

Aus dem  
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie  
Klinik für Neurologie mit Lehrstuhl für Experimentelle Neurologie  
Direktor: Professor Dr. med. K. M. Einhäupl

## **Habilitationsschrift**

# **Mechanismen der Blutflussantwort auf neuronale Aktivierung – physiologische und pathophysiologische Aspekte**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Experimentelle Neurologie

vorgelegt vor dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Gabor Petzold

geboren am 6. Dezember 1972 in Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Haberl, München

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Luhmann, Mainz

Eingereicht: 14. Mai 2008

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 2. März 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Mechanismen der physiologischen Blutflussantwort auf neuronale Aktivität – die funktionelle Hyperämie	1
1.2 Pathophysiologisch relevante Veränderungen von neuronaler Aktivität und Blutfluss – Cortical Spreading Depression und Cortical Spreading Ischemia	3
<b>2. Mechanismen der physiologischen Blutflussantwort auf neuronale Aktivität – die funktionelle Hyperämie</b>	<b>7</b>
2.1 Die Rolle lokaler synaptischer Aktivität und astrozytärer Signalkaskaden während funktioneller Hyperämie	7
<b>3. Pathophysiologische Aspekte der Blutflussantwort auf neuronale Aktivität – Cortical Spreading Depression und Cortical Spreading Ischemia</b>	<b>22</b>
3.1 CSD und CSI und damit assoziierte Blutflussveränderungen – die Rolle von Endothelin-1	22
3.2 Stickstoffmonoxid (NO) als Transmitter der Blutflussveränderungen während CSD und CSI	31
3.3 Blockierbarkeit von CSD und CSI durch NMDA-Rezeptor-Inhibitoren	44
3.4 Modulation des depolarisationsinduzierten Kalziueinstroms in Neuronen durch NO – Rolle von Ionenkanälen und Glutamatrezeptoren	53
3.5 Modulation der Auslösungsschwelle und Blutflussantwort von CSD und CSI durch den extrazellulären NO-Spiegel	60

<b>4. Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1 Funktionelle Hyperämie nach physiologischer peripherer Stimulation	69
4.2 Pathophysiologisch relevante neurovaskuläre Phänomene – Cortical Spreading Depression und Cortical Spreading Ischemia	71
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>88</b>
<b>8. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>89</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Mechanismen der physiologischen Blutflussantwort auf neuronale Aktivität – die funktionelle Hyperämie

Obwohl das menschliche Gehirn nur ca. 2 % des gesamten Körpergewichts ausmacht, verbraucht es jedoch 20 % der zur Verfügung stehenden Energie (Attwell und Laughlin, 2001). Unter Normalbedingungen deckt das Gehirn seinen Energiebedarf überwiegend durch Glukose (Raichle und Mintun, 2006). Da die zerebralen Energiereserven sehr gering sind, ist physiologische Hirnaktivität von einer kontinuierlichen und ausreichenden Zufuhr von Sauerstoff und Glukose über den zerebralen Blutfluss (*cerebral blood flow*, CBF) abhängig. Neben dieser großen Bedeutung des globalen CBF für die Hirnfunktion verfügt das Gehirn darüber hinaus über Mechanismen, den lokalen CBF der jeweiligen Aktivität eines lokalen neuronalen-glialen Ensembles anzupassen. Dieses funktionelle Hyperämie – oder, alternativ, neurovaskuläre Kopplung – genannte Phänomen gewährleistet, dass eine räumlich umgrenzte neuronale Aktivierung zu einer lokalen Blutflusssteigerung in diesem Areal führt (Lauritzen, 2001; Iadecola, 2004). Die funktionelle Hyperämie sorgt somit dafür, dass sich der CBF stets der entsprechenden lokalen Aktivität anpasst, eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Glukose gewährleistet ist, und potentiell schädliche Nebenprodukte des zerebralen Stoffwechsels abtransportiert werden können.

Obwohl die Entdeckung der funktionellen Hyperämie in das vorletzte Jahrhundert zurückreicht (Roy und Sherrington, 1890), sind die zugrunde liegenden Mechanismen zu einem erheblichen Teil ungeklärt. Ein genaueres Verständnis ist jedoch sowohl aus wissenschaftlichen als auch aus klinischen Gründen erstrebenswert. So stellt die funktionelle Hyperämie die physiologische Grundlage für den überwiegenden Teil der modernen neurowissenschaftlichen funktionellen Bildgebungsverfahren dar, wie z. B. der funktionellen Kernspintomographie und der Positronenemissionstomographie (Villringer und Dirnagl, 1995; Logothetis und Wandell, 2004; Raichle und Mintun, 2006). Darüber hinaus haben Untersuchungen an Patienten sowie an Tiermodellen neurologischer

Erkrankungen ergeben, dass die funktionelle Hyperämie bei einer Reihe verschiedener Erkrankungen gestört sein kann, z. B. bei Morbus Alzheimer (Iadecola, 2004), Migräne (Olesen et al., 1981), Schädel-Hirn-Trauma (Richards et al., 2001) sowie nach zerebraler Ischämie (Mies et al., 1990; Schmitz et al., 1997).

Die aktuelle Literatur der letzten Jahre zum Thema funktionelle Hyperämie ist insbesondere von zwei Fragen geprägt worden: Welche Art von lokaler neuronaler Aktivität korreliert am genauesten mit funktioneller Hyperämie, und auf welchem Weg gelangt die Information über den jeweiligen neuronalen Aktivitätszustand zu den Blutgefäßen?

In der Frage, welche Art neuronaler Aktivität der funktionellen Hyperämie am ehesten zugrunde liegt, sind verschiedene Arbeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. So sind sowohl lokale synaptische Aktivität (Logothetis et al., 2001; Lauritzen, 2005) als auch postsynaptische Aktionspotentiale (Rees et al., 2000) mit Blutflussveränderungen korreliert worden. Ein Grund für die Unklarheit in diesem Thema liegt darin, dass traditionelle Methoden der Messung der synaptischen Aktivität – z. B. Messung des Feldpotentials – nur schlecht zwischen der präsynaptischen Freisetzung von Neurotransmittern und den Auswirkungen dieser Transmitter an lokalen postsynaptischen Dendriten unterscheiden können.

In der zweiten Fragestellung, welche zellulären Signalkaskaden letztendlich zu lokalen Blutflussveränderungen führen, sind in den letzten Jahren Astrozyten in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (Iadecola und Nedergaard, 2007). Diese Gliazellen stehen sowohl mit Synapsen als auch mit Blutgefäßen in engem Kontakt und sind daher für derartige Aufgaben geradezu prädestiniert. Eine Reihe von Publikationen konnte in den letzten Jahren zeigen, dass neuronale oder direkte astrozytäre Stimulation in akuten Hirnschnitten zu Vasodilatation führt (Zonta et al., 2003; Filosa et al., 2006). Andere Studien wiederum konnten zeigen, dass Astrozyten Blutgefäße in Hirnschnitten auch konstringieren können (Mulligan und MacVicar, 2004; Metea und Newman, 2006). Darüber

hinaus konnte demonstriert werden, dass direkte Freisetzung von Kalzium durch Photostimulation in Astrozyten *in vivo* zu Vasodilatation von präkapillären Arteriolen führt (Takano et al., 2006). Während diese Studien eindrucksvoll demonstrierten, dass direkt stimulierte Astrozyten den Gefäßtonus beeinflussen können, blieb der Nachweis, dass Astrozyten auch an funktioneller Hyperämie nach peripherer sensorischer Stimulation beteiligt sind, bisher aus.

Die beschriebenen offenen Fragestellungen wurden in der ersten Originalarbeit der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift untersucht (Petzold et al., 2008a). Hierzu wurde *in-vivo*-Zwei-Photonenmikroskopie verwendet, eine Methode, die aufgrund ihrer hohen optischen Eindringtiefe, großen Auflösung, relativ geringen Phototoxizität und der Möglichkeit der Simultananregung mehrerer Fluorophore mit einer Wellenlänge das Feld der *In Vivo Imaging* revolutioniert hat (Denk und Svoboda, 1997).

Es konnte mittels Zwei-Photonenmikroskopie des olfaktorischen Systems transgener Mauslinien nachgewiesen werden, dass die funktionelle Hyperämie stark mit lokaler präsynaptischer Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat korreliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Astrozyten über verschiedene Signalwege für einen Großteil der Blutflussveränderungen nach sensorischer Aktivierung im olfaktorischen System verantwortlich sind.

## **1.2 Pathophysiologisch relevante Veränderungen von neuronaler Aktivität und Blutfluss – Cortical Spreading Depression und Cortical Spreading Ischemia**

Während es bei der funktionellen Hyperämie zu einer lokalen Blutflussantwort auf physiologische neuronal-gliale Aktivität kommt, kann auch pathologische Hirnaktivität mit Blutflussveränderungen einhergehen. In den weiteren Arbeiten der vorliegenden Habilitationsschrift wurden insbesondere zwei pathophysiologisch relevante

neurovaskuläre Phänomene untersucht, die *Cortical Spreading Depression* und die *Cortical Spreading Ischemia*.

Bei der *Cortical Spreading Depression* (CSD) handelt es sich um eine sich progredient ausbreitende Depolarisation von Neuronen und Astrozyten im Neocortex (Leão, 1944; Somjen, 2001). Diese langsame Depolarisationswelle (ca. 3-5 mm/min) kann durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren ausgelöst werden, z. B. Glutamat oder Kalium, und ist aufgrund der massiven Ionenumverteilungen während der Depolarisations- und Repolarisationsvorgänge mit starkem Energieverbrauch assoziiert (Somjen, 2001). Wahrscheinlich aufgrund dieses Energieverbrauches kommt es zu charakteristischen Blutflussveränderungen, die sich zusammen mit der Depolarisation fortbewegen – zunächst kann eine temporäre, mild ausgeprägte Hypoämie beobachtet werden, der dann eine transiente, deutliche Hyperämie folgt, der wiederum eine länger ausgeprägte Oligämie nachfolgt (Duckrow, 1993; Lauritzen, 1994; Zhang et al., 1994; Dreier et al., 1998). Die CSD-induzierte transiente Hyperämie konnte in vielen Studien mit der Bildung des vasoaktiven gasförmigen Transmitters Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) in Verbindung gebracht werden (Duckrow, 1993; Fabricius et al., 1995; Dreier et al., 1998).

Die CSD ist in vielerlei Hinsicht pathophysiologisch relevant. So existiert mittlerweile eine überwältigende Anzahl von Hinweisen, dass die CSD das pathophysiologische Korrelat der Migräneaura darstellt: CSD und Migräneaura sind beide von einer charakteristischen Abfolge von neuronaler Exzitation, gefolgt von einer Phase neuronaler Untererregbarkeit, geprägt (Lashley, 1941; Lauritzen, 1994; Gorji, 2001); dieselben Blutflussveränderungen wie bei der CSD lassen sich auch bei Migränepatienten messen (Hadjikhani et al., 2001); Tiermodelle genetisch bedingter Migräneformen haben eine signifikant niedrigere CSD-Schwelle (van den Maagdenberg et al., 2004); und klinisch verwendete Migräneprophylaktika können die Entstehung von CSD verhindern (Ayata et al., 2006).

Eine zweite wichtige pathophysiologische Bedeutung neben der Migräneaura kommt der CSD im Rahmen elektrophysiologischer Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie

zu. Es ist bekannt, dass es im Rahmen der Zellschädigung nach Ischämie zu Freisetzung von Kalium kommt, was letztendlich zu einer Auslösung von Perinfarkt-Depolarisationen führt (Nedergaard und Hansen, 1993; Müller und Somjen, 2000; Ayata et al., 2004). In tierexperimentellen Schlaganfallmodellen führten diese Perinfarkt-Depolarisationen zu einer deutlichen Zunahme der Infarktgröße (Hossmann, 1996; Busch et al., 1996; Hartings et al., 2003). Aufgrund dieser Auswirkungen von Perinfarkt-Depolarisationen auf die Infarktgröße ist eine pharmakologische Inhibition dieser CSD-verwandten Phänomene nach Schlaganfall klinisch von großem Interesse (Mies et al., 1994; Dirnagl et al., 1999).

Ein drittes Beispiel für die pathophysiologische Relevanz der CSD stellt das Schädel-Hirn-Trauma dar. Hier konnten CSD-ähnliche Depolarisationen direkt an Patienten gemessen werden (Mayevsky et al., 1996; Fabricius et al., 2006).

Bei der *Cortical Spreading Ischemia* (CSI) handelt es sich um ein der CSD elektrophysiologisch ähnliches Phänomen, welches allerdings mit einer fundamental unterschiedlichen Blutflussantwort assoziiert ist. Wie oben beschrieben, kann CSD durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ausgelöst werden. Wenn jedoch zusätzlich zu der erhöhten Kaliumkonzentration Blocker der NO-Synthase appliziert werden, kommt es zu einer Umkehr der Blutflussantwort – im Gegensatz zur CSD-assoziierten Hyperämie kommt es nunmehr zu einem Blutflussabfall in ischämische Bereiche (Dreier et al., 1998). Darüber hinaus ist die Repolarisation, die bei der CSD üblicherweise rasch eintritt (Somjen, 2001), bei der CSI deutlich verzögert (ca. 30 min) (Dreier et al., 1998). Die Kombination aus deutlich verzögerter Repolarisation und Umkehr der Blutflussantwort von Hyperämie zu Ischämie führt zu ausgeprägten kortikalen Nekrosen (Dreier et al., 2000). Aufgrund mehrerer experimentell-klinischer Korrelationen sowie aktueller klinischer Daten ist die Hypothese aufgestellt worden, dass CSI das pathophysiologische Korrelat von verzögerten ischämischen neurologischen Defiziten (*delayed ischemic neurological deficits*, DINDs) nach Subarachnoidalblutungen darstellen könnte (Dreier et al., 1998; Dreier et al., 2000; Dreier et al., 2002a; Dreier et al., 2002b; Dreier



et al., 2006). DINDs repräsentieren die wichtigste post-akute Komplikation nach Subarachnoidalblutungen (van Gijn und Rinkel, 2001), so dass ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge, die mit der Entstehung dieser kortikalen Hirninfarkte assoziiert sind, von großem klinisch-wissenschaftlichen Interesse ist.

Mehrere offene Fragestellungen bezüglich der CSD und der CSI wurden in Originalarbeiten der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift untersucht. Zunächst wurde getestet, welche Auswirkungen der Vasokonstriktor Endothelin-1 auf die Auslösung und die Blutflussantwort von CSD und CSI hat (Petzold et al., 2003). In einer weiteren Arbeit wurden die Repolarisationsvorgänge während CSI sowie die Abhängigkeit der Blutflussantworten von CSD und CSI von der zerebralen NO-Konzentration analysiert (Dreier et al., 2001). Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss Inhibitoren von neuronalen N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren auf CSD und CSI und die mit diesen Phänomenen assoziierten Blutflussveränderungen haben (Petzold et al., 2005a). In einer weiteren Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob NO neben seinen vaskulären Effekten auch direkte Auswirkungen auf den neuronalen Kalziumeinstrom während neuronaler Depolarisationen hat, und auf welchen Mechanismen dieser Einfluss basiert (Petzold et al., 2005b). Schließlich wurde ermittelt, welchen Einfluss NO auf die Auslösungsschwelle von CSD *in vivo* und *in vitro* hat (Petzold et al., 2008b).

## **2. Mechanismen der physiologischen Blutflussantwort auf neuronale Aktivität – die funktionelle Hyperämie**

### **2.1 Die Rolle lokaler synaptischer Aktivität und astrozytärer Signalkaskaden während funktioneller Hyperämie**

**Petzold GC**, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 2008 (im Druck).

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Hyperämie nach peripherer sensorischer Stimulation im olfaktorischen System untersucht. Zur Messung der präsynaptischen Aktivität wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die den präsynaptischen Marker SynaptopHluorin in olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimiert (Bozza et al., 2004). SynaptopHluorin ist eine pH-abhängige Variante des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP), die spezifisch in präsynaptischen Transmitter-Vesikeln exprimiert wird und einen optischen Marker für präsynaptische Glutamatfreisetzung darstellt. In dieser Arbeit wurden mittels Zwei-Photonenmikroskopie Blutflussänderungen, präsynaptische Aktivität und lokale postsynaptische und astrozytäre Kalziumveränderungen *in vivo* gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass präsynaptische Glutamatfreisetzung eng mit funktioneller Hyperämie korreliert ist. Nach postsynaptischer lokaler Blockierung von ionotropen glutamatergen Rezeptoren ergab sich dagegen keine signifikante Änderung der Blutflussantwort. Es kam allerdings zu einer deutlichen Reduktion der funktionellen Hyperämie, wenn astrozytäre metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) oder der astrozytäre Glutamattransport gehemmt wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass der mGluR-abhängige Weg über intraastrozytäre Kalziumerhöhungen und astrozytäre Cyclooxygenase vermittelt wird, während die Regulierung der funktionellen Hyperämie durch astrozytären Glutamattransport unabhängig von Cyclooxygenase abläuft.

### **3. Pathophysiologische Aspekte der Blutflussantwort auf neuronale Aktivität – Cortical Spreading Depression und Cortical Spreading Ischemia**

#### **3.1 CSD und CSI und damit assoziierte Blutflussveränderungen – die Rolle von Endothelin-1**

**Petzold GC**, Einhäupl KM, Dirnagl U, Dreier JP. Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Annals of Neurology* 2003; 54: 591-598.

Die Entstehung verzögerter kortikaler Hirninfarkte (DINDs) nach Subarachnoidalblutung ist mit dem Auftreten von Depolarisationswellen assoziiert worden, die zusammen mit einem ischämischen Blutflussabfall über den Cortex propagieren (*Cortical Spreading Ischemia*, CSI). Mit der Entstehung von DINDs sind in der Literatur insbesondere zwei Faktoren in Zusammenhang gebracht worden: Hämoglobin aus lysierten Erythrozyten (Kistler et al., 1983; Pluta et al., 1998) und der zerebrale Vasokonstriktor Endothelin-1 (Zimmermann und Seifert, 1998). In dieser Arbeit wurden daher elektrophysiologische und vaskuläre Effekte von Endothelin-1 in Hinsicht auf CSD und CSI untersucht. Es wurde gezeigt, dass topische Applikation von Endothelin-1 CSD auslöst, wobei die CSD-assoziierte Hyperämie im Vergleich zu Kontroll-CSDs signifikant verringert war. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Kombination aus Endothelin-1 und Hämoglobin CSI auslöst. Es wurde ausserdem nachgewiesen, dass Endothelin-1 nicht nur vasokonstriktive Eigenschaften besitzt, sondern über eine Modulation der zerebralen Na<sup>+</sup>-/K<sup>+</sup>-ATPase direkte Auswirkungen auf die neuronal-astrogliale Repolarisationsfähigkeit nach CSD und CSI hat.

### 3.2 Stickstoffmonoxid (NO) als Transmitter der Blutflussveränderungen während CSD und CSI

Dreier JP, **Petzold G**, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U. Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *Journal of Physiology* 2001; 531: 515-526.

in dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen der zerebrale NO-Spiegel auf die Blutflussveränderungen nach CSD und CSI hat. Hierzu wurden in Ratten kranielle Fenster installiert, über denen der lokale mikrovaskuläre Blutfluss mittels der Laser-Doppler-Methode gemessen wurde. Darüber hinaus wurde das zerebrale *direct current* (DC-) Potential mit extrazellulären Elektroden gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Erniedrigung des lokalen NO-Spiegels – der in den kraniellen Fenster durch topische Applikation von NO-Synthase-Inhibitoren moduliert wurde – CSDs in CSIs konvertiert werden konnten. Durch erniedrigten NO-Spiegel und erhöhte Kaliumkonzentration ausgelöste CSIs wiederum konnten durch Gabe eines NO-Donors in CSDs revertiert werden. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei CSD und CSI um zwei verwandte Phänomene handelt, die sich durch ihre unterschiedlichen Blutflussantworten unterscheiden. Darüber hinaus wurde die im Vergleich zur CSD verzögerte Repolarisation bei der CSI untersucht. Dazu wurde die gleiche extrazelluläre Komposition, die CSI *in vivo* auslöst – also ein verminderter NO-Spiegel und eine erhöhte Kaliumkonzentration – auf akute Hirnschnitte angewendet. Bei den dadurch ausgelösten Depolarisationen ergab sich keine signifikant verlängerte Repolarisationszeit im Vergleich zur alleinigen Applikation eines erhöhten Kaliumspiegels. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die *in vivo* beobachtete verzögerte Repolarisationszeit insbesondere darauf zurückzuführen ist, dass *in vivo* eine NO-Synthase-Blockierung zu Vasokonstriktion führt und durch den dadurch hervorgerufenen Energiemangel eine suffiziente Repolarisation verhindert wird.

### 3.3 Blockierbarkeit von CSD und CSI durch NMDA-Rezeptor-Inhibitoren

**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<sup>+</sup> concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke* 2005; 36: 1270-1277.

Da – wie einleitend erwähnt – CSDs mit der Pathogenese vieler verschiedener neurologischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht worden sind, ist eine pharmakologische CSD-Blockierung von klinischem Interesse. In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren des glutamatergen NMDA-Rezeptors CSDs blockieren (Hernández-Cáceres et al., 1987; Lauritzen und Hansen, 1992; Mies et al., 1994). Allerdings liegt bei einigen CSD-Varianten, z. B. Perinfarkt-Depolarisationen (Nedergaard und Hansen, 1993), sowie bei der CSI (Dreier et al., 2001), eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration vor, deren Auswirkung auf die Suszeptibilität von derartigen Phänomenen auf pharmakologische Inhibitoren bisher weitgehend nicht untersucht worden war. In dieser Arbeit wurde daher ermittelt, ob der extrazelluläre Kaliumspiegel Einfluss auf die Blockierbarkeit von CSDs und CSIs durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten hat. Zu diesem Zweck wurden CSDs und CSIs *in vivo*, sowie CSDs in akuten Hirnschnitten, mittels elektrophysiologischer Methoden, Laser-Doppler-Blutflussmessungen und *intrinsic optical imaging* gemessen. Sowohl Gehirne von Ratten als auch akute, aus Operationsmaterial gewonnene humane Hirnschnitte wurden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Kaliumkonzentration in Bereiche, wie sie auch in der Penumbra von Hirninfarkten gefunden werden, die Suszeptibilität von CSDs gegenüber NMDA-Rezeptor-Blockade deutlich verringert. Allerdings konnten NMDA-Rezeptor-Antagonisten die Propagation von CSD aus kortikalen Arealen mit hoher Kaliumkonzentration in Areale mit normalem Kaliumspiegel vermindern. Ähnliche Effekte des Kaliumspiegels wurden auch in Hirnschnitten von Rattegehirnen sowie in postoperativen humanen Hirnschnitten gefunden.

### **3.4 Modulation des depolarisationsinduzierten Kalziumeinstroms in Neuronen durch NO – Rolle von Ionenkanälen und Glutamatrezeptoren**

**Petzold GC**, Scheibe F, Braun JS, Freyer D, Priller J, Dirnagl U, Dreier JP. Nitric oxide modulates calcium entry through P/Q-type calcium channels and N-methyl-d-aspartate receptors in rat cortical neurons. *Brain Research* 2005; 1063: 9-14.

Neuronale Depolarisationen – wie sie z. B. auch bei der CSD vorkommen – sind mit einer deutlichen Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration verbunden (Kunkler und Kraig, 1998; Chuquet et al., 2007). Darüber hinaus hat die intrazelluläre Kalziumkonzentration direkte Auswirkungen auf die zerebrale CSD-Schwelle (Basarsky et al., 1998). Wie einleitend und in den vorausgehenden Arbeiten beschrieben, hat der extrazelluläre NO-Spiegel deutliche Auswirkungen auf die Blutflussveränderungen während CSD und CSI. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die extrazelluläre NO-Konzentration darüber hinaus auch direkt den Einstrom von Kalzium in depolarisierte Neuronen modulieren kann. Hierzu wurden primäre Kulturen von Rattenneuronen verwendet, die durch eine Erhöhung des Kaliumspiegels im Medium temporär depolarisiert wurden. Der intrazelluläre Kalziumspiegel wurde durch fluorometrische Messung des Kalziumindikators Fluo-4 gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass der depolarisationsinduzierte Kalziumeinstrom durch Inhibition der NO-Synthase signifikant verstärkt wurde und durch Gabe von NO-Donoren attenuiert wurde. Diese Modulierbarkeit des Kalziumeinstroms konnte durch Applikation von Inhibitoren des spannungsabhängigen P/Q-Kalziumkanals oder von Antagonisten des NMDA-Rezeptors blockiert werden. Antagonisten von spannungsabhängigen N- oder L-Kalziumkanälen hatten keinen Effekt. Auf pathophysiologische Phänomene wie z. B. CSD übertragen, implizieren diese Ergebnisse, dass ein pathologischer Abfall des NO-Spiegels die Entstehung und Ausbreitung von CSDs und CSD-verwandten Phänomenen begünstigen könnte.

### **3.5 Modulation der Auslösungsschwelle und Blutflussantwort von CSD und CSI durch den extrazellulären NO-Spiegel**

**Petzold GC**, Haack S, von Bohlen und Halbach O, Priller J, Lehmann TN, Heinemann U, Dirnagl U, Dreier JP. Nitric oxide modulates spreading depolarization threshold in the human and rodent cortex. *Stroke* 2008; 39: 1292-1299.

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt, kann der neuronale Kalziumspiegel durch den extrazellulären NO-Spiegel moduliert werden. Da die zerebrale Suszeptibilität gegenüber CSD deutlich vom neuronalem Kalziumstrom abhängt (Basarsky et al., 1998), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der zerebrale NO-Spiegel direkte Auswirkungen auf die Schwelle von CSD und CSI hat. Hierfür wurden Blutfluss und extrazelluläres DC-Potential *in vivo* gemessen. Darüber hinaus wurde CSD in akuten Hirnschnitten mittels *intrinsic optical imaging* und ionensensitiven Mikroelektroden bestimmt. Zunächst konnte mit fluoreszierenden optischen NO-Indikatoren und zellspezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass während einer CSD NO v. a. von Neuronen und Endothelzellen gebildet wird. Daraufhin wurde nachgewiesen, dass eine Senkung des NO-Spiegels zu einer deutlich verringerten CSD- und CSI-Schwelle *in vivo* und *in vitro* führte. Selektive Inhibition der neuronalen NO-Synthase (nNOS) hatte keinen Effekt, was darauf schließen lässt, dass der Schwelleneffekt insbesondere von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) vermittelt wird. Diese Hypothese konnte in Experimenten mit eNOS- oder nNOS-*Knockout*-Mäusen bestätigt werden. Inhibition der zyklischen Guanylatzyklase hatten keinen Effekt, was auf direkte Effekte von NO schließen lässt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass der Effekt der NO-Synthase-Blockierung auf die CSD-Schwelle durch Applikation von Inhibitoren des spannungsabhängigen P/Q-Kalziumkanals oder durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten verhindert werden konnte.

## 4. Diskussion

### 4.1 Funktionelle Hyperämie nach physiologischer peripherer Stimulation

In der zuerst beschriebenen Arbeit (Petzold et al., 2008a) wurde der Einfluss individueller Komponenten der synaptischen exzitatorischen Neurotransmission auf funktioneller Hyperämie, sowie die zugrunde liegenden Signalkaskaden, untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mäuse verwendet, die SynaptopHluorin, einen optischen Marker präsynaptischer Glutamatfreisetzung, in olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimieren (Bozza et al., 2004). Mittels Zwei-Photonenmikroskopie wurden präsynaptische Aktivität, postsynaptische Kalziumkonzentration und kapilläre und arterioläre Blutflussveränderungen *in vivo* nach sensorischer Stimulation gemessen. Die beiden wichtigsten neuen Erkenntnisse dieser Arbeit sind, dass präsynaptische Aktivität und funktionelle Hyperämie eng miteinander korreliert sind, und dass Astrozyten funktionelle Hyperämie über mindestens zwei separate Mechanismen regulieren.

Ein bisher ungeklärter und in der aktuellen Literatur kontrovers diskutierter Aspekt der funktionellen Hyperämie betrifft die Frage, welche neuronale Aktivität den Blutflussveränderungen zugrunde liegt. Verschiedene Studien haben ergeben, dass sowohl lokale synaptische Aktivität (Lauritzen, 2001; Logothetis et al., 2001), als auch postsynaptisches *Spiking* primärer efferenter Neuronen (Rees et al., 2000), und auch eine Kombination beider Signale (Mukamel et al., 2005), mit funktioneller Hyperämie korrelieren könnten. Eine Unsicherheit hinsichtlich des Begriffs der lokalen synaptischen Aktivität bestand bisher vor allem darin, dass traditionelle (elektrische) Messungen dieser Aktivität nur unzureichend lokale prä- von postsynaptischer Aktivität unterscheiden konnten. Beispielsweise ist das lokale Feldpotential in olfaktorischen Glomeruli fast ausschließlich von postsynaptischen Veränderungen geprägt (Aroniadou-Anderjaska et al., 1997), so dass die Messung präsynaptischer Komponenten durch Bestimmung des Feldpotentials kaum möglich ist. In der vorliegenden Arbeit konnte der Anteil präsynaptischer Aktivität an funktioneller Hyperämie erstmals getrennt gemessen werden.



Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, dass im olfaktorischen System die funktionelle Hyperämie, und somit auch die mit funktioneller Kernspintomographie gemessenen Signale (Kida et al., 2002), überwiegend lokale synaptische Aktivität, und insbesondere präsynaptische Aktivität, repräsentieren. Einschränkend muss darauf verwiesen werden, dass das olfaktorische System zwar zur Untersuchung neurovaskulärer Zusammenhänge gut geeignet und charakterisiert ist (Chaigneau et al., 2003), sich jedoch anatomisch und funktionell von anderen Regionen, z. B. dem Neocortex oder dem Cerebellum, unterscheidet. Im olfaktorischen System konvergieren alle Rezeptorneuronen, die denselben Rezeptortyp exprimieren, in 1-2 Glomeruli im Bulbus olfactorius (Mombaerts et al., 1996), wo sie Synapsen mit efferenten sekundären Hauptneuronen (Mitralzellen) bilden. Ein wichtiger Unterschied z. B. zum somatosensorischen Cortex liegt somit darin, dass in der vorliegenden Arbeit die erste Synapse zwischen peripherer Stimulation und zentralen efferenten Neuronen untersucht wurde, während im Neocortex das gemessene Signal zuvor im Hirnstamm und Thalamus prozessiert und umgeschaltet worden ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich somit nicht vorbehaltlos auf alle anderen sensorischen Systeme übertragen. Die spezielle funktionelle Anatomie des olfaktorischen Systems, unter Ausnutzung der selektiven Expression von SynaptopHluorin in Rezeptorneuronen, hat jedoch eine äußerst präzise Messung und Trennung von prä- und postsynaptischer Aktivität ermöglicht, die bisher in anderen Systemen noch nicht durchführbar ist. Es ist zukünftigen Studien vorbehalten zu überprüfen, ob die Anteile synaptischer Aktivität an funktioneller Hyperämie regionale oder stimulusabhängige Unterschiede zeigen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass Astrozyten wichtige Mediatoren der funktionellen Hyperämie sind. Bisher war bekannt, dass direkt oder indirekt stimulierte Astrozyten in akuten Hirnschnitten Arteriolen dilatieren und konstringieren können (Zonta et al., 2003; Mulligan und MacVicar, 2004; Filosa et al., 2006). Darüber hinaus führte direkte Astrozytenstimulation *in vivo* durch lichtgesteuerte Kalziumfreisetzung zu Vasodilatation (Takano et al., 2006). In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass

Astrozyten nach peripherer sensorischer Aktivität einen Großteil der funktionellen Hyperämie regulieren. Es wurde gezeigt, dass Astrozyten auf olfaktorische Stimulation mit Kalziumerhöhungen reagieren und diese Kalziumveränderungen in weiter entfernte, um präkapilläre Arteriolen herum lokalisierte Astrozyten propagieren, wo sie mit arteriolären Gefäßerweiterungen korrelieren. Darüber hinaus konnten zwei astrozytäre vasoaktive Signalwege identifiziert werden: Erstens über Aktivierung des astrozytären metabotropen Glutamaterezeptors 5 (mGluR5), sowie zweitens über Aktivierung des Glutamatransporters GLT-1. Zudem konnte gezeigt werden, dass der erste Weg über die astrozytäre Cyclooxygenase 1 gesteuert wird, während der zweite Weg weitgehend unabhängig von Cyclooxygenase 1 abläuft. Zusammenfassend konnte somit ein direkter Zusammenhang zwischen Astrozyten und funktioneller Hyperämie belegt werden sowie intrazelluläre Signalkaskaden identifiziert werden. Da verschiedene akute und chronische neurologische Erkrankungen Störungen der funktionellen Hyperämie aufweisen (Girouard und Iadecola, 2006), könnten sich durch diese Arbeit auch potentiell interessante Ansatzpunkte für therapeutisch-pharmakologische Interventionen ergeben.

## **4.2 Pathophysiologisch relevante neurovaskuläre Phänomene – Cortical Spreading**

### **Depression und Cortical Spreading Ischemia**

Während im ersten Teil dieser Arbeit funktionelle Hyperämie nach physiologischer sensorischer Stimulation und die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht wurden, befasste sich der zweite Teil der Arbeit mit Phänomenen, bei denen es zu pathophysiologisch relevanten neurovaskulären Veränderungen kommt.

Mehrere neurologische Erkrankungen sind mit der *Cortical Spreading Depression* (CSD) in Verbindung gebracht worden: die Migräneaura (Lauritzen, 1994; Hadjikhani et al., 2001), Perinfarkt-Depolarisationen (Nedergaard und Hansen, 1993; Müller und Somjen, 2000; Ayata et al., 2004) sowie Depolarisationen nach akutem Schädel-Hirn-Trauma (Mayevsky et al., 1996; Fabricius et al., 2006). Während diese CSD-ähnlichen Depolarisationen mit einem

transienten Blutflussanstieg verbunden sind, der mit der Depolarisationswelle über den Cortex propagiert, existiert darüber hinaus noch eine Variante, bei der die Depolarisationsfront mit einer lang anhaltenden Ischämie voranschreitet. Dieses *Cortical Spreading Ischemia* (CSI) genannte Phänomen ist aufgrund einer Reihe von Erkenntnissen in Zusammenhang mit *delayed ischemic neurological deficits* (DINDs) nach Subarachnoidalblutung gebracht worden: Erstens können Produkte der Hämolyse (Kalium und Hämoglobin) CSI auslösen (Dreier et al., 1998; Dreier et al., 2001). Zweitens ist die Infarktmorphologie von DINDs (Birse und Tom, 1960) und CSI (Dreier et al., 2000) sehr ähnlich. Drittens finden sich erniedrigte NO-Spiegel, wie sie bei der CSI durch den NO-„Fänger“ Hämoglobin oder durch Applikation von NO-Synthase-Hemmern hervorgerufen werden, auch nach Subarachnoidalblutung in Zusammenhang mit DINDs (Pluta et al., 1996; Sakowitz et al., 2001). Viertens sind Nimodipin und hypertensive hypervolämische Hämodilution sowohl in der Prävention von DINDs (van Gijn und Rinkel, 2001) als auch in der Inhibition von CSI (Dreier et al., 2002b) wirksam. Fünftens konnte in einer prospektiven multizentrischen klinischen Studie (*Co-Operative Study on Brain Injury Depolarizations, COSBID*) gezeigt werden, dass prolongierte wandernde Depolarisationen bei Patienten nach Subarachnoidalblutung auftreten, und dass das Erscheinen dieser Depolarisationen mit dem Auftreten von DINDs assoziiert ist (Dreier et al., 2006).

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengestellten Arbeiten haben mehrere neue Aspekte zur Entstehung von CSD und CSI und den damit verbundenen Pathomechanismen untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass CSD und CSI zwei verwandte Phänomene sind, die sich jedoch in ihrer Blutflussantwort sowie in der Länge der Depolarisation unterscheiden (Dreier et al., 2001). Wurden CSDs durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ausgelöst, konnten sie durch Ko-Applikation eines NO-Inhibitors in eine CSI umgewandelt werden, und durch darauf folgende Applikation eines NO-Donors wieder in eine CSD revertiert werden. Dies ließ den Schluss zu, dass NO an der Entstehung der Blutflussantwort der CSD beteiligt ist, und dass eine Inhibition dieser NO-Bildung während derartiger Depolarisationsphänomene ischämische

Hirnfarkte induzieren kann. In einer weiteren Arbeit (Petzold et al., 2008b) konnte direkt mittels fluoreszierender NO-sensitiver Indikatoren nachgewiesen werden, dass NO während einer CSD von Endothelzellen und Neuronen, jedoch nicht von Astrozyten, gebildet wird. Diese Erkenntnisse haben mehrere klinische Implikationen. Zum Einen ist NO als Auslöser von Kopfschmerzen nach Migräneaura vermutet worden (Thomsen und Olesen, 1998). In dieser Arbeit (Petzold et al., 2008b) ergaben sich wichtige Hinweise für die Validität dieser Vermutung, indem erstmals gezeigt wurde, dass Neuronen und Endothelzellen kurz nach der CSD NO bilden und daher als primäre Auslöser dieses schmerzverursachenden Transmitters in Frage kommen. Zweitens implizieren die Befunde, dass CSD-assoziierten Erkrankungen das Risiko lokaler Hirnischämien beinhalten können, wenn sie mit einer Erniedrigung der lokalen NO-Konzentration einhergehen. Hier sind, wie bereits erwähnt, Subarachnoidalblutungen zu nennen, darüber hinaus sind diese Überlegungen aber grundsätzlich auch auf andere hämorrhagische Erkrankungen, wie intrazerebrale Blutung und hämorrhagische Hirntraumata, übertragbar. Eine dritte Implikation dieser Ergebnisse ist, dass NO-Synthase-Inhibitoren, für die in einigen klinischen Studien eine Wirksamkeit auf den Migränekopfschmerz gezeigt wurde (Lassen et al. 1997), aufgrund dieser Zusammenhänge in Migränepatienten das potentielle Risiko ischämischer Nebenwirkungen beinhalten könnten.

Ein weiteres Ergebnis der vorgelegten Arbeiten ist, dass NO auch direkte Auswirkungen auf die Schwelle zur Auslösung von CSDs hat (Petzold et al., 2008b). Es konnte gezeigt werden, dass eine Absenkung des NO-Spiegels die CSD-Schwelle signifikant erniedrigt. Dies konnte auch in Hirnschnitten gezeigt werden, so dass – da Hirnschnitte keinen Blutfluss aufweisen – auf direkte neuronale, d. h. nichtvaskuläre, Effekte von NO zu schließen war. Damit übereinstimmend konnte in einer weiteren Arbeit gezeigt werden, dass eine Erniedrigung des NO-Spiegels den depolarisationsinduzierten Kalziumeinstrom über spannungsabhängige P/Q-Kanäle und NMDA-Rezeptoren in Neuronen verstärkt (Petzold et al., 2005b).

Diese Arbeiten lassen zwei wichtige Schlussfolgerungen zu. Erstens ist das Auftreten von CSDs im gesunden menschlichen Gehirn offensichtlich selten, was sich auch an der relativ hohen CSD-Schwelle in menschlichen Hirnschnitten zeigte (Petzold et al., 2008b). Andererseits war in der multizentrischen COSBID-Studie die Quote der Patienten mit Subarachnoidalblutung und DINDs, bei denen CSD-ähnliche Depolarisationen beobachtet wurden, erstaunlich hoch (Dreier et al., 2006), so dass bei diesen Patienten offensichtlich eine erhöhte Suszeptibilität für CSDs bestand. Diese Arbeit impliziert, dass der verminderte NO-Spiegel, der im Subarachnoidalraum während der Entstehung von DINDs vorliegt (Pluta et al., 1996), durch Absenkung der CSD-Schwelle für die höhere CSD-Rate verantwortlich sein könnte.

Die zweite Schlussfolgerung dieser beiden Arbeiten ist, dass eine pharmakologische Erhöhung des NO-Spiegels eine sinnvolle prophylaktische Intervention darstellen könnte. In kleineren Studien ergaben sich Hinweise für positive Effekte von NO-Donoren nach Subarachnoidalblutung (Thomas et al., 1999). Ob diese Effekte auf den hier nachgewiesenen Einfluss von NO auf die CSD-Schwelle zurückzuführen sind, und ob die Erkenntnisse potentiell auch auf die Therapie anderer Erkrankungen übertragbar sind, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

Eine weitere offene Frage betreffend des Zusammenhangs zwischen DINDs und CSI ist, ob andere Faktoren, die mit DINDs in Zusammenhang gebracht wurden, ebenfalls CSI auslösen können. Insbesondere der zerebrale Vasokonstriktor Endothelin-1 ist aufgrund tierexperimenteller und klinischer Erkenntnisse immer wieder mit DINDs in Zusammenhang gebracht worden (Zimmermann und Seifert, 1998). In der hier vorgelegten Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Kombination von Endothelin-1 und Hämoglobin im Subarachnoidalraum CSI auslöst (Petzold et al., 2003). Diese Daten stärken zusätzlich einen potentiellen Zusammenhang zwischen CSI und DINDs nach Subarachnoidalblutungen.

Eine weitere klinisch wichtige Frage ist, ob pathologische neurovaskuläre Phänomene, wie CSD und CSI, pharmakologisch inhibierbar sind. Viele Studien konnten zeigen, dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten CSD im gesunden Gehirn blockieren können (Hernández-Cáceres et al., 1987; Lauritzen und Hansen, 1992). Dieses Ergebnis konnte in den hier vorgelegten Arbeiten bestätigt werden, jedoch ergab sich zusätzlich als neue Erkenntnis, dass diese Inhibierbarkeit der CSD durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten deutlich abnimmt, wenn der extrazelluläre Kaliumspiegel erhöht ist (Petzold et al., 2005a). Hierbei ist zu betonen, dass der Kaliumspiegel in Bereichen lag, wie sie auch in der Penumbrazone nach zerebraler Ischämie (Nedergaard und Hansen, 1993) sowie in intrazerebralen Hämatomen (Ohta et al., 1983) gemessen wurden. Vermutlich entstehen derartige Depolarisationen nach zerebraler Ischämie aufgrund hoher Kaliumkonzentrationen im anoxischen Zentrum, propagieren dann als Periinfarkt-Depolarisationen durch die Penumbrazone, in der die Kaliumkonzentration ebenfalls erhöht ist (Nedergaard und Hansen, 1993), um dann schließlich in der Peripherie als „normale“ CSDs zu enden (Hossmann, 1996). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeiten legt die Vermutung nahe, dass, obwohl nach Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten keine CSDs mehr in der Infarktperipherie detektierbar sind, weiterhin gewebeschädigende Periinfarkt-Depolarisationen in der Penumbra auftreten könnten. Interessanterweise konnte diese Hypothese mittlerweile von einer anderen Arbeitsgruppe (Shin et al., 2006) in einem Tiermodell der fokalen Ischämie bestätigt werden.

## 5. Zusammenfassung

Lokale Blutflussveränderungen als Folge einer verstärkten neuronalen Aktivität bilden die Basis moderner funktioneller Bildgebungsverfahren. Diese funktionelle Hyperämie sorgt dafür, dass sich der Blutfluss stets den lokalen metabolischen Erfordernissen anpasst. Darüber hinaus sind pathologische Veränderungen dieser Regulation zwischen neuronaler Aktivität und Blutfluss mit verschiedenen neurologischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht worden.

Ziel dieser Arbeiten war es, die zugrunde liegende synaptische Aktivität sowie die Rolle von Astrozyten in der physiologischen funktionellen Hyperämie zu bestimmen, und verschiedene Mechanismen von gestörter Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und Blutfluss zu untersuchen.

Funktionelle Hyperämie wurde im olfaktorischen System transgener Mäuse mittels Zwei-Photonenmikroskopie analysiert. Es wurde gezeigt, dass funktionelle Hyperämie eng mit lokaler präsynaptischer Freisetzung von Glutamat korreliert. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Astrozyten auf Veränderungen der lokalen synaptischen Aktivität reagieren und den Blutfluss über verschiedene Wege regulieren, nämlich über metabotrope Glutamatrezeptoren und astrozytäre Cyclooxygenase, sowie über astrozytäre Glutamataufnahme.

Als wichtige Beispiele für pathologisch veränderter Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und Blutfluss wurden *in-vivo*-Modelle der *Cortical Spreading Depression* (CSD) und der *Cortical Spreading Ischemia* (CSI) untersucht. Beide Phänomene zeichnen sich durch langsam fortschreitende Depolarisationen aus, die im Fall der CSD mit Hyperämie und im Fall der CSI mit Ischämie und kortikalen Hirninfarkten gekoppelt sind. Die CSD ist u. a. mit der Migräneaura und Periinfarkt-Depolarisationen nach fokaler Ischämie assoziiert worden, während die CSI mit verzögerten ischämischen Infarkten nach Subarachnoidalblutung in Zusammenhang gebracht worden ist. In dieser Arbeit konnten

wichtige mechanistische Aspekte dieser beiden Phänomene aufgeklärt werden. Es wurde gezeigt, CSD und CSI zwei verwandte Phänomene sind. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass *in vivo* eine CSD in eine CSI umgewandelt werden kann, wenn der lokale extrazelluläre Stickstoffmonoxid (NO)-Spiegel im Gehirn gesenkt wird. Umgekehrt konnte durch Gabe von NO-Donoren eine CSI in eine CSD revertiert werden. Diese Ergebnisse sind klinisch relevant, da nach Subarachnoidalblutung der NO-Fänger Hämoglobin freigesetzt wird und bei Patienten entsprechend eine niedrige NO-Konzentration vorliegt, was die Entstehung von CSI begünstigen könnte.

Eine weitere Arbeit zur CSI beschäftigte sich mit der Frage nach auslösenden Faktoren. Der zerebrale Vasokonstriktor Endothelin-1, der in mehreren klinischen Studien in Zusammenhang mit ischämischen Defiziten nach Subarachnoidalblutung gebracht worden war, konnte in Kombination mit Hämoglobin als wichtiger Auslöser der CSI identifiziert werden.

Da die Schwelle zur Auslösung von CSD im menschlichen Gehirn relativ hoch ist, jedoch in der multizentrischen klinischen COSBID-Studie Depolarisationswellen bei erstaunlich vielen Patienten nach Subarachnoidalblutung gemessen wurden, beschäftigten sich weitere Arbeiten mit der Frage, welches extrazelluläre Milieu die Auslösung von CSD und CSI begünstigt. Es wurde gezeigt, dass ein erniedrigter NO-Spiegel die kortikale Suszeptibilität sowohl gegenüber CSD als auch CSI erhöht, und dass dies auf direkte Effekte des NO-Spiegels auf neuronale Signalwege zurückzuführen ist. *In vivo* und *in vitro* ergaben sich Hinweise, dass insbesondere neuronale NMDA-Rezeptoren und P/Q-Kalziumkanäle in diesen Mechanismus involviert sind.

Um mögliche pharmakologische Interventionen von CSD und CSI zu untersuchen, wurde die Effizienz von NMDA-Rezeptorblockern analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Suszeptibilität von CSD und CSI gegenüber NMDA-Rezeptor-Antagonisten deutlich verringert ist, wenn der extrazelluläre Kaliumspiegel Werte erreicht, die experimentell in der Penumbra ischämischer Hirninfarkte sowie nach zerebralen Blutungen gemessen



wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Effizienz derartiger Rezeptorblocker in diesen pathophysiologischen Konstellationen erniedrigt sein könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

Aroniadou-Anderjaska V, Ennis M, Shipley MT (1997) Glomerular synaptic responses to olfactory nerve input in rat olfactory bulb slices. *Neuroscience* 79:425-434.

Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133-1145.

Ayata C, Dunn AK, Gursoy-Ozdemir Y, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA (2004) Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:744-755.

Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA (2006) Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol* 59:652-661.

Basarsky TA, Duffy SN, Andrew RD, MacVicar BA (1998) Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices. *J Neurosci* 18:7189-7199.

Birse SH, Tom MI (1960) Incidence of cerebral infarction associated with ruptured intracranial aneurysms. A study of 8 unoperated cases of anterior cerebral aneurysm. *Neurology* 10:101-106.

Bozza T, McGann JP, Mombaerts P, Wachowiak M (2004) In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron* 42:9-21.

Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA (1996) Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1090-1099.

Chaigneau E, Oheim M, Audinat E, Charpak S (2003) Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13081-13086.

Chuquet J, Hollender L, Nimchinsky EA (2007) High-resolution in vivo imaging of the neurovascular unit during spreading depression. *J Neurosci* 27:4036-4044.

Denk W, Svoboda K (1997) Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18:351-357.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.

Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K<sup>+</sup> is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:978-990.

Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhüpl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg* 93:658-666.

Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 531:515-526.

Dreier JP, Sakowitz OW, Harder A, Zimmer C, Dirnagl U, Valdueza JM, Unterberg AW (2002a) Focal laminar cortical MR signal abnormalities after subarachnoid hemorrhage. *Ann Neurol* 52:825-829.

Dreier JP, Windmuller O, Petzold G, Lindauer U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2002b) Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats. *Neurosurgery* 51:1457-1465.

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 (2006) Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain* 129:3224-3237.

Duckrow RB (1993) A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res* 618:190-195.

Fabricius M, Akgoren N, Lauritzen M (1995) Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol* 269:H23-H29.

Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M (2006) Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain* 129:778-790.

Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, Nelson MT (2006) Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9:1397-1403.

Girouard H, Iadecola C (2006) Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* 100:328-335.

Gorji A (2001) Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev* 38:33-60.

Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4687-4692.

Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, Tortella FC (2003) Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci* 23:11602-11610.

Hernández-Cáceres J, Macias-González R, Brozek G, Bures J (1987) Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res* 437:360-364.

Hossmann KA (1996) Perinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:195-208.

Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.

Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369-1376.

Kida I, Xu F, Shulman RG, Hyder F (2002) Mapping at glomerular resolution: fMRI of rat olfactory bulb. *Magn Reson Med* 48:570-576.

Kistler JP, Crowell RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG, Zervas T, Fisher CM (1983) The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study. *Neurology* 33:424-436.

Kunkler PE, Kraig RP (1998) Calcium waves precede electrophysiological changes of spreading depression in hippocampal organ cultures. *J Neurosci* 18:3416-3425.

Lashley KS (1941) Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiatry* 46:331-339.

Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Olesen J (1997) Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet* 349:401-402.

Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117:199-210.

Lauritzen M (2001) Relationship of spikes, synaptic activity, and local changes of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1367-1383.

Lauritzen M (2005) Reading vascular changes in brain imaging: is dendritic calcium the key? *Nat Rev Neurosci* 6:77-85.

Lauritzen M, Hansen AJ (1992) The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:223-229.

Leão AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390.

Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A (2001) Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412:150-157.

Logothetis NK, Wandell BA (2004) Interpreting the BOLD signal. *Annu Rev Physiol* 66:735-769.

Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE (1996) Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res* 740:268-274.

Metea MR, Newman EA (2006) Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26:2862-2870.

Mies G, Kohno K, Hossmann KA (1994) Prevention of periinfarct direct current shifts with glutamate antagonist NBQX following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:802-807.

Mies G, Paschen W, Hossmann KA (1990) Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:638-645.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.

Mukamel R, Gelbard H, Arieli A, Hasson U, Fried I, Malach R (2005) Coupling between neuronal firing, field potentials, and FMRI in human auditory cortex. *Science* 309:951-954.

Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.

Müller M, Somjen GG (2000) Na(+) dependence and the role of glutamate receptors and Na(+) channels in ion fluxes during hypoxia of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 84:1869-1880.

Nedergaard M, Hansen AJ (1993) Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:568-574.

Ohta O, Osaka K, Siguma M, Yamamoto M, Shimizu M, Toda N (1983) 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*, pp353-358. New York: Raven Press.

Olesen J, Larsen B, Lauritzen M (1981) Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol* 9:344-352.

Petzold GC, Einhüpl KM, Dirnagl U, Dreier JP (2003) Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 54:591-598.

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 (2005a) Increased extracellular K<sup>+</sup> concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke* 36:1270-1277.

Petzold GC, Scheibe F, Braun JS, Freyer D, Priller J, Dirnagl U, Dreier JP (2005b) Nitric oxide modulates calcium entry through P/Q-type calcium channels and N-methyl-d-aspartate receptors in rat cortical neurons. *Brain Res* 1063:9-14.

Petzold GC, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN (2008a) Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* (im Druck).

Petzold GC, Haack S, von Bohlen Und Halbach O, Priller J, Lehmann TN, Heinemann U, Dirnagl U, Dreier JP (2008b) Nitric oxide modulates spreading depolarization threshold in the human and rodent cortex. *Stroke* 39:1292-1299.

Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ, Oldfield EH (1998) Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 88:557-561.



Pluta RM, Thompson BG, Dawson TM, Snyder SH, Boock RJ, Oldfield EH (1996) Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 84:648-654.

Raichle ME, Mintun MA (2006) Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci* 29:449-476.

Rees G, Friston K, Koch C (2000) A direct quantitative relationship between the functional properties of human and macaque V5. *Nat Neurosci* 3:716-723.

Richards HK, Simac S, Piechnik S, Pickard JD (2001) Uncoupling of cerebral blood flow and metabolism after cerebral contusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:779-781.

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

Sakowitz OW, Wolfrum S, Sarrafzadeh AS, Stover JF, Dreier JP, Dendorfer A, Benndorf G, Lanksch WR, Unterberg AW (2001) Relation of cerebral energy metabolism and extracellular nitrite and nitrate concentrations in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1067-1076.

Schmitz B, Böttiger BW, Hossmann KA (1997) Functional activation of cerebral blood flow after cardiac arrest in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1202-1209.

Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C (2006) Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1018-1030.

Somjen GG (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81:1065-1096.

Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9:260-267.

Thomas JE, Rosenwasser RH, Armonda RA, Harrop J, Mitchell W, Galaria I (1999) Safety of intrathecal sodium nitroprusside for the treatment and prevention of refractory cerebral vasospasm and ischemia in humans. *Stroke* 30:1409-1416.

Thomsen LL, Olesen J (1998) Nitric oxide theory of migraine. *Clin Neurosci* 5:28-33.

van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD (2004) A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41:701-710.

van Gijn J, Rinkel GJ (2001) Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain* 124:249-278.

Villringer A, Dirnagl U (1995) Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7:240-276.

Zhang ZG, Chopp M, Maynard KI, Moskowitz MA (1994) Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:939-943.

Zimmermann M, Seifert V (1998) Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery* 43:863-875.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Jens Dreier und Prof. Uli Dirnagl aus der Neurologischen Klinik und Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité danken. Ihre langjährige konstruktive Begleitung und großzügige Unterstützung meines wissenschaftlichen und klinischen Werdeganges haben die Entstehung großer Teile dieser Arbeit ermöglicht. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Experimentellen Neurologie, insbesondere der Dreier AG, sowie den Mitarbeitern der Neurologischen Klinik für die klinische und wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Einhäupl möchte ich für das wissenschaftsfreundliche Klima an seiner Klinik danken sowie für seine Unterstützung und Förderung.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Prof. Venki Murthy, Center for Brain Science der Harvard University, und den Mitarbeitern seines Labors. Die freundschaftliche Atmosphäre, wissenschaftliche Begeisterungsfähigkeit und hervorragende Unterstützung haben ebenfalls entscheidend zu hier vorgestellten Arbeiten beigetragen.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Frau und meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung, guten Ratschläge und Hilfe in allen Lebenslagen.

## 8. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 12. Juni 2008

Dr. Gabor Petzold.