

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

DISSERTATION

**Extrazelluläre Ionenänderungen während Cortical Spreading
Ischaemia im zerebralen Kortex der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Olaf Windmüller
aus Nordhausen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Dreier
2. Prof. Dr. med. P. Schmiedek
3. Prof. Dr. H. Luhmann

Datum der Promotion: 22.02.2008

Kurzzusammenfassung

‚Cortical spreading depression‘ (CSD) ist eine Depolarisationswelle der Hirnrinde, die sich mit einer Geschwindigkeit von 3 mm/min ausbreitet. Während CSD ist der neuronale Metabolismus aktiviert, d. h., der Energiebedarf des Gewebes steigt massiv an; der regionale Blutfluss ist an den aktivierten Metabolismus gekoppelt und steigt ebenfalls. Die resultierende hyperämische Flussveränderung breitet sich zusammen mit der neuronal-astroglialen Depolarisationswelle im zerebralen Kortex aus (Cortical Spreading Hyperaemia). Das Parenchym erholt sich von einer CSD unter physiologischen Bedingungen ohne neuronalen Schaden.

Der Begriff ‚cortical spreading ischaemia‘ (CSI) beschreibt einen erst kürzlich entdeckten Ischämie Mechanismus: CSI wird durch eine CSD ausgelöst, die als Folge einer veränderten vaskulären Reaktivität nicht zu einer Hyperämie, sondern zu einer starken arteriellen Konstriktion in der Mikrozirkulation der Hirnrinde mit der Folge einer Ischämie führt. Diese wandernde Ischämie breitet sich gemeinsam mit der Depolarisationswelle in der Hirnrinde aus (daher der Begriff ‚cortical spreading ischaemia‘). Der der CSI zugrunde liegende Mechanismus ist demnach eine Umkehrung der Kopplung zwischen CSD und dem regionalen Blutfluss. Die Folge von experimentell induzierter CSI sind weit verteilte kortikale Nekrosen.

Es wurde als Hypothese formuliert, dass CSI ein pathophysiologischer Mechanismus der verzögerten ischämischen neurologischen Defizite (engl.: ‚delayed ischaemic neurological deficit‘ (DIND)) nach Subarachnoidalblutung (SAB) beim Menschen sein könnte. DINDs treten bei Patienten mit SAB typischerweise etwa eine Woche nach der Blutung auf und sind assoziiert mit ischämischen Hirninfarkten, die besonders häufig als Rindenbandnekrosen imponieren. Die ‚spreading ischaemia‘-Hypothese der DINDs beruht

- 1) auf der experimentellen Auslösung von CSI durch Blutabbauprodukte im Subarachnoidalraum,
- 2) auf der Ähnlichkeit des Infarktmusters mit Rindenbandnekrosen (s. o.),
- 3) auf gemeinsamen pharmakologischen Eigenschaften (s. u.) und
- 4) auf einer kürzlich erarbeiteten multizentrischen, prospektiven klinischen Studie, in der CSD-ähnliche Depolarisationswellen während der Entstehung von DINDs bei SAB-Patienten mit Hilfe von subduralen Elektroden elektrophysiologisch nachgewiesen wurden.

Die vorliegende experimentelle Dissertation beschäftigt sich mit den Mechanismen der CSI. In der Publikation (1) wurde die CSI in vivo mit dem NO-Scavenger Oxyhämoglobin und einer erhöhten Kalium-Ionenkonzentration im Subarachnoidalraum der Ratte induziert, während intrakortikale Potentialänderungen, der extrazelluläre pH-Wert, Änderungen des extrazellulären

Volumens und die extrazellulären Konzentrationen von Kalium-, Natrium-, Kalzium- und Chloridionen im Kortex mit ionenselektiven Mikroelektroden gemessen wurden. Zusätzlich wurden der Blutfluss im Bereich der zerebralen Mikrozirkulation und das subarachnoidale DC-Potential erfasst. Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob extrazelluläre Ionenkonzentrationsänderungen die der CSI zugrunde liegende Vasokonstriktion vermitteln. Der vaskuläre Effekt der Ionenkonzentrationsänderungen kann in vivo allerdings nicht unabhängig von der neuronal-astroglialen Depolarisationswelle getestet werden. Eine intrakortikale Applikation von Kalium-Ionen, in Konzentrationen, wie sie während CSI gemessen wurden, würde selbst eine Depolarisationswelle induzieren. Deshalb bildeten die in vivo erfolgten Messungen der extrazellulären Ionenkonzentrationsänderungen die Basis für die Entwicklung eines In-vitro-Modells der CSI, welches von einem Kooperationspartner untersucht wurde. In diesem Modell wurde, in An- bzw. Abwesenheit von NO, ein Ionencocktail abluminal an der isolierten Arteria cerebri media der Ratte appliziert, der die ionale Zusammensetzung aufwies, die vorher von mir während CSI in vivo gemessen worden war. Dabei wurde festgestellt, dass der Ionencocktail in Anwesenheit von NO zu einer arteriellen Dilatation und in Abwesenheit von NO zu einer ausgeprägten Konstriktion führte. Somit zeigte sich eine Übereinstimmung der Befunde in der isolierten Arteria cerebri media mit den In-vivo-Befunden. In Zukunft können daher wesentliche mechanistische Aspekte der CSI mit einem erweiterten Methodenspektrum in vitro untersucht werden.

In der Publikation (2) untersuchten wir, ob die CSD/CSI durch einen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR)-Antagonisten gehemmt werden kann, da bekannt ist, dass NMDAR-Antagonisten, unter physiologischen Bedingungen, CSD wirkungsvoll blockieren. Ich stellte fest, dass der NMDAR-Antagonist die CSI nicht hemmen konnte. In weiteren In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen konnten wir dann nachweisen, dass dafür die erhöhte basale extrazelluläre Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$) verantwortlich ist. Diese Ergebnisse implizieren, dass eine Neuroprotektion mit NMDAR-Antagonisten gegen das Auftreten von CSD/CSIs wenig Erfolg versprechend ist.

CSI wird nicht nur durch eine erhöhte basale $[K^+]_o$ in Kombination mit der topischen Gabe des NO-Fängers Oxyhämoglobin, sondern auch durch die Kombination von erhöhter basaler $[K^+]_o$ mit einem NO-Synthase (NOS)-Inhibitor ausgelöst. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die CSI wieder in eine Spreading Hyperaemia zurückverwandelt werden kann, wenn entweder ein NO-Donor oder der Kalziumantagonist Nimodipin gleichzeitig mit dem NOS-Inhibitor und einer erhöhten Kalium-Ionenkonzentration im artefiziellen zerebrospinalen Liquor ($[K^+]_{ASCF}$) appliziert wurden. Im dritten Teilprojekt meiner Dissertation (Publikation (3))

untersuchte ich nun, ob Nimodipin auch dann die CSI in eine Hyperämie zurückverwandelt, wenn diese nicht durch einen NOS-Inhibitor, sondern durch den NO-Scavenger Oxyhämoglobin, also die klinisch relevantere Auslösebedingung, induziert wurde. Nimodipin ist im klinischen Kontext besonders interessant, weil es die einzige medikamentöse Option zur prophylaktischen Behandlung von DINDs darstellt, für die ein Effekt in klinischen Studien gesichert werden konnte. Die konservative klinische Akuttherapie von DINDs besteht in einer moderaten Volumenexpansion bzw. Hämodilution (so genannte Triple-H-Therapie: ‚hypertension, hypervolaemia, haemodilution‘). Deshalb war das zweite Ziel dieses Teilprojektes, den Effekt einer intravenösen Hydroxyethylstärke (HAES)-Gabe auf die CSI zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische intravenöse Gabe von Nimodipin oder HAES die CSI partiell in eine Cortical Spreading Hyperaemia zurückverwandeln.

Die Ergebnisse besitzen Implikationen für das pathophysiologische Verständnis von DINDs nach SAB und könnten in Zukunft Relevanz für die Therapieentwicklung gewinnen. *Basierend auf dem Tiermodell der CSI* wurde bereits eine prospektive, multizentrische, internationale Pilotstudie am Menschen durchgeführt, in der CSD-ähnliche Depolarisationen während der Entstehung von DINDs nachgewiesen werden konnten. Darauf aufbauend wird derzeit eine internationale Diagnosestudie der Phase III vorbereitet. In dieser soll getestet werden, ob das Auftreten verzögerter ischämischer Hirninfarkte nach SAB zuverlässig anhand bestimmter Musterveränderungen CSD-ähnlicher Depolarisationswellen on-line, am Krankenbett vorhergesagt werden kann. Weiterhin werden zurzeit die Blutflussveränderungen beim Menschen untersucht, die gemeinsam mit diesen elektrophysiologisch gemessenen Depolarisationswellen auftreten. Wenn sich in diesen klinischen Studien bestätigen sollte, dass die CSI ein Pathomechanismus bei Patienten mit DIND ist, implizieren die hier vorgestellten experimentellen Ergebnisse, dass das In-vivo-Modell der CSI bei der Ratte ein viel versprechendes Instrument bei der Suche nach neuen therapeutischen Strategien darstellt. Die hier vorgestellte experimentelle Dissertation versteht sich insofern als Teil eines translationalen Ansatzes von der ‚bench‘ zur ‚bedside‘ und von der ‚bedside‘ zur ‚bench‘. Die gemessenen Ionenänderungen waren für die Charakterisierung der CSI von großer Bedeutung.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	3
Abkürzungen und Begriffe	8
1 Einleitung	9
2 Zielstellung	11
3 Methodik	12
3.1 Tierpräparation	12
3.2 Hämoglobinpräparation	13
3.3 Die Messung des zerebralen Blutflusses	13
3.4 Die Messung des subarachnoidalen DC-Potentials	13
3.5 Die Messung des pH_o , der $[K^+]_o$, der $[Na^+]_o$, der $[Ca^{2+}]_o$, der $[Cl^-]_o$ und des extrazellulären Volumens sowie des intrakortikalen DC-Potentials	14
3.6 Die extrazelluläre Konzentration an Magnesium-Ionen	14
3.7 Größenveränderungen des Extrazellulärtraums	15
3.8 Statistik	15
4 Ergebnisse	16
4.1 Publikation (1): Veränderungen des pH_o , der $[K^+]_o$, der $[Na^+]_o$, der $[Ca^{2+}]_o$, der $[Cl^-]_o$ und des extrazellulären Volumens während CSI in vivo	16
4.2 Publikation (2): Die CSI und der NMDA-Rezeptorantagonist MK-801	17
4.2.1 Gruppe 1 und 2: Eine NMDAR-Blockade inhibiert CSIs nicht	17
4.2.2 Gruppe 3: Eine NMDAR-Blockade inhibiert SD-ähnliche Depolarisationen bei einer hohen $[K^+]_o$ nicht	17
4.2.3 Gruppe 4: Die NMDAR-Blockade verhindert die CSD-Ausbreitung vom Gewebe mit erhöhter $[K^+]_o$ in Gewebe mit normaler $[K^+]_o$	18
4.3 Publikation (3): Die CSI und die Wirkung von Nimodipin bzw. HAES	18
4.3.1 Gruppe 1: CBF- und DC-Potentialveränderungen unter physiologischen Bedingungen (Cortical Spreading Depression nach Leão)	18
4.3.2 Gruppe 2: Die Inversion der Kopplung zwischen der sich aus- breitenden neuronalen Aktivierung und dem CBF bei Hämoglobin und einer erhöhten $[K^+]_{ACSF}$ im Subarachnoidalraum	19

4.3.3 Gruppe 3: Die Wiederherstellung der Kopplung zwischen der sich ausbreitenden neuronalen Aktivierung und dem CBF unter intravenöser Applikation von Nimodipin	19
4.3.4 Gruppe 4: Die Wiederherstellung der Kopplung zwischen der sich ausbreitenden neuronalen Aktivierung und dem CBF unter intravenöser HAES-Gabe	20
4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation (3)	21
5 Diskussion	21
5.1 Mögliche Zusammenhänge zwischen der CSI und DINDs	21
5.2 Das Modell der Cortical Spreading Ischaemia	23
5.3 Publikation (3): Die CSI und Nimodipin bzw. eine moderate Volumenexpansion/Hämodilution	26
5.4 Publikation (2): Die CSI und die Problematik der NMDA-Rezeptorantagonisten	29
5.5 Publikation (1): Extrazelluläre Ionenveränderungen während CSI im Vergleich zur CSD und zur anoxischen Depolarisation	30
5.6 Die Grenzen unseres experimentellen Ansatzes	34
5.7 Ausblicke	35
Dankesworte	36
Publikationsliste	37
Ausgewählte Publikationen	37
Weitere Publikationen und Buchartikel	37
Erklärung über den Anteil an den Publikationen	38
Anlage - Ausgewählte Publikationen	39
Literaturverzeichnis	40
Erklärung	54
Lebenslauf	55

Abkürzungen und Begriffe

ACSF	artefizielle zerebrospinale Flüssigkeit
AD	anoxische Depolarisation
CBF	zerebraler Blutfluss
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CSD	Cortical Spreading Depression
CSI	Cortical Spreading Ischaemia
DC	Direct Current (langsames Summenpotential)
DIND	verzögerte ischämische neurologische Defizite
HAES	Hydroxyethylstärke
L-NNA	N ^G -nitro-L-Arginin
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MK-801	Dizocilpin (ein N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonist)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
SAB	Subarachnoidalblutung
[Ca ²⁺] _o	extrazelluläre Kalzium-Ionenkonzentration
[Cl ⁻] _o	extrazelluläre Chlorid-Ionenkonzentration
[K ⁺] _{ACSF}	Kalium-Ionenkonzentration in der artefiziellen zerebrospinalen Flüssigkeit
[K ⁺] _o	extrazelluläre Kalium-Ionenkonzentration
[Mg ²⁺] _o	extrazelluläre Magnesium-Ionenkonzentration
[Na ⁺] _o	extrazelluläre Natrium-Ionenkonzentration
pH _o	extrazellulärer pH-Wert
[TPA ⁺] _o	extrazelluläre Tetrapropyl-Ammonium-Ionenkonzentration

1 Einleitung

Im Jahre 1941 beschrieb der Bostoner Neuropsychologe Lashley seine eigenen visuellen Migräneauraen, welche sich typischerweise vor dem Auftreten von Migränekopfschmerzen entwickelten. Die Symptome begannen im Zentrum des Sehens und breiteten sich von dort innerhalb eines Zeitraumes von 10 bis 40 Minuten in die Peripherie seines Gesichtsfeldes aus. Lashley interpretierte diese Erscheinung als eine Welle intensiver neuronaler Erregung, gefolgt von neuronaler Inhibition, welche sich mit 3 mm/min in der visuellen Hirnrinde ausbreitete [1].

Drei Jahre später entdeckte der brasilianische Physiologe Leão eine Welle intensiver neuronaler Erregung, gefolgt von einer Depression der elektrokortikographischen Aktivität, die ebenfalls mit 3 mm/min in der Hirnrinde des Kaninchens wanderte [2]. Leão nannte das Phänomen „Cortical Spreading Depression of electrocorticographic activity“ (CSD). 1945 formulierten Leão und Morison dann die so genannte Spreading Depression-Theorie der Migräneaura [3].

Anfang der achtziger Jahre war es möglich geworden, die Blutflussveränderungen während Migräneaura mit der intrakarotidialen ^{133}Xe -Methode beim Menschen zu messen. Es fand sich dabei eine Minderperfusion, die im occipitalen Kortex einsetzte, um von dort in andere Hirnregionen zu wandern. Dabei folgte sie nicht den vaskulären Territorien, sondern der zytoarchitektonischen Struktur des Hirns. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit betrug 2-3 mm/min. Das Phänomen wurde als Spreading Oligaemia im Sinne der letzten Phase der Blutflussantwort auf CSD interpretiert, wie sie aus Tierexperimenten bekannt war [4]. Dass es sich dabei nicht um einen Artefakt handelte, bestätigte sich später in Studien mit Positronenemissionstomographie [5] und funktioneller Kernspintomographie [6].

Das Primatenhirn scheint gegenüber CSD besser geschützt zu sein als das Hirn anderer Säugetierfamilien [7]. CSDs konnten jedoch auch im menschlichem Hirngewebe nachgewiesen werden, sowohl *in vitro* an Hirnschnitten [8] als auch *in vivo* während stereotaktischer Neurochirurgie [9], nach Schädel-Hirn-Trauma [10], bei Patienten mit spontaner intrazerebraler Blutung [11, 12] und nach Subarachnoidalblutung (SAB) [13].

Dass der CSD auch eine Rolle in den pathophysiologischen Prozessen nach SAB zukommen könnte, wurde schon Anfang der achtziger Jahre postuliert [14, 15]. Dabei sind zwei Phasen zu unterscheiden: Eine Akutphase und die Phase des Vasospasmus nach SAB. Das Auftreten von CSDs in der Akutphase nach SAB bestätigten Busch et al. (1998) [16] experimentell mit Hilfe der funktionellen Kernspintomographie im Tierversuch. Berichtet wird auch das Auftreten visueller migräneaura-artiger Sensationen bei einer Patientin 10 Minuten nach Einsetzen heftiger Kopfschmerzen und Nackensteifigkeit als Symptome einer SAB [17].

Zwischen dem 4. und 14. Tag nach SAB kommt es bei 20-30 % der Patienten zum Auftreten von sogenannten ‚delayed ischaemic neurological deficits‘ (DINDs). Bei diesen Patienten findet sich im zerebralen Angiogramm in der Regel ein Vasospasmus, welcher mit einer Häufigkeit von etwa 70 % nach SAB beobachtet wird [18]. Während die Abwesenheit angiographischer Spasmen einen hohen negativen prädiktiven Wert besitzt, beträgt der positive prädiktive Wert von moderaten bis schweren angiographischen Spasmen für die Entwicklung eines DIND nur zwischen 33 bis 50 % [19, 20].

DINDs stellen die wichtigste Komplikation nach SAB dar [21]. Sie führen bei ungefähr 6 % der SAB-Patienten zu bleibenden Behinderungen und bei 7 % zum Tod [21].

Die Pathogenese der DINDs ist bislang nicht verstanden. Die Häufigkeit ihres Auftretens korreliert jedoch mit der Menge des subarachnoidalen Blutes im initialen Computertomogramm [22, 23] und der Zeitpunkt ihres Auftretens mit dem Maximum der Hämolyse des subarachnoidalen Blutes [24, 25]. Es wird daher allgemein vermutet, dass die Hämolyseprodukte für die Entstehung der verzögerten ischämischen Schlaganfälle verantwortlich sind [26].

Megyesi et al. (2000) [27] zählten 57 verschiedene Tiermodelle zur Studie des Vasospasmus. Die in diesen Modellen bisher durchgeführten Untersuchungen konzentrieren sich im Wesentlichen auf die Auswirkungen der subarachnoidalen Blutprodukte auf die Gefäßweite der basalen Hirnarterien. Eine direkte Untersuchung der dabei möglicherweise auftretenden Ischämien, der neuronalen Netzwerkantworten und histologischen Veränderungen des Nervengewebes wurde kaum durchgeführt. Möglicherweise ist dies dadurch bedingt, dass in den vorliegenden Modellen kaum Ischämien auftreten. Dies jedenfalls legt eine der wenigen Studien zur Ischämie im meist verwendeten Vasospasmus-Modell nahe [28].

Dass bei der Entstehung der DINDs auch die Reaktionsweise der Mikrozirkulation und des neuronal-astroglialen Netzwerks sowohl auf die subarachnoidalen Blutprodukte als auch hinsichtlich des Vasospasmus eine Rolle spielen, wurde erst in jüngster Zeit ein Schwerpunkt in diesem Forschungsbereich [29].

Unser Anteil hieran besteht in der Entwicklung eines Tiermodells, in dem Hämolyseprodukte im Subarachnoidalraum zuverlässig Ischämien in der Hirnrinde induzieren [30]. In diesem Modell erzeugt eine Erhöhung der subarachnoidalen Kalium-Ionenkonzentration oder eine Senkung der Glukosekonzentration in Kombination mit einer Stickstoffmonoxid (NO)-Senkung durch den NO-Scavenger Hämoglobin oder den NO-Synthase-Inhibitor Nitro-L-Arginin (L-NNA) eine langsame vasospastische Reaktion, der sich CSDs überlagern. Diese führen nicht, wie physiologischerweise, zu einer Vasodilatation mit anschließender milder Vasokonstriktion, sondern zu einer akuten, extremen und lang andauernden Vasokonstriktion (Cortical Spreading

Ischaemia) [30]. Es entstehen als Folge wandernde Ischämien der Hirnrinde und Infarktmuster [31], die dem pathoanatomischen Korrelat von DINDs, nämlich kortikalen laminären und glockenförmigen Infarkten entsprechen [32, 33, 34].

Das Prinzip dieser sogenannten Cortical Spreading Ischaemia (CSI) ist eine Ischämie als Folge einer invertierten Kopplung zwischen neuronaler Aktivierung und Blutfluss. Faktoren wie Kalium-Ionen und Hämoglobin werden nach SAB als Resultat der Hämolyse aus den Erythrozyten freigesetzt. Ein Absinken der intrakortikalen Glukosekonzentration nach SAB wurde beim Menschen mit Hilfe von bedside-Mikrodialyse-Verfahren nachgewiesen [35, 36].

Aus dem pathophysiologischen Konzept der CSI leitet sich pathogenetisch eine mögliche zentrale Bedeutung von CSDs bei der Entstehung der verzögerten ischämischen Schlaganfälle nach SAB ab.

2 Zielstellung

In der Publikation (1) [37] wurde die CSI in vivo mit dem NO-Scavenger Oxyhämoglobin und einer erhöhten Kalium-Ionenkonzentration im Subarachnoidalraum der Ratte induziert, während langsame Potentialänderungen, der extrazelluläre pH-Wert, Änderungen des extrazellulären Volumens und die extrazellulären Konzentrationen von Kalium-, Natrium-, Kalzium- und Chloridionen im Kortex mit ionenselektiven Mikroelektroden gemessen wurden. Zusätzlich wurden der Blutfluss im Bereich der zerebralen Mikrozirkulation und das subarachnoidale DC-Potential erfasst.

Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob extrazelluläre Ionenkonzentrationsänderungen die Vasokonstriktion, die der CSI zugrunde liegt, vermitteln. Der vaskuläre Effekt der Ionenkonzentrationsänderungen kann in vivo nicht unabhängig von der neuronal-astroglialen Depolarisationswelle getestet werden. Die intrakortikale Applikation von Kalium-Ionen, in Konzentrationen, wie sie während CSI gemessen wurden, würde eine Depolarisationswelle induzieren [38]. Deshalb untersuchten wir den Effekt eines Cocktails mit Ionenkonzentrationsänderungen, die denen entsprachen, die während Spreading Ischaemia in vivo gemessen wurden, durch extraluminale Applikation an einer isolierten Arteria cerebri media der Ratte in vitro in Gegenwart und in Abwesenheit von NO. Somit bildeten die in der vorliegenden Arbeit [37] in vivo erfolgten Messungen der extrazellulären Ionenkonzentrationsänderungen die Basis für die Entwicklung eines In-vitro-Modells der CSI.

Obwohl N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR)-Antagonisten unter physiologischen Bedingungen CSDs wirkungsvoll blockieren [39, 40], scheint ihre Effizienz unter einer Energiedefizienz reduziert zu sein [41, 42, 43]. In einem zweiten Teilprojekt [44] (Publikation (2)) wurde *in vivo* untersucht, ob eine erhöhte ($[K^+]_o$)-Baseline diese reduzierte pharmakologische Wirksamkeit verursacht.

Bereits in früheren Arbeiten [30, 45] konnte gezeigt werden, dass die CSI in eine Spreading Hyperaemia konvertiert werden kann, wenn entweder ein NO-abhängiger Vasodilatator, wie S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine, oder ein NO-unabhängiger Vasodilatator, wie der Kalziumantagonist Nimodipin, mit dem NOS-Inhibitor und einer erhöhten Kalium-Ionenkonzentration im artefiziellen zerebrospinalen Liquor ($[K^+]_{ACSF}$) koappliziert wurden. Derzeit ist nicht erforscht, ob der Effekt des Nimodipins unabhängig von der pharmakologischen Substanz ist, welche zur Senkung des NO-Levels genutzt wird. In einem dritten Teilprojekt [46] (Publikation (3)) wurde untersucht, ob Nimodipin auch die CSI, induziert durch den NO-Scavenger Oxyhämoglobin und ein erhöhtes ($[K^+]_{ACSF}$), als klinisch relevanten Modus der CSI-Auslösung, in eine Cortical Spreading Hyperaemia konvertiert.

Zusätzlich zu Nimodipin ist eine moderate Volumenexpansion bzw. Hämodilution eine klinische Behandlungsoption für DINDs. Deshalb war es das zweite Ziel dieses Teilprojektes [46], den Effekt einer intravenösen Hydroxyethylstärke (HAES)-Gabe auf die CSI zu charakterisieren.

3 Methodik

3.1 Tierpräparation (Publikationen (1-3), siehe auch [37, 44, 46])

Männliche Wistarratten wurden mit 100 mg/kg Körpergewicht Natriumthiopental intraperitoneal anästhesiert, tracheotomiert und künstlich beatmet.

Die linke Femoralarterie und -vene wurden kannuliert und eine Elektrolytlösung kontinuierlich infundiert (0,5 ml/h). Die Körpertemperatur wurde durch ein Heizpolster bei $38,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ gehalten. Der systemische arterielle Druck und der endexpiratorische Kohlendioxidpartialdruck wurden überwacht. Regelmäßig erfolgten mittels eines Blutgasanalysergerätes Messungen des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (P_aO_2), des arteriellen Kohlendioxid-Partialdrucks (P_aCO_2) und des arteriellen pH-Wertes.

Parietal wurde eine Kraniotomie, wie schon zuvor beschrieben [30], unter Nutzung eines durch Elektrolytlösung gekühlten Bohrers durchgeführt. Die Dura mater wurde entfernt.

Ein Einfluss Schlauch machte es möglich, den Hirnkortex im Bereich des offenen kraniellen Fensters mit künstlichem zerebrospinalen Liquor (ACSF) zu superfundieren. Die Zusammensetzung des Kontroll-ACSF ist den jeweiligen Publikationen [37, 44, 46] zu entnehmen. Der ACSF wurde mit einer Gasmischung, welche 6,6 % O₂, 5,9 % CO₂ und 87,5 % N₂ enthielt, äquilibriert.

Modifizierungen der Tierpräparation bei den einzelnen Teilprojekten sowie Darstellungen der Versuchsaufbauten sind in den entsprechenden Publikationen [37, 44, 46] näher erläutert. Alle Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt.

3.2 Hämoglobinpräparation

Das Hämoglobin wurde frisch aus dem Citratblut von Wistarratten gewonnen. Die genaue Aufbereitungsprozedur und die Konzentrationen sowie die Zusammensetzung des Hämoglobins und der Elektrolyte im ACSF, welche zur Spreading Ischaemia führten, sind den einzelnen Publikationen [37, 44, 46] zu entnehmen.

3.3 Die Messung des zerebralen Blutflusses

Der zerebrale Blutfluss wurde kontinuierlich mit zwei Laserdopplersonden aufgezeichnet. Hierbei wurde darauf geachtet, die Laserdopplersonden nicht direkt über größeren Gefäßen zu positionieren, um lediglich die Blutflussveränderungen im Bereich der Mikrozirkulation zu erfassen. Um die Ausbreitung der CSI zu messen, wurden die verwendeten Laserdopplersonden zueinander in einem definierten Abstand von 4 mm angeordnet.

Die Methode der Laserdoppler-Blutflussmessung wurde 1989 von Dirnagl und Mitarbeitern [47] validiert. Die ermittelten Blutflusswerte sind keine Absolutwerte, sondern relative Veränderungen in Bezug zu einem Baseline-Level (definiert als 100 %), welches jeweils zu Beginn des Experiments erfasst wurde. Ein Nulllevel wurde am Ende der Experimente nach globaler Ischämie aufgezeichnet.

3.4 Die Messung des subarachnoidalen DC-Potentials

Das subarachnoidale Gleichgewichtspotential (direct current) wurde mit einem Silberchloriddraht (Silber/Silberchlorid-Elektrode) gemessen, welcher zwischen dem Kortex und seinen Hüllen befestigt wurde. Die Elektrode war mit einem Differenzialverstärker verbunden.

3.5 Die Messung des pH_o , der $[\text{K}^+]_o$, der $[\text{Na}^+]_o$, der $[\text{Ca}^{2+}]_o$, der $[\text{Cl}^-]_o$ und des extrazellulären Volumens sowie des intrakortikalen DC-Potentials

Um Veränderungen des intrakortikalen DC-Potentials und der extrazellulären Ionenkonzentrationen messen zu können, nutzten wir ionenselektive Mikroelektroden. Diese wurden, wie bereits früher beschrieben [48], aus doppelläufigem Thetaglas hergestellt. Der Spitzendurchmesser betrug $3\ \mu\text{m}$. Die Referenzseite für die Messung des DC-Potentials wurde mit $154\ \text{mM NaCl}$ gefüllt. Die ionenselektive Seite wurde zuerst mit Methyltrichlorsilan und Dichlormethan silanisiert und dann die Spitze mit dem Ionenaustauscher befüllt. Die ionenselektiven Elektroden wurden unter Nutzung von geeigneten Kalibrationslösungen vor den Experimenten getestet. Die Ionenaustauscher (Fluka/Sigma-Aldrich) sowie die Füll- und Kalibrierlösungen sind in der Publikation (1) [37] angegeben.

Die Abschätzung des Einflusses von Störionen auf die Messergebnisse erfolgte mittels der Nikolsky-Eisenmann-Gleichung (erweiterte Nernst-Gleichung).

Mittels eines Differenzialverstärkers wurde das Referenzsignal vom Signal der ionenselektiven Seite subtrahiert, um auf diese Weise die Spannungsverschiebung, verursacht durch die Ionenkonzentrationsänderung, zu erhalten. Die Veränderung der jeweiligen Ionenkonzentration wurde dann unter Verwendung der Nernst-Gleichung berechnet.

Die Messtiefe im zerebralen Kortex betrug $100\ \mu\text{m}$. Im kaudalen Teil des kraniellen Fensters nutzten wir zwei zusammengeklebte Mikroelektroden, während eine einzelne Mikroelektrode rostral positioniert wurde (siehe auch [37], Abbildung 1 - Versuchsaufbau). Gewöhnlich war eine der zusammengeklebten Elektroden kaliumsensitiv, während die andere variierte. Das Zusammenkleben erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Eine Elektrodenspitze war dabei leicht gebogen, so dass die beiden Elektrodenspitzen in einer parallelen Ausrichtung mit einem Abstand zwischen den Spitzen im Bereich von ca. $5\ \text{bis}\ 25\ \mu\text{m}$ zusammengeklebt werden konnten [48, 49].

3.6 Die extrazelluläre Konzentration an Magnesium-Ionen

Der Selektivitätskoeffizient selbst ist eine Funktion der absoluten Mess- und Störionenkonzentration. Optimalerweise sollte die gemessene Elektrodenpotentialdifferenz lediglich von der Aktivität des Messions abhängig sein bzw. Einflüsse von Störionen vernachlässigbar gering sein (linearer Bereich der Nikolsky-Antwort-Kurve). Für die Bestimmung der K^+ -, Ca^{2+} -, Na^+ -, pH - und Cl^- -Veränderungen war diese Bedingung weitgehend erfüllt.

Es war hingegen nicht möglich, mit den gegenwärtig verfügbaren Ionenaustauschern aufgrund des hohen Selektivitätskoeffizienten für Kalziumionen zuverlässige Messungen für die extrazelluläre Magnesium-Ionenkonzentration zu erhalten. Unter den physiologischen Bedingungen mit einer $[Ca^{2+}]_o$, waren die Mg^{2+} -Elektroden blind für Mg^{2+} , mit dem Absinken der $[Ca^{2+}]_o$ während der CSI wurden sie sensitiver gegenüber Mg^{2+} , blieben aber innerhalb des nichtlinearen Bereichs der Nikolsky-Antwort-Kurve.

Die Beträge aller gemessenen Veränderungen an $[Na^+]_o$, $[K^+]_o$, $[Ca^{2+}]_o$, $[Cl^-]_o$, pH_o und des extrazellulären Volumens während Spreading Ischaemia blieben innerhalb des Bereichs der bereits früher berichteten Änderungen für beides, die anoxische Depolarisation und die Spreading Depression [50, 51, 52, 53]. Deshalb wurde die Veränderung der $[Mg^{2+}]_o$ während CSI, basierend auf Messungen mit Mikrodialyse und Graphitflammen-Atomabsorptionsspektroskopie in einem Arteria cerebri media-Verschluss-Modell der Wüstenrennmaus, geschätzt [54].

3.7 Größenveränderungen des Extrazellulärraums

Die Veränderungen in der Größe des Extrazellulärraums wurden mit Tetrapropyl-Ammonium-Ionen (TPA^+)-selektiven Elektroden geschätzt, welche den Ionenaustauscher Corning 474317 enthielten. Hierbei wurde ausgenutzt, dass dieser Corning-Kalium-Ionenaustauscher sensitiv gegenüber tetraalkylierten Ammonium-Ionen ist [55]. Zu diesem Zweck wurde der Kortex mit ACSF superfundiert, welche TPA^+ in einer Konzentration von 2 mM enthielt. Unter diesen Bedingungen waren die Elektroden praktisch blind für Kalium-Ionen. Davon ausgehend, dass TPA^+ weitgehend auf den Extrazellulärraum beschränkt bleibt, ist seine Konzentration umgekehrt proportional zur Volumenfraktion des Extrazellulärraums [56, 57].

3.8 Statistik

Alle Daten im Text und in den Abbildungen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die verwendeten statistischen Testmethoden werden in den jeweiligen Publikationen [37, 44, 46] erläutert. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Publikation (1): Veränderungen des pH_o , der $[\text{K}^+]_o$, der $[\text{Na}^+]_o$, der $[\text{Ca}^{2+}]_o$, der $[\text{Cl}^-]_o$ und des extrazellulären Volumens während CSI in vivo [37]

Um die Veränderungen der Ionenkonzentrationen des Extrazellulärraums ($[\text{K}^+]_o$, $[\text{Na}^+]_o$, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, $[\text{Cl}^-]_o$) und des pH-Wertes zu messen, generierten wir eine Spreading Ischaemia, indem wir $[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$ schrittweise in 60 min-Intervallen steigerten (3, 25, 35, 45 mM). Nach Aufnahme einer Baseline unter Superfusion von ASCF ($[\text{K}^+]_{\text{ACSF}} = 3$ mM, kein Oxyhämoglobin) folgte während des gesamten weiteren Experiments die kontinuierliche Applikation des NO-Scavengers Oxyhämoglobin. Die erste Spreading Ischaemia trat bei 25 mM $[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$ in 4 der 36 Tiere auf, bei 35 mM $[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$ in 29 der 36 und bei 45 mM $[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$ in den verbleibenden drei Tieren.

Die Veränderungen des zerebralen Blutflusses, der DC-Potentialparameter und die Veränderungen der extrazellulären Ionenkonzentrationen während Spreading Ischaemia sind im Detail der Publikation (1) [37] zu entnehmen (siehe hierzu auch Abbildung 2 in [37]).

Wesentlich ist die Ähnlichkeit zur normalen Cortical Spreading Depression. Im Gegensatz zur anoxischen Depolarisation [58] startete die Spreading Ischaemia nicht mit einer ausgeprägten graduellen Abnahme des pH, sondern mit einem alkalischen Shift von 7,35 auf $7,68 \pm 0,14$, gefolgt von einer Abnahme des pH auf $6,85 \pm 0,26$ (siehe Abbildung 2 in [37]). Die Verzögerung zwischen dem Einsetzen des negativen intrakortikalen DC-Shifts an den kaudalen und rostralen Aufzeichnungsseiten betrug 46 ± 40 s und die Verzögerung zwischen dem Einsetzen der Hypoperfusionen 39 ± 40 s, was eine Ausbreitung von beiden, der Depolarisationswelle und der ischämischen Flussveränderung, suggeriert.

Acht Experimente wurden durchgeführt, um die Abnahme des Extrazellulärraumes während Spreading Ischaemia zu berechnen. Unter Superfusion von TPA^+ (2 mM) trat die erste Spreading Ischaemia bei 25 mM $[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$ in drei der acht Experimente und bei 35 mM $[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$ in den verbleibenden 5 Tieren auf. Die Veränderungen des zerebralen Blutflusses und des intrakortikalen als auch des subarachnoidalen DC-Potentials während Spreading Ischaemia waren nicht signifikant unterschiedlich zu denen in Abwesenheit von TPA^+ . Die berechnete Extrazellulärraumvolumenabnahme während Spreading Ischaemia betrug $70,4 \pm 16,9$ %.

4.2 Publikation (2): Die CSI und der NMDA-Rezeptorantagonist MK-801 [44]

4.2.1 Gruppe 1 und 2: Eine NMDAR-Blockade inhibiert CSIs nicht

In Gruppe 1 generierten wir eine CSI durch kontinuierliche Superfusion des NO-Scavengers Oxyhämoglobin (2,5 mmol/l) und schrittweisen Anstieg der $[K^+]_{ACSF}$ auf 3, 25 und 35 mmol/l ($n = 6$). Vor der CSI stieg das $[K^+]_o$ graduell an (kaudale Mikroelektrode $6,7 \pm 1,0$ mmol/l; rostrale Mikroelektrode $9,1 \pm 4,4$ mmol/l). Die CSI war charakterisiert durch eine lang andauernde Absenkung des zerebralen Blutflusses auf ein ischämisches Niveau und eine folgende transiente Hyperämie (siehe auch Tabelle 2 und Abbildung 1A in [44]). Die Flussveränderungen waren begleitet von einer transienten Negativierung des DC-Potentials und einem transienten Peak der $[K^+]_o$. Die Verzögerung zwischen dem Einsetzen der Hypoperfusionen, zwischen den beiden Laserdopplersonden, zeigte die Ausbreitung der ischämischen Flussveränderungen an.

Diese Gruppe wurde verglichen mit der Gruppe 2 ($n = 6$), in welcher die CSI durch dasselbe Protokoll generiert wurde, aber der nichtkompetitive NMDAR-Antagonist MK-801 (5 mg/kg Körpergewicht) durch eine zweimalige intravenöse Bolusgabe, und zwar bei normaler und erhöhter $[K^+]_{ACSF}$, appliziert wurde. Die CSIs traten trotz NMDAR-Blockade, angezeigt durch eine Erniedrigung der Amplitude des Elektrokortikogramms nach MK-801-Injektion, bei einer ähnlichen Schwelle wie in der Gruppe 1 auf.

4.2.2 Gruppe 3: Eine NMDAR-Blockade inhibiert SD-ähnliche Depolarisationen bei einer hohen $[K^+]_o$ nicht

Wir superfundierten den Kortex mit einer hohen $[K^+]_{ACSF}$ (130 mmol/l), um CSD-ähnliche Depolarisationen in vivo zu generieren ($n = 5$; eine niedrigere $[K^+]_{ACSF}$ induzierte CSD-ähnliche Depolarisationen nicht zuverlässig [31]). Die Mikroelektroden und die Laserdopplersonden wurden an den entgegengesetzten Enden des kraniellen Fensters positioniert. Vor den CSD-ähnlichen Depolarisationen stieg die $[K^+]_o$ auf $7,7 \pm 6,8$ mmol/l (kaudal) und auf $5,7 \pm 5,8$ mmol/l (rostral). CSD-ähnliche Depolarisationen, charakterisiert durch einen negativen DC-Shift, einem transienten Anstieg der $[K^+]_o$ und eine kurze Hypoperfusion mit transientser Hyperämie (wie beschrieben in [31]), traten in allen Tieren auf. Zwischen den Ableitstellen innerhalb des kraniellen Fensters bestand eine Verzögerung, was die Ausbreitung der neurovaskulären Veränderungen anzeigt (siehe Abbildung 1B in [44]). Verglichen mit der CSI (Gruppe 1 und 2) waren die Dauer des DC-Shifts sowie das Ausmaß und die Dauer der Hypoperfusion signifikant kleiner ($P < 0.001$, Student-t-Test). Nach drei aufgezeichneten CSD-ähnlichen Depolarisationen wurde die Perfusion zur physiologischen ACSF gewechselt und MK-801 als Bolus injiziert. Wenn MK-801 das zerebrale Gewebe erreicht hatte, wurde erneut eine

erhöhte $[K^+]_{ACSF}$ superfundiert. In allen Tieren waren die induzierten CSD-ähnlichen Depolarisationen unter MK-801 ohne Unterschied zu den CSD-ähnlichen Depolarisationen ohne MK-801, traten aber bei einer signifikant höheren Kaliumschwelle ($15,6 \pm 4,9$ mmol/l kaudal, $11,3 \pm 4,7$ mmol/l rostral) auf. Das heißt, die NMDAR-Blockade verschiebt zwar die Schwelle, blockiert aber die CSD-ähnlichen Depolarisationen unter einer erhöhten $[K^+]_o$ nicht.

4.2.3 Gruppe 4: Die NMDAR-Blockade verhindert die CSD-Ausbreitung vom Gewebe mit erhöhter $[K^+]_o$ in Gewebe mit normaler $[K^+]_o$

Um die Empfindlichkeit der CSD-ähnlichen Depolarisationen und der CSD auf MK-801 ($n = 5$) zu untersuchen, implantierten wir zwei ipsilaterale kranielle Fenster. Um CSD-ähnliche Depolarisationen zu generieren, wurde das kaudale Fenster mit einer erhöhten $[K^+]_{ACSF}$ (130 mmol/l) superfundiert. Diese Depolarisationen erschienen dann als CSD im rostralen Fenster, welches während des gesamten Experimentes mit physiologischer ACSF superfundiert wurde. Die hohe $[K^+]_{ACSF}$ im kaudalen Fenster verursachte einen graduellen Anstieg der $[K^+]_o$ ($6,7 \pm 3,7$ mmol/l). Die $[K^+]_o$ rostral blieb konstant. Im kaudalen Fenster traten 5 ± 4 CSD-ähnliche Depolarisationen auf und 3 ± 1 dieser Depolarisationen breiteten sich in das rostrale Fenster aus. Nach MK-801-Gabe traten die CSD-ähnlichen Depolarisationen nur noch im kaudalen Fenster auf (8 ± 2 innerhalb von 60 Minuten), während die Ausbreitung in das rostrale Fenster komplett blockiert wurde (Die Abbildung 2 in [44] zeigt ein Beispiel.).

4.3 Publikation (3): Die CSI und die Wirkung von Nimodipin bzw. HAES [46]

Verglichen mit den Kontrollwerten, senkte Nimodipin signifikant den mittleren arteriellen Druck (MAP) ($P \leq 0.05$). HAES senkte, verglichen mit den Gruppen 1 und 2, signifikant die Hämatokrit-Level ($P \leq 0.05$).

4.3.1 Gruppe 1: CBF- und DC-Potentialveränderungen unter physiologischen Bedingungen (Cortical Spreading Depression nach Leão)

Eine neuronal-astrogliale Depolarisationswelle wurde durch KCl am offenen kraniellen Fenster ausgelöst (siehe Abbildung 1 in [46] – experimentelles Modell). Die Welle breitete sich in das kortikale Gebiet unter dem geschlossenen kraniellen Fenster aus, wo wir den CBF und das DC-Potential maßen. In 14 Tieren wurde der Kortex unter dem geschlossenen kraniellen Fenster mit physiologischer ACSF superfundiert. Die Depolarisationswelle führte zu einem subarachnoidalen DC-Shift von $2,2 \pm 0,6$ mV, welcher $1,7 \pm 0,6$ Minuten dauerte. Die Welle war an einen CBF-Anstieg (Cortical Spreading Hyperaemia) auf 293 ± 91 % gekoppelt (verglichen

mit den Baseline-Werten von 100 %). Dieses Ereignis ist als Leão's Cortical Spreading Depression [4] bekannt und in den Abbildungen 2D bzw. 3A in [46] dargestellt. Die statistische Analyse ist in Abbildung 4 in [46] zu sehen.

4.3.2 Gruppe 2: Die Inversion der Kopplung zwischen der sich ausbreitenden neuronalen Aktivierung und dem CBF bei Hämoglobin und einer erhöhten $[K^+]_{ACSF}$ im Subarachnoidalraum

In weiteren 16 Tieren wurde der Kortex unterhalb des geschlossenen kraniellen Fensters mit ACSF, welche Hämoglobin in einer Konzentration von 2,5 mmol/l und Kalium-Ionen in einer Konzentration von 20 mmol/l enthielt, superfundiert. Originale der experimentellen Aufzeichnungen sind in Abbildung 2A in [46] präsentiert. Es konnte beobachtet werden, dass die erythrozytären Produkte den CBF graduell auf 70 ± 33 % reduzierten. Wenn eine sich ausbreitende neuronal-astrogliale Depolarisationswelle am offenen kraniellen Fenster ausgelöst wurde, breitete sich diese in das geschlossene kraniale Fenster aus, wo das typische Erscheinungsbild einer Cortical Spreading Ischaemia aufgezeichnet werden konnte [30]. Das subarachnoidale DC-Potential demonstrierte dabei einen negativen DC-Shift von $-7,4 \pm 2,6$ mV, welcher für $33,3 \pm 33,4$ Minuten andauerte. Die neuronal-astrogliale Depolarisationswelle induzierte keinen CBF-Anstieg, sondern eine Senkung auf 36 ± 24 %, welche $29,5 \pm 35,5$ Minuten anhielt. Die Inversion der Kopplung zwischen neuronaler Aktivierung und dem CBF in der Gegenwart von Hämoglobin und einer erhöhten $[K^+]_{ACSF}$ ist in der Abbildung 3B in [46] in einer höheren zeitlichen Auflösung dargestellt. Den Vergleich zur physiologischen Kopplung zeigt die Abbildung 3A in [46] und die statistische Analyse ist aus Abbildung 4 in [46] ersichtlich.

Die CBF-Senkung, getriggert durch die sich ausbreitende neuronal-astrogliale Depolarisationswelle in der Gegenwart roter Blutzellprodukte, dauerte so lange, wie die neuronale Depolarisation anhielt. Deshalb waren die Dauer der Hypoperfusion und die des negativen DC-Shifts linear korreliert ($r = 0,99$; $P < 0,01$). Den ischämischen Episoden folgte eine lang dauernde Hyperämie auf 133 ± 63 %.

4.3.3 Gruppe 3: Die Wiederherstellung der Kopplung zwischen der sich ausbreitenden neuronalen Aktivierung und dem CBF unter intravenöser Applikation von Nimodipin

Zwölf Tieren wurde intravenös Nimodipin in einer Dosierung von 2 $\mu\text{g/kg KG/min}$ gegeben. Originale der experimentellen Aufzeichnungen sind in Abbildung 2B in [46] präsentiert.

Es konnte beobachtet werden, dass die intravenöse Nimodipin-Gabe zu einem CBF-Anstieg auf $199 \pm 85 \%$ führte. Die Koapplikation von ACSF mit Hämoglobin in einer Konzentration von $2,5 \text{ mmol/l}$ und K^+ in einer Konzentration von 20 mmol/l senkte den Blutfluss auf $154 \pm 77 \%$ während der kontinuierlichen intravenösen Nimodipin-Infusion. Nach Auslösung einer sich ausbreitenden neuronal-astroglialen Depolarisationswelle am offenen kraniellen Fenster wurde unter diesen Bedingungen keine Cortical Spreading Ischaemia gemessen, sondern es zeigte sich eine nur noch kurze initiale Hypoperfusion von 154 auf $99 \pm 56 \%$ für $2,3 \pm 6,5$ Minuten, gefolgt von einer Hyperämie auf $217 \pm 87 \%$. Der negative DC-Shift betrug $-5,5 \pm 1,6 \text{ mV}$ und dauerte für $3,6 \pm 6,2$ Minuten an. In einer höheren zeitlichen Auflösung sind diese charakteristischen Veränderungen in der Abbildung 3C in [46] demonstriert. Den Vergleich zur „echten“ Cortical Spreading Depression unter physiologischen Bedingungen zeigt die Abbildung 3A und den zur Cortical Spreading Ischaemia die Abbildung 3B in [46]. Die statistische Analyse ist aus der Abbildung 4 [46] ersichtlich.

Nur in einer Ratte versagte die Behandlung mit Nimodipin hinsichtlich der Umkehrung der Spreading Ischaemia in die Spreading Hyperaemia. In Antwort auf die Depolarisationswelle wurde hier eine CBF-Reduktion auf 43% beobachtet, die 23 Minuten andauerte. Interessanterweise hatte dieses Tier den niedrigsten MAP (40 mm Hg) von allen Tieren.

4.3.4 Gruppe 4: Die Wiederherstellung der Kopplung zwischen der sich ausbreitenden neuronalen Aktivierung und dem CBF unter intravenöser HAES-Gabe

Bei 10 Tieren wurde HAES (6%) intravenös mit 5 ml/h anstelle von Nimodipin gegeben. Originale der experimentellen Aufzeichnungen sind in Abbildung 2C in [46] präsentiert. HAES steigerte den CBF auf $168 \pm 32 \%$. Die Koapplikation von ACSF mit Hämoglobin in einer Konzentration von $2,5 \text{ mmol/l}$ und K^+ in einer Konzentration von 20 mmol/l senkte den Blutfluss während der kontinuierlichen intravenösen HAES-Infusion auf $133 \pm 42 \%$. Nach Auslösung einer sich ausbreitenden neuronal-astroglialen Depolarisationswelle am offenen kraniellen Fenster wurde keine Cortical Spreading Ischaemia, sondern eine nur noch kurze initiale Hypoperfusion von 133 auf $102 \pm 44 \%$ für $1,7 \pm 3,6$ Minuten beobachtet, gefolgt von einer Hyperämie auf $218 \pm 31 \%$ (Abbildung 2C in [46]). Der negative DC-Shift betrug $-4,9 \pm 1,2 \text{ mV}$ und dauerte für $3,6 \pm 4,4$ Minuten. Die statistische Analyse ist aus Abbildung 4 [46] ersichtlich.

Wie Nimodipin versagte auch HAES in einer Ratte (CBF-Abfall auf 23% für 12 min) dabei, die Cortical Spreading Ischaemia in die Hyperaemia zu konvertieren. Der MAP dieses Tieres war, verglichen mit dem Mittelwert für die Gruppe 4 (101 mm Hg), ungewöhnlich niedrig (67 mm Hg).

4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation (3) [46]

Eine sich ausbreitende neuronal-astrogliale Depolarisationswelle wurde durch KCl an einem offenen kraniellen Fenster getriggert. Die Welle breitete sich von dort zu einem geschlossenen kraniellen Fenster aus, wo der CBF und das DC-Potential gemessen wurden. Wenn der Kortex unter dem geschlossenen kraniellen Fenster mit physiologischer ACSF superfundiert wurde, konnte ein physiologisches Muster eines kurzen negativen DC-Shifts, assoziiert mit einer Cortical Spreading Hyperaemia (Cortical Spreading Depression), aufgezeichnet werden (Gruppe 1). Wenn die über das geschlossene kranielle Fenster superfundierte ACSF Hämoglobin und eine erhöhte $[K^+]_{ASCF}$ enthielt, war die CBF-Antwort auf die neuronal-astrogliale Depolarisationswelle lokal von einer Cortical Spreading Hyperaemia in eine Cortical Spreading Ischaemia konvertiert (Gruppe 2) (wie bereits zuvor berichtet [30]). Wenn entweder Nimodipin (Gruppe 3) oder HAES (Gruppe 4) prophylaktisch intravenös gegeben wurde, kehrte sich die Cortical Spreading Ischaemia, trotz der Gegenwart von Hämoglobin und einer erhöhten $[K^+]_{ASCF}$, in eine Cortical Spreading Hyperaemia um.

Also beobachteten wir: 1. dass die Cortical Spreading Ischaemia, induziert durch Hämoglobin und eine erhöhte $[K^+]_{ASCF}$, eine pharmakologische Antwort auf Nimodipin zeigt (ähnlich der Cortical Spreading Ischaemia, induziert durch NOS-Inhibition und eine erhöhte $[K^+]_{ASCF}$) und

2. dass die Cortical Spreading Ischaemia sensitiv auf eine moderate Volumenexpansion bzw. Hämodilution ist.

5 Diskussion

5.1 Mögliche Zusammenhänge zwischen der CSI und DINDs

Das Auftreten von DINDs wurde erstmalig von Robertson (1949) [59] vor fünf Jahrzehnten beschrieben. Das Jahr der Entdeckung fiel in die Ära der zerebralen Angiographie, welche durch Moniz 1927 [60] eingeleitet wurde. Als Ecker und Riemenschneider (1951) [61] erstmalig verzögerte arterielle Spasmen nach Subarachnoidalblutung mittels zerebraler Angiographie demonstrierten, glaubte man im Prinzip, die Pathogenese der verzögerten ischämischen neurologischen Defizite erklären zu können. Man ging davon aus, dass arterielle Spasmen der Arterien des Circulus Willisii die zerebrale Infarzierung verursachen.

Jedoch haben verschiedene Erkenntnisse die einfache Verbindung zwischen DINDs und Vasospasmen angefochten:

- a) Neil-Dwyer et al. (1994) [33] fanden in ihrer prospektiven Autopsiestudie keinen signifikanten Unterschied bezüglich dem Auftreten von DIND-induzierten Läsionen zwischen Patienten mit und ohne angiographisch demonstrierten Vasospasmen,
- b) auch das pathoanatomische Muster und die weite Verteilung der DIND-induzierten Läsionen im Kortex legen nahe, dass das pathophysiologische Schlüsselproblem nicht allein von den proximalen Segmenten der Zerebralarterien abhängig ist,
- c) Tierstudien zur Subarachnoidalblutung versagen wesentlich darin, DINDs oder verzögerte Läsionen trotz angiographischem Spasmusnachweis zu demonstrieren.

Als eine Alternative haben wir vorgeschlagen, dass die direkte Aktion der roten Blutzellprodukte auf die Mikrozirkulation und auf das neuronal-astrogliale Netzwerk für die mit DINDs assoziierten kortikalen Läsionen verantwortlich sein könnte.

Hämoglobin und Kalium sind das Protein und das Ion mit der höchsten Konzentration in Erythrozyten und werden freigesetzt, wenn diese lysieren. Die Spreading Ischaemia tritt lokal auf, wo eine erhöhte Kaliumkonzentration und Hämoglobin im Subarachnoidalraum präsent sind. Die Spreading Ischaemia ist eine maligne Form der Spreading Depression-Varianten. Hier startet die Depolarisationswelle ähnlich einer regulären Spreading Depression bei normalem Blutfluss, aber die Kopplung zwischen dem aktivierten Metabolismus und dem zerebralen Blutfluss ist invers. So induziert die neuronal-astrogliale Depolarisationswelle eine schwere Vasokonstriktion der zerebralen Arterien und Arteriolen, welche in einer ischämischen Blutflussveränderung resultiert [30]. Diese ischämischen Blutflussveränderungen breiten sich zusammen mit der neuronal-astroglialen Depolarisationswelle im zerebralen Kortex aus (Cortical Spreading Ischaemia).

Die Cortical Spreading Ischaemia führt zu fokalen, glockenförmigen oder laminären Infarkten des Kortex der Ratte, welche dem pathoanatomischen Muster der DINDs beim Menschen sehr ähnlich sind [31].

Dies und die Induktion der Spreading Ischaemia durch Hämoglobin und Kalium-Ionen im Subarachnoidalraum stützen die Hypothese [30], dass die Spreading Ischaemia das pathophysiologische Korrelat der weit verteilten fokalen kortikalen Nekrosen sein könnte, welche in ungefähr 80 % der Autopsiefälle nach Subarachnoidalblutung beim Menschen beobachtet wurden [32, 33, 34]. Dass die Läsionen primär auf den Kortex beschränkt sind, ist dadurch erklärbar, dass die sich ausbreitenden Depolarisationswellen nicht in die weiße Substanz

laufen. Tiefere Strukturen können durch die Wellen nur geschädigt werden, wenn lange penetrierende Arterien im kortikalen Niveau konstringiert werden.

In einer prospektiven klinischen Studie konnte mit Hilfe einer Bedside-Mikrodialyse nachgewiesen werden, dass es im zerebralen Extrazellulärraum bei Patienten nach Subarachnoidalblutung im Vergleich zu Kontrollpatienten zu einer Abnahme von NO-Metaboliten wie Nitrit und Nitrat kommt [62]. Dies kann als indirekter Hinweis dafür betrachtet werden, dass die Bioverfügbarkeit von NO bei Patienten mit Subarachnoidalblutung im Verlauf der ersten Woche nach dem Ereignis abnimmt. Da ein NO-Mangel eine der Voraussetzungen für das Auftreten einer Cortical Spreading Ischaemia ist, unterstützt auch dies die Hypothese, dass die Cortical Spreading Ischaemia der Pathomechanismus von DINDs sein könnte.

5.2 Das Modell der Cortical Spreading Ischaemia

Die Cortical Spreading Ischaemia (CSI) ist ein neu entdecktes Ischämieprinzip. Die CSI wird durch eine Cortical Spreading Depression (CSD) ausgelöst, die als Folge einer veränderten vaskulären Reaktivität nicht zu einer Hyperämie, sondern zu einer Ischämie führt. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass zerebrale Ischämien durch eine Inversion der Kopplung zwischen neuronaler Aktivierung und regionalem Blutfluss möglich sind.

Über den komplexen Mechanismus der CSI ist insgesamt wenig bekannt. Die Veränderung der vaskulären Reaktivität wird hervorgerufen durch eine Senkung der kortikalen NO-Konzentration, z. B. durch die topische Applikation des NO-Scavengers Oxyhämoglobin oder durch den NO-Synthase-Inhibitor Nitro-L-Arginin (L-NNA), in Kombination mit einem zweiten Faktor, z. B. einer Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration.

Die NO-Bindungsaffinität des Hämoglobins ist strukturabhängig. Wird in der Lunge Sauerstoff an die Hämgruppe gebunden, so wird auch die NO-Bindung an das Zystein⁹³ der reaktiven Sulfhydrylgruppe des Hämoglobins unterstützt. Durch die Bindung von NO wird aus dem Oxyhämoglobin das S-Nitroso-Hämoglobin. Während der Desoxygenierung hingegen kommt es über eine allosterische Konformationsänderung auch zur Freisetzung der NO-Gruppe. Auf diese Weise kann Hämoglobin, abhängig vom physiologischen Sauerstoffgradienten, den örtlichen Blutfluss mit dem Sauerstoffbedarf des Gewebes in Übereinstimmung bringen [63, 64].

Auch das erythrozytäre Glutathion beeinflusst die NO-Freisetzung des Hämoglobins. Es vermag selbst NO aus den Erythrozyten an endotheliale Rezeptoren abzugeben, was zur Gefäßrelaxation führt. Befindet sich Hämoglobin hingegen frei im Extrazellulärraum, so fehlt die regulierende Wirkung des Glutathions. Es dominiert die NO-abfangende Wirkung des Hämoglobins, woraus

eine hochgradige Gefäßverengung resultiert. Hierbei ist die Affinität des freien Hämoglobins zu NO ist bis zu 10.000-mal größer als die zu Sauerstoff [65].

Als zusätzliche vasokonstriktorisches Eigenschaften des Hämoglobins werden die Freisetzung von vasoaktiven Eicosanoiden und Endothelin, die Hemmung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation, das Auslösen von strukturellen Schäden der Arterienwand und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen angesehen [66, 67].

Aus der Fülle von NO-Funktionen ist zum Verständnis der hier vorliegenden Arbeit insbesondere die vasodilatatorische Wirkung von Bedeutung. Sie wird unter anderen darauf zurückgeführt, dass die lösliche Guanylat-Cyclase (sGC) aktiviert wird und so zur Bildung von cyclischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) führt [68]. Nachfolgend kommt es durch die Aktivierung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase zur Öffnung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen in glatten Muskelzellen von Arterien und somit zu deren Relaxation [69].

Durch eine zerebrale NOS-Inhibition war es in einer ganzen Reihe von Veröffentlichungen möglich, die Blutflussantwort auf die CSD zu reduzieren und so die gefäßregulierende Funktion des NO im Rahmen der CSD zu zeigen [70, 71, 72, 73]. Allerdings gibt es auch Arbeiten, die diese Abnahme der CSD-abhängigen Blutflussantwort durch die Reduktion der kortikalen NOS-Aktivität nicht belegen konnten [74, 75, 76, 77].

Die Wirkung von Kalium-Ionen auf die zerebrale Perfusion ist konzentrationsabhängig. So konnten McCulloch und Mitarbeiter in Veröffentlichungen über die vasomotorische Antwort pialer Venen und Arterien demonstrieren, dass die perivaskuläre Applikation von kaliumfreier ACSF zu einer signifikanten Reduktion des arteriellen Gefäßdurchmessers führt. Eine Kaliumkonzentration von 10 mM hingegen führt zu einer signifikanten Zunahme des Gefäßdurchmessers und eine weitere Steigerung auf 40 mmol/l zu einer Konstriktion der pialen Gefäße [78]. Veröffentlichungen weiterer Autoren bestätigen diese Kaliumkonzentrationsabhängigkeit des Tonus zerebraler Arterien und Arteriolen [79, 80].

Hinsichtlich der Interaktion von Kalium und NO in Bezug auf die Vasomotorik beobachteten Rapoport und Murad an der isolierten Aorta von Ratten bei mäßiger Kaliumerhöhung (10 mmol/l) in Zusammenhang mit der Applikation des NO-Donor's Natriumnitroprussid einen synergistischen vasodilatatorischen Effekt [81].

Während des Ablaufs der CSI kommt es zu einer Depolarisation des neuronal-astrozytären Netzwerks mit nachfolgender Vasokonstriktion. Dies steht im Gegensatz sowohl zur anoxischen Depolarisation als auch zu Periinfarktdepolarisationen, die im Bereich von Minuten nach einer Gefäßokklusion im Rahmen der fokalen Infarktstehung auftreten [82, 4].

Durch die Reizung des neuronal-astrozytären Netzwerks kommt es zur Ausschüttung von vasokonstringierenden Substanzen, wodurch der zeitliche Zusammenhang von Depolarisation und nachfolgendem Blutflussabfall während der CSI erklärt werden könnte. Ein wichtiger Faktor bezüglich dieser vasokonstringierenden Substanzen ist die extrazelluläre Kaliumkonzentration, die während der CSD von 3 auf 60 mmol/l ansteigt [38, 50]. Wie bereits erwähnt, wirken extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von über 20 mmol/l vasokonstriktorisch [78].

Physiologischerweise führt eine erhöhte Kaliumkonzentration nach CSD zur Freisetzung des Vasodilatators NO [83], was wiederum die vasokonstriktive Wirkung hoher Kaliumkonzentrationen antagonisiert.

Dieser Mechanismus versagt während der CSI, da ihre Entstehung an eine reduzierte NO-Konzentration (durch den NOS-Inhibitor L-NNA oder den NO-Scavenger Hämoglobin) gekoppelt ist. Die Interaktion von Kalium-Ionen und NO ist bereits in In-vitro-Arbeiten an isolierten Hunde- und Schweinearterien untersucht worden. Es zeigte sich, dass eine reduzierte NO-Aktivität die vasokonstringierende Wirkung hoher Kaliumkonzentrationen verstärkt [84, 85, 86]. Der CSD-induzierte Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration führt in Anwesenheit eines NOS-Inhibitors und ansonsten physiologischen Bedingungen lediglich zu einer initialen kurzen Hypoperfusion [71]. Wird jedoch zusätzlich zu der reduzierten NO-Konzentration die Repolarisation des neuronal-astroglialen Netzwerks, z. B. durch eine verminderte Aktivität der Na, K-ATPase, partiell gehemmt, kommt es zu einer prolongierten kaliuminduzierten Vasokonstriktion. Dabei könnte die chronisch erhöhte extrazelluläre Kalium-Baselinekonzentration direkt herabregulierend auf die Na, K-ATPase wirken (im Gegensatz zu einer akuten extrazellulären Kaliumerhöhung) [87].

Wenn diese vasokonstriktorische Phase über eine gewisse Zeitspanne anhält, resultiert ein Aufbrauchen der Sauerstoff- und Glukosevorräte von Neuronen und Astrozyten. Wird diese Phase über einen direkten neuronal-astroglialen Mechanismus verlängert, vergrößert sich ebenfalls die Phase, in der ATP während verminderter Substratzufuhr verbraucht wird, so dass die zellulären Energiereserven dann irgendwann für eine Repolarisation nicht mehr ausreichen. Da an die fortbestehende neuronale Depolarisation in vivo die Vasokonstriktion gekoppelt ist, verbleibt das Gewebe über diesen Circulus vitiosus im Zustand der Ischämie. Für die Spätphase der CSI spielt also die Unfähigkeit zur Repolarisation CSD-artiger-Depolarisationen durch Energiemangel eine herausragende Rolle [45].

Kommt es schließlich wieder zur Repolarisation, fällt der vasokonstriktorische Reiz weg und die Perfusion setzt wieder auf höherem Niveau ein.

Während der subarachnoidale Kaliumschwellenwert zum Auslösen einer CSD in der Gegenwart von Hämoglobin oder L-NNA zwischen 20–35 mmol/l liegt, beträgt er ohne Zugegenheit von NO-senkenden Substanzen 50-80 mmol/l [31]. Dieser verminderte Kaliumschwellenwert für das Auslösen einer CSD durch NO-senkende Substanzen in der ACSF könnte durch das reduzierte zerebrale Blutflussniveau bedingt sein. Die resultierende Minderperfusion stört die Freisetzung von Kalium-Ionen aus den glialen Endfüßchen in das Gefäßsystem [88]. Hierdurch nimmt der Abtransport von Kalium über das Blut ab und es kommt zu einem Persistieren der erhöhten subarachnoidalen Kaliumkonzentration.

Der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor ist bei der Entstehung und Ausbreitung der CSD in allen bislang untersuchten Arten bedeutsam [4, 8, 40]. Eine Abnahme der NO-Konzentration verursacht auch eine Verminderung der NO-vermittelten Herabregulation des (NMDA)-Rezeptors über seine Redoxstelle [89]. Es könnte somit zu einer Verstärkung des agonistischen Effektes von Glutamat am NMDA-Rezeptor kommen.

5.3 Publikation (3): Die CSI und Nimodipin bzw. eine moderate Volumenexpansion/ Hämodilution [46]

Ein neueres systematisches Review aller randomisierten und kontrollierten klinischen Studien zu Kalzium-Antagonisten bei Patienten mit SAB (insgesamt 2756 Patienten) bestätigt eine signifikante Reduktion der Häufigkeit eines schlechten Outcomes durch Nimodipin. Diese Absenkung resultiert aus der Reduktion des Auftretens von DINDs [90].

Auf der zellulären Ebene hemmt Nimodipin direkt langsam inaktivierende spannungsabhängige Kalzium-Kanäle (L-Typ-Kanäle). Die Blockade des Kalziumeintritts vom Extrazellulärraum in den glatten Gefäßmuskel führt zur zerebralen Vasodilatation und steigert die zerebrale Perfusion [91, 92, 93].

Es wurde diskutiert, dass der chronische Vasospasmus der zerebralen Hauptgefäße durch Kalziumantagonisten umgekehrt werden könnte [94]. In verschiedenen randomisierten klinischen Versuchen wurde jedoch angiographisch kein signifikanter Effekt einer Nimodipin-Behandlung auf den zerebralen Vasospasmus gefunden [90]. Zusätzlich löste sich ein chronischer Vasospasmus, induziert durch autologes Blut im Subarachnoidalraum von Primaten, in Antwort auf hohe Dosen von Nimodipin nicht [95, 96, 97].

Es wird angenommen, dass Hämoglobin die Hauptrolle in der Pathogenese des Spasmus der großen Arterien spielt [25, 26]. Jedoch antagonisiert Nimodipin die Hämoglobin induzierte arterielle Konstriktion in verschiedenen Spezies wie Affe, Hund und Mensch kaum [98].

Diese klinischen und experimentellen Funde legen nahe, dass die anti-ischämischen Effekte des Nimodipins mit einer direkten Protektion der Neurone über eine Blockade des exzitotoxischen Kalziumeintritts im Zusammenhang stehen könnten [99, 100]. Wenn jedoch der zytoprotektive Effekt auf Neurone die Schlüsselfunktion des Nimodipins wäre, dann müsste die Substanz auch bei anderen Typen der Ischämie als bei DINDs wirksam sein. In verschiedenen Tierstudien zur fokalen zerebralen Ischämie war Nimodipin jedoch nicht konsistent effektiv [101, 102]. In einer neueren Metaanalyse ergab sich kein Hinweis, dass Nimodipin bei Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall ohne vorhergehende SAB den ‚Outcome‘ verbessert [103].

Die Reduktion des Risikos in den letzten 20 Jahren, eine verzögerte Ischämie zu entwickeln, ist nicht nur durch die prophylaktische Anwendung von Nimodipin bedingt, sondern auch durch ein verbessertes Flüssigkeitsmanagement. In ca. einem Drittel der Patienten nach SAB kommt es zu einer exzessiven Natriurese und einer intravaskulären Volumenkontraktion [104]. In der Vergangenheit wurde die Hyponatriämie fälschlicherweise einer Wasserretention zugeschrieben. Deshalb wurde eine Flüssigkeitsrestriktion angewendet, was, wie später gefunden, das Risiko für DINDs erhöht. Zwei nicht randomisierte Studien, die historische Kontrollfälle benutzten, legen nahe, dass eine tägliche Flüssigkeitsaufnahme von mehr als 3 l einer Elektrolytlösung (verglichen mit 1,5–2 l, genutzt in der Vergangenheit) mit einer niedrigeren Rate an DINDs assoziiert waren [105, 106]. Zusätzlich verglich eine randomisierte Studie Kontrollen und Patienten, behandelt mit einer Volumenexpansion mit Albumin und Kristalloiden, um einen Hämokrit-Wert um 45 % zu erreichen [107]. In diesem kleinen Versuch resultierte eine moderate hypervolämische Hämodilution in einer signifikanten Reduktion der Häufigkeit von DINDs. Eine intensivere prophylaktische Volumenexpansion mit erhöhten kardialen Füllungsdrücken war einer moderaten Volumenexpansion nicht überlegen [108, 109]. Die Hyponatriämie an sich steigert das Risiko für DINDs nicht [110].

Autopsiestudien haben gezeigt, dass das vorherrschende pathomorphologische Korrelat der DINDs nach SAB kortikale Infarzierungen sind, welche auch in Gebieten entfernt der aneurysmatragenden Arterie auftreten können [32, 33, 34, 110, 111].

Unsere Arbeitsgruppe hat vorgeschlagen, dass diese kortikalen Läsionen aus einem Mechanismus, verbunden mit der Cortical Spreading Ischaemia, resultieren könnten [30, 31]. Wie auch in der Publikation (3) [46] gezeigt werden konnte, bewirken Nimodipin und HAES in Ratten die Überführung der Spreading Ischaemia in eine Spreading Hyperaemia [30, 45], was die Beziehung zwischen Tiermodell und klinischen Bedingungen unterstützt.

Bei der Cortical Spreading Ischaemia ist die CBF-Antwort auf eine neuronal-astrogliale Depolarisationswelle invertiert, so dass eine lokale Vasokonstriktion (anstelle einer Vasodilatation) induziert wird. Die Vasokonstriktion reduziert das neuronal-astrogliale Angebot an Energiesubstraten, was wiederum die neuronal-astrogliale Repolarisation verhindert. Da aber die neuronal-astrogliale Depolarisation eine Vasokonstriktion produziert, resultiert ein Circulus vitiosus, der zu einer prolongierten Ischämie führt. Wenn der Ausgangs-CBF erhöht ist (d. h. durch Nimodipin oder HAES), dann beginnt die neuronal-astroglial getriggerte CBF-Senkung von einem höheren CBF-Niveau. Der Grad der Hypoperfusion ist so weniger stark als in der Abwesenheit von Nimodipin oder HAES. Unter diesen Bedingungen wird während der Hypoperfusionsphase mehr Energie für den neuronal-astroglialen Repolarisationsprozess geliefert und der Circulus vitiosus wird unterbrochen. Übereinstimmend mit dieser Hypothese, dass eine kurze, einzelne, initiale Hypoperfusion von einem höherem CBF-Niveau startet, was in der Gegenwart von Nimodipin oder HAES beobachtet wurde (siehe Abbildung 3C in Publikation (3) [46]), kommt es, verglichen hiermit, zu einer prolongierten ischämischen Antwort in ihrer Abwesenheit (Abbildung 3B in Publikation (3) [46]).

Im Gegensatz hierzu begünstigen Vasokonstriktoren oder Senker des arteriellen Mitteldrucks das Auftreten der Spreading Ischaemia. Normale Hämatokrit-Werte für Ratten bewegen sich in einem Bereich von 35 bis 55 % [112]. Deshalb blieb der Hämatokrit-Wert für alle vier Gruppen unserer Studie physiologisch. Innerhalb dieses physiologischen Bereichs jedoch reduzierte HAES signifikant die Hämatokrit-Werte. Die resultierende Senkung der Blutviskosität war wahrscheinlich verantwortlich für das Ansteigen des CBF in dem kortikalen Bereich, in dem erythrozytäre Produkte superfundiert wurden.

Es wurde gezeigt, dass eine ausgeprägte Cortical Spreading Ischaemia zu kortikalen Infarzierungen führt, im Gegensatz zu Spreading Depolarisations, welche nur mit kurzen initialen Hypoperfusionen verbunden sind [31]. Wir extrapolieren von diesen früheren Ergebnissen in diese Studie (Publikation (3) [46]), dass die CBF-Antworten auf die Spreading Depolarisations in der Gegenwart von Nimodipin oder HAES wahrscheinlich nicht in einem neuronalen Schaden resultieren.

Von unserer Studie können keine Rückschlüsse hinsichtlich territorialer Infarkte nach SAB gezogen werden, welche wahrscheinlich den üblichen pathogenetischen Kaskaden der Ischämie folgen.

Die Hämatokrit-Level bei Patienten mit ischämischen Schlaganfällen, unabhängig von einer SAB, waren signifikant höher, verglichen mit gematchten Kontrollobjekten [113, 114]. Jedoch im Gegensatz zum Nutzen für Patienten mit DINDs konnte eine Metaanalyse keine Hinweise

dafür finden, dass eine moderate Volumenexpansion die Outcomes verbesserte [115]. Unter den Patienten mit ischämischen Schlaganfällen, unabhängig von einer SAB, war die intravenöse Gabe von Nimodipin (0,5 µg/kg KG/min) assoziiert mit einem signifikant erhöhtem Risiko eines schlechten Outcomes [103]. Deshalb ist es möglich, dass die intravenöse Nimodipin-Gabe aufgrund der unterschiedlichen unterliegenden Mechanismen zwar effektiv gegen die Cortical Spreading Ischaemia ist, aber schädlich bei territorialen Ischämien nach SAB.

5.4 Publikation (2): Die CSI und die Problematik der NMDA-Rezeptorantagonisten [44]

Die Ergebnisse der Publikation (2) [44] belegen, dass NMDAR-Antagonisten CSD-ähnliche Depolarisationen oder CSIs nicht blockieren, wenn die $[K^+]_o$ auf ähnliche Konzentrationen wie die in der ischämischen Penumbra in vivo [116] oder in hypoxischen Hirnschnitten erhöht wurde [117]. Unsere Ergebnisse könnten für neuroprotektive Strategien bei Hirntraumen, Schlaganfall oder Hirnblutungen relevant sein, bei denen das Auftreten von CSD-ähnlichen Depolarisationen diskutiert wird [7, 11, 16, 118, 119, 120], aber auch für ischämische Infarkte nach SAB, die durch CSIs verursacht sein könnten [30, 31, 121].

Pathologische $[K^+]_o$ -Anstiege, die SD-ähnlichen Depolarisationen oder CSIs vorangehen, könnten durch eine Energieerniedrigung, wie in der ischämischen Penumbra [116, 117], induziert sein. Sie könnten aber auch durch die Gewebeerstörung beim Hirntrauma [122] oder die K^+ -Freisetzung durch Hämolyse nach SAB [123] verursacht werden.

CSD-ähnliche Depolarisationen können den Gewebeschaden verstärken [118, 119]. Da NMDAR-Antagonisten die CSD im normalen Gewebe blockieren, wurden sie als vielversprechende Substanzen angesehen, die den zerstörenden Effekt der CSD-ähnlichen Depolarisationen mindern. NMDAR-Antagonisten reduzieren die Frequenz der CSD-ähnlichen Depolarisationen nach experimenteller fokaler Hirnischämie [42, 43, 118], aber sie hatten keinen Effekt auf die anoxische Depolarisation (AD) [39, 40, 117]. Jedoch verglichen mit ihrem potenten Effekt auf „normale“ CSDs war die Effizienz der NMDAR-Antagonisten auf CSD-ähnliche Depolarisationen niedriger [41, 42, 43, 118].

Auch wir fanden, dass NMDAR-Antagonisten die Schwelle für CSD-ähnliche Depolarisationen erhöhen, aber dass ihre Effizienz dramatisch reduziert ist, wenn die Baseline $[K^+]_o$ ansteigt. Dies impliziert, dass unter pathologischen Bedingungen CSD-ähnliche Depolarisationen, die vom Gewebe mit einer erhöhten $[K^+]_o$ ausgehen, nicht durch NMDAR-Antagonisten geblockt werden können.

Eine graduelle Entwicklung von der AD über die CSD-ähnlichen Depolarisationen zur CSD angenommen, könnten diese Depolarisationen empfindlicher auf NMDAR-Inhibitoren werden,

je weiter sie sich vom kompromittierten Gewebe entfernen. Dies legt nahe, dass CSD-ähnliche Depolarisationen unter NMDAR-Blockade dann nur noch im verletzten Gewebe auftreten, aber nicht mehr in der Infarktperipherie.

Auffallend ist, dass das therapeutische Zeitfenster der NMDAR-Antagonisten in einigen Tiermodellen des Schlaganfalls endet, bevor die Mehrheit der CSD-ähnlichen Depolarisationen erscheint [124], was andere Effekte als die CSD-Inhibition nahelegt. Zum Beispiel könnte ein erniedrigter posthypoxischer Sauerstoffverbrauch [125] zu den neuroprotektiven Effekten der NMDAR-Antagonisten beitragen. In Gegensatz hierzu wurde kürzlich gezeigt, dass nach fokaler Ischämie die verzögerte Applikation eines NMDAR-Antagonisten die Infarktgröße und die Frequenz der CSD-ähnlichen Depolarisationen reduziert [118]. Überdies inhibiert MK-801, in einer höheren Konzentration, CSD-ähnliche Depolarisationen in Rattenhirnschnitten unter hohen Kalium-ACSF-Konzentrationen [126]. Jedoch konnte eine Schwellenverschiebung aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Designs nicht gefunden werden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ist unter einer Glutamatrezeptorinhibition mit Kynurenat auch die Kaliumschwelle für CSDs im Schildkrötenkleinhirn *in vivo* erhöht [127]. Da andere Kanäle über NMDAR-vermittelte Ionenströme während der Ischämie teilnehmen, könnte die Charakterisierung der Rolle dieser Kanäle während einer Energiekompromittierung helfen alternative neuroprotektive Strategien zu entwickeln.

Zusammenfassend zeigten wir, dass *in vivo* die Effizienz der NMDAR-Inhibitoren auf CSD-ähnliche Depolarisationen und CSIs kritisch durch einen Anstieg der $[K^+]_o$ -Baseline reduziert wurde. Der NMDAR-Antagonist MK-801 macht das Gewebe weniger empfindlich gegenüber CSD-ähnlichen Depolarisationen, aber er inhibiert CSD-ähnliche Depolarisationen nicht, wenn die $[K^+]_o$ -Baseline erhöht ist.

5.5 Publikation (1): Extrazelluläre Ionenveränderungen während CSI im Vergleich zur CSD und zur anoxischen Depolarisation [37]

In der Publikation (1) [37] wurde die CSI *in vivo* mit dem NO-Scavenger Oxyhämoglobin und einer erhöhten Kaliumkonzentration im Subarachnoidalraum der Ratte induziert, während langsame Potentialänderungen, der pH-Wert, Änderungen des extrazellulären Volumens und die Konzentrationen von Kalium-, Natrium-, Kalzium- und Chloridionen im Kortex mit ionenselektiven Mikroelektroden gemessen wurden.

Ziel dieses Teilprojektes [37] war es, mit Hilfe der *in vivo* erfolgten Messungen der extrazellulären Ionenkonzentrationsänderungen die Basis für die Entwicklung eines *In-vitro*-

Modells der CSI zu legen, um nachfolgend herauszufinden, ob extrazelluläre Ionenkonzentrationsänderungen die Vasokonstriktion vermitteln, die der CSI zugrunde liegt.

Es wurde bereits früher berichtet, dass die Ionenveränderungen während Spreading Depression und der anoxischen Depolarisation sehr ähnlich in verschiedenen Spezies sind [4, 38, 50, 51, 52, 53, 128, 129, 130]. Deshalb ist es nicht überraschend, dass die Beträge der Ionenveränderungen, die extrazelluläre Schrumpfung und die Abnahme der scheinbaren extrazellulären Osmolarität während Spreading Ischaemia auch innerhalb des gleichen Bereichs liegen.

Während der CSD und während der CSI steigt die extrazelluläre Kaliumkonzentration abrupt an, während bei der zerebralen Ischämie dem raschen Anstieg des Kaliums ein initial langsamer Anstieg über einige Minuten vorangeht. So bestehen nach Hansen und Zeuthen (1981) [51] die Veränderungen der extrazellulären Kalium-Ionenkonzentration während globaler Ischämie aus einem initial langsamen Anstieg von 3 auf 10 mM, gefolgt von einem abrupten Anstieg auf 50 bis 60 mM und einem terminal weiteren langsamen Ansteigen auf 75 mM. Diese Veränderungen korrespondieren mit den Veränderungen des DC-Potentials: 1. Prä-Depolarisationsphase - gradueller Anstieg auf positive Werte um 4 ± 2 mV, 2. Phase der anoxischen Depolarisation [131] mit einem raschen negativen Ausschlag um 19 ± 2 mV relativ zum nicht beteiligten Extrazellulärraum und 3. Post-Depolarisationsphase mit einer leichten positiven Auslenkung um 5 mV [51]. Die Veränderungen der Ionenkonzentrationen in der Prä-Depolarisationsphase (Dauer 1-2 min) lassen sich aus der Kombination zweier Effekte erklären. Eine Beseitigung des extrazellulären Wassers, verursacht durch ein Ansteigen der osmotisch wirksamen Partikel, generiert durch den einsetzenden anaeroben Metabolismus [132], und Veränderungen der transmembranären Ionenpermeabilität und aktiven Transportraten. Die Dauer der Phase 1 kann durch eine der globalen Ischämie vorangehende Hypoglykämie verkürzt werden [133].

In der Phase 3 der globalen Ischämie werden die Veränderungen der Phase 2 verstärkt. Diese Veränderungen sind voll reversibel, wenn der zerebrale Blutfluss wiederhergestellt wird [134, 135].

Während der CSD hingegen sind die Veränderungen spontan reversibel. Das charakteristische Muster der interstitiellen Ionenkonzentrationsänderungen bei CSD ist transient, aber in Prinzip sehr ähnlich den Ionenveränderungen bei zerebraler Ischämie. Auch hier gibt es eine Phase 1, deren Dauer aber nur einige Sekunden beträgt [38, 51]. So beschreiben Hansen und Zeuthen (1981) [51] im parietalen Kortex der Ratte nach Auslösen einer CSD durch Nadelstich oder KCl-Applikation ein Ansteigen der extrazellulären Kaliumkonzentration vom Ruhewert von 3,1 mM auf 50 mM innerhalb von 3 s, was von einer abrupten negativen Änderung des intrakortikalen DC-Potentials begleitet ist. Die hohe Kaliumkonzentration blieb ungefähr für 20 s auf diesem

Niveau, um dann langsam abzufallen. Nach 40 s erreichte die extrazelluläre Kaliumkonzentration wieder das Niveau wie vor der CSD. In einigen Experimenten wurde ein Kalium-Undershoot während der nächsten 1-2 Minuten mit Werten bis 2,6 mM beobachtet. Die Veränderungen der Ionenkonzentrationen starteten dabei nicht zur selben Zeit nach dem Auslösen der CSD. So ging der Anstieg des Kaliums dem Abfall von Kalzium, Natrium und Chlorid um ca. 5 bis 10 s voran und erreichte während dieser Zeit einen Wert von ca. 10 mM [38, 51].

Im Gegensatz zur raschen Normalisierung der extrazellulären Kalium-Ionenkonzentration nach CSD bleibt während CSI die Kalium-Ionenkonzentration aufgrund der gestörten Repolarisationsfähigkeit des neuronal-astroglialen Netzwerks über längere Zeit erhöht, so dass es in Verbindung mit einem NO-Mangel zu einer verlängerten kaliuminduzierten Vasokonstriktion kommt.

Sowohl bei der CSD als auch der anoxischen Depolarisation dürfte der Anstieg des extrazellulären Kaliums durch ein Ansteigen der Kaliumpermeabilität der Neurone bedingt sein, welche durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumaktivität ausgelöst sein könnte [136]. Dieses erhöhte intrazelluläre Kalzium könnte aus den Mitochondrien aufgrund des raschen Abfalls der Sauerstoffspannung und der daraus resultierenden Einschränkung der mitochondrialen Atmung resultieren [137, 138].

Der Anstieg der $[K^+]_o$ auf 10-12 mM könnte dann zu einer Depolarisation von präsynaptischen Nervenendigungen führen und Kalziumkanäle öffnen, was eine nichtselektive Freisetzung von exzitatorischen und inhibitorischen Transmittern induziert. Diese wiederum öffnen Kanäle der subsynaptischen Membranen und erlauben Kationen und Anionen sich entsprechend ihres elektrochemischen Potentials zu verteilen. Durch diesen Mechanismus freigesetzte Kalium-Ionen diffundieren in entferntere Gebiete und depolarisieren benachbarte terminale Nervenendigungen [139]. Die zentrale Rolle der lokal aufgebauten Kalium-Ionenkonzentration suggeriert, dass jede Interferenz mit der Kalium-Ionenhomeostase die CSD-Auslösung beeinflusst. Ein Charakteristikum der normalen Gliazellfunktion ist die Aufrechterhaltung der Kalium-Ionenhomeostase, und Unterschiede in der Fähigkeit der Glia, ein institielles Kaliumangebot zu bewältigen, könnten die Unterschiedlichkeiten der Empfänglichkeit verschiedener Tiere und Hirnregionen bezüglich der CSD erklären [15].

Die gemessene Veränderung der $[Cl^-]_o$ bei Spreading Ischaemia war etwas kleiner als die früher berichtete für die Ratte während Spreading Depression und der anoxischen Depolarisation [51]. Ungefähr 9 mM der Differenz von 20 mM könnten erklärt werden durch die höhere Selektivität

des Chlorid-Ionophor I (Cocktail A) gegenüber dem interferierenden Bikarbonat, verglichen mit dem Corning-477315-Austauscher, welcher in früheren Studien genutzt wurde [38, 140, 141].

Die Veränderungen der Ionenkonzentrationen im Extrazellulärraum reflektieren nicht direkt den Betrag der Ionenströme über die Zellmembran, da die Größe des Interzellulärraums während der Ionenbewegungen schrumpft [57].

Die Abnahme des extrazellulären Volumens während CSD wird unter Verwendung von Cholinchlorid bzw. N-TRIS (Trimethyltris-(hydroxymethyl)-methyl-Ammoniumion) mit 50 % angegeben [50]. Jing et al. (1994) beschreiben während CSD und hypoxischen CSD-ähnlichen Depolarisationen eine durchschnittliche Abnahme des interstitiellen Volumens um 70 % unter Verwendung von iontophoretisch applizierten Tetramethyl- bzw. Tetraethyl-Ammonium-Ionen (TMA^+ und TEA^+) [128].

Die Bestimmung von Größenveränderungen des Extrazellulärraumes mit tetraalkylierten Ammonium-Ionen basiert auf der Annahme, dass diese Markersubstanzen intrazelluläre Kompartimente in Ruhe und bei neuronaler Aktivität nicht passieren [142]. Die am häufigsten verwendete Markersubstanz ist Tetramethylammonium (TMA^+). Jedoch wurde gezeigt, dass TMA^+ und TEA^+ neuronale Membranen über NMDA-Kanäle [143] und nikotinerge Acetylcholinrezeptoren [144] passieren. Des Weiteren wurde bei intraglijalen Messungen gezeigt, dass TMA^+ auch in Gliazellen aufgenommen wird [145]. Dies legt nahe, dass die Größenveränderungen des Extrazellulärraumes, bestimmt mit dieser Methode, eher unterschätzt werden. Ein Anstieg der Molekülgröße der verwendeten Markersubstanz (TMA^+ (MW: 109,9), TEA^+ (MW: 165,7), TPA^+ (MW: 221,8)) führt wahrscheinlich zu einem reduzierten Transport durch zelluläre Membranen, so dass unter Verwendung von TPA^+ diese Unterbewertung der Größenveränderung des Extrazellulärraumes am geringsten ausfallen dürfte [146].

Hansen und Nedergaard (1988) [147] beschreiben während der Phase 1 einer zerebralen Ischämie ein rasches Abfallen des extrazellulären pH, vermutlich eher verursacht durch den erhöhten pCO_2 innerhalb des Hirns und sekundär durch die Titration von Bikarbonationen durch Laktat als durch einen Nettotransport von Hydronium- und Bikarbonationen über die Zellmembranen [52].

Die Ionenveränderungen bei CSD hingegen sind typischerweise von pH-Veränderungen begleitet, die aus einem raschen initialen, interstitiellen, alkalischen Shift bestehen, gefolgt von einer prolongierten Azidose [52, 58, 148, 149]. Die initiale alkalische pH-Veränderung könnte durch einen Kalziuminflux bedingt sein. So generiert synchrone neuronale Aktivität eine

alkalische pH-Transiente mit einer beträchtlichen Abhängigkeit zu den externen Kalzium-Ionen [150, 151, 152, 153]. Es wurde vorgeschlagen, dass solche Alkalisierungen durch einen Ca^{2+} - H^{+} -Austausch über die plasmalemmale Ca, H-ATPase entstehen könnten [154]. Im Kontrast hierzu konnte gezeigt werden, dass der alkalische pH-Shift während Ouabain induzierten CSDs in vitro auch in kalziumfreien Lösungen persistierte, während die nachfolgende Azidose in der Abwesenheit von Kalzium deutlich vermindert war [155].

Im Gegensatz zur anoxischen Depolarisation [58] startete auch die Spreading Ischaemia nicht mit einer ausgeprägten graduellen Abnahme des pH, sondern mit einem deutlichen alkalischen Shift, gefolgt von einer Abnahme des pH. Deutlich wird hierbei die Ähnlichkeit zu den Veränderungen des pH während einer normalen CSD.

5.6 Die Grenzen unseres experimentellen Ansatzes

Es gibt mehrere Limitationen unseres experimentellen Ansatzes. Eine wichtige Einschränkung besteht in der relativ hohen Konzentration an Hämoglobin und der hohen Kaliumkonzentration im künstlichen Liquor, welche für die Induktion einer Cortical Spreading Ischaemia verwendet wurden.

Die in unseren Experimenten angewendete Hämoglobinkonzentration war fünfmal so hoch wie die in menschlichen zerebralen Hämatomen gemessene [156].

Die Notwendigkeit einer relativ hohen Hämoglobinkonzentration ist möglicherweise bedingt durch Folgendes:

- a) In kleinen Säugetieren liegt die ischämische Schwelle höher und die Kollateralisation ist besser als beim Menschen. Ein Einfluss der Spezies wird des Weiteren dadurch unterstützt, dass DINDs in SAB-Tiermodellen bisher nie beobachtet wurden [27].
- b) Die Inkubationszeit in unseren Experimenten ist kürzer, verglichen mit der nach SAB.
- c) Die Hämoglobinapplikation spart die Hirnbasis aus, so dass Spasmen der basalen Arterien nicht zur Energiekompromittierung beitragen können.

In zukünftigen Studien wird es interessant sein, zu erforschen, ob eine niedrigere Hämoglobinkonzentration ausreichend für die Induktion einer Cortical Spreading Ischaemia ist, wenn NO-produzierende Quellen in ähnlicher Weise wie im Falle einer SAB gestört werden [157].

Das Niveau der Kalium-Ionenkonzentration im artifiziellen Liquor ist ebenfalls relativ hoch. Extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von diesem Betrag wurden allerdings tatsächlich in menschlichen zerebralen Hämatomen gemessen [123]. Der Effekt eines Anstiegs der Baseline-Kaliumkonzentration im Liquor ist wahrscheinlich vermittelt durch einen graduellen Anstieg der

extrazellulären Kaliumkonzentration im Kortex und eine begleitende Downregulation der Na, K-ATPase-Aktivität sowie eine Störung der neuronal-astroglialen Repolarisation [45]. All diese Veränderungen können wahrscheinlich auch durch andere Faktoren als eine erhöhte Kaliumkonzentration im Liquor erreicht werden, welche mit der Pathogenese der DINDs verbunden sind, wie z. B. die Energiekompromittierung durch arterielle Spasmen [116, 158, 159], eine Erniedrigung der intrazerebralen Glukosekonzentration [20, 31] oder einem Anstieg an endogenen Quabain-ähnlichen Faktoren [160, 161].

5.7 Ausblicke

Unsere Ergebnisse fordern dazu auf, in zukünftigen Studien unter Nutzung von Monitoringinstrumenten wie DC-EEG, Nahinfrarotspektroskopie, Mikrodialyse oder funktionellem MRT zu untersuchen, ob CSIs in Patienten nach SAB auftreten. CSD-ähnliche Depolarisationen bei Patienten nach SAB und in Korrelation mit DINDs sind von unserer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen worden [162]. Wir hoffen, dass das Modell dazu beitragen wird, neue Strategien für die Behandlung von Patienten mit Subarachnoidalblutung zu entwickeln.

Dankesworte

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. J.P. Dreier, der meine Dissertation von Anfang an begleitet hat, für die Überlassung des Themas, die Lehre der experimentellen Methoden und die Vermittlung eines unverzichtbaren Basiswissens, die hervorragende Betreuung und andauernde Unterstützung sowie die fortwährende Motivation zum wissenschaftlichen Arbeiten, auch nach Misserfolgen, im Rahmen eines freundschaftlichen Verhältnisses.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. U. Heinemann für die fortwährende Unterstützung und geduldige fachliche Beratung, insbesondere bei der Herstellung und Anwendung der ionenselektiven Mikroelektroden. Auch möchte ich mich bei ihm für die langjährige Möglichkeit der Arbeit als studentische Hilfskraft im Institut für Neurophysiologie bedanken, welche einen wichtigen Teil der Finanzierung meines Studiums ausmachte.

Bei Frau Dr. U. Lindauer, Herrn Dr. D. Megow, Frau Dr. S. Gabriel, Herrn Dr. G. Petzold, Herrn Dr. S. Major, Herrn M. Foddis und Herrn S. Haack bedanke ich mich für die überaus freundschaftliche, hilfsbereite und fruchtbare Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich für die immer wählende Unterstützung in jeder erdenklichen Hinsicht.

Publikationsliste

Ausgewählte Publikationen

- (1) Windmüller O, Lindauer U, Foddiss M, Einhaupl KM, Dirnagl U, Heinemann U, Dreier JP. Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain* 2005 Sep;128(Pt 9):2042-51. [37]
- (2) Petzold GC, Windmüller O, Haack S, Major S, Buchheim K, Megow D, Gabriel S, Lehmann TN, Drenckhahn C, Peters O, Meierkord H, Heinemann U, Dirnagl U, Dreier JP. Increased extracellular K⁺ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke* 2005 Jun;36(6):1270-7. [44]
- (3) Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion / hemodilution in rats. *Neurosurgery* 2002 Dec;51(6):1457-65; discussion 1465-7. [46]

Weitere Publikationen und Buchbeiträge

- (4) Schuchmann S, Meierkord H, Stenkamp K, Breustedt J, Windmüller O, Heinemann U, Buchheim K. Synaptic and nonsynaptic ictogenesis occurs at different temperatures in submerged and interface rat brain slices. *J Neurophysiol* 2002 Jun;87(6):2929-35.
- (5) Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain* 2002 Jan;125(Pt 1):102-12.
- (6) Jauch R, Windmüller O, Lehmann TN, Heinemann U, Gabriel S. Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy. *Brain Res* 2002 Jan 18; 925(1):18-27.
- (7) Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhaupl K M, Dirnagl U. Ischemia caused by inverse coupling between neuronal activation and cerebral blood flow in rats. In: Tomita M, Kanno I, Hamel E (eds). *Brain activation and CBF control*. Amsterdam, Elsevier, 2002, pp 487-492.

Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Hiermit erkläre ich, dass sich mein Anteil an den Publikationen folgendermaßen ergibt:

Publikation (1): Die Versuchsplanung, die Durchführung der Experimente (Herstellung und Testung der ionenselektiven Mikroelektroden, Hämoglobingewinnung, Tierpräparation, Durchführung der elektrophysiologischen Messungen), die Versuchsauswertung und die Erstellung des Manuskripts wurde hauptsächlich durch mich unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. J.P. Dreier durchgeführt. Im Rahmen des Kongresses „Brain 2003“ erfolgte die Vorstellung der In-vivo-Daten als Posterpräsentation. Federführend für den In-vitro-Teil der Publikation (1) waren Herr PD Dr. med. J.P. Dreier und Frau Dr. U. Lindauer, wobei Herr M. Foddis wesentlich an der Durchführung der Experimente beteiligt war.

Publikation (2): Federführend bei dieser Veröffentlichung waren Dr. med. G. Petzold, Herr S. Haack und ich (geteilte Erstautorenschaft). Mein Anteil bestand in der selbstständigen Planung, Vorbereitung und Durchführung sowie der Auswertung der In-vivo-Experimente und der Beteiligung an der Verfassung dieser Publikation. Für die Publikation (2) erfolgten zusätzlich In-vitro-Messungen mit Mikroelektroden und intrinsischen optischen Signalen durch Herrn Dr. med. G. Petzold und Herrn S. Haack.

Publikation (3): Federführend bei dieser Publikation war PD Dr. med. J.P. Dreier. Ich führte einen Teil der Nimodipin-Experimente und alle HAES-Experimente durch. Zusätzlich war ich für die Auswertung meiner Versuche verantwortlich und an der Manuskriptkorrektur beteiligt.

Anlage - Ausgewählte Publikationen

„Aus Urheberrechtsgründen wird diese Publikation in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Windmüller O, Lindauer U, Foddis M, Einhaupl KM, Dirnagl U, Heinemann U, Dreier JP.

Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO.

Brain 2005 Sep;128(Pt 9):2042-51. [37]

„Aus Urheberrechtsgründen wird diese Publikation in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Petzold GC*, Windmüller O*, Haack S*, Major S, Buchheim K, Megow D, Gabriel S, Lehmann TN, Drenckhahn C, Peters O, Meierkord H, Heinemann U, Dirnagl U, Dreier JP.

Increased extracellular K⁺ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia.

Stroke 2005 Jun;36(6):1270-7. (* geteilte Erstautorenschaft) [44]

„Aus Urheberrechtsgründen wird diese Publikation in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhaupl KM, Dirnagl U.

Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats.

Neurosurgery 2002 Dec;51(6):1457-65; discussion 1465-7. [46]

Literaturverzeichnis

- [1] Lashley K. Pattern of cerebral integration indicated by the scotomas of migrane. *Arch Neurol Psychiatry* 1941;46:331-339.
- [2] Leao AA. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7:359-390.
- [3] Leão AA and Morison RS. Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 1945;8:33-45.
- [4] Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 1994 Feb;117 (Pt 1):199-210. Review.
- [5] Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med* 1994 Dec 22; 331(25):1689-92.
- [6] Cutrer FM, Sorensen AG, Weisskoff RM, Ostergaard L, Sanchez del Rio M, Lee EJ, Rosen BR, Moskowitz MA. Perfusion-weighted imaging defects during spontaneous migrainous aura. *Ann Neurol* 1998 Jan;43(1):25-31.
- [7] Strong AJ, Smith SE, Whittington DJ, Meldrum BS, Parsons AA, Krupinski J, Hunter AJ, Patel S, Robertson C. Factors influencing the frequency of fluorescence transients as markers of peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000 Jan; 31(1):214-22.
- [8] Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, Villemure JG. Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol* 1991 Oct;30(4):589-96.
- [9] Sramka M, Brozek G, Bures J, Nadvornik P. Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery. *Appl Neurophysiol* 1977-1978;40(1):48-61.
- [10] Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res* 1996 Nov 18;740(1-2):268-74.
- [11] Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke* 2002 Dec;33(12):2738-43.

-
- [12] Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain* 2006 Mar;129(Pt 3):778-90. Epub 2005 Dec 19.
- [13] Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann T-N, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarisations. *Brain* 2006 (in press).
- [14] Hubschmann OR, Kornhauser D. Cerebral arterial spasm. *J Neurosurg* 1980 Nov; 53(5):732-3.
- [15] Hansen AJ, Lauritzen M. The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Bras Cienc* 1984 Dec;56(4):457-79. Review.
- [16] Busch E, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME. Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 1998 Oct;29(10):2155-61.
- [17] Dreier JP, Sakowitz OW, Unterberg AW, Benndorf G, Einhaupl KM, Valdueza JM. Migrainous aura starting several minutes after the onset of subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 2001 Oct 9;57(7):1344-5.
- [18] Brouwers PJ, Dippel DW, Vermeulen M, Lindsay KW, Hasan D, van Gijn J. Amount of blood on computed tomography as an independent predictor after aneurysm rupture. *Stroke* 1993 Jun;24(6):809-14.
- [19] Vora YY, Suarez-Almazor M, Steinke DE, Martin ML, Findlay JM. Role of transcranial Doppler monitoring in the diagnosis of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1999 Jun;44(6):1237-47; discussion 1247-8.
- [20] Unterberg AW, Sakowitz OW, Sarrafzadeh AS, Benndorf G, Lanksch WR. Role of bedside microdialysis in the diagnosis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 2001 May;94(5):740-9.
- [21] Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg* 1990 Jul;73(1):18-36.
- [22] Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 1980 Jan; 6(1):1-9.

-
- [23] Kistler JP, Crowell RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG, Zervas T, Fisher CM. The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study. *Neurology* 1983 Apr;33(4):424-36.
- [24] Vermeulen M, van Gijn J, Hijdra A, van Crevel H. Causes of acute deterioration in patients with a ruptured intracranial aneurysm. A prospective study with serial CT scanning. *J Neurosurg* 1984 May;60(5):935-9.
- [25] Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ, Oldfield EH. Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1998 Mar;88(3):557-61.
- [26] Macdonald RL, Weir BK. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 1991 Aug;22(8):971-82. Review.
- [27] Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, Findlay JM. In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery* 2000 Feb;46(2):448-60; discussion 460-1. Review.
- [28] Kaoutzanis M, Yokota M, Sabilia R, Peterson JW. Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods* 1993 Dec; 50(3):301-7.
- [29] Dietrich HH, Dacey RG Jr. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 2000 Mar;46(3):517-30. Review.
- [30] Dreier JP, Korner K, Ebert N, Gorner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhaupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U. 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* 1998 Sep; 18(9):978-90.
- [31] Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhaupl KM, Victorov I, Dirnagl U. 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* 2000 Oct;93(4):658-66.
- [32] Stoltenburg-Didinger G, Schwarz K. Brain lesions secondary to subarachnoid hemorrhage due to ruptured aneurysms. In: Cervós-Navarro J, Ferszt R (eds). *Stroke and microcirculation*. New York, Raven Press, 1987, pp 471-480.
- [33] Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber CJ, Smith PW. Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate. *Acta Neurochir (Wien)* 1994;131(1-2):137-45.

-
- [34] Birse SH, Tom MI. Incidence of cerebral infarction associated with ruptured intracranial aneurysms. A study of 8 unoperated cases of anterior cerebral aneurysm. *Neurology* 1960 Feb;10:101-6.
- [35] Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U, Saveland H. Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration. *Neurosurgery* 1999 Nov;45(5):1176-84; discussion 1184-5.
- [36] Sarrafzadeh AS, Unterberg AW, Lanksch WR. Bedside-microdialysis for early detection of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Case report and review of the literature. *Zentralbl Neurochir* 1998;59(4):269-73.
- [37] Windmuller O, Lindauer U, Foddis M, Einhaupl KM, Dirnagl U, Heinemann U, Dreier JP. Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain* 2005 Sep;128(Pt 9):2042-51. Epub 2005 May 18.
- [38] Kraig RP, Nicholson C. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 1978;3(11):1045-59.
- [39] Hernandez-Caceres J, Macias-Gonzalez R, Brozek G, Bures J. Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res* 1987 Dec 29;437(2):360-4.
- [40] Lauritzen M, Hansen AJ. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992 Mar; 12(2):223-9.
- [41] Ayata C, Shin H, Dunn AK, Boas DA, Moskowitz MA. MK-801 prevents the expansion of blood-flow deficit in acute focal cerebral ischemia by blocking the cerebrovascular effects of ischemic neuroglial depolarization. Abstract 821.2.2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience; 2004.
- [42] Iijima T, Mies G, Hossmann KA. Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992 Sep;12(5):727-33.
- [43] Mies G, Kohno K, Hossmann KA. Prevention of periinfarct direct current shifts with glutamate antagonist NBQX following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994 Sep;14(5):802-7.

-
- [44] Petzold GC, Windmüller O, Haack S, Major S, Buchheim K, Megow D, Gabriel S, Lehmann TN, Drenckhahn C, Peters O, Meierkord H, Heinemann U, Dirnagl U, Dreier JP. Increased extracellular K^+ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke* 2005 Jun;36(6):1270-7.
- [45] Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 2001 Mar 1;531(Pt 2):515-26.
- [46] Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion / hemodilution in rats. *Neurosurgery* 2002 Dec;51(6):1457-65; discussion 1465-7.
- [47] Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989 Oct;9(5):589-96.
- [48] Lux HD, Neher E. The equilibration time course of $(K^+)_0$ in cat cortex. *Exp Brain Res* 1973 Apr 30;17(2):190-205.
- [49] Heinemann U, Lux HD. Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. *Brain Res* 1975 Jul 25;93(1):63-76.
- [50] Hansen AJ, Olsen CE. Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand* 1980 Apr;108(4):355-65.
- [51] Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 1981 Dec;113(4):437-45.
- [52] Mutch WA, Hansen AJ. Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984 Mar;4(1):17-27.
- [53] Vorisek I, Sykova E. Ischemia-induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K^+ , and pH in the developing rat cortex and corpus callosum. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997 Feb;17(2):191-203.
- [54] Lee MS, Wu YS, Yang DY, Lee JB, Cheng FC. Significantly decreased extracellular magnesium in brains of gerbils subjected to cerebral ischemia. *Clin Chim Acta* 2002; 318:121-5.

-
- [55] Neher E, Lux HD. Rapid changes of potassium concentration at the outer surface of exposed single neurons during membrane current flow. *J Gen Physiol* 1973 Mar; 61(3):385-99.
- [56] Nicholson C, Phillips JM. Diffusion of anions and cations in the extracellular micro-environment of the brain [proceedings] *J Physiol* 1979 Nov;296:66P.
- [57] Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res* 1980;40: 432-9.
- [58] Kraig RP, Ferreira-Filho CR, Nicholson C. Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol* 1983 Mar;49(3):831-50.
- [59] Robertson EG. Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. *Brain* 1949;72:150-185.
- [60] Moniz E. L'Encéphalographie artérielle, son importance dans la localisation des tumeurs cérébrales. *Rev Neurol* 1927;2:72.
- [61] Ecker A, Riemenschneider PA. Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg* 1951 Nov; 8(6):660-7.
- [62] Sakowitz OW, Wolfrum S, Sarrafzadeh AS, Stover JF, Lanksch WR, Unterberg AW. Temporal profiles of extracellular nitric oxide metabolites following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2002;81:351-4.
- [63] Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996 Mar 21;380(6571):221-6.
- [64] Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997 Jun 27;276(5321):2034-7.
- [65] Perutz MF. Blood. Taking the pressure off. *Nature* 1996 Mar 21;380(6571):205-6.
- [66] Macdonald RL, Weir BK. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 1991 Aug;22(8):971-82. Review.
- [67] Zabramski JM. Vasospasm after subarachnoid hemorrhage. In: Bederson JB, editor. *Subarachnoid hemorrhage: pathophysiology and management, Neurosurgical Topics. The American Association of Neurological Surgeons, 1997, p 127-156.*
- [68] Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 Feb 20;93(4):1480-5.

-
- [69] Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993 Jul;265(1 Pt 1):C299-303.
- [70] Colonna DM, Meng W, Deal DD, Busija DW. Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke* 1994 Dec;25(12):2463-70.
- [71] Duckrow RB. A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res* 1993 Aug 6;618(2):190-5.
- [72] Fabricius M and Lauritzen M. Examination of the role of nitric oxide for the hypercapnic rise of cerebral blood flow in rats. *Am J Physiol* 1994;266:H1457-H1464.
- [73] Goadsby PJ, Kaube H, Hoskin KL. Nitric oxide synthesis couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res* 1992 Nov 6;595(1):167-70.
- [74] Irikura K, Maynard KI, Moskowitz MA. Importance of nitric oxide synthase inhibition to the attenuated vascular responses induced by topical L-nitroarginine during vibrissal stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994 Jan;14(1):45-8.
- [75] Wang Q, Paulson OB, Lassen NA. Effect of nitric oxide blockade by NG-nitro-L-arginine on cerebral blood flow response to changes in carbon dioxide tension. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992 Nov;12(6):947-53.
- [76] Wolf T, Lindauer U, Obrig H, Dreier J, Back T, Villringer A, Dirnagl U. 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* 1996 Nov;16(6):1100-7.
- [77] Zhang ZG, Chopp M, Maynard KI, Moskowitz MA. Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994 Nov;14(6):939-43.
- [78] McCulloch J, Edvinsson L, Watt P. Comparison of the effects of potassium and pH on the calibre of cerebral veins and arteries. *Pflugers Arch* 1982 Mar;393(1):95-8.
- [79] Edwards DH, Byrne JV, Griffith TM. The effect of chronic subarachnoid hemorrhage on basal endothelium-derived relaxing factor activity in intrathecal cerebral arteries. *J Neurosurg* 1992 May;76(5):830-7.
- [80] Kuschinsky W, Wahl M, Bosse O, Thureau K. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ Res* 1972 Aug;31(2):240-7.
- [81] Rapoport RM, Murad F. Effect of ouabain and alterations in potassium concentration on relaxation induced by sodium nitroprusside. *Blood Vessels* 1983;20(5):255-64.

-
- [82] Back T, Nedergaard M and Ginsberg M. The ischemic penumbra: pathophysiology and relevance of spreading depression-like phenomena. In: Ginsberg MD and Bogousslavsky J, editors. *Cerebrovascular disease – pathology, diagnosis and treatment*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific Publications, 1998, p 276-286.
- [83] Dickie BG, Lewis MJ, Davies JA. Potassium-stimulated release of nitric oxide from cerebellar slices. *Br J Pharmacol* 1990 Sep;101(1):8-9.
- [84] Minato H, Hashizume M, Masuda Y, Hosoki K. Modulation of extraluminally induced vasoconstrictions by endothelium-derived nitric oxide in the canine basilar artery. *Arzneimittelforschung* 1995 Jun;45(6):675-8.
- [85] Rapoport RM, Schwartz K, Murad F. Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ Res* 1985 Jul;57(1):164-70.
- [86] Nishiye E, Nakao K, Itoh T, Kuriyama H. Factors inducing endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig basilar artery as estimated from the actions of haemoglobin. *Br J Pharmacol* 1989 Mar;96(3):645-55.
- [87] Hajek I, Subbarao KV, Hertz L. Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 1996 Mar;28(3):335-42.
- [88] Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 1987 Aug 21;237(4817):896-8.
- [89] Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993 Aug 12; 364(6438):626-32.
- [90] Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J. Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Neurology* 1998 Apr;50(4):876-83. Review.
- [91] Andersson KE, Edvinsson L, MacKenzie ET, Skarby T, Young AR. Influence of extracellular calcium and calcium antagonists on contractions induced by potassium and prostaglandin F₂ alpha in isolated cerebral and mesenteric arteries of the cat. *Br J Pharmacol* 1983 May;79(1):135-40.
- [92] Haws CW, Gourley JK, Heistad DD. Effects of nimodipine on cerebral blood flow. *J Pharmacol Exp Ther* 1983 Apr;225(1):24-8.

-
- [93] Kazda S, Towart R. Nimodipine: a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebrovascular action. *Acta Neurochir (Wien)* 1982;63(1-4):259-65.
- [94] Allen GS, Bahr AL. Cerebral arterial spasm: part 10. Reversal of acute and chronic spasm in dogs with orally administered nifedipine. *Neurosurgery* 1979 Jan;4(1):43-7.
- [95] Espinosa F, Weir B, Overton T, Castor W, Grace M, Boisvert D. A randomized placebo-controlled double-blind trial of nimodipine after SAH in monkeys. Part 1: Clinical and radiological findings. *J Neurosurg* 1984 Jun;60(6):1167-75.
- [96] Lewis PJ, Weir BK, Nosko MG, Tanabe T, Grace MG. Intrathecal nimodipine therapy in a primate model of chronic cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 1988 Mar;22(3):492-500.
- [97] Nosko M, Weir B, Krueger C, Cook D, Norris S, Overton T, Boisvert D. Nimodipine and chronic vasospasm in monkeys: Part 1. Clinical and radiological findings. *Neurosurgery* 1985 Feb;16(2):129-36.
- [98] Nosko M, Krueger CA, Weir BK, Cook DA. Effects of nimodipine on in vitro contractility of cerebral arteries of dog, monkey, and man. *J Neurosurg* 1986 Sep;65(3):376-81.
- [99] Brandt L, Andersson KE, Ljunggren B, Saveland H, Ryman T. Cerebrovascular and cerebral effects of nimodipine - an update. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1988;45:11-20. Review.
- [100] Pisani A, Calabresi P, Tozzi A, D'Angelo V, Bernardi G. L-type Ca^{2+} channel blockers attenuate electrical changes and Ca^{2+} rise induced by oxygen/glucose deprivation in cortical neurons. *Stroke* 1998 Jan;29(1):196-201; discussion 202.
- [101] Langley MS, Sorkin EM. Nimodipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cerebrovascular disease. *Drugs* 1989 May;37(5):669-99. Review.
- [102] Scriabine A, Schuurman T, Traber J. Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders. *FASEB J* 1989 May;3(7):1799-806. Review.
- [103] Horn J, Limburg M. Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2001 Feb;32(2):570-6. Review.
- [104] van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain* 2001 Feb;124(Pt 2):249-78. Review.
- [105] Hasan D, Vermeulen M, Wijdicks EF, Hijdra A, van Gijn J. Effect of fluid intake and antihypertensive treatment on cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1989 Nov;20(11):1511-5.

-
- [106] Vermeij FH, Hasan D, Bijvoet HW, Avezaat CJ. Impact of medical treatment on the outcome of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1998 May; 29(5):924-30.
- [107] Rosenwasser RH, Delgado TE, Buchheit WA, Freed MH. Control of hypertension and prophylaxis against vasospasm in cases of subarachnoid hemorrhage: a preliminary report. *Neurosurgery* 1983 Jun;12(6):658-61.
- [108] Lennihan L, Mayer SA, Fink ME, Beckford A, Paik MC, Zhang H, Wu YC, Klebanoff LM, Raps EC, Solomon RA. Effect of hypervolemic therapy on cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage: a randomized controlled trial. *Stroke* 2000 Feb;31(2):383-91.
- [109] Egge A, Waterloo K, Sjöholm H, Solberg T, Ingebrigtsen T, Romner B. Prophylactic hyperdynamic postoperative fluid therapy after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a clinical, prospective, randomized, controlled study. *Neurosurgery* 2001 Sep;49(3):593-605; discussion 605-6.
- [110] Falconer MA. Surgical pathology of spontaneous intracranial haemorrhage due to aneurysms and arteriovenous malformations. *Proc R Soc Med* 1954 Aug;47(8):693-700.
- [111] Robertson EG. Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. *Brain* 1949;72:150-185.
- [112] Sharp PE, La Regina MC: *The Laboratory Rat*. Boca Raton, CRC Press, 1998.
- [113] Toghi H, Yamanouchi H, Murakami M, Kameyama M: Importance of the hematocrit as a risk factor in cerebral infarction. *Stroke* 1978;9:369-374.
- [114] Harrison MJ, Pollock S, Kendall BE, Marshall J. Effect of haematocrit on carotid stenosis and cerebral infarction. *Lancet* 1981 Jul 18;2(8238):114-5.
- [115] Asplund K, Israelsson K, Schampi I: Haemodilution for acute ischaemic stroke (Cochrane Review), in *The Cochrane Library*. Oxford, Update Software, 2001, issue 4.
- [116] Nedergaard M, Hansen AJ. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993 Jul;13(4):568-74.
- [117] Muller M, Somjen GG. Na⁽⁺⁾ dependence and the role of glutamate receptors and Na⁽⁺⁾ channels in ion fluxes during hypoxia of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 2000 Oct;84(4):1869-80.
- [118] Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, Tortella FC. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci* 2003 Dec 17;23(37):11602-10.

-
- [119] Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. 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* 1996 Nov;16(6):1090-9.
- [120] Rogatsky GG, Sonn J, Kamenir Y, Zarchin N, Mayevsky A. Relationship between intracranial pressure and cortical spreading depression following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2003 Dec;20(12):1315-25.
- [121] Petzold GC, Einhaupl KM, Dirnagl U, Dreier JP. Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 2003 Nov;54(5):591-8.
- [122] Reinert M, Khaldi A, Zauner A, Doppenberg E, Choi S, Bullock R. High level of extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure. *J Neurosurg* 2000 Nov;93(5):800-7.
- [123] Otha O, Osaka K, Siguma M, Yamamoto M, Shimizu K, Toda N. Cerebral vasospasm following ruptured intracranial aneurysms, especially some contributions of potassium ion released from subarachnoid hematoma to delayed cerebral vasospasm. In: Bevan JA, ed. *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. New York, NY: Raven Press; 1983:353-358.
- [124] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999 Sep;22(9):391-7. Review.
- [125] Chi OZ, Anwar M, Sinha AK, Weiss HR. Effects of MK-801 on cerebral regional oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats. *Circ Res* 1991 Aug;69(2):414-20.
- [126] Anderson TR, Andrew RD. Spreading depression: imaging and blockade in the rat neocortical brain slice. *J Neurophysiol* 2002 Nov;88(5):2713-25.
- [127] Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C. Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 1988 Dec 20; 475(2):317-27.
- [128] Jing J, Aitken PG, Somjen GG. Interstitial volume changes during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization in hippocampal tissue slices. *J Neurophysiol* 1994 Jun;71(6):2548-51.
- [129] Mazel T, Richter F, Vargova L, Sykova E. Changes in extracellular space volume and geometry induced by cortical spreading depression in immature and adult rats. *Physiol Res* 2002;51 Suppl 1:S85-93.
- [130] Hrabetova S, Hrabe J, Nicholson C. Dead-space microdomains hinder extracellular diffusion in rat neocortex during ischemia. *J Neurosci* 2003 Sep 10;23(23):8351-9.

-
- [131] Leão AAP. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1947;10:409-419.
- [132] Hossmann KA, Tagaki S. Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp Neurol* 1976; 51:124-131.
- [133] Hansen AJ. The extracellular potassium concentration in brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta Physiol Scand* 1978 Mar;102(3):324-9.
- [134] Hansen AJ, Gjedde A, Siemkowicz E. Extracellular potassium and blood flow in the post-ischemic rat brain. *Pflugers Arch* 1980 Dec;389(1):1-7.
- [135] Siemkowicz E, Hansen AJ. Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. *Stroke* 1981 Mar-Apr; 12(2):236-40.
- [136] Meech RW. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1978;7:1-18. Review.
- [137] Lehninger AL. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem J* 1970 Sep; 119(2):129-38. Review.
- [138] Reneau DD, Guilbeau EJ, Null RE. Oxygen dynamics in brain. *Microvasc Res* 1977 May;13(3):337-44.
- [139] Nicholson C, Kraig RP. The behaviour of extracellular ions during spreading depression. In: *The application of ion-selective electrodes* (ed. T. Zeuthen), Elsevier/North-Holland Biomedical Press B. V., Amsterdam, 1981, pp. 217-238.
- [140] Baumgarten CM. An improved liquid ion exchanger for chloride ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 1981 Nov;241(5):C258-63.
- [141] Kondo Y, Buhner T, Seiler K, Fromter E, Simon W. A new double-barrelled, ionophore-based microelectrode for chloride ions. *Pflugers Arch* 1989 Sep;414(6):663-8.
- [142] Nicholson C, Chen KC, Hrabetova S, Tao L. Diffusion of molecules in brain extracellular space: theory and experiment. *Prog Brain Res* 2000;125:129-54. Review.
- [143] Wright JM, Kline PA, Nowak LM. Multiple effects of tetraethylammonium on N-methyl-D-aspartate receptor-channels in mouse brain neurons in cell culture. *J Physiol* 1991 Aug;439:579-604.
- [144] Akk G, Auerbach A. Inorganic, monovalent cations compete with agonists for the transmitter binding site of nicotinic acetylcholine receptors. *Biophys J* 1996 Jun; 70(6):2652-8.
- [145] Ballanyi K, Grafe P, Serve G, Schlue WR. Electrophysiological measurements of volume changes in leech neuropile glial cells. *Glia* 1990;3(3):151-8.

-
- [146] Gutschmidt KU, Johannes Müller Institute of Physiology, Charité-University Medicine Berlin, Germany; personal communication.
- [147] Hansen AJ, Nedergaard M. Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem Pathol* 1988 Jul-Dec;9:195-209.
- [148] Somjen GG. Acidification of interstitial fluid in hippocampal formation caused by seizures and by spreading depression. *Brain Res* 1984 Oct 8;311(1):186-8.
- [149] Nicholson C. Comparative neurophysiology of spreading depression in the cerebellum. *An Acad Bras Cienc* 1984 Dec;56(4):481-94. Review.
- [150] Grichtchenko II, Chesler M. Calcium- and barium-dependent extracellular alkaline shifts evoked by electrical activity in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 1996 Dec; 75(4):1117-26.
- [151] Paalasmaa P, Kaila K. Role of voltage-gated calcium channels in the generation of activity-induced extracellular pH transients in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1996 Jun;75(6):2354-60.
- [152] Paalasmaa P, Taira T, Voipio J, Kaila K. Extracellular alkaline transients mediated by glutamate receptors in the rat hippocampal slice are not due to a proton conductance. *J Neurophysiol* 1994 Oct;72(4):2031-3.
- [153] Smith SE, Gottfried JA, Chen JC, Chesler M. Calcium dependence of glutamate receptor-evoked alkaline shifts in hippocampus. *Neuroreport* 1994 Dec 20;5(18):2441-5.
- [154] Schwiening CJ, Kennedy HJ, and Thomas RC. Calcium-hydrogen exchange by the plasma membrane Ca-ATPase of voltage-clamped snail neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B* 1993;253:285-289.
- [155] Menna G, Tong CK, Chesler M. Extracellular pH changes and accompanying cation shifts during ouabain-induced spreading depression. *J Neurophysiol* 2000 Mar; 83(3):1338-45.
- [156] Ohta T, Kajikawa H, Yoshikawa Y, Shimizu K, Funatsu N, Yamamoto M, Toda N. Cerebral vasospasm and hemoglobin: clinical and experimental studies. In: Wilkins RH (ed). *Cerebral arterial spasm*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980, pp 166-172.
- [157] Pluta RM, Thompson BG, Dawson TM, Snyder SH, Boock RJ, Oldfield EH. Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 1996 Apr; 84(4):648-54.
- [158] Jamme I, Petit E, Gerbi A, Maixent JM, MacKenzie ET, Nouvelot A. Changes in ouabain affinity of Na⁺, K⁺-ATPase during focal cerebral ischaemia in the mouse. *Brain Res* 1997 Nov 7;774(1-2):123-30.

- [159] Muller M, Somjen GG. Na⁽⁺⁾ and K⁽⁺⁾ concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 2000 Feb; 83(2):735-45.
- [160] Dreier JP, Ebert N, Reuter U, Wolf T, Leistner S, Villringer A, Dirnagl U. Pharmacological transformation of spreading depression (SD) related hyperperfusion to an acute and longlasting hypoperfusion by NOS-inhibition and ouabain. *Soc Neurosci Abstr* 1997;23:1309.
- [161] Lusic I, Ljusic D, Maskovic J, Jankovic S. Plasma and cerebrospinal fluid endogenous digoxin-like immunoreactivity in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 1999;141(7):691-7.
- [162] Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA, Sakowitz OW, Seemann JH, Thieme A, Lauritzen M, Strong AJ. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain* 2006 Dec;129(Pt 12):3224-37.

Erklärung

Ich, Olaf Windmüller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Extrazelluläre Ionenänderungen während Cortical Spreading Ischaemia im zerebralen Kortex der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Temnitzquell, den 08.05.2007

O. Windmüller

Lebenslauf

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