et al., 2011a). In dieser Hinsicht ist es besonders interessant, dass der negative Effekt SD zu induzieren, hier für ET-1₍₁₋₃₁₎ wesentlich schwächer ausgeprägt war als für ET-1.

Außerdem war die Zeit bis zur ersten SD nach ET-1₍₁₋₃₁₎-Applikation signifikant länger als bei ET-1, obwohl sich die rCBF-Werte vor den ersten SDs in beiden Versuchsgruppen nicht unterschieden. Es scheint daher, als ob ein bestimmter Schwellenwert des rCBF existiert, ab welchem beide ETs SD auslösen bzw. SDs allgemein ausgelöst werden.

4.4 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

4.4.1 Multifaktorielle DC-Shift-Entstehung

Für die Entstehung des DC-Potenzials während SD gibt es drei wichtige Theorien, die im Folgenden kurz erläutert werden:

- **Gliale Pufferung:** Astrozyten versuchen, die neuronale Aktivität zu stabilisieren bzw. wiederherzustellen, indem sie den pH-Wert in engen Schranken regulieren. Dies legt eine Beteiligung der Gliazellen an der DC-Potenzialentstehung nahe, wobei vermutlich die vermehrt vaskulär und astrozytär im Gehirn vorkommende Karboanhydrase eine wichtige Rolle spielt. Da DC-Antworten auf SD auch auftreten, wenn die elektrische Hirnaktivität durch z.B. Narkotika schon reduziert ist, wurde früher vermutet, dass das DC-Potenzial glial und das AC-Potenzial neuronal generiert werden (Lehmenkühler et al., 1999).

- **Neuronale Potenzialverschiebungen:** Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wird die ursprünglich für Signalverluste in telegrafischen Unterseekabeln entwickelte Kabeltheorie, auch als mathematisches Model für die elektrischen Ströme in Nervenfasern verwendet.
- **Potenzial über der intakten BBB:** Die BBB erhält durch ihre restriktive Funktion und ihre aktiven Ausgleichmechanismen ein elektrisches Potenzial aufrecht, welches mit der DC-Potenzialentstehung assoziiert wird.

DC-Potenzialänderungen während SD

Es ist bekannt, dass neuronale Massendepolarisationen während SD und epileptischer Aktivität mit DC-Potenzialänderungen assoziiert sind (Dietzel et al., 1989). Diese sogenannten DC-Shifts können sowohl *in vivo* als auch in Hirnschnitten, welche keine intakte BBB mehr besitzen, beobachtet werden (Dreier and Heinemann, 1991; Dreier et al., 2002a). Daher ist es wahrscheinlicher, dass das DC-Potenzial während SD im Hirnparenchym generiert wird und nicht an der BBB.

Bestätigend hierzu zeigten Messungen während SD und epileptischer Aktivität unterschiedliche DC-Profile in Abhängigkeit von der Messtiefe der Elektroden und wiesen so auf die lokale Entstehung des DC-Potenzials im Hirnparenchym hin (Canals et al., 2005). Weiterhin zeigten kortikal und epikranial aufgezeichnete DC-Potenzialänderungen während SD und epileptischer Aktivität in Ratten die gleiche Polarität (Lehmenkühler et al., 1991). Aktuell wurde dies auch für SDs in Patienten bestätigt, welche sowohl im an der Hirnoberfläche gemessenen ECoG, als auch im gleichzeitig aufgezeichneten konventionellen EEG mit einem negativen DC-Shift assoziiert waren (Drenckhahn et al., 2012).

DC-Potenzialänderungen während HC

Hyperkapnie war in meinen *in-vivo*-Experimenten, im Gegensatz zu SD, mit einem positiven DC-Shift im Neokortex assoziiert. In aktuellen Hirnschnitt-Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurden jedoch negative DC-Shifts als Antwort auf Hyperkapnie nachgewiesen. Dieser Unterschied in der Polarität der DC-Potenzialänderungen befürwortet die Hypothese, dass die schon in früheren *in-vivo*-Studien gemessenen, positiven Hyperkapnie-induzierten DC-Shifts im Kortex von Ratten, Hasen, Ziegen und Hunden (Woody et al., 1970) an der BBB generiert werden.

Die Entstehung des mit Hyperkapnie assoziierten DC-Shifts an der Grenzfläche zwischen Blut und Gehirn wird auch von anderen Studien unterstützt,

welche zeigten, dass diese DC-Shifts ein von der Messtiefe unabhängiges, homogenes Profil im Kortex und der weißen Substanz aufweisen (Amzica, 2002; Caspers et al., 1987; Wurtz and O’Flaherty, 1967; O’Leary and Goldring, 1964). Damit existiert ein klarer Unterschied zu den von der jeweiligen kortikalen Schicht abhängigen DC-Gradienten während SD oder epileptischer Aktivität.

Lehmenkühler et al. (1999) beschrieben, dass Hyperkapnie-induzierte DC-Shifts in Ratten epikranial gemessen eine genau entgegengesetzte (negative) Polarität im Vergleich zu intrakortikal oder epidural gemessenen, positiven Potenzialänderungen hatten, welche auch in meinen Experimenten auftraten. Anhand dieser Resultate scheint der DC-Shift während Hyperkapnie, im Gegensatz zu SD, keinen neuronalen Ursprung zu haben.

Dennoch könnten auch die Hyperkapnie-assoziierten DC-Shifts durch Neurone generiert werden: Dazu müsste, in Anlehnung an die Kabeltheorie, die beobachtete pH-Wertabnahme im Kortex ungleichmäßig verteilte Zonen neuronaler Hyperpolarisation hervorrufen, welche dann intrazelluläre und transmembrane Ströme induzieren und so zu DC-Shifts führen.

Die **Kabeltheorie** für Nervenfasern versucht die orts- bzw. entfernungs- und zeitabhängigen Potenzialveränderungen in Nervenfasern, insbesondere in Dendriten zu berechnen. Sie berücksichtigt dabei den transversalen Stromverlust, welcher unter anderem durch

- (i) den Längswiderstand des Zytosols,
- (ii) den endlichen Widerstand der Zellmembran, der einen Austausch zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum begünstigt, sowie
- (iii) durch die Membrankapazität, die einen Strom zur Membran hin erzeugt, entsteht.

Nach der Kabeltheorie würde ein Strom innerhalb der Pyramidenzellen zu den stärker hyperpolarisierten Regionen fließen. Er würde außerdem die Zellen an Stellen mit mehr pH-Wert-abhängigen K^+ -Kanälen verlassen und könnte an weniger hyperpolarisierten Stellen wieder in die Zellen eintreten, da dort weniger dieser K^+ -Kanäle vorhanden sind, welche bei Azidose öffnen. Der Nettostrom aus den Zellen würde dann ein dynamisches jedoch stabiles positives Potenzial in den äußeren Anteilen der hyperpolarisierten Zellmembranen produzieren, welches in der Summe als positiver extrazellulärer DC-Shift gemessen werden könnte. Ein analoger Mechanismus inhomogener neuronaler Membranpolarisation stellt die Basis für z.B. die extrazellulären postsynaptischen Feldpotenziale oder für den negativen DC-Shift während SD dar (Herreras, 1990; Canals et al., 2005).

Für den Hyperkapnie-assoziierten DC-Shift ist diese Theorie jedoch so nicht anwendbar. Wie oben erwähnt, ist Hyperkapnie in verschiedenen Studien mit einem homogenen intrakortikalen DC-Profil assoziiert, welches keine zonalen Gradienten aufweist (Amzica, 2002; Caspers et al., 1987; Wurtz and O’Flaherty, 1967; O’Leary and Goldring, 1964).

Astrozyten könnten, im Sinne eines lokalen **glialen Pufferungsmechanismus**, für vor allem K^+ -Ionen, ebenfalls zu der extrazellulären DC-Potenzialänderung beitragen (Dietzel et al., 1989). Es wird vermutet, dass Astrozyten K^+ am Ort hoher Konzentration aufnehmen, mithilfe interzellulärer elektrischer Verbindungen (gap junctions), weiterleiten und an entfernter Stelle wieder an den Extrazellulärraum abgeben. Zudem soll die K^+ -Freisetzung aktivierter Neurone, bzw. die Angleichung der intra- und extrazellulären K^+ -Konzentrationen eine Depolarisation lokaler Astrozyten verursachen (Dietzel et al., 1989). Zum Potenzialausgleich würde ein Strom entstehen, der innerhalb und zwischen benachbarten Astrozyten vom Zentrum der neuronalen Depolarisation weggeleitet wird. Der Verlust positiver Ladung im Depolarisationszentrum würde dann zu einem negativen, extrazellulär messbaren DC-Shift und zu einem positiven DC-Shift in der Peripherie führen.

Lehmenkühler et al. (1985) nahmen an, dass Neurone die Ursache der lokalen $[K^+]_o$ -Erhöhung sind, da der K^+ -Anteil am extrazellulären Gesamtvolumen unbeeinflusst blieb und die K^+ -Permeabilität der BBB während Hyperkapnie sank. Ähnlich den *in-vivo*-Ergebnissen von Lehmenkühler and Pöppelmann (1989), war Hyperkapnie in meinen *in-vivo*-Experimenten und in aktuellen Hirnschnitt-Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit einem geringen Anstieg der $[K^+]_o$ assoziiert. In Übereinstimmung mit der Theorie der glialen Pufferung eines neuronalen Kaliumausstroms (i) zeigten Lehmenkühler and Pöppelmann (1989), dass kortikale Gliazellen während Hyperkapnie depolarisieren, und (ii) Hirnschnitt-Experimente unserer Arbeitsgruppe demonstrierten eine kleine negative DC-Verschiebung während Hyperkapnie.

Umso überraschender ist das Ergebnis meiner Studie, in welcher die BBB durch DHC für Makromoleküle geöffnet wurde, jedoch der positive Hyperkapnie-assoziierte DC-Shift nach dieser BBB-Öffnung keine Veränderung zeigte, obwohl alle Hinweise für seine Entstehung an der intakten BBB sprechen. Weiterhin fand ich keine erhöhten Basiswerte der $[K^+]_o$ nach topischer DHC-Applikation: Sowohl im Vergleich von verschiedenen Zeitpunkten vor und nach DHC-Gabe als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe änderte sich die $[K^+]_o$ nicht signifikant. Wenn tatsächlich ein nach BBB-Öffnung auftretender Elektrolytausgleich zwischen Serum und Hirnparenchym stattfand, müsste jedoch auch ein Anstieg der $[K^+]_o$ zu beobachten sein, da die K^+ -Konzentration im Serum höher als im Liquor ist (Bondoli et al., 1981).

Diese Beobachtungen führen zu der hochinteressanten jedoch kontroversen Schlussfolgerung, dass die elektrische Schranke zwischen Blut und Hirngewebe nicht unbedingt mitzerstört wird, wenn die BBB-Permeabilität für Makromoleküle wie Albumin erhöht wird, obwohl die dabei wichtigen Ionen wesentlich kleiner sind.

Es gibt zwei Wege, die durch die BBB normalerweise versperrt sind, einen transzellulären und einen parazellulären, wobei der parazelluläre Weg durch Zonulae occludentes verschlossen wird und bei Öffnung den Austausch von kleinen Molekülen, wie Kalium erlauben würde. Dass sich die $[K^+]_o$ nach DHC-Gabe nicht änderte, zeigt, dass mit großer Wahrscheinlichkeit nur der transzelluläre Weg für Makromoleküle durch DHC geöffnet wird, weshalb eine Evans-Blue-Extravasation auftritt, während der parazelluläre Weg unter DHC vermutlich geschlossen bleibt.

Alternativ könnte es sein, dass Kalium zwar vom Serum in das Interstitium gelangt, aber die Astrozyten es so effizient abpuffern, dass es zu keiner Ionenkonzentrationsänderung kommt. Das ist jedoch eher unwahrscheinlich, da es einer gewissen glialen Reaktionszeit auf den $[K^+]_o$ -Anstieg bedarf und so wenigstens eine kurze Schwankung des $[K^+]_o$ messbar sein müsste. Es ist ebenfalls sehr unwahrscheinlich, dass die DC-Messungen an Stellen im Kortex stattfanden, die nicht vom DHC erreicht wurden. Denn in diesem Fall hätte mindestens eine Verminderung der positiven Hyperkapnie-induzierten DC-Änderung auftreten müssen, da mithilfe des neuen Algorithmus gezeigt wurde, dass ein recht großes Areal von der BBB-Öffnung betroffen war. Der fehlende $[K^+]_o$ -Anstieg nach DHC-Gabe konnte auch nicht durch Verdünnungseffekte erklärt werden und lässt somit nur den Schluss zu, dass die BBB unter DHC selektiv für kleine Ionen, insbesondere K^+ , geschlossen blieb.

4.4.2 PH-Wert unter Hyperkapnie

Da in meinen Untersuchungen das DC-Potenzial während Hyperkapnie in seinem Profil und zeitlichen Verlauf sehr gut mit dem extrazellulären pH-Wert korreliert, lässt sich eine direkte Abhängigkeit des DC-Potenzials vom pH-Wert vermuten. Serie 2 dieser Arbeit zeigte, dass *in vivo*, unter erhöhtem pCO_2 der Atemluft, sowohl eine Senkung des arteriellen als auch des extrazellulären, zerebralen pH-Werts stattfindet. In Hirnschnitten wurde ebenfalls eine pH-Wertabhängigkeit der Depolarisationen und Hyperpolarisationen verschiedener Nervenzellschichten unter Hyperkapnie beschrieben (Lehmenkühler and Pöppelmann, 1989).

Zusammenfassend deuten die beobachtete, zeitlich mit dem positiven DC-Shift korrelierende, reversible Verminderung der neuronalen Aktivität (Burst Suppression) und die gleichzeitige extrazelluläre pH-Wert-Senkung um ca.

0,2 pH-Einheiten darauf hin, dass gliale und neuronale Mechanismen Einfluss auf die Entstehung des DC-Potenzials während Hyperkapnie nehmen.

Bezüglich der BBB-Beteiligung an der pCO_2 -abhängigen DC-Shift-Entstehung wäre es interessant, außerdem die mit Hyperkapnie assoziierten pH-Wertänderungen nach BBB-Öffnung durch verschiedene Methoden zu untersuchen und mit den hier vorliegenden Daten zu vergleichen. Spekulativ würde ich keine Änderung für das DHC-Modell erwarten, da es vermutlich nur den transzellulären Weg der BBB beeinflusst, aber möglicherweise könnten Abweichungen auftreten, wenn andere BBB-Modelle beide Wege beeinflussen.

4.4.3 ET-1 und BBB

Stanimirovic et al. (1993) berichteten, dass ET-1 die Endothelpermeabilität in Kulturen humaner zerebraler Kapillarzellen erhöht. Sie beschrieben, dass schon eine Stunde nach ET-1-Gabe eine Durchlässigkeit der Endothelzellkulturen für Chrom (^{51}Cr) und Laktatdehydrogenase auftrat und vermuteten daraufhin, dass dieser ET-1-Effekt durch rezeptorspezifische Aktivierung der Proteinkinase C sowie durch intrazelluläre Kalziummobilisation verursacht wird (Stanimirovic et al., 1993).

Später zeigten Narushima et al. (1999), dass ein intrazisternal applizierter Bolus von 40 pmol ET-1 in Hunden zu einer verstärkten Fluorescein-Permeation in den Liquor cerebrospinalis führt, welche mit einer vorher applizierten Dosis des selektiven ET_A -Rezeptorantagonisten S-0139 verhindert werden konnte (Narushima et al., 1999). Außerdem fanden Matsuo et al. (2001), dass S-0139-Administration die zerebrale Ödembildung und die Albumin-Extravasation in einem Ischämie-Modell der Ratte vermindert, wobei die Ischämie nicht ET-1-induziert, sondern durch Filament-Okklusion der Arteria cerebri media hervorgerufen wurde. Diese Studie impliziert, dass ET-1 generell während fokaler Ischämie ausgeschüttet wird und über den ET_A -Rezeptor an der verzögert auftretenden BBB-Öffnung beteiligt ist (Matsuo et al., 2001). Obwohl in der Literatur mehrfach durch ET-1 verursachte BBB-Störungen beschrieben werden, führten ET-1-induzierte SDs, ebenso wie SDs in physiologischem Gewebe, in meinen Experimenten zu keiner signifikanten frühen BBB-Öffnung.

Meine Ergebnisse zeigten, dass in den ersten Stunden nach topischer ET-1-Applikation keine signifikante BBB-Öffnung stattfindet. Im Zusammenhang mit den oben genannten Beobachtungen (Stanimirovic et al., 1993; Narushima et al., 1999; Matsuo et al., 2001), vermute ich, dass ET-1 die BBB tatsächlich öffnet, aber diese Öffnung zeitlich erst nach der SD-Induktion einsetzt. Die verzögerte BBB-Öffnung durch ET-1 spricht wiederum für eine ischämische BBB-Öffnung, da diese länger braucht, um sich zu entwickeln.

Diese Schlussfolgerung wird durch weitere experimentelle Hinweise unterstützt: Kuroiwa et al. (1985) und Jin et al. (2010) vermuteten, dass zerebrale Ischämie und Reperfusionsschäden dynamische Veränderungen der BBB-Permeabilität induzieren. Initiale, leichte BBB-Veränderungen sollen dabei reversibel und somit weniger schädlich sein. In den genannten Studien schien sich, nach einer Refraktärzeit zwischen einer und fünf Stunden, eine stärkere und persistierende BBB-Störung zu entwickeln, welche eventuell Therapieansätze, wie die Thrombolyse aber auch Nebenwirkungen, wie das vasogene Ödem, negativ beeinflussen könnten und somit ein Ziel für die therapeutische Intervention darstellt (Kuroiwa et al., 1985; Jin et al., 2010).

4.4.4 Spreading Depolarization unter ET-1

Der Vasokonstriktor ET-1 scheint das Gewebe anfälliger für pathologische Prozesse zu machen, da, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dreier et al. (2007), längere SDs unter ET-1 auftreten als in gesundem Gewebe. Die verlängerte SD-Dauer spricht dafür, dass ET-1 eine der Penumbra von Ischämien ähnliche Umgebung schafft (**Oliveira-Ferreira et al., 2010**). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass sich in meinen Experimenten eine BBB-Öffnung zu einem späteren Zeitpunkt (> 3 Stunden) hätte nachweisen lassen, denn die fokale Ischämie ist typischerweise mit einer verzögert auftretenden BBB-Öffnung, nach mehr als drei Stunden, assoziiert (Pluta et al., 1994; Belayev et al., 1996; Kuroiwa et al., 1985). Die fehlende zeitige BBB-Öffnung nach ET-1-Gabe, liefert somit einen weiteren Hinweis dafür, dass die in anderen Studien beobachtete, mit ET-1 assoziierte BBB-Unterbrechung nicht durch direkte ET-1-Wirkung auf die BBB, sondern eher sekundär, durch die ET-1-induzierte Vasokonstriktion und Ischämie entsteht.

Es ist nicht auszuschließen, dass eine geringfügige Änderung der BBB-Permeabilität dem von mir entwickelten Algorithmus entgangen sein könnte. Weiterhin könnte nur eine Permeabilitätserhöhung für kleinere Moleküle, durch z.B. die Zonulae occludentes des parazellulären Wegs, stattgefunden haben, welche anhand der Extravasation des relativ großen Albumin-Evans-Blue-Komplexes nicht nachzuweisen gewesen wäre.

4.4.5 Evans-Blue-Quantifizierung

Evans-Blue-Quantifizierung in der Literatur

In der Literatur findet man quantitative Evans-Blue-Auswertungen meist im Zusammenhang mit Perfusionsfixation und Fluoreszenzmessungen nach chemischer Homogenisierung des Gewebes, denn Evans Blue fluoresziert nach Anregung bei 470 nm oder 540 nm mit einer Emission von 680 nm.

In der Studie von Gursoy-Özdemir et al. (2004) wurden Ratten, 15 min vor SD-Induktion, Evans Blue intravenös verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h und 48 h) wurden dann Gewebeproben entnommen, welche in mehreren Schritten chemisch behandelt und mit aufwändigen Schnittverfahren für die eigentliche Analyse vorbereitet werden mussten (für nähere Beschreibungen siehe auch Katayama et al. (1978); Gursoy-Özdemir et al. (2004) und **Jorks et al. (2011b)**).

Vergleich mit der TBR aus veröffentlichten Daten

Zum Vergleich meiner Resultate mit Ergebnissen von Seiffert et al. (2004) und Gursoy-Özdemir et al. (2004) berechnete ich die jeweiligen TBRs aus den in beiden Studien veröffentlichten Daten. Die TBR-Werte aus meinen eigenen Untersuchungen waren dabei geringfügig niedriger für die jeweiligen Messzeitpunkte und weisen vermutlich auf eine etwas geringere Genauigkeit meiner Methode hin. Ursache hierfür könnte das in allen Tieren, infolge der OP, unterschiedlich stark ausgeprägte Ödem in der Fensterregion sein. Da SD eine zeitabhängige Ödembildung verursacht, könnte die Evans-Blue-Konzentration und somit auch die blaue Intensität durch den Verdünnungseffekt schwächer erschienen sein, und die tatsächliche TBR meiner Experimente würde höher liegen als mit meiner Methode berechnet.

In dieser Untersuchung konnte jedoch gezeigt werden, dass mein neuer semi-quantitativer Algorithmus die nötige Sensitivität besitzt, große Permeabilitätsunterschiede (DHC versus Kontrolle) aufzuzeigen (**Jorks et al., 2011b**). Dabei besteht eine gewisse Unsicherheit in Bezug auf seine Sensitivität gegenüber sehr kleinen Permeabilitätsänderungen der BBB. Vorteile des neuen Algorithmus vor anderen in der Literatur beschriebenen Methoden sind der geringere Arbeitsaufwand, die niedrigeren Kosten sowie die enorme Zeitersparnis. Außerdem wird die gesamte Auswertung, trotz der Notwendigkeit der visuellen Kontrolle und der manuellen Auswahl repräsentativer Schnittbilder, durch den nachfolgenden automatisierten Ablauf wesentlich weniger von menschlichen Fehlern beeinflusst. Es ist geplant, diesen Algorithmus zur Validierung in weitere Studien zu integrieren und mit anderen gängigen Methoden zu vergleichen. Jedoch ist meiner Meinung nach, bei Bedarf einer genauen Quantifizierung, die Methode von Katayama et al. (1978) zu bevorzugen.

4.5 Ausblick

In geplanten nachfolgenden Studien werden die hier untersuchten Theorien zur DC-Entstehung weitergehend betrachtet: vor allem sollen der Einfluss der Dendriten (Canals et al., 2005; Herreras, 2005) und die Bedeutung der Energie- (Hypoglykämie-) sowie der Elektrolytabhängigkeit auf DC-Messungen in Hirnschnitten intensiver untersucht werden. Aufgrund meiner interessanten Ergebnisse zur BBB und der kontroversen Schlussfolgerung über die beiden, relativ unabhängig voneinander beeinflussbaren Passagewege der BBB, könnten in nachfolgenden Arbeiten sowohl weitere BBB-Modelle als auch weitere Nachweismethoden der BBB-Öffnung eingesetzt werden.

Diese Grundlagenuntersuchungen sollen eine Basis für neue therapeutische und diagnostische Strategien nach z.B. aSABs und Hirninfarkten sein, da sich die zerebrale Zirkulation von Ratten und Mäusen nicht prinzipiell von der höherer Spezies unterscheidet und auch viele molekularen Mechanismen auf den Menschen übertragbar sind. In unserer Arbeitsgruppe werden unter anderem auch DC-ECoG-Messungen und gleichzeitige EEG-Ableitungen von SDs beim Menschen untersucht. So können tierexperimentelle Erkenntnisse rasch in klinischen Studien umgesetzt werden. Zum Beispiel ist die COSBID-Studie unserer Arbeitsgruppe die erste multizentrische, klinische Studie, in der untersucht wird, wie sich das Auftreten von SDs bei Patienten nach aSAB auf die Prognose auswirkt.

4.5.1 Klinischer Ausblick

Da SD kein einzelner spezialisierter Prozess ist, sondern als Summenmaß für den drohenden Zelluntergang eines großen Nervenzellverbandes gesehen werden kann, ist sie sowohl für neue Therapiestrategien als auch diagnostisch bedeutsam (Dreier, 2009). Die Messung eines solchen komplexen Summenprozesses, wie z.B. in der ECoG, soll dann idealer Weise zu sinnvollen Therapieentscheidungen am Patientenbett verhelfen.

Da jetzt humane Daten zu DC-Messungen bei SD zur Verfügung stehen, wird vermutlich eine verbesserte zeitliche Einschätzung von klinisch wichtigen Subprozessen möglich. Eventuell könnten dann alle bei Energiemangel beschriebene Schadens- oder Reparaturmechanismen im Kortex in ihrer Beziehung zum Summenphänomen SD eingeordnet werden. Dies wiederum könnte eine praktische Bedeutung für einen zeitlich differenzierten Einsatz von Neuroprotektiva erlangen, da Signale wie z.B. die NMDA-Rezeptoraktivierung, die in der Akutphase zum Zelltod beitragen, in der Regenerationsphase an Prozessen der Reparatur und Plastizität beteiligt sind (Lo, 2008).

In ähnlicher Weise könnte sich auch die Bedeutung von ET-1 und des ET_A-Rezeptors für die akute und die subakute Behandlung unterscheiden.

Außerdem könnten Messungen von SD als Summenmaß für den drohenden Zelluntergang in Zukunft zur Durchführung einer frühen Therapiestratifikation verhelfen. D.h. der Patient würde selektiv im Moment der Schadensentstehung einer bestimmten, möglicherweise nebenwirkungsreichen aber wirksamen Therapie zugeführt werden, während diese Therapie bei anderen Patienten, die keinen Schlaganfall entwickeln, vermieden wird (Dreier, 2009). Dies könnte z.B. bei verzögerten ischämischen Schlaganfällen nach aSAB, welche erst Tage nach der eigentlichen Hirnblutung auftreten, genutzt werden, da sich der Patient dann bereits auf der neurologischen Intensivstation befindet, wo das Auftreten von SDs online erfasst werden kann (Dreier, 2009).

Um jedoch diese pathologischen DC-Signale beim Menschen richtig interpretieren zu können, ist es notwendig, die verschiedenen DC-Generatoren besser zu verstehen. Insbesondere Atemgasabhängige DC-Potentiale sind hier als klinisch wichtiger Störfaktor zu nennen, welche daher in meiner Dissertation eingehender untersucht worden sind.

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006).** “Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.” *Nat Rev Neurosci*, 7(1): 41–53.
- Amzica, F. (2002).** “In vivo electrophysiological evidences for cortical neuron-glia interactions during slow (<1 Hz) and paroxysmal sleep oscillations.” *J Physiol Paris*, 96(3–4): 209–219.
- Baltatu, O., Nishimura, H., Hoffmann, S., Stoltenburg, G., Haulica, I. D., Lippoldt, A., Ganten, D., and Urata, H. (1997).** “High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary glands.” *Brain Res*, 752(1–2): 269–278.
- Barone, F. C., Globus, M. Y. T., Price, W. J., White, R. F., Storer, B. L., Feuerstein, G. Z., Busto, R., and Ohlstein, E. H. (1994).** “Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(2): 337–342.
- Belayev, L., Busto, R., Zhao, W., and Ginsberg, M. D. (1996).** “Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats.” *Brain Res*, 739(1–2): 88–96.
- Bondoli, A., Magalini, S. I., de Angelis, C., Foti, A., Rodola, F., Mascaro, A., and Ranieri, R. (1981).** “Changes in plasma and cerebrospinal fluid electrolytes in hypercapnia.” *Resuscitation*, 9(1): 99–102.
- Brightman, M. W. and Reese, T. S. (1969).** “Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.” *J Cell Biol*, 40(3): 648–677.
- Broderick, J. P. and Swanson, J. W. (1987).** “Migraine-related strokes. Clinical profile and prognosis in 20 patients.” *Arch Neurol*, 44(8): 868–871.
- Bureš, J., Burešova, O., and Křivánek, J. (1974).** “The mechanism and applications of Leão’s spreading depression of electroencephalographic activity.” *New York: Academic Press 1974*, (410).
- Busch, E., Gyngell, M. L., Eis, M., Hoehn-Berlage, M., and Hossmann, K. A. (1996).** “Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 16(6): 1090–1099.

- Butt, A. M., Jones, H. C., and Abbott, N. J. (1990).** “Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study.” *J Physiol*, 429: 47–62.
- Buxton, R. B. and Frank, L. R. (1997).** “A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 17(1): 64–72.
- Canals, S., Makarova, I., López-Aguado, L., Largo, C., Ibarz, J. M., and Hererras, O. (2005).** “Longitudinal depolarization gradients along the somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: a novel feature of spreading depression.” *J Neurophysiol*, 94(2): 943–951.
- Caspers, H., Speckmann, E. J., and Lehmenkühler, A. (1987).** “DC potentials of the cerebral cortex. Seizure activity and changes in gas pressures.” *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 106: 127–178.
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P., and Fenart, L. (2007).** “Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development.” *Nat Rev Drug Discov*, 6(8): 650–661.
- Chiarelli, P. A., Bulte, D. P., Wise, R., Gallichan, D., and Jezzard, P. (2007).** “A calibration method for quantitative BOLD fMRI based on hyperoxia.” *Neuroimage*, 37(3): 808–820.
- Csiba, L., Paschen, W., and Mies, G. (1985).** “Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading depression in rat brain.” *Brain Res*, 336(1): 167–170.
- Cui, P., Tani, K., Kitamura, H., Okumura, Y., Yano, M., Inui, D., Tamaki, T., Sone, S., and Kido, H. (2001).** “A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes.” *J Leukoc Biol*, 70(2): 306–312.
- Davis, T. L., Kwong, K. K., Weisskoff, R. M., and Rosen, B. R. (1998).** “Calibrated functional MRI: mapping the dynamics of oxidative metabolism.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4): 1834–1839.
- Dietz, R. M., Kiedrowski, L., and Shuttleworth, C. W. (2007).** “Contribution of Na^+ / Ca^{2+} exchange to excessive Ca^{2+} loading in dendrites and somata of CA1 neurons in acute slice.” *Hippocampus*, 17(11): 1049–1059.
- Dietzel, I., Heinemann, U., and Lux, H. D. (1989).** “Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain.” *Glia*, 2(1): 25–44.
- Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., and Pulsinelli, W. (1989).** “Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 9(5): 589–596.

- Dirnagl, U., Niwa, K., Lindauer, U., and Villringer, A. (1994).** “Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide.” *Am J Physiol*, 267(1 Pt 2): H296–H301.
- Dohmen, C., Sakowitz, O. W., Fabricius, M., Bosche, B., Reithmeier, T., Ernestus, R. I., Brinker, G., Dreier, J. P., Woitzik, J., Strong, A. J., and Graf, R. (2008).** “Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence.” *Ann Neurol*, 63(6): 720–728.
- Dreier, J. (2009).** “Spreading depolarization, Tsunami im Hirn.” *Neuroforum*, 4: 108–113.
- Dreier, J. P. (2011).** “The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease.” *Nat Med*, 17(4): 439–447.
- Dreier, J. P., Ebert, N., Priller, J., Megow, D., Lindauer, U., Klee, R., Reuter, U., Imai, Y., Einhüpl, K. M., Victorov, I., and Dirnagl, U. (2000).** “Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage?” *J Neurosurg*, 93(4): 658–666.
- Dreier, J. P. and Heinemann, U. (1991).** “Regional and time dependent variations of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices.” *Exp Brain Res*, 87(3): 581–596.
- Dreier, J. P., Kleeberg, J., Alam, M., Major, S., Kohl-Bareis, M., Petzold, G. C., Victorov, I., Dirnagl, U., Obrenovitch, T. P., and Priller, J. (2007).** “Endothelin-1-induced spreading depression in rats is associated with a microarea of selective neuronal necrosis.” *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(2): 204–213.
- Dreier, J. P., Kleeberg, J., Petzold, G., Priller, J., Windmüller, O., Orzechowski, H. D., Lindauer, U., Heinemann, U., Einhüpl, K. M., and Dirnagl, U. (2002a).** “Endothelin-1 potently induces Leão’s cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura?” *Brain*, 125(Pt 1): 102–112.
- Dreier, J. P., Körner, K., Ebert, N., Görner, A., Rubin, I., Back, T., Lindauer, U., Wolf, T., Villringer, A., Einhüpl, K. M., Lauritzen, M., and Dirnagl, U. (1998).** “Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(9): 978–990.
- Dreier, J. P., Körner, K., Görner, A., Lindauer, U., Weih, M., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1995).** “Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(6): 914–919.
- Dreier, J. P., Major, S., Manning, A., Woitzik, J., Drenckhahn, C., Steinbrink, J., Toliás, C., Oliveira-Ferreira, A. I., Fabricius, M., Hartings, J. A., Vajkoczy, P., Lauritzen, M., Dirnagl, U., Bohner, G., and Strong, A. J. (2009).** “Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage.” *Brain*, 132(Pt 7): 1866–1881.

- Dreier, J. P., Sakowitz, O. W., Harder, A., Zimmer, C., Dirnagl, U., Valdeza, J. M., and Unterberg, A. W. (2002b).** “Focal laminar cortical MR signal abnormalities after subarachnoid hemorrhage.” *Ann Neurol*, 52(6): 825–829.
- Dreier, J. P., Tille, K., and Dirnagl, U. (2004).** “Partial antagonistic effect of adenosine on inverse coupling between spreading neuronal activation and cerebral blood flow in rats.” *Neurocrit Care*, 1(1): 85–94.
- Dreier, J. P., Windmüller, O., Petzold, G., Lindauer, U., Einhüpl, K. M., and Dirnagl, U. (2002c).** “Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats.” *Neurosurgery*, 51(6): 1457–1465; discussion 1465–1467.
- Dreier, J. P., Woitzik, J., Fabricius, M., Bhatia, R., Major, S., Drenckhahn, C., Lehmann, T. N., Sarrafzadeh, A., Willumsen, L., Hartings, J. A., Sakowitz, O. W., Seemann, J. H., Thieme, A., Lauritzen, M., and Strong, A. J. (2006).** “Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations.” *Brain*, 129(Pt 12): 3224–3237.
- Drenckhahn, J. C., Winkler, M. K. L., Major, S., Scheel, M., Kang, E. K., Pinczolits, A., Grozea, C., Hartings, J. A., Woitzik, J., and Dreier, J. P. f. t. C. s. g. (2012).** “Correlates of spreading depolarization in human scalp electroencephalography.” *Brain*, 135: 853–868.
- Duckrow, R. B. (1993).** “A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited.” *Brain Res*, 618(2): 190–195.
- Duckrow, R. B., Beard, D. C., and Brennan, R. W. (1985).** “Regional cerebral blood flow decreases during hyperglycemia.” *Ann Neurol*, 17(3): 267–272.
- Ehrenreich, H., Anderson, R. W., Fox, C. H., Rieckmann, P., Hoffman, G. S., Travis, W. D., Coligan, J. E., Kehrl, J. H., and Fauci, A. S. (1990).** “Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages.” *J Exp Med*, 172(6): 1741–1748.
- Ehrenreich, H., Burd, P. R., Rottem, M., Hultner, L., Hylton, J. B., Garfield, M., Coligan, J. E., Metcalfe, D. D., and Fauci, A. S. (1992).** “Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines.” *New Biol*, 4(2): 147–156.
- Ehrlich, P. (1885).** “Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie.” *Verlag von August Hirschwald, Berlin*.
- Etminan, N., Vergouwen, M. D., Ildigwe, D., and Macdonald, R. L. (2011).** “Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(6): 1443–1451.
- Fabricius, M., Fuhr, S., Bhatia, R., Boutelle, M., Hashemi, P., Strong, A. J., and Lauritzen, M. (2006).** “Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex.” *Brain*, 129: 778–790.

- Fecteau, M. H., Honore, J. C., Plante, M., Labonte, J., Rae, G. A., and D’Orleans-Juste, P. (2005).** “Endothelin-1(1-31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration in vivo.” *Hypertension*, 46(1): 87–92.
- Forslund, T. and Metsarinne, K. (1992).** “[The endothelial cell as an endocrine organ - endothelin].” *Tidsskr Nor Laegeforen*, 112(5): 648–652.
- Gault, L. M., Lin, C. W., LaManna, J. C., and Lust, W. D. (1994).** “Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression.” *Brain Res*, 641(1): 176–180.
- Gawlik, R., Jastrzebski, D., Ziora, D., and Jarzab, J. (2006).** “Concentration of endothelin in plasma and BALF fluid from asthmatic patients.” *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 4: 103–110.
- Gjedde, A., Hansen, A. J., and Quistorff, B. (1981).** “Blood-brain glucose transfer in spreading depression.” *J Neurochem*, 37(4): 807–812.
- Goldmann, E. E. (1913).** “Vitalfärbung am Zentralnervensystem.” *Abh. K. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Med.*, 1: 1–60.
- Graf, R. and Strong, A. (2007).** “Spreading Depression und Periinfarktdepolarisation: Depolarisationswellen umkreisen und vergrößern zerebrale Läsionen beim ischämischen Schlaganfall.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8): 4687–4692.
- Grubb, J., R. L., Raichle, M. E., Eichling, J. O., and Ter-Pogossian, M. M. (1974).** “The effects of changes in PaCO₂ on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time.” *Stroke*, 5(5): 630–639.
- Gursoy-Özdemir, Y., Qiu, J., Matsuoka, N., Bolay, H., Bermppohl, D., Jin, H., Wang, X., Rosenberg, G. A., Lo, E. H., and Moskowitz, M. A. (2004).** “Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9.” *J Clin Invest*, 113: 1447–1455.
- Hadjikhani, N., Sanchez Del Rio, M., Wu, O., Schwartz, D., Bakker, D., Fischl, B., Kwong, K. K., Cutrer, F. M., Rosen, B. R., Tootell, R. B., Sorensen, A. G., and Moskowitz, M. A. (2001).** “Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8): 4687–4692.
- Hansen, A. J. and Olsen, C. E. (1980).** “BRAIN EXTRACELLULAR-SPACE DURING SPREADING DEPRESSION AND ISCHEMIA.” *Acta Physiologica Scandinavica*, 108(4): 355–365.
- Hatashita, S. and Hoff, J. T. (1990).** “Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats.” *Stroke*, 21(4): 582–588.
- Hattingen, E., Blasel, S., Dettmann, E., Vatter, H., Pilatus, U., Seifert, V., Zanella, F. E., and Weidauer, S. (2008).** “Perfusion-weighted MRI to evaluate cerebral autoregulation in aneurysmal subarachnoid haemorrhage.” *Neuroradiology*, 50(11): 929–938.

- Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005).** “The blood-brain barrier / neurovascular unit in health and disease.” *Pharmacol Rev*, 57(2): 173–185.
- Hayasaki-Kajiwara, Y., Naya, N., Shimamura, T., Iwasaki, T., and Nakajima, M. (1999).** “Endothelin generating pathway through endothelin1-31 in human cultured bronchial smooth muscle cells.” *Br J Pharmacol*, 127(6): 1415–1421.
- Haynes, W. G. (1995).** “Endothelins as regulators of vascular tone in man.” *Clin Sci (Lond)*, 88(5): 509–517.
- Herreras, O. (1990).** “Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ.” *J Neurophysiol*, 64(5): 1429–1441.
- Herreras, O. (2005).** “Electrical prodromals of spreading depression void Grafstein’s potassium hypothesis.” *J Neurophysiol*, 94(5): 3656–3657.
- Hodgkin, A. L. (1951).** “Ionic basis of electrical activity in nerve and muscle.” *Biol Rev Cambridge Phil Soc*, 26: 399–409.
- Jin, A. Y., Tuor, U. I., Rushforth, D., Kaur, J., Muller, R. N., Petterson, J. L., Boutry, S., and Barber, P. A. (2010).** “Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke.” *BMC Neurosci*, 11: 12.
- Jorks, D., Major, S., Oliveira-Ferreira, A. I., Kleeberg, J., and Dreier, J. P. (2011a).** “Endothelin-1_(1–31) induces spreading depolarization in rats.” *Acta Neurochir Suppl*, 110(Pt 1): 111–117.
- Jorks, D., Milakara, D., Alam, M., Kang, E. J., Major, S., Friedman, A., and Dreier, J. P. (2011b).** “A novel algorithm for the assessment of blood-brain barrier permeability suggests that brain topical application of endothelin-1 does not cause early opening of the barrier in rats.” *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2011: Article ID: 169580, 7 pages.
- Katayama, S., Shionoya, H., and Ohtake, S. (1978).** “A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats.” *Microbiol Immunol*, 22(2): 89–101.
- Kistler, J. P., Crowell, R. M., Davis, K. R., Heros, R., Ojemann, R. G., Zervas, T., and Fisher, C. M. (1983).** “The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study.” *Neurology*, 33(4): 424–436.
- Klatzo, I. (1987).** “Pathophysiological aspects of brain edema.” *Acta Neuropathol*, 72: 236–239.
- Kleeberg, J., Petzold, G. C., Major, S., Dirnagl, U., and Dreier, J. P. (2004).** “ET-1 induces cortical spreading depression via activation of the ETA receptor / phospholipase C pathway in vivo.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(4): H1339–H1346.

- Koroleva, V. I. and Bureš, J. (1979).** “Circulation of cortical spreading depression around electrically stimulated areas and epileptic foci in the neocortex of rats.” *Brain Res*, 173(2): 209–215.
- Kraig, R. P., Ferreira-Filho, C. R., and Nicholson, C. (1983).** “Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment.” *J Neurophysiol*, 49(3): 831–850.
- Kraig, R. P. and Nicholson, C. (1978).** “Extracellular ionic variations during spreading depression.” *Neuroscience*, 3(11): 1045–1059.
- Kuroiwa, T., Ting, P., Martinez, H., and Klatzo, I. (1985).** “The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion.” *Acta Neuropathol*, 68(2): 122–129.
- LaManna, J. C. and Rosenthal, M. (1975).** “Effect of ouabain and phenobarbital on oxidative metabolic activity associated with spreading cortical depression in cats.” *Brain Res*, 88: 145–149.
- Lauritzen, M. (1984).** “Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO_2 response.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 4(4): 546–554.
- Lauritzen, M. (1987).** “Regional cerebral blood-flow during cortical spreading depression in rat-brain - increased reactive hyperperfusion in low-flow states.” *Acta Neurologica Scandinavica*, 75(1): 1–8.
- Lauritzen, M. (1994).** “Pathophysiology of the migraine aura - The spreading depression theory.” *Brain*, 117: 199–210.
- Lauritzen, M. and Hansen, A. J. (1992).** “The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12(2): 223–229.
- Leão, A. A. P. (1944).** “Spreading depression of activity in the cerebral cortex.” *J Neurophysiol*, 7: 359–390.
- Leão, A. A. P. (1947).** “Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex.” *J Neurophysiol*, 10: 409–414.
- Leão, A. A. P. and Morison, R. S. (1945).** “Propagation of spreading cortical depression.” *J Neurophysiology*, 8: 33–45.
- Lee, E. J., Hung, Y. C., and Lee, M. Y. (1999).** “Early alterations in cerebral hemodynamics, brain metabolism, and blood-brain barrier permeability in experimental intracerebral hemorrhage.” *J Neurosurg*, 91(6): 1013–1019.
- Lee, M. E., de la Monte, S. M., Ng, S. C., Bloch, K. D., and Quertermous, T. (1990).** “Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system.” *J Clin Invest*, 86(1): 141–147.

- Lehmenkühler, A., Caspers, H., and Kersting, U. (1985).** “Relations between DC potentials, extracellular ion activities, and extracellular volume fraction in the cerebral cortex with changes in pCO₂.” *M. Kessler (Ed.), Ion Measurements in Physiology and Medicine, Springer, Berlin*, pages 199–205.
- Lehmenkühler, A. and Pöppelmann, T. (1989).** “Nachweis der corticalen „spreading depression“-Reaktion mit Hilfe von DC-Registrierungen an der Schädeloberfläche.” *P. Wolf (Ed.), Epilepsie 88, Einhorn Presse Verlag, Reinbek*, pages 364–367.
- Lehmenkühler, A., Richter, F., and Pöppelmann, T. (1999).** “Hypoxia- and hypercapnia-induced DC potential shifts in rat at the scalp and the skull are opposite in polarity to those at the cerebral cortex.” *Neurosci Lett*, 270(2): 67–70.
- Lehmenkühler, A., Richter, F., Scheller, D., and Speckmann, E. J. (1990).** “Spreading depression–cortical reactions: disorders of the extracellular microenvironment.” *EEG EMG Z Elektroenzephalogr Elektromyogr Verwandte Geb.*, (1): 1–6.
- Lehmenkühler, A., Richter, F., Scheller, D., and Speckmann, E. J. (1991).** “Non-invasive DC-recordings from the skull and the skin during cortical spreading depression: a model of detection of migraine.” *J. Olesen (Ed.), Frontiers in Headache Research, Migraine and Other Headaches: The Vascular Mechanisms, Raven Press, New York*, pages 167–170.
- Leslie, S. J., Rahman, M. Q., Denvir, M. A., Newby, D. E., and Webb, D. J. (2004).** “Endothelins and their inhibition in the human skin microcirculation: ET[1-31], a new vasoconstrictor peptide.” *Br J Clin Pharmacol*, 57(6): 720–725.
- Levasseur, J. E., Wei, E. P., Raper, A. J., Kontos, A. A., and Patterson, J. L. (1975).** “Detailed description of a cranial window technique for acute and chronic experiments.” *Stroke*, 6(3): 308–317.
- Lewandowsky, M. (1900).** “Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit.” *Z Klin Med*, 40: 480–494.
- Lindauer, U., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1993).** “Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anesthetics.” *Am J Physiol*, 264(4 Pt 2): H1223–H1228.
- Lipton, R. B., Scher, A. I., Kolodner, K., Liberman, J., Steiner, T. J., and Stewart, W. F. (2002).** “Migraine in the United States: epidemiology and patterns of health care use.” *Neurology*, 58(6): 885–894.
- Lo, E. H. (2008).** “A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke.” *Nat Med*, 14(5): 497–500.
- Lou, H. C., Edvinsson, L., and MacKenzie, E. T. (1987).** “The concept of coupling blood flow to brain function: revision required?” *Ann Neurol*, 22(3): 289–297.
- Lu, Y., Wang, L. G., Liao, Z., Tang, C. S., Wang, W. Z., and Yuan, W. J. (2007).** “Cardiovascular effects of centrally applied endothelin-1 1-31 and its relationship to endothelin-1 1-21 in rats.” *Auton Neurosci*, 133(2): 146–152.

- Lux, H. D. and Neher, E. (1973).** “The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex.” *Exp Brain Res*, 17(2): 190–205.
- Macdonald, R. L., Kassell, N. F., Mayer, S., Ruefenacht, D., Schmiedek, P., Weidauer, S., Frey, A., Roux, S., and Pasqualin, A. (2008).** “Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial.” *Stroke*, 39(11): 3015–3021.
- Macdonald, R. L., Pluta, R. M., and Zhang, J. H. (2007).** “Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution.” *Nat Clin Pract Neurol*, 3(5): 256–263.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2001).** “Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1 - 31), in human mammary and coronary arteries in vitro.” *Br J Pharmacol*, 134(6): 1360–1366.
- Marshall, W. H. (1959).** “Spreading cortical depression of Leão.” *Physiol Rev*, 39(2): 239–279.
- Matsuo, Y., Mihara, S., Ninomiya, M., and Fujimoto, M. (2001).** “Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats.” *Stroke*, 32(9): 2143–2148.
- Matter, K. and Balda, M. S. (2003).** “Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability.” *J Cell Biol*, 161(3): 459–460.
- Mayevsky, A. and Weiss, H. R. (1991).** “Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression.” *J Cereb Blood Flow Metabolism*, 11(5): 829–836.
- Mies, G. and 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.” *Experimental Neurology*, 84(2): 249–258.
- Nakano, A., Kishi, F., Minami, K., Wakabayashi, H., Nakaya, Y., and Kido, H. (1997).** “Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells.” *J Immunol*, 159(4): 1987–1992.
- Narushima, I., Kita, T., Kubo, K., Yonetani, Y., Momochi, C., Yoshikawa, I., Shimada, K., and Nakashima, T. (1999).** “Contribution of endothelin-1 to disruption of blood-brain barrier permeability in dogs.” *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360(6): 639–645.
- Nedergaard, M. and Astrup, J. (1986).** “Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and $[^{14}C]$ 2-deoxyglucose phosphorylation.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 6(5): 607–615.
- Nedergaard, M. and Hansen, A. J. (1993).** “Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(4): 568–574.

- Nita, D. A., Vanhatalo, S., Lafortune, F. D., Voipio, J., Kaila, K., and Amzica, F. (2004).** “Nonneuronal origin of CO_2 -related DC EEG shifts: an in vivo study in the cat.” *J Neurophysiol*, 92(2): 1011–1022.
- O’Leary, J. L. and Goldring, S. (1964).** “D-C Potentials of the Brain.” *Physiol Rev*, 44: 91–125.
- Olesen, J., Bousser, M. G., Diener, H., Dodick, D., First, M., and Goadsby, P. (2004).** “The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edition.” *Cephalalgia*, 24(Suppl 1): 1–160.
- Olesen, J., Larsen, B., and Lauritzen, M. (1981).** “Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine.” *Ann Neurol*, 9(4): 344–352.
- Oliveira-Ferreira, A. I., Milakara, D., Alam, M., Jorks, D., Major, S., Hartings, J. A., Lückl, J., Martus, P., Graf, R., Dohmen, C., Bohner, G., Woitzik, J., and Dreier, J. P. (2010).** “Experimental and preliminary clinical evidence of an ischemic zone with prolonged negative DC shifts surrounded by a normally perfused tissue belt with persistent electrocorticographic depression.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(8): 1504–1519.
- Pardridge, W. M. (2005).** “Molecular biology of the blood-brain barrier.” *Mol Biotechnol*, 30(1): 57–70.
- Pavlassek, J., Haburcak, M., Masanova, C., and Orlicky, J. (1993).** “Increase of catecholamine content in the extracellular space of the rat’s brain cortex during spreading depression wave as determined by voltametry.” *Brain Res*, 628(1-2): 145–148.
- Petzold, G. C., Einhäupl, K. M., Dirnagl, U., and Dreier, J. P. (2003).** “Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space.” *Ann Neurol*, 54(5): 591–598.
- Piilgaard, H. and Lauritzen, M. (2009).** “Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(9): 1517–1527.
- Pluta, R., Lossinsky, A. S., Wisniewski, H. M., and Mossakowski, M. J. (1994).** “Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest.” *Brain Res*, 633(1–2): 41–52.
- Pluta, R. M., Afshar, J. K., Boock, R. J., and Oldfield, E. H. (1998).** “Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage.” *J Neurosurg*, 88(3): 557–561.
- Proust, F., Hannequin, D., Langlois, O., Freger, P., and Creissard, P. (1995).** “Causes of morbidity and mortality after ruptured aneurysm surgery in a series of 230 patients. The importance of control angiography.” *Stroke*, 26(9): 1553–1557.
- Reese, T. S. and Karnovsky, M. J. (1967).** “Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase.” *J Cell Biol*, 34(1): 207–217.

- Ren, A. J., Yuan, X., Lin, L., Xu, J., Chen, T., Wang, W. Z., Yan, X. H., Qing, Y. W., Tang, C. S., and Yuan, W. J. (2006).** “Arrhythmogenic action of endothelin-1(1-31) through conversion to endothelin-1(1-21).” *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(6): 937–941.
- Sakamoto, Y., Doi, Y., Ohsato, K., and Fujimoto, S. (1993).** “Immunoelectron microscopy on the localization of endothelin in the umbilical vein of perinatal rabbits.” *Anat Rec*, 237(4): 482–488.
- Salom, J. B., Torregrosa, G., and Alborch, E. (1995).** “Endothelins and the cerebral circulation.” *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 7(2): 131–152.
- Sanchez, R. and Pile-Spellman, J. (1990).** “Radiologic features of cerebral vasospasm.” *Neurosurg Clin N Am*, 1(2): 289–306.
- Scheller, D., Heister, U., Kolb, J., and Tegtmeier, F. (1993).** “On the role of excitatory amino acids during generation and propagation of spreading depression.” *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment; München: Urban & Schwarzenberg*, pages 355—366.
- Schneider, J. G., Tilly, N., Hierl, T., Sommer, U., Hamann, A., Dugi, K., Leidig-Bruckner, G., and Kasperk, C. (2002).** “Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus.” *Am J Hypertens*, 15(11): 967–972.
- Sedlakova, R., Shivers, R. R., and Del Maestro, R. F. (1999).** “Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit.” *J Submicrosc Cytol Pathol*, 31(1): 149–161.
- Seiffert, E., Dreier, J. P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., and Friedman, A. (2004).** “Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex.” *J Neurosci*, 24(36): 7829–7836.
- Shin, H. K., Dunn, A. K., Jones, P. B., Boas, D. A., Moskowitz, M. A., and Ayata, C. (2006).** “Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(8): 1018–1030.
- Somjen, G. G. (2001).** “Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization.” *Physiol Rev*, 81(3): 1065–1096.
- Somjen, G. G. (2004).** “Ions in the Brain. Normal function, seizures and stroke.” *New York: Oxford University Press*.
- Sramka, M., Brozek, G., Bures, J., and Nadvornik, P. (1977).** “Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery.” *Appl Neurophysiol*, 40(1): 48–61.
- Stanimirovic, D. B., McCarron, R., Bertrand, N., and Spatz, M. (1993).** “Endothelins release ^{51}Cr from cultured human cerebrovascular endothelium.” *Biochem Biophys Res Commun*, 191(1): 1–8.
- Stern, M. D. (1975).** “In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering.” *Nature*, 254(5495): 56–58.

- Strong, A. J., Anderson, P. J., Watts, H. R., Virley, D. J., Lloyd, A., Irving, E. A., Nagafuji, T., Ninomiya, M., Nakamura, H., Dunn, A. K., and Graf, R. (2007).** “Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex.” *Brain*, 130(Pt 4): 995–1008.
- Strong, A. J., Fabricius, M., Boutelle, M. G., Hibbins, S. J., Hopwood, S. E., and Jones, R. (2002).** “Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain.” *Stroke*, 33: 2738—2743.
- Suzaki, Y., Yoshizumi, M., Yamashita, Y., Abe, S., Tsuchiya, K., Satoh, Y., Kuroda, Y., Horike, K., Kano, M., Fukata, Y., Kitaichi, T., Hori, T., Masuda, Y., Kitagawa, T., Minakuchi, K., and Tamaki, T. (2003).** “Determination of plasma concentrations of endothelin-1(1-31) and endothelin-1 in healthy subjects and patients with atherosclerosis.” *J Cardiovasc Pharmacol*, 41 Suppl 1: S83–S87.
- Swank, R. L. and Watson, C. W. (1949).** “Effects of barbiturates and ether on spontaneous electrical activity of dog brain.” *J Neurophysiol*, 12(2): 137–60.
- Takakura, Y., Audus, K. L., and Borchardt, R. T. (1991).** “Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells.” *Adv Pharmacol*, 22: 137–165.
- Takano, K., Latour, L. L., Formato, J. E., Carano, R. A., Helmer, K. G., Hasegawa, Y., Sotak, C. H., and Fisher, M. (1996).** “The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping.” *Ann Neurol*, 39(3): 308–318.
- Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Lovatt, D., Hansen, A. J., Kasischke, K. A., and Nedergaard, M. (2007).** “Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia.” *Nat Neurosci*, 10(6): 754–762.
- Taylor, D. L., Obrenovitch, T. P., and Symon, L. (1996).** “Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia.” *Neurochem Res*, 21(9): 1013–1021.
- Tomkins, O., Friedman, O., Ivens, S., Reiffurth, C., Major, S., Dreier, J. P., Heinemann, U., and Friedman, A. (2007).** “Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex.” *Neurobiol Dis*, 25(2): 367–377.
- Tschirgi, R. D. (1962).** “Blood-brain barrier: fact or fancy?” *Fed Proc*, 21: 665–671.
- van Gijn, J. and Rinkel, G. J. (2001).** “Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management.” *Brain*, 124(Pt 2): 249–278.
- Vatter, H., Konczalla, J., Weidauer, S., Preibisch, C., Raabe, A., Zimmermann, M., and Seifert, V. (2007).** “Characterization of the endothelin-B receptor expression and vasomotor function during experimental cerebral vasospasm.” *Neurosurgery*, 60(6): 1100–8; discussion 1108–1109.

- Vergouwen, M. D., Etminan, N., Ildigwe, D., and Macdonald, R. L. (2011).** “Lower incidence of cerebral infarction correlates with improved functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(7): 1545–1553.
- Vergouwen, M. D., Vermeulen, M., Coert, B. A., Stroes, E. S., and Roos, Y. B. (2008).** “Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an additional explanation for delayed cerebral ischemia.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(11): 1761–1770.
- Voipio, J., Tallgren, P., Heinonen, E., Vanhatalo, S., and Kaila, K. (2003).** “Millivolt-scale DC shifts in the human scalp EEG: evidence for a nonneuronal generator.” *J Neurophysiol*, 89(4): 2208–2214.
- Wada, A., Tsutamoto, T., Ohnishi, M., Sawaki, M., Fukai, D., Maeda, Y., and Kinoshita, M. (1999).** “Effects of a specific endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiac, renal, and neurohumoral functions in congestive heart failure: comparison of effects with those of endothelin A receptor antagonism.” *Circulation*, 99(4): 570–577.
- Windmüller, O., Lindauer, U., Foddis, M., Einhäupl, K. M., Dirnagl, U., Heinemann, U., and Dreier, J. P. (2005).** “Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO.” *Brain*, 128(Pt 9): 2042–2051.
- Wolf, T., Lindauer, U., Obrig, H., Dreier, J., Back, T., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1996).** “Systemic nitric oxide synthase inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression in rats: a noninvasive near-infrared spectroscopy and laser-Doppler flowmetry study.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 16(6): 1100–1107.
- Wolf, T., Lindauer, U., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1997).** “Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats.” *Brain Res*, 761(2): 290–299.
- Wolff, H. G. (1963).** “Headache and Other Head Pain.” *New York: Oxford University Press*, 6th ed.
- Woody, C. D., Marshall, W. H., Besson, J. M., Thompson, H. K., Aleonard, P., and Albe-Fessard, D. (1970).** “Brain potential shift with respiratory acidosis in the cat and monkey.” *Am J Physiol*, 218(1): 275–283.
- Wurtz, R. H. and O’Flaherty, J. J. (1967).** “Physiological correlates of steady potential shifts during sleep and wakefulness. I. Sensitivity of the steady potential to alterations in carbon dioxide.” *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 22(1): 30–42.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988).** “A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.” *Nature*, 332(6163): 411–415.

- Yoshizumi, M., Kim, S., Kagami, S., Hamaguchi, A., Tsuchiya, K., Houchi, H., Iwao, H., Kido, H., and Tamaki, T. (1998).** “Effect of endothelin-1 (1-31) on extracellular signal-regulated kinase and proliferation of human coronary artery smooth muscle cells.” *Br J Pharmacol*, 125(5): 1019–1027.
- Zappe, A. C., Uludag, K., Oeltermann, A., Ugurbil, K., and Logothetis, N. K. (2008).** “The influence of moderate hypercapnia on neural activity in the anesthetized nonhuman primate.” *Cereb Cortex*, 18(11): 2666–2673.
- Zhang, Z. G., Chopp, M., Maynard, K. I., and Moskowitz, M. A. (1994).** “Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis.” *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(6): 939–943.
- Zimmermann, M. M. D. and Seifert, V. M. D. (1998).** “Endothelin and Subarachnoid Hemorrhage: An Overview.” *Neurosurgery*, 43(4): 863–875.

Anhang A

A.1 Publikationen

Oliveira-Ferreira A. I., Milakara D., Alam M., Jorks D., Major S., Hartings J. A., Lückl J., Martus P., Graf R., Dohmen C., Bohner G., Woitzik J. und Dreier J.P. (COSBID study group) Experimental and preliminary clinical evidence of an ischemic zone with prolonged negative DC shifts surrounded by a normally perfused tissue belt with persistent electrocorticographic depression
J Cereb Blood Flow Metab., 2010; vol 30; pp 1504–1519; no. 8

Jorks D., Major S., Oliveira-Ferreira A. I., Kleeberg J., Dreier J. P. Endothelin-1_(1–31) induces spreading depolarization in rats
Acta Neurochir Suppl., 2011; 110(Pt 1); pp 111–117

Jorks D., Milakara D., Alam M., Kang E. J., Major S., Friedman A., Dreier J. P. A novel algorithm for the assessment of blood-brain barrier permeability suggests that brain topical application of endothelin-1 does not cause early opening of the barrier in rats
Cardiovasc Psychiatry Neurol., 2011; vol 2011; Article ID 169580, 7 pages. Epub 2011 Mar 30.

Nicoletti C., Offenhauser, N., Jorks D., Major S., Dreier J. P. Assessment of Neurovascular Coupling
Springer Protocols Handbooks 2012; vol 8; Chapter 24.

Kang E. J., Major S., Jorks D., Reiffurth C., Offenhauser N., Friedman A., Dreier J. P. Blood-brain barrier opening to large molecules does not imply blood-brain barrier opening to small ions
Neurobiol Dis., 2013; vol 52; pp 204–218. Epub 2013 Jan 3.

A.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
aBGA	arterielle Blutgasanalyse
AC	Wechselspannung (alternating current)
aCSF	künstlicher Liquor (artificial cerebrospinal fluid)
Ag^+	Silberion
$AgCl$	Silberchlorid
AP	Aktionspotenzial
aSAB	Subarachnoidalblutung nach Aneurysma
BBB	Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier)
BOLD	blood-oxygenation-level-dependent MRT
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca^{2+}	Kalziumion
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
$[Ca^{2+}]_o$	extrazelluläre Kalizumkonzentration
CBF	zerebraler Blutfluss (cerebral blood flow)
CBV	zerebrales Blutvolumen
Cl^-	Chloridion
$CMRO_2$	Rate des zerebralen Sauerstoffverbrauchs (cerebral rate of oxygen consumption)
^{51}Cr	schweres Chrom
DC	Gleichspannung (direct current)
DC_i	intrakortikales DC-ECoG der Mikroelektroden
DC_{CO_2}	CO_2 -Reaktivität des DC-Potenzials
DC_{sub}	im Subduralraum gemessene DC-ECoG
DC-Shifts	DC-Potenzialänderungen
DHC	Natrium-Dehydrocholat
DIND	Delayed Ischaemic Neurological Deficits
ECE-1	Endothelin-Converting-Enzym-1
ECoG	Elektrokortikografie
EEG	Elektroenzephalografie
EPSPs	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial

Abkürzung	Erklärung
ET-1	Endothelin-1 ₍₁₋₂₁₎
ET-1	Endothelin-1 ₍₁₋₂₁₎
ET-1 ₍₁₋₃₁₎	Endothelin-1 ₍₁₋₃₁₎
IoP	Integral des Quadrates (integral of power)
K^+	Kaliumion
$[K^+]_o$	extrazelluläre Kaliumkonzentration
kPa	Kilopascal
MAP	systemischer mittlerer arterieller Blutdruck
min	Minute
$\frac{\mu mol}{L}$	Mikromol pro Liter
$\frac{mmol}{L}$	Millimol pro Liter
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MRT	Magnetresonanztomografie
Na^+	Natriumion
$NaCl$	Natriumchlorid
NEP	neutrale Endopeptidase (NEP) 24.11
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
$\frac{nmol}{L}$	Nanomol pro Liter
$paCO_2$	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
paO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck
rCBF	lokaler CBF (regional cerebral blood flow)
$rCBF_{CO_2}$	CO_2 -Reaktivität des rCBF
ROI	region of interest
s	Sekunde
SD	Spreading Depolarization
SI	Spreading Ischemia
TBR	target-to-background-ratio
z.B.	zum Beispiel

A.3 Source Code

Listing 1: Variablen einlesen

```

1 function dj_GetBrainHisto
2 % saves original and cut images as .pdf and as 'struct' A
3 cc=cd;
4 root='C:\Dokumente und Einstellungen\wurm\Desktop\Histo\';
5 path_s=[uigetdir(root,'CHOOSE PATH to FILE of one GROUP'),filesep];
6 cd(path_s)
7
8 % create 'struct'
9 D=dir([path_s,'dj*']);
10 xind=length(D):-1:1;
11 for k=xind
12     if strcmpi(D(k).name,'.')==1 || strcmpi(D(k).name,'..')==1
13         D(k)=[];
14     end
15 end
16 D=rmfield(D,{'isdir','date','datum','bytes'});
17 clear xind
18 xind=1:length(D);
19
20 % save variables
21 cd(path_s(1:end-1))
22 save dir_list D
23 cd(cc)
24
25 % path to single animal files
26 for k=xind
27     cd([path_s,D(k).name])
28     A=dir('im*');
29     yind=length(A):-1:1;
30     for j=yind
31         if strcmpi(A(j).name,'.')==1 || strcmpi(A(j).name,...
32             '..')==1 || isdir(A(j).name) || strcmpi(A(j).name(end...
33             -3:end),'mat')==1 || isempty(A(j).name)
34             A(j)=[];
35         end
36     end
37     A=rmfield(A,{'isdir','date','datum','bytes'});
38     save dir_list A
39     clear yind
40     yind=1:length(A);
41     aa=round(sqrt(length(yind))); %for subplots
42     bb=ceil(sqrt(length(yind)));
43     clear j
44
45 % read in data

```

```

46     for j=yind
47         t0=imread(A(j).name);
48         A(j).orgim=t0;
49         A(j).grayim=rgb2gray(t0);
50         clear t0
51     end
52     clear j
53
54     % brain mask
55     s=size(A(1).orgim);
56     for j=yind
57         a0=A(j).orgim;
58         [A(j).brain,A(j).mask,A(j).copy,A(j).cropx]=...
59         dcm_getbrain(a0,A(j).orgim,s);
60         % here would be subplot generation
61         clear a0
62     end
63
64     % save struct
65         cd([path_s,D(k).name])
66         save brain A
67         cd(cc)
68 end
69 end
70
71 % nested function for identifying brain outline
72 function [new,use,cropy,cropx]=dcm_getbrain(t0,new,s,flag)
73 use=zeros(s(1),s(2));
74 a=3;
75
76 % one of three filters
77 t0=rgb2gray(t0);
78 [COUNTS,X]=imhist(t0,10);
79 t0(t0<X(6))=0;
80 t0(t0>X(9))=0;
81
82 if flag==1
83     cutoff=mean2(t0)+0.4*std2(t0);
84     t0(t0>cutoff)=0;
85     cutoff=mean2(t0)-1*std2(t0);
86     t0(t0<cutoff)=0;
87     t0(end-20:end,:)=0;
88     t0(1:20,:)=0;
89     t0(:,end-20:end)=0;
90     t0(:,1:20)=0;
91 elseif flag==2
92     cutoff=mean2(t0>0)+2.7*std2(t0);
93     t0(t0>cutoff)=0;
94     cutoff=mean2(t0>0)-0.5*std2(t0);

```

```

95     t0(t0<cutoff)=0;
96     end
97
98     % contour plot
99     t0=single(t0);
100    [xx yy zz]=gradient(t0);
101    t0=zz;
102    clear xx yy zz
103    f3=figure;
104    set(f3,'windowStyle','modal','visible','off');
105    [c,h]=contour3(t0,a);
106    hlen=1:length(h);
107    indi=1;
108    pnew=zeros(a,1);
109    pind=pnew;
110    for i=hlen
111        % get all contour line coordinates
112        xd=get(h(i),'xdata');
113        yd=get(h(i),'ydata');
114        if (yd(end-1)==yd(1)) && (xd(end-1)==xd(1))
115            % if polygon complete, calculate area
116            pnew(indi)=polyarea(xd(1:end-1),yd(1:end-1));
117            pind(indi)=i;
118            indi=indi+1;
119        end
120    end
121
122    [p,newi]=sort(pnew,'descend');
123    hand=pind(newi(1));
124    xd=get(h(hand),'xdata');
125    yd=get(h(hand),'ydata');
126    use(:,:)=poly2mask(xd(1:end-1),yd(1:end-1),s(1),s(2));
127    clear cropx cropy t0
128
129    [cropy,cropx]=cropIMG(use,s);
130    for j=1:3
131        new(:, :, j)=new(:, :, j).*uint16(use);
132    end
133    clear a t0 xd yd hand indi pind pnew p h hlen
134    close(f3);
135    end
136
137    % nested function for cropping image
138    function [cropy,cropx]=cropIMG(use,s)
139    yy=1:s(1);
140    xx=1:s(2);
141    yyr=s(1):-1:1;
142    xxr=s(2):-1:1;
143    for j=yy

```

```
144     f_oben=find(use(j,:),1);
145     if ~isempty(f_oben)
146         clear f_oben
147         fo_ind=j-1;
148         break;
149     end
150 end
151 for j=yyr
152     f_unten=find(use(j,:),1);
153     if ~isempty(f_unten)
154         clear f_unten
155         fu_ind=j+1;
156         break;
157     end
158 end
159 for j=xx
160     f_left=find(use(:,j),1);
161     if ~isempty(f_left)
162         clear f_left
163         fl_ind=j-1;
164         break;
165     end
166 end
167 for j=xxr
168     f_right=find(use(:,j),1);
169     if ~isempty(f_right)
170         clear f_right
171         fr_ind=j+1;
172         break;
173     end
174 end
175 cropy=fo_ind:fu_ind;
176 cropx=fl_ind:fr_ind;
177 clear s use fl_ind fr_ind fo_ind fu_ind j yy xx yyr xxr
178 end
```

Listing 2: Lokalisation der vier Quadrate

```

1  % load data
2  cc=cd;
3  root=uigetdir('C:\...', 'Choose File of Group to Evaluate');
4  cd(root);
5  load representative % struct C from 'chooseRep.m'
6  load dir_list       % struct E from 'brainCutOut.m'
7  cd(cc);
8
9  yind=1:length(C);
10 aa=round(sqrt(length(yind))); % for subplots
11 bb=ceil(sqrt(length(yind)));
12
13 % figure
14 figure(1)
15     set(gcf, 'color', 'k');
16     colordef black
17
18 subOrg=zeros(length(yind),1);
19 F(length(yind)).roi=zeros(50,100,3);
20 m_blue=zeros(length(yind),5);
21
22 for nr=yind;
23     cropy=C(nr).cropy;
24     cropx=C(nr).cropx;
25     D=C(nr).brain(cropy, cropx, :);
26     s1=size(D);
27     y1{nr}=1:fix(0.2*s1(1)); % upper 1/5
28
29 % find x-values of squares
30 % x2 = blue square; x2a x2b x2c = 3 white squares
31     x1=fix(s1(2)*11/16)+10:fix(s1(2)*11/16)+59;
32     x2=[x1 sort(x1, 'descend')];
33     x1a=s1(2)-x1(end):s1(2)-x1(end)+49;
34     x2a=[x1a sort(x1a, 'descend')];
35     x1b=fix(s1(2)*14/16):fix(s1(2)*14/16)+49;
36     x2b=[x1b sort(x1b, 'descend')];
37     x1c=s1(2)-x1b(end):s1(2)-x1b(end)+49;
38     x2c=[x1c sort(x1c, 'descend')];
39
40 % find y-values of squares
41     y2=ones(length(x2),1);
42     y2a=y2;
43     y2b=y2;
44     y2c=y2;
45     y2(1:length(x2)/2)=y2(1:length(x2)/2)*find ...
46         (im2bw(D(y1{nr}, fix(s1(2)*11/16)+60)),1, 'first');
47     y2(length(x2)/2+1:end)=y2(length(x2)/2+1:end)*(y2(1)+50);
48     y2a(1:length(x2)/2)=y2a(1:length(x2)/2)*find, ...

```

```

49         (im2bw(D(y1{nr} fix(s1(2)*5/16) - 60)),1,'first ');
50
51     y2a(length(x2)/2+1:end)=y2a(length(x2)/...
52         2+1:end)*(y2a(1)+50);
53     y2b(1:length(x2)/2)=y2b(1:length(x2)/2)...
54         *(y2(1)+length(y1{nr})*3);
55     y2b(length(x2)/2+1:end)=y2b(length(x2)/...
56         2+1:end)*(y2b(1)+50);
57     y2c(1:length(x2)/2)=y2c(1:length(x2)/2)...
58         *(y2(1)+length(y1{nr})*3);
59     y2c(length(x2)/2+1:end)=y2c(length(x2)/...
60         2+1:end)*(y2c(1)+50);
61
62     % calculate mean intensity of squares
63     F(nr).roi=D(y2(1):y2(end),x1,:);
64     F(nr).contr=D(y2a(1):y2a(end),x1a,:);
65     F(nr).ipsi=D(y2b(1):y2b(end),x1b,:);
66     F(nr).contu=D(y2c(1):y2c(end),x1c,:);
67     FF=F(nr).roi(:, :, 3);
68     m_blue(nr,1)=mean(FF(FF>0));
69     FF=F(nr).contr(:, :, 3);
70     m_blue(nr,2)=mean(FF(FF>0));
71     m_blue(nr,5)=m_blue(nr,1)/m_blue(nr,2);
72     FF=F(nr).ipsi(:, :, 3);
73     m_blue(nr,3)=mean(FF(FF>0));
74     m_blue(nr,6)=m_blue(nr,1)/m_blue(nr,3);
75     FF=F(nr).contu(:, :, 3);
76     m_blue(nr,4)=mean(FF(FF>0));
77     m_blue(nr,7)=m_blue(nr,1)/m_blue(nr,4);
78     clear FF
79
80     % plot brain and mark squares
81     subOrg(nr)=subplot(aa,bb,nr);
82     imshow(C(nr).brain)
83     title(subOrg(nr),[num2str(E(nr).name),' ',num2str...
84         (C(nr).name)], 'fontsize',8,'fontname','arial');
85     hold on
86     fill(x2+(cropx(1)-1),y2+(copy(1)-1),'b')
87     fill(x2a+(cropx(1)-1),y2a+(copy(1)-1),'w')
88     fill(x2b+(cropx(1)-1),y2b+(copy(1)-1),'w')
89     fill(x2c+(cropx(1)-1),y2c+(copy(1)-1),'w')
90
91     % here follows printing picture for visual control + reading ...
92     % values into Excel with xlswrite(m,header,colnames,filename)
93     end

```

A.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Dê Vi Lê Jorks, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Effekte von Endothelin-1 auf die Blutgefäß-Hirn-Achse selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. Soweit fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, sind Quellen angegeben, wie auch bei sonst verwendeten Hilfsmitteln und verwendeter Literatur.

Berlin, den 27. Februar 2013

Dê Vi Lê Jorks

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Unterstützung sowie das geduldige Erklären danke ich Herrn Prof. Dr. med. Jens Dreier und Herrn Sebastian Major. Ich habe viele Anregungen von ihnen bekommen und noch mehr von ihnen gelernt.

Frau Eun Jeung Kang, die mit mir zur selben Zeit ihre Promotion begann, danke ich von Herzen für die sehr gute Zusammenarbeit.

Ich danke Dr. rer. nat. Mesbah Alam für seine Hilfe und die unzähligen Elektroden, die er für mich gebaut hat.

Herrn Denny Milakara danke ich für die konstruktiven Gespräche, die vielen sehr guten Anregungen für Programmierlösungen, die Motivation und die wunderbare Freundschaft.

Frau PhD Ana Isabella Oliviera-Ferreira danke ich für die Motivation und die Veröffentlichung meiner pH-Daten.

Meiner lieben Mutter Martina und meiner kleinen Schwester Toan danke ich sehr dafür, dass sie mir jederzeit und in jeglicher Hinsicht beigestanden haben. Ebenso danke ich meiner Familie und Herrn Martin Benz für die finanzielle Unterstützung.

