

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung von Hämoglobin-
Deoxygenierungs-abhängigen Mechanismen der
neurovaskulären Kopplung im cerebralen Kortex
der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Benjamin Rohrer

aus München

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. vet. U. Lindauer
2. Prof. Dr. med. A. R. Pries
3. Prof. Dr. med. H. Scheich

Datum der Promotion: 01.06.2008

Zusammenfassung

Das heutige Verständnis der Gehirnfunktion beruht zu einem großen Teil auf der Entwicklung funktioneller Bildgebungsmethoden. Dabei kann ein Anstieg der Aktivität von Nervenzellen indirekt durch einen erhöhten cerebralen Blutfluss (CBF) nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und cerebralem Blutfluss wird als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet. Die molekulare Grundlage dieser Kopplung ist bislang nur unvollständig verstanden.

Eine vorherrschende Hypothese geht davon aus, dass die neurovaskuläre Kopplung von der Deoxygenierung des Hämoglobins abhängig sei. Unsere Versuche verfolgten das Ziel, diese Hypothese zu überprüfen und den Einfluss der Hämoglobin-Deoxygenierung auf die Neurovaskuläre Kopplung *in vivo* zu analysieren.

Zur Überprüfung deoxy-Hämoglobin (deoxy-Hb)-abhängiger Regulationsmechanismen haben wir die kortikalen Blutflussantworten auf somatosensorische Stimulation der Ratte unter normobaren (1 Atmosphäre of absolut pressure (ATA), 21%O₂) und zum anderen unter hyperbaren Bedingungen (mittels 3 ATA, 100%O₂) gemessen. Die hyperbare Hyperoxygenierung verhindert, aufgrund der ausgeprägten Sauerstoffsättigung unter 3 ATA und 100%O₂, die von dem Sauerstoffbedarf abhängige Deoxygenierung des Hämoglobins. Ein an die Hämoglobin-Deoxygenierung gekoppelter Mechanismus würde unter hyperbarer Hyperoxygenierung außer Kraft gesetzt und eine Zunahme der Blutflussantwort auf die somatosensorische Stimulation verhindern.

Zur Analyse der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verwendeten wir die optische Mikrofaser-Spektroskopie. Wir konnten zeigen, dass unter den hyperbaren Bedingungen eine 100%ige Hb-O₂ Sättigung eintritt und sich die Konzentration des deoxy-Hb unter Stimulation nicht mehr verändert. Somit können wir davon ausgehen, dass die hyperbare Hyperoxygenierung (mittels 3 ATA, 100%O₂) für die Unterbindung der Hämoglobin-Deoxygenierung ausreicht.

Für die Messung der Blutflussantworten zogen wir die Laser-Doppler-Flussmessung heran. Unter hyperbaren Bedingungen konnte eine reproduzierbare, und im Vergleich zu Messungen unter normobaren Bedingungen sogar vergrößerte, CBF-Antwort auf somatosensorische Stimulation nachgewiesen werden.

Durch diese Ergebnisse wird eindeutig gezeigt, dass die Hämoglobin-Deoxygenierung und nachgeschaltete Mechanismen für die Regulation der Neurovaskulären Kopplung nicht verantwortlich sein können.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	III
ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE.....	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 KONTEXT.....	1
1.2 MODERNE FUNKTIONELLE BILDGEBUNG DES GEHIRNS.....	2
1.3 PHYSIOLOGIE DES CEREBRALEN BLUTFLUSSES.....	3
1.3.1 Neurovaskuläre Kopplung.....	4
1.3.2 Korrelation zwischen neuronaler Aktivität, Blutfluss und Sauerstoffmetabolismus	8
1.4 HÄMOGLOBIN-DEOXYGENIERUNG	12
1.4.1 ATP-Hypothese	13
1.4.2 Nitrit-Hypothese.....	13
1.5 NO AUS SNO-HB	14
1.5.1 Hypothese nach Stamler et al.....	14
1.5.2 Experimentelle Validierung des Stamler-Modells	17
1.5.3 Kritische Punkte des Stamler-Modells	19
1.6 FRAGESTELLUNG	23
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 FUNKTIONELLE STIMULATION DES VORDERPFOTEN-AREALS DER RATTE.....	26
2.2 BERECHNUNG DER SAUERSTOFFSÄTTIGUNG UNTER 3 ATA UND 100% O ₂	27
2.3 LASER-DOPPLER-FLUSSMESSUNG UND REFLEXIONS-SPEKTROSKOPIE	28
2.3.1 Laser-Doppler-Flussmessung	28
2.3.2 Spektroskopie	29
2.3.3 Messung und Berechnung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins	31
2.3.4 Aufbau und Konstruktion der Kombinations-Sonde	32
2.4 VERSUCHSAUFBAU UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	33
2.4.1 Liste der verwendeten Materialien :	33
2.4.2 Präparation	34
2.5 ZIEL DER VERSUCHE.....	36
2.6 VERSUCHSAUFBAU	36
2.7 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	37
2.8 SOMATOSENSORISCH EVOZIERTE POTENTIALE (SEP)	40
2.9 DATENANALYSE	40
2.9.1 Statistische Auswertung.....	40
2.9.2 Analyse der Spektroskopie-Daten.....	41
2.9.3 Analyse der LDF-Daten	41
2.9.4 Berechnung der Area under the curve (AUC).....	41

2.9.5	<i>Berechnung der SEP-Amplituden</i>	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	PHYSIOLOGIE DER VERSUCHSTIERE	42
3.1.1	<i>Werte aus den Versuchstieren</i>	42
3.2	KONTROLLVERSUCHE LDF	44
3.3	ERGEBNISSE DER HYPERBAREN HYPEROXYGENIERUNG LDF	45
3.3.1	<i>Area under the curve (AUC)</i>	46
3.3.2	<i>Blutflusshöhepunkt (Peak)</i>	48
3.3.3	<i>Zeit bis zur maximalen Blutflussantwort (Time to peak)</i>	49
3.3.4	<i>Zeit bis zum Absinken auf Ausgangsniveau (Time to zero)</i>	50
3.3.5	<i>Vergleich der neuronalen Antworten</i>	51
3.4	LDF/SPEKTROSKOPIE-VERSUCHE	53
3.4.1	<i>Kontrollversuche LDF/Spektroskopie</i>	53
3.4.2	<i>Hyperbare Hyperoxygenierungs-Versuche LDF/Spektroskopie</i>	55
4	DISKUSSION	59
4.1	VERSUCHSMODELL	59
4.2	ERGEBNISSE DER HBO-VERSUCHE	61
4.2.1	<i>Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation unter hyperbarer Hyperoxygenierung</i>	61
4.2.2	<i>Vergleich mit der Literatur</i>	62
4.2.3	<i>Vergrößerung der Blutflussantworten aufgrund von Hyperexzitabilität?</i>	63
4.3	METHODEN-KRITIK	67
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
	LITERATURVERZEICHNIS	72
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	80
	DANKSAGUNG	81
	LEBENS LAUF	82

Abkürzungen und Begriffe

AE1	Anion-Austauscher
ATA	Atmospheres of absolut pressure
ATP	Adenosintriphosphat
BOLD	blood oxygenation level dependent
CBF	cerebraler Blutfluss
CMR _{glc}	cerebrale metabolische Rate für Glukose
CMRO ₂	cerebrale metabolische Rate für Sauerstoff
COX	Cyclooxygenase
Cysβ93	Cystein β93
deoxy-Hb	deoxygeniertes Hämoglobin
DPF	wellenlängenabhängiger Korrekturfaktor (Differential Pathlength Factor)
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EEG	Elektroenzephalogramm
EET	Epoxyeicosatrien-Säurederivate
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GSNO	Glutathion-SNO
HBO	hyperbare Hyperoxygenierung
HDRF	hemoglobin-derived relaxing faktor
LDF	Laser-Doppler-Flussmessung
MRT	Magnetresonanztomographie
NO-Hb	Eisen-Nitrosyl-Hämoglobin
NOS	NO-Synthetase
OEF	Sauerstoff-Extraktions-Fraktion
oxy-Hb	oxygeniertes Hämoglobin
PET	Positronenemissionstomographie
SEP	somatosensorisch evozierte Potentiale
SNO-Hb	S-Nitroso-Hämoglobin

1 Einleitung

1.1 Kontext

Die Funktion des Gehirns ist aufgrund seiner enormen Komplexität noch immer nur in Ansätzen verstanden. Ein entscheidender Schritt hin zu einem kompletteren Verständnis des Gehirns und seiner Funktion wurde mit Hilfe der funktionellen Bildgebung vollzogen. Diese Verfahren ermöglichen, bestimmte Gehirnregionen und -zentren mit relativ großer räumlicher und zeitlicher Auflösung spezifischen Funktionen zuzuordnen. Die funktionelle Anatomie, also die topische Zuordnung von Hirnarealen zu bestimmten Fähigkeiten, begann mit neuropathologischen Untersuchungen beim Menschen und den daraus resultierenden experimentellen Läsions-Studien. Die nicht-invasive Messung von Hirnaktivität war lange Zeit nur mit elektrophysiologischen Methoden, wie dem Elektroenzephalogramm (EEG), möglich. Diese Verfahren verfügen jedoch über eine sehr schlechte räumliche Auflösung. Die Entdeckung der nicht-invasiven funktionellen Bildgebung (funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT), Positronenemissionstomographie (PET), Optical Imaging) hat ein exakteres Bild der Hirnfunktion entstehen lassen. In den letzten 15 Jahren hat die ständige Verbesserung dieser Methoden zu einem außerordentlichen Wissenszuwachs geführt. Die funktionelle Bildgebung hat auch Einzug in die klinische Anwendung gefunden. Sie dient zum Beispiel der Lokalisierung des Sprachareals vor neurochirurgischen Operationen.

Die grundlegende Einschränkung der Aussagekraft der funktionellen Bildgebungsverfahren liegt jedoch darin, dass nicht die neuronale Aktivität direkt dargestellt wird, sondern Veränderungen von Blutfluß, Oxygenierung und neuronalem Metabolismus während erhöhter Aktivität. Dies wird als neurometabolische und neurovaskuläre Kopplung bezeichnet.

Die Frage, wie die Regulation der neurovaskulären Kopplung funktioniert und wie sie beeinflusst wird, ist nicht vollständig geklärt. Somit fehlen noch entscheidende Schritte zum Verständnis der Hirnfunktion und ihrer Bildgebung. Während die Signale der funktionellen Bildgebung unter physiologischen Bedingungen in der Regel ein korrektes Korrelat neuronaler Aktivität darstellen, ist ihre Aussagekraft in pathologischen Zuständen, bei denen eine Minderperfusion vorliegt (z.B. bei Karotis-Stenose), eingeschränkt. Blutflussstörungen könnten zu vollkommen veränderten Signalen der funktionelle Bildgebung führen und somit keine Aussage über die Funktion des Hirnareals zulassen. Auch für diese Fragestellung ist ein detaillierteres Verständnis der neurovaskulären Kopplung unbedingt von Nöten.

Die intensive Forschung im Bereich der funktionellen Bildgebung hat die technischen Möglichkeiten der Darstellung aktivierter Hirnareale deutlich erweitert. Das Verständnis der physiologischen Grundlagen steckt dagegen noch in den Anfängen.

Im Folgenden werde ich zunächst auf die moderne funktionelle Bildgebung eingehen, die für den hier gewählten Versuchsansatz relevanten physiologischen Mechanismen erläutern und die Fragestellung dieser Arbeit darlegen.

1.2 Moderne funktionelle Bildgebung des Gehirns

Die wichtigsten Methoden der funktionellen Bildgebung sind fMRT, PET und das Optical Imaging, welche Änderungen des Blutflusses, -volumens, des Sauerstoff- und Glukosemetabolismus in Ruhe und Aktivität darstellen können.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) macht sich die magnetischen Eigenschaften der Körpergewebe zu Nutze, um Informationen über die Struktur und die Funktion der Gewebe zu gewinnen. Zur Darstellung neuronaler Aktivität dient die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT). Es existieren verschiedene Methoden der Signalverarbeitung in der funktionellen Magnetresonanztomographie. Die bedeutendste verwendet das so genannte BOLD-Signal (blood oxygenation level dependent) [Ogawa et al., 1990]. Das Signal dieser Methode beruht auf den paramagnetischen Eigenschaften von deoxy-Hämoglobin (deoxy-Hb) und ermöglicht somit die Messung der deoxy-Hb-Konzentration im Gewebe. Die Gewebskonzentration wird jedoch durch die Parameter cerebraler Blutfluß (CBF) und Blutvolumen, sowie durch den aeroben Metabolismus (O_2 -Verbrauch) beeinflusst. Die zeitliche Auflösung bewegt sich im Rahmen von ca. 3 Sekunden Verzögerung zu Beginn der Messung sowie einer Verzögerung von mehreren Sekunden bei Beendigung der Aktivität. Auch die räumliche Auflösung ist limitiert. Die Ausdehnung der CBF-Antwort ist größer als das Areal der neuronalen Aktivität und Spezies-abhängig [Malonek and Grinvald, 1996]. Somit ist die zeitliche und räumliche Auflösung der fMRT beschränkt.

Eine weitere Methode zur Darstellung von Stoffwechselveränderungen im Gehirn ist die Positronenemissionstomographie (PET). Bei dieser Methode werden Marker, deren Konzentration sich bei neuronaler Aktivität verändert, wie radioaktiv markiertes Wasser, Sauerstoff und Glukose verwendet. Die PET ist somit eine sensitive Methode, um den Metabolismus der verwendeten Marker arealspezifisch darzustellen. Die Auflösung der PET ist technischen Beschränkungen unterworfen. Die räumliche Auflösung bewegt sich im Bereich von 3-5 mm (in MicroPET Untersuchungen kann eine Auflösung < 2 mm erreicht

werden). Die physikalische und biologische Halbwertszeit (HWZ) der Marker begrenzt die zeitliche Auflösung über das minimale Interstimulus-Intervall auf etwa 10 Minuten.

Das Optical Imaging ist eine Methode zur Darstellung von Hirnfunktion, welche ebenso auf die Blutflussregulation und somit auf die neurovaskulären Kopplung zurückgreift. Bei dieser Methode wird im Rahmen optischer Spektroskopie-Analysen die unterschiedliche Absorptionsstärke von oxy- und deoxy-Hb genutzt, um Veränderungen während neuronaler Aktivität darzustellen.

Die funktionelle Bildgebung dient zum einen der funktionellen Neuroanatomie und zum anderen erreicht sie durch die Identifizierung von funktionell relevanten Hirnarealen vor neurochirurgischen Eingriffen, sowie z.B. durch Plastizitätsuntersuchungen bei Schlaganfallpatienten, klinische Relevanz. Ihre Beschränkung liegt in der Tatsache, dass begleitende Faktoren dargestellt werden und nicht die neuronale Aktivität selbst. Zur exakten Deutung der funktionellen Bildgebung ist die genaue Kenntnis aller Einflüsse auf die jeweilig gemessenen Parameter und deren Zusammenhang mit neuronaler Aktivität unabdingbar.

1.3 Physiologie des cerebralen Blutflusses

Der cerebrale Blutfluss ist elementar für die Funktion des Gehirns. Bei Betrachtung der Sicherheitsmechanismen zur Konstanthaltung der cerebralen Blutversorgung und der Folgen kurzzeitiger Unterbrechungen des Blutflusses wird deutlich, wie relevant eine ausreichende Blutversorgung ist. Das Gewicht des menschlichen Gehirns beträgt nur 2% des gesamten Körpergewichts, erhält jedoch 15% des Herzzeitvolumens und sein Anteil am gesamten Sauerstoffverbrauch beläuft sich auf 20%. Das Gehirn ist ein sehr empfindliches Organ, welches durch die geringsten Störungen in seiner Versorgung geschädigt wird und nur in sehr geringem Maße regeneriert. Dies liegt vor allem an den geringen metabolischen Reserven des Gehirns. Der aerobe Metabolismus des Gehirns stellt ca. 90% des gesamten Metabolismus in Ruhe dar. Dies zeigt deutlich wie abhängig das Gehirn von der Sauerstoffversorgung ist und erklärt die rasche Degeneration von Hirngewebe bei einer Sauerstoffminderversorgung. Diese Zahlen verdeutlichen den enormen Stellenwert des cerebralen Blutflusses und verlangen geradezu nach einem tieferen Verständnis der regulierenden Mechanismen.

Die Blutversorgung des Gehirns ist aber nicht nur für die Sauerstoffversorgung, sondern auch für die Anlieferung von Glukose, sowie den Abtransport von Metaboliten wie CO₂ und Laktat verantwortlich. Es wird diskutiert, ob eine dieser Aufgaben des Blutflusses auch der entscheidende Trigger der Blutflussregulation ist. Aufgrund der Tatsache, dass der Blutfluss

im Gehirn einerseits durch neuronale Aktivität reguliert wird, andererseits aber auch durch eine Reihe anderer, zum Teil unbekannter Faktoren, ergeben sich interessante Fragen zur Interaktion der verschiedenen Kontrollmechanismen. Ich werde im Folgenden die bekannten Mechanismen der neurovaskulären Kopplung, des neuronalen Metabolismus und der neurometabolischen Kopplung kurz erläutern, da sie die Grundlage der Fragestellung dieser Arbeit darstellen.

1.3.1 Neurovaskuläre Kopplung

Neurovaskuläre Kopplung bezeichnet das Zusammenspiel von neuronaler Aktivität und regionalem cerebralen Blutfluss (rCBF), d. h. dass auf eine neuronale Stimulation ein Blutflussanstieg in diesem Hirnareal erfolgt. Die Blutflussantwort beginnt innerhalb der ersten Sekunden nach Stimulationsbeginn und erreicht nach ca. 5-6 Sekunden ihren Höhepunkt, gefolgt von einer etwas niedrigeren Plateauphase [Lindauer et al., 1993]. Die Verläufe von oxy-/deoxy-Hb während der CBF-Antwort stellen sich folgendermaßen dar: Infolge des Blutflussanstieges steigt die oxy-Hb-Konzentration deutlich an, während die deoxy-Hb-Konzentration über den Zeitraum der CBF-Antwort abnimmt. Diese Veränderungen werden später im Detail erläutert.

Für die Regulation der neurovaskulären Kopplung sind seit ihrer ersten Beschreibung durch Roy and Sherrington [Roy and Sherrington, 1890] die verschiedensten Hypothesen aufgestellt worden. Ein eindeutiger und eventuell allein verantwortlicher Mediator ist bis heute nicht gefunden worden.

1.3.1.1 Diskutierte Mediatoren der neurovaskulären Kopplung

Eine Vielzahl von Mechanismen und Faktoren wurden bislang als Mediatoren der neurovaskulären Kopplung diskutiert und in Tierexperimenten beobachtet. Eine komplette Blockade der CBF-Antwort wurde jedoch durch Inhibition einzelner möglicher Signaltransduktionswege nicht erreicht. Es konnte lediglich eine Reduktion der CBF-Antwort bis zu 70 % der Kontrollwerte nachgewiesen werden [Dirnagl et al., 1994]. Daraus lässt sich schließen, dass ein Zusammenspiel mehrerer Signaltransduktionswege vorliegt und nur durch die gleichzeitige Inhibition aller Faktoren die neurovaskuläre Kopplung unterbrochen werden könnte. Im Folgenden werden die derzeit diskutierten Signaltransduktionswege dargestellt.

Laktat

Neuronale Aktivität löst einen leichten Anstieg der Laktatkonzentration im Gewebe aus [Prichard et al., 1991]. Diese leichte Azidose könnte zu einer Gefäßdilataion im aktivierten Areal und somit zu einer Blutflußzunahme führen. Mit einem für den Gefäßdurchmesser relevanten Abfall des extrazellulären pH-Wertes ist wahrscheinlich erst nach einem signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration im Gewebe zu rechnen. Da der Laktatanstieg jedoch erst nach ca. 15 sec eine pH-Wert-Veränderung von ca. -0,2 bewirkt und er nur transient auftritt, kann diese Veränderung die rasche Dynamik der Blutflussantwort nicht erklären [Chesler and Kraig, 1987].

Sauerstoff/Glukose

Sauerstoffmangel im Gewebe führt bekanntermaßen zu einer Vasodilatation. Diese scheint durch das aus dem Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) entstandene Adenosin und andere (z.B. endotheliale), noch nicht identifizierte Mediatoren [Close et al., 1994], oder direkt über Sauerstoff-sensitive Ionenkanäle [Lopez-Barneo, 1996; Lopez-Barneo et al., 1997] vermittelt zu sein. Auf das Verhältnis von Sauerstoffmetabolismus und neurovaskulärer Kopplung wird später noch detailliert eingegangen.

Im aktivierten Hirnareal ist der Glukosemetabolismus erhöht. Der Bedarf an Glukose könnte als Mediator der CBF-Antwort fungieren. Eindeutige Evidenzen für den Einfluss des Glukosemetabolismus auf den CBF konnten nicht gefunden werden. Unter Hypoglykämie kann eine Zunahme des Blutflusses registriert werden. Dieser CBF-Anstieg ist jedoch auch nach Ausgleich des Glukosemangels noch nachweisbar [Chen, 1994]. Ebenso verändert eine exzessive Glukosezufuhr (Hyperglykämie) die regionale Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation nicht [Wolf et al., 1997]. Diese Beobachtungen können den Einfluss des Glukosemetabolismus in der neurovaskulären Kopplung nicht spezifizieren.

Adenosin und Adenosintriphosphat

Eine weitere Hypothese zur Regulation der neurovaskulären Kopplung, in der Adenosin die entscheidende Rolle spielt, wurde 1975 von Rubio et al. [Rubio et al., 1975] erarbeitet. Bei der Entstehung eines Missverhältnisses zwischen Verstoffwechslung von energiereichen Substraten und deren Bereitstellung konnte die Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) beobachtet werden. Der resultierende Anstieg der intra- und extrazellulären Adenosinkonzentration könnte über den Adenosinrezeptor zu einer Vasodilatation führen. Die Blockade dieser Rezeptoren führt zu einer verringerten

Blutflussantwort (- 65-68% rCBF) auf neuronale Stimulation [Ko et al., 1990; Dirnagl et al., 1993; Dirnagl et al., 1994]. Obwohl durch diese Effekte eine Beteiligung der Adenosinrezeptoren an der Blutflussantwort nachgewiesen ist, scheint es sich nur um einen partiellen Effekt zu handeln. Zudem konnte unter funktioneller Stimulation kein signifikantes Missverhältnis zwischen Energiestoffwechsel und Substratanlieferung festgestellt werden.

Eine weitere Rolle in der Regulation des regionalen cerebralen Blutflusses wird dem unter Gewebehypoxie von den Erythrozyten freigesetztem ATP zugeschrieben [Dietrich et al., 2000]. Das freigesetzte ATP könnte an die endothelständigen ATP-Rezeptoren binden und eine Vasodilatation bewirken [Kelm et al., 1988; Ellsworth et al., 1995]. Für diesen Mechanismus müsste eine relative Hypoxie während erhöhter Aktivität vorhanden sein. Dies konnte jedoch nicht eindeutig belegt werden.

Kalium

Kalium (K^+) wird von Neuronen während ihrer Aktivierung ausgeschüttet und somit erhöht sich seine extrazelluläre Konzentration. Das Kalium könnte von Gliazellen aufgenommen und zu den Arteriolen befördert werden. Dort ausgeschüttet, könnte es an den glatten Gefäßmuskelnzellen aufgrund der Hyperpolarisierung dilatierend wirken [Paulson and Newman, 1987; Emmi et al., 2000; Filosa et al., 2006]. Die Blockade von calciumabhängigen Kalium-Kanälen führt zu einer Reduktion der CBF-Antwort von bis zu 80% und könnte daraufhin deuten, dass Kalium ein weiterer Regulator des CBF ist [Gerrits et al., 2002]. Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration auf Werte, die unter funktioneller Stimulation erreicht werden, löst im Modell der Cerebellum-Stimulation keine vergleichbare Blutflußantwort aus. Somit kann der Anstieg des regionalen Blutflusses nicht ausschließlich auf dieser sog. Kalium-Siphoning-Hypothese beruhen [Caesar et al., 1999].

Arachidonsäure

Unter neuronaler Aktivität wird Glutamat von den präsynaptischen Endigungen freigesetzt. Glutamat kann dann über die Bindung an Glutamat-Rezeptoren auf postsynaptischen Neuronen und Astrozyten einen intrazellulären Calcium-Anstieg und die Freisetzung von Arachidonsäure über die Aktivierung der Phospholipase C, A2 und der DAG-Lipase bewirken. Die freigesetzten Arachidonsäure-Metaboliten könnten über zwei Mechanismen an der neurovaskulären Kopplung beteiligt sein.

Zum einen könnten aus der Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen (COX) verschiedene vasokonstriktorische oder vasodilatatorische Prostaglandine gebildet werden. Die

Cyclooxygenase 2 (COX2) wird von postsynaptischen Zielzellen exzitatorischer Neurone exprimiert. Unter glutamaterger Aktivität könnte sich die Konzentration von freigesetzten Arachidonsäure-Metaboliten erhöhen und einen Anstieg vasodilatatorischer Prostaglandine bedingen.

Eine Blockade der COX2 oder eine Deletion des für COX2 codierenden Genes führt zu signifikanten Verringerungen der Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation [Niwa et al., 2000].

Zum anderen könnten die Arachidonsäure-Metaboliten durch das von Astrozyten exprimierte Zytochrom P450 zu vasoaktiven Epoxyeicosatrien-Säurederivaten (EET) metabolisiert werden [Harder et al., 1998]. Eine Inhibition der Zytochrom-P450-Epoxygenase löst eine Reduktion der CBF-Antwort auf Whisker-Stimulation um bis zu 69% aus [Peng et al., 2002]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Bildung vasoaktiver Prostaglandine über die COX2 und EET über Zytochrom P450 wichtige Rollen in der neurovaskulären Kopplung zufallen könnten.

Stickstoffmonoxid (NO)

Es ist bekannt, dass NO über eine hohe vasodilatatorische Potenz verfügt und lokal vom Endothel oder Zellen des Nervensystems produziert wird. NO wurde aufgrund der identischen biologischen wie chemischen Eigenschaften als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) identifiziert. Drei Formen der NO-Synthetase (NOS) sind im Gehirn bekannt: neuronale NOS (n-NOS), endotheliale NOS (e-NOS) und induzierbare NOS (i-NOS). Die induzierbare Form der NO-Synthetase wird bei Entzündungsprozessen gebildet (z.B. von Makrophagen, aber auch von Neuronen und Astrozyten). Die anderen beiden konstitutiv exprimierten Isoformen (n-NOS und e-NOS) existieren unter physiologischen Bedingungen und halten einen basalen NO-Spiegel im Hirngewebe aufrecht [Iadecola, 1992; Dirnagl et al., 1993; Akgoren et al., 1996].

NO scheint keine entscheidende Rolle als Mediator der neurovaskulären Kopplung zu spielen, da eine Blockade der NOS die Blutflussantwort auf neuronale Aktivität nicht vollständig unterbindet [Dirnagl et al., 1993; Irikura et al., 1994] und die lokale Applikation von NO-Donoren oder cGMP während der NOS-Blockade eine Wiederherstellung der CBF-Antworten [Lindauer et al., 1999] bewirkt.

Basales perivaskuläres NO agiert im zerebralen Kortex sehr wahrscheinlich als Modulator und nicht als Mediator der Blutflussregulation und ermöglicht somit andere Kopplungsmechanismen.

Eine weitere Hypothese zur neurovaskulären Kopplung, in der Stickstoffmonoxid eine entscheidende Rolle zukommt, wurde 1997 von Stamler et al. [Stamler et al., 1997] aufgestellt. In diesem Konzept wird NO im Rahmen der Deoxygenierung des Hämoglobins (Hb) freigesetzt. Dieses Modell wird im Folgenden ausführlich behandelt.

1.3.1.2 Neurogene Kopplungsmechanismen

Das Gefäßsystem des Gehirns ist mit einem komplexen System intrinsischer Innervation ausgestattet. Einige Autoren haben diesem sog. „mini brain“ eine entscheidende Rolle in der neurovaskulären Kopplung zugeschrieben [Lou et al., 1987]. Dieses engmaschige Netz könnte vasoaktive Substanzen (vor allem Neuropeptide) in direkter Umgebung der neuronalen Aktivität freisetzen [Vaucher and Hamel, 1995; Cohen et al., 1997; Cohen et al., 1999]. Dieser neurogene Mechanismus der Kopplung würde eine zeitlich besonders enge Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und Blutfluss ermöglichen. Die Bedeutung der intrinsischen Innervation ist bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen. Ein Zusammenspiel von verschiedenen Mediatoren und regionalen Nervenplexi könnte für die Kopplungsmechanismen verantwortlich sein.

1.3.2 Korrelation zwischen neuronaler Aktivität, Blutfluss und Sauerstoffmetabolismus

Roy und Sherrington schlossen aus ihren Beobachtungen auf eine mögliche Kopplung von neuronaler Aktivität und cerebralem Blutfluss. Ihrer Vermutung nach könnte die Kopplung der Sauerstoffanlieferung dienen, da der Sauerstoffverbrauch unter neuronaler Aktivität ansteigt und der Bedarf gedeckt werden muss. Dies würde eine enge, bedarfsabhängige, an den O₂-Metabolismus gebundene Blutflussregulation bedingen.

Der Kopplung von neuronaler Aktivität und regionalem Blutfluss, wie sie Roy und Sherrington annahmen, steht die von Fox und Raichle [Fox and Raichle, 1986] festgestellte Entkopplung entgegen.

Fox und Raichle befassten sich 1986 mit dem Kopplungsmechanismus von cerebralem Blutfluss, cerebralem Sauerstoffmetabolismus (CMRO₂) und der cerebralen metabolischen Rate für Glukose (CMRglc). Sie beobachteten die Veränderungen dieser Größen unter somatosensorischer Stimulation mittels Positronenemissionstomographie. Sie fanden weit über das Maß des Sauerstoffmetabolismus (CMRO₂+5%) hinausgehende Anstiege des CBF (+29%) sowie der CMRglc (+17%). Daraus schlossen sie, dass der Sauerstoffmetabolismus

und der Glukosemetabolismus im Gehirn unabhängig voneinander in die Kopplung des cerebralen Blutflusses eingreifen könnten.

Um die unterschiedliche Reaktion des CBF und des $CMRO_2$ sowie des CMR_{glc} auf neuronale Aktivität besser zu verstehen, und einen tieferen Einblick in die Regulation der neurovaskulären und neurometabolischen Mechanismen zu erlangen, verglichen Fox et al. [Fox et al., 1988] zwei Jahre später den CBF und die $CMRO_2$ mit der CMR_{glc} des menschlichen visuellen Cortex unter visueller Stimulation.

Sie beschrieben in ihren Beobachtungen folgendes:

- CBF und CMR_{glc} steigen unter Stimulation stark an (CBF 50%; CMR_{glc} 51%).
- $CMRO_2$ stieg nur um 5% an und das Molarverhältnis zwischen O_2 /Glukose beträgt nur 0.4/1.

Daraus schließen Fox et al.:

- dass 91% des aktivitätsbedingten Anstiegs der Glukoseaufnahme anaerob von statten geht. Der Großteil der Energie wird jedoch, aufgrund der höheren Effizienz, durch aerobe Glykolyse bereitgestellt.
- der CBF Anstieg übersteigt die $CMRO_2$ um ein Vielfaches, so dass ein signifikanter Rückgang in der Sauerstoff-Extraktions-Fraktion (OEF) zu verzeichnen ist.
- der über das Maß der Sauerstoffbereitstellung hinaus gehende Glukosemetabolismus müsste Laktat produzieren. Ein Laktatanstieg während Stimulation konnte aber bisher nicht überzeugend dargestellt werden.

Unter der Vorstellung, dass die CBF-Antwort der exakt bedarfsgerechten Anlieferung von Sauerstoff dient, erscheint der Befund, dass der O_2 -Gehalt im Blut des aktivierten Areals zunimmt und die Konzentration an deoxygeniertem Hämoglobin (deoxy-Hb) abnimmt, contraintuitiv. Die Veränderung der deoxy-Hb Konzentration bildet die Grundlage der fMRT und somit die Basis für 19293 Publikationen seit 1990 (PubMed, 2007).

Diese Beobachtung legte die Idee nahe, dass die CBF-Antwort einen anderen Zweck als die O_2 -Anlieferung erfüllt. Fox und Raichle schlossen aus diesen Ergebnissen, dass der erhöhte Blutfluss weniger einem Sauerstoffverbrauch entgegenwirken soll, sondern vielmehr die Glukosezufuhr sichert.

Dem entgegen steht die von [Wolf et al., 1997] nachgewiesene Unabhängigkeit des CBF von der Glukosezufuhr. Eine exzessive Glukosezufuhr löst keine Reduktion der CBF-Antwort aus. Neuere Arbeiten auf diesem Gebieten deuten daraufhin, dass die $CMRO_2$ im Mittel deutlich höher als ursprünglich gezeigt liegt ($CMRO_2 +25%$) [Gjedde et al., 2002] und so dem Sauerstoffmetabolismus des Gehirns eine weitaus größere Rolle in der Regulation des CBF

zufallen könnte, als von Fox und Raichle angenommen [Fox and Raichle, 1986; Fox et al., 1988].

Eine mögliche Erklärung für den überproportionalen Anstieg des cerebralen Blutflusses im Vergleich zum cerebralen Sauerstoffmetabolismus wurde von Buxton et al [Buxton and Frank, 1997] geliefert. Buxton et al. erklärten dies durch den diffusionslimitierten Sauerstofftransport in das Gewebe. Die Hypothese der diffusionslimitierten Sauerstoffversorgung basiert auf der Annahme, dass alle Kapillaren im Ruhezustand durchblutet sind und keine weiteren Kapillaren unter neuronaler Aktivierung hinzugeschaltet werden („no capillary recruitment“) [Villringer et al., 1994]. Bei steigendem Blutfluss ist die Verweildauer des Blutes in den Kapillaren verkürzt und somit auch die Möglichkeit der Sauerstoffabgabe in das Gewebe. Um die Sauerstoffgabe in benötigtem Maße anzuheben, muss der Blutfluss somit überproportional steigen. Die Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation müsste den Verbrauch von Sauerstoff bei weitem übersteigen, um die Gewebeversorgung mit Sauerstoff sicherstellen zu können.

Für die Blutflussmessungen ergeben sich hieraus folgende Überlegungen. Der ausgeprägte Blutflussanstieg bewirkt eine deutliche Vermehrung an oxygeniertem Blut im Aktivierungsareal, welche die Erhöhung der Konzentration an deoxy-Hb unterbindet. Das vorhandene deoxy-Hb wird aufgrund des enormen Bluteinstroms ausgewaschen und so ist insgesamt ein Konzentrationsabfall zu beobachten. Somit wäre die Entstehung von deoxy-Hb, wenn deoxy-Hb über den gesamten Zeitraum der Stimulation vermehrt produziert würde, aufgrund der Blutflusserhöhung nicht messbar [Lindauer et al., 2001].

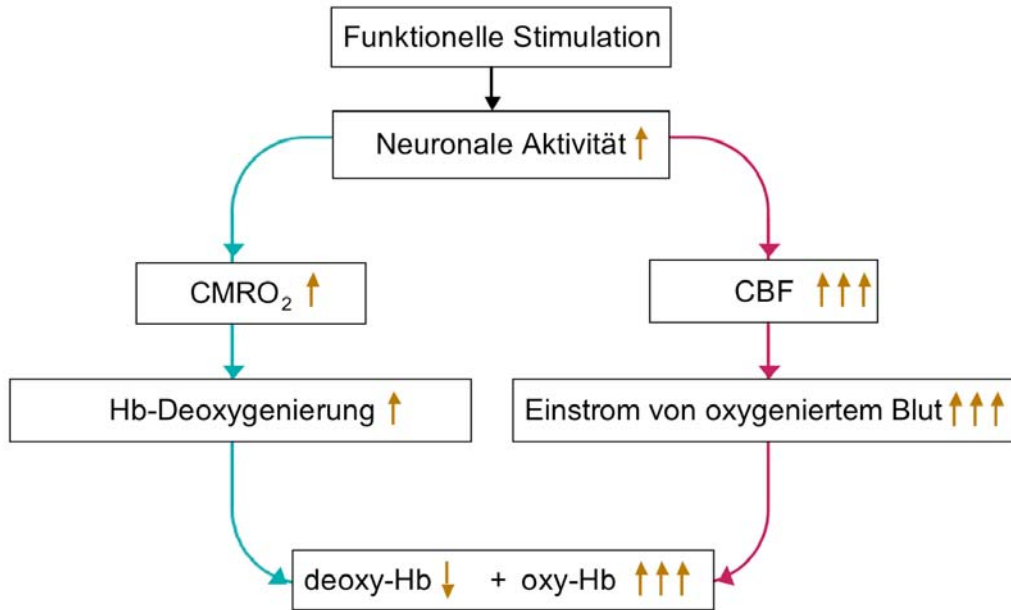


Abb. 1: Die Abbildung zeigt ein mögliches Modell für den Zusammenhang zwischen Sauerstoffmetabolismus und cerebralem Blutfluss unter funktioneller Stimulation.

Der Anstieg des Blutfluss übersteigt den des Sauerstoffmetabolismus unter funktioneller Stimulation und so ergeben sich bei der Messung von zerebralem Blutfluss und den oxy-/deoxy-Hb Konzentrationen folgende Verläufe.

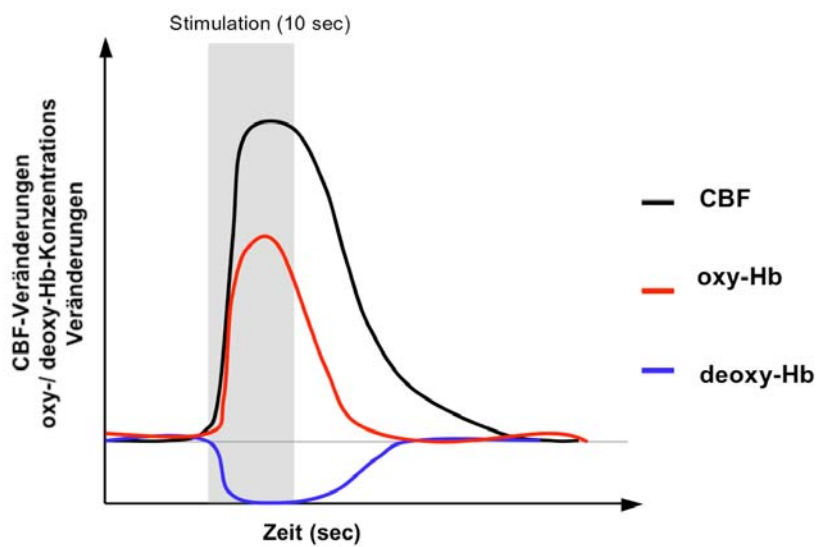


Abb. 2: Die Abbildung zeigt die Reaktionen des cerebralen Blutflusses (CBF) und der oxy-/ deoxy-Hämoglobin-Konzentration auf funktionelle Stimulation unter norm Bedingungen (21%O₂, 1 ATA).

Die Reaktion des Blutflusses auf Stimulation ist deutlich ausgeprägt und bewirkt einen starken Anstieg der Konzentration von oxygeniertem Hämoglobin (oxy-Hb) im aktivierten Areal. Simultan fällt die deoxy-Hb-Konzentration aufgrund des Einstroms von arteriellem, hoch oxygeniertem Blut ab (deoxy-Hb-outwash).

1.4 Hämoglobin-Deoxygenierung

Das während erhöhter neuronaler Aktivität entstehende deoxy-Hb bildet die Grundlage für drei verschiedene Modelle zur sauerstoffbedarfsorientierten Regulation des Blutflusses über einen deoxy-Hb-abhängigen Mechanismus. Zum einen die Reduktion von Nitrit zu NO durch deoxy-Hb, zum anderen die Ausschüttung von ATP aus den Erythrozyten und schließlich die NO-Freisetzung aus S-Nitroso-Hämoglobin (SNO-Hb) .

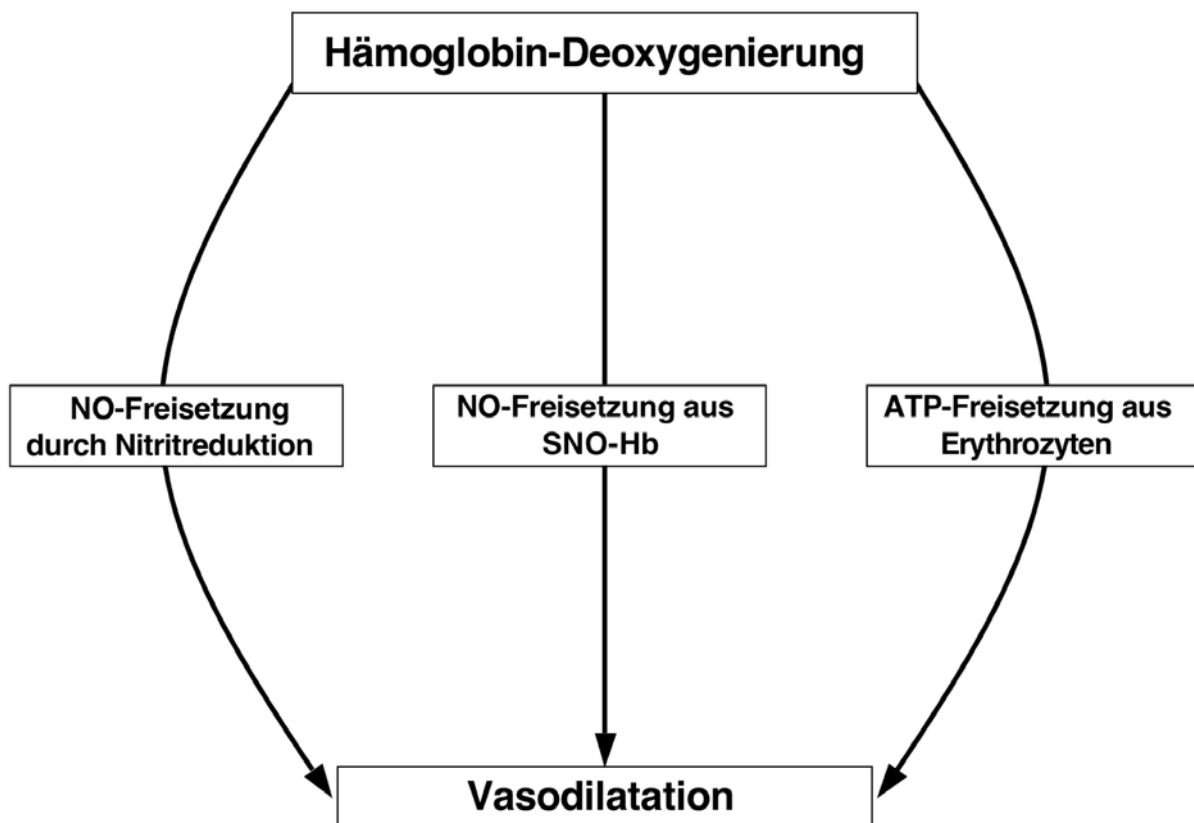


Abb. 3: Schematische Darstellung der Hämoglobin-Deoxygenierungs-abhängigen Mechanismen der cerebralen Blutflussregulation

1.4.1 ATP-Hypothese

Die ATP-Hypothese beschreibt eine an die Hämoglobin-Deoxygenierung gekoppelte ATP-Ausschüttung aus dem Erythrozyten mit anschließender Vasodilatation. Versuche an der isolierten Arterie konnten zeigen, dass nur in Anwesenheit von Erythrozyten im Gefäßlumen bei Hypoxie eine Gefäßdilatation auslösbar ist. Die durch Hypoxie ausgelöste Dilatation war von einem ATP-Anstieg begleitet. Daraus lässt sich schließen, dass die roten Blutzellen einen Beitrag zur Regulation des Gefäßtonus liefern könnten, in dem ATP eine entscheidende Rolle spielt [Dietrich et al., 2000].

ATP wird unter Einwirkung von Scherkräften (mechanische Verformung), Azidose sowie Hypoxie aus dem Erythrozyten ausgeschüttet [Bergfeld and Forrester, 1992; Ellsworth et al., 1995; Sprague et al., 1996; Burnstock, 2006] und löst über purinerge P2Y-Rezeptoren am vaskulären Endothel die Freisetzung von NO und/oder EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) mit nachfolgender Vasodilatation aus [Burnstock, 1987; Ellsworth et al., 1995; Dietrich et al., 1996; McCullough et al., 1997; Bryan et al., 2005].

Studien an der Skelettmuskulatur des Menschen konnten zeigen, dass unter erhöhter Aktivität die Deoxygenierung des Hämoglobins eine vermehrte ATP-Ausschüttung bewirkt [Gonzalez-Alonso et al., 2002].

Die Erythrozyten könnten somit nicht nur als Sauerstofftransporter, sondern auch als Sensor für den Bedarf an O₂ fungieren. Der Bedarf an Sauerstoff würde über eine erhöhte Ausschüttung von ATP und die daraus resultierende Blutflussvermehrung abgedeckt werden.

1.4.2 Nitrit-Hypothese

Ein möglicher deoxy-Hb-abhängiger Mechanismus für die sauerstoffbedarfsorientierte Blutflussregulation basiert auf der Kapazität des deoxy-Hb Nitrit zu NO zu reduzieren.

Die Reaktion des NO mit Sauerstoff unter Bildung von Nitrit in der Lunge konserviert die Bioaktivität des NO. Gladwin et al. konnten einen arteriell/venösen Gradienten mit signifikant erniedrigter venöser Konzentration für Nitrit feststellen. Nitrit stellt einen NO-Speicher dar und löst bei Infusion eine lokale Blutflusszunahme aus. Unter Sauerstoffverbrauch wird vermehrt NO aus Nitrit freigesetzt das vasoaktiv werden kann [Gladwin et al., 2000]. In vitro Daten deuten auf diese deoxy-Hb-vermittelte Reduktion des Nitrts zu NO hin [Cosby et al., 2003; Nagababu et al., 2003]. In diesem Modell ist somit die blutflussregulierende Freisetzung des NO an die Deoxygenierung des Hämoglobins gekoppelt.

1.5 NO aus SNO-Hb

Die Entstehung von deoxy-Hb bildet die Grundlage für ein weiteres Modell der zerebralen Blutflussregulation. In diesem Konzept agiert Stickstoffmonoxid (NO), welches im Rahmen der Hämoglobin-Deoxygenierung freigesetzt wird, als direkter Mediator der Blutflussregulation [Stamler et al., 1997].

1.5.1 Hypothese nach Stamler et al.

Im Folgenden werde ich kurz das Hämoglobin-Molekül beschreiben um die Funktionen und Reaktionen des im Mittelpunkt der „Stamler-Theorie“ stehenden Proteins zu erläutern. Im Anschluss daran wird das Modell an sich im Detail besprochen.

1.5.1.1 Hämoglobin

Hämoglobin ist ein kugelförmiges Protein, welches im menschlichen Erythrozyten vorkommt. Der Hämoglobingehalt eines einzelnen Erythrozyten beträgt zwischen 27 -34 pg. Hämoglobin war das erste Protein, dessen Tertiär- und Quartärstruktur aufgeklärt wurde. Es besteht aus vier Untereinheiten (4 Polypeptidketten), d.h. je zwei α -Ketten mit 141 Aminosäuren und 2 β -Ketten mit 146 Aminosäuren. Hämoglobin ist somit ein Proteintetramer mit insgesamt 574 Aminosäuren und einer Molekülmasse von etwa 64,5 kDa.

Jede Untereinheit trägt in ihrem Inneren eine Hämgruppe. Beim Sauerstofftransport wird der Sauerstoff reversibel an das Häm-Eisen angelagert, ohne dies jedoch zu oxidieren (Schutz des Eisens durch die Globinketten).

Hämoglobin besitzt folgende Funktionen:

- Transport des Sauerstoffs im Blut
- Beteiligung am Transport des Kohlendioxids und Stickoxids im Blut
- Beteiligung an der Pufferung zur Aufrechterhaltung der normalen Wasserstoffionenkonzentration im Extrazellulärraum

Schon Ende der 40er Jahre war beschrieben worden, dass sich die räumliche Struktur des Hb bei Sauerstoffaufnahme ändert. Hb kommt in zwei verschiedenen Formen vor, die sich hauptsächlich in der Anordnung der Untereinheiten, also der Quartärstruktur unterscheiden. Traditionell wird die Hauptkonformation des deoxy-Hämoglobins als T-Zustand und die des oxy-Hämoglobins als R-Zustand bezeichnet.

1.5.1.2 Hämoglobin als Stickstoffmonoxid (NO) Transporter

Hämoglobin besitzt die Möglichkeit neben Sauerstoff und Kohlendioxid auch NO zu transportieren. NO kann im Hb-Molekül an unterschiedliche Stellen binden. Zum einen an das Häm und zum anderen an Cystein β 93 (Cys β 93), wobei das Verhältnis von Häm-gebundenem und Cys β 93-gebundenem NO von der Affinität dieser beiden Bindungsstellen für NO abhängt. Die Affinität der Bindungsstellen verändert sich mit der Oxygenierung des Hb-Moleküls. NO wird bei der Bindung an das Häm inaktiviert (Autoscavenging). Dieser Mechanismus zeigt sich verantwortlich für den bekannten vasokonstriktorisches Einfluss von Hb.

Im Modell von Stamler et al. [Stamler et al., 1997] könnte die biologische Aktivität des NO durch die Bindung an das Cys β 93 bewahrt werden. Das Cys β 93 ist ein hoch konservierter Bestandteil des Hb-Moleküls und könnte als Autoscavenging-Inhibitor fungieren [Gow et al., 1999].

1.5.1.3 Oxygenierungsabhängige Affinität von Cys β 93 zu NO

Hämoglobin liegt zum einen in der oxygenierten, d.h. mit Sauerstoff beladenen, R-Form (R für relaxed) und zum anderen in der deoxygenierten T-Form (T für tense) im Blut vor. In diesen Zuständen verfügt Hämoglobin über unterschiedliche Affinität zu Sauerstoff und Stickstoffmonoxid.

Die räumliche Veränderung des Hb in Abhängigkeit von seiner Oxygenierung bildet die Grundlage für das von der Arbeitsgruppe um Stamler entworfene Modell zur Regulation des Blutflusses. In diesem Modell könnte Hb zusätzlich zu seiner Hauptfunktion des Sauerstofftransportes auch den Vasodilatator NO transportieren: Im venösen System und bei Eintritt in den Lungenkreislauf befindet sich ein Großteil des Hb im T-Zustand (deoxygeniert). Hb nimmt in der Lunge in Verbindung mit O₂ auch NO auf, und bildet aufgrund von Strukturveränderungen den sog. R-Zustand (oxygeniert). In diesem Zustand besitzt das Cys β 93 eine sehr hohe Affinität zu NO. Dadurch könnte ein Teil des im deoxygenierten Zustand des Hb am Häm gebundenen NO bei Hb-Oxygenierung intramolekular an das Cys β 93 transferiert werden. Die nun entstandene Verbindung wird als S-Nitroso-Hb (SNO-Hb) bezeichnet [Jia et al., 1996].

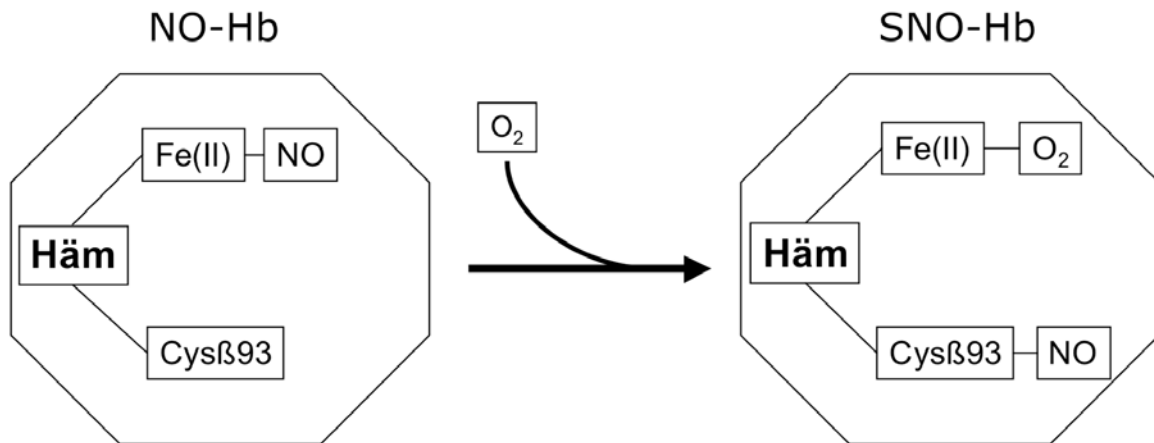


Abb. 4: Schematische Darstellung der SNO-Hb Entstehung

Am Zielort setzt Hämoglobin seinen Sauerstoff frei und infolge dessen ändert sich die Konformation des Hb-Moleküls derart, dass die Bindungsstelle des Cysβ93 für Stickstoffmonoxid blockiert wird und dieses somit simultan freigesetzt werden muss. Stamler et al. gehen davon aus, dass das mit dem Sauerstoff freigesetzte Stickstoffmonoxid als Vasodilatator und somit als Mediator der Blutflussregulation fungieren könnte [Gow and Stamler, 1998] (siehe Abb. 3,4).

1.5.1.4 Freisetzung von NO vs. Autoscavenging

In der T-Struktur des Hb (deoxy-Hb) besitzt Häm eine sehr hohe Affinität zu NO. Es stellt sich deshalb die Frage, wie verhindert werden kann, dass im Rahmen der Hb-Deoxygenierung das aus der Cysβ93-Bindung freigesetzte NO nicht sofort vollständig an Häm gebunden wird (Autoscavenging).

NO bildet in Verbindung mit Cysβ93 im oxygenierten Zustand des Hb SNO-Hb. NO könnte über ein spezielles Transportprotein, den Anion-Austauscher (AE1) aus dem Erythrozyten transferiert werden. NO würde somit bei der Freisetzung nicht dem intra-erythrozytären Autoscavenging des Häms zum Opfer fallen, da es sich erst beim Transport durch die Erythrozytenmembran aus der SNO Verbindung löst [Jia et al., 1996]. Zum anderen könnte die Freisetzung über die Reaktion mit in Erythrozyten vorhandenem Glutathion zu GSNO vermittelt werden [Stamler et al., 1997]. Das freigesetzte NO könnte im Anschluss als „HDRF“ (hemoglobin-derived relaxing faktor) aktiv werden. Das Stamler-Modell basiert auf der Vermutung, dass trotz eines hohen Prozentsatzes an Autoscavenging durch das Häm (ca. 99 %), die geringe Menge (ca. 1 % des gesamt NO) des freiwerdenden NO aus der SNO-Verbindung ausreichen könnte, um eine deutliche Vasodilatation zu bewirken.

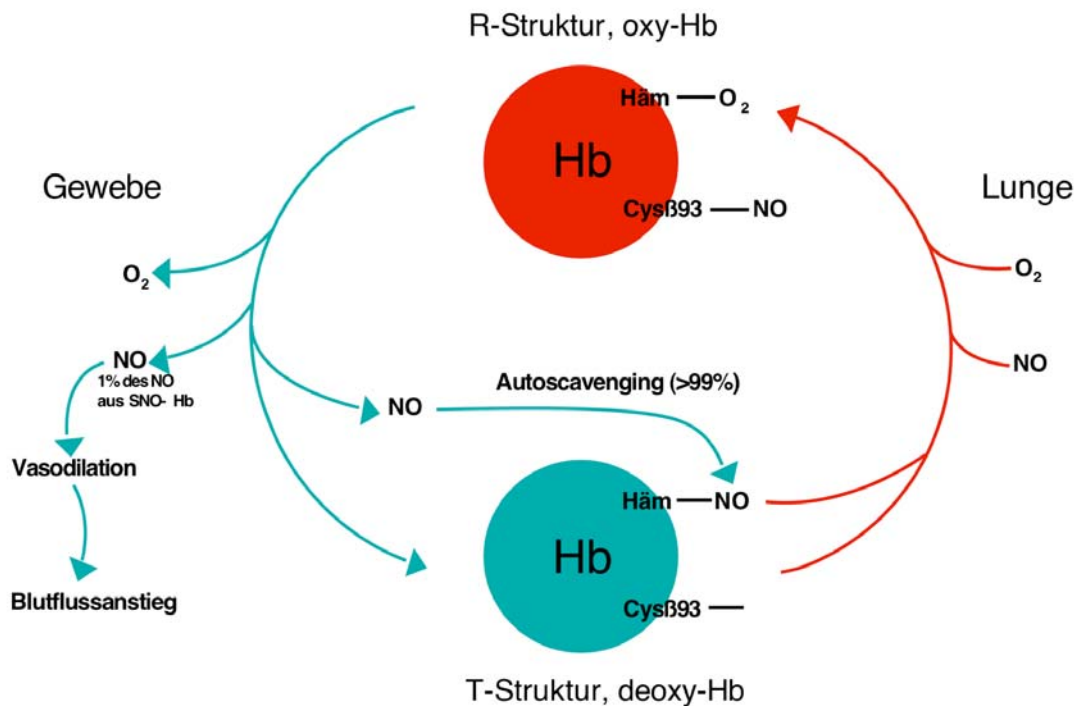


Abb. 5: Schematische Darstellung des O₂-/NO-Kreislaufs im Stamler-Modell

1.5.2 Experimentelle Validierung des Stamler-Modells

1.5.2.1 Einflüsse von Hb und SNO-Hb auf die Gefäße

Zur Überprüfung des relaxierenden Einflusses des SNO-Hb auf die Gefäße wurde die Reaktion der thorakalen Aorta des Kaninchens in ex-vivo Präparationen auf SNO-Hb mit der auf NO-Hb verglichen [Stamler et al., 1997]. Es wurde gezeigt, dass SNO-Hb wie NO-Hb bei 95% und 21% Sauerstoffgehalt in der Umgebung eine Gefäßkontraktion auslösen. Es scheint keine NO-Abgabe zu entstehen und dementsprechend auch keine Vasodilatation einzutreten. Stattdessen scheint das vaskulär produzierte NO an Hb gebunden und dem System entzogen zu werden, wodurch eine Durchmesserverringering entsteht. Unter Hypoxie (<1% O₂) hingegen löst NO-Hb ebenfalls eine Kontraktion aus, während SNO-Hb eine Dilatation bewirkt. Stamler et al. schlossen hieraus, dass die Vasokonstriktion des NO-Hb unter Hypoxie auf die Inaktivierung des NO durch das Autoscavenging zurückzuführen ist, die O₂-Abgabe durch SNO-Hb jedoch zu einer Freisetzung von NO führt und so eine Dilatation auslösen könnte.

Bei Betrachtung des cerebrovaskulären Effektes des SNO-Hb in in vivo Versuchen an Ratten fiel auf, dass bei Infusion von SNO-Hb (1µmol/kg über 3 min) im Vergleich zu NO-Hb der Blutfluss unter 21% O₂ (inspiratorisch) in allen metabolisch aktiven Hirnarealen anstieg. Dieser Anstieg wurde unter 100% O₂ in allen Hirnregionen verringert und unter 100% O₂+3ATA, (d.h. Versorgung des Gewebes nur durch physikalisch gelösten Sauerstoff, keine Deoxygenierung des Hb) in eine Blutflussabnahme umgekehrt [Stamler et al., 1997].

Stamler et al. schlossen hieraus, dass die Vasodilatation durch SNO-Hb nur bei Deoxygenierung des Hb stattfinden kann.

Zusätzlich überprüften Stamler et al. die Einflüsse von oxy-Hb, SNO-Hb und GSNO bei 21% und 100% O₂ auf den Blutdruck (RR) der Ratte [Stamler et al., 1997]. Die Substanzen wurden über die V. femoris in einer Konzentration von 1µmol/kg über 1min injiziert. Die Messungen wurden 10 min nach der Injektion gestartet. Die oxy-Hb-Injektion hat einen blutdrucksteigernden Effekt (ca. 11% RR-Anstieg unter 21% O₂; 7% RR-Anstieg unter 100% O₂ Steigerung). Nach SNO-Hb-Gabe ist ein deutlich verminderter Blutdruckanstieg (ca. 5% unter 21% O₂; 2% unter 100% O₂) zu beobachten. GSNO führte zu einem Blutdruckabfall (ca. 5% unter 21% O₂; 7% unter 100% O₂).

Stamler et al. schlossen hieraus, dass der verminderte Blutdruckanstieg nach SNO-Hb-Gabe sowie der Blutdruckabfall nach GSNO-Injektion durch den vasodilatatorischen Einfluss des freigesetzten NO bedingt ist.

1.5.2.2 Lokale Konzentrationen von NO-Hb und SNO-Hb in den Gefäßen

Die Messung der Konzentrationen von SNO-Hb und NO-Hb im Blut der Ratte und des Menschen sollten Aufschluss darüber geben, unter welchen Bedingungen SNO-Hb und NO-Hb gebildet und verbraucht werden. Es wurden die SNO-Hb und NO-Hb Konzentrationen in den A. carotidae (arteriell) und den V. cavae, sowie im rechten Vorhof (venös) überprüft [Jia et al., 1996; McMahon et al., 2002].

Es wurde beobachtet, dass bei einem Sauerstoffgehalt von 21 % in der Atemluft im venösen Blut NO-Hb überwiegt und nahezu gleiche Mengen an SNO-Hb und NO-Hb im arteriellen Blut zu finden sind. Unter hyperbarer Hyperoxygenierung (HBO) mittels 3 ATA und 100% Sauerstoff (d.h. fehlende Deoxygenierung des Hb) konnten erhöhte Spiegel an SNO-Hb arteriell wie venös gemessen werden. Ein arteriell/venöser SNO-Hb Gradient war unter diesen Bedingungen nicht mehr nachweisbar.

Stamler et al. schlossen hieraus, dass unter absoluter Sauerstoffsättigung des Hämoglobins keine Zunahme des zerebralen Blutflusses zur Versorgung des aktivierten Hirnareals mehr stattfindet. SNO-Hb kann sich somit im Blut anreichern.

1.5.3 Kritische Punkte des Stamler-Modells

SNO-Hb wurde als Regulator des Blutflusses und der Gewebeoxygenierung vorgeschlagen, der über die allosterisch kontrollierte Bindung und Abgabe von NO und Sauerstoff wirkt. Das Stamler-Modell setzt voraus, dass sich erstens NO-Hb bildet und zweitens, dass durch den Transfer von NO zum Cys β 93 und die Bildung von SNO-Hb die Aktivität des NO gesichert wird. Es existieren einige kritische Kommentare und es wurden Zweifel an diesen Mechanismen und den von Stamler et al. beschriebenen Versuchsergebnissen geäußert. Im Folgenden werden diese kurz erläutert.

1.5.3.1 NO-Transfer im Erythrozyten

Ein essentieller Bestandteil der SNO-Hb Hypothese ist die Vorstellung, dass NO an das Cys β 93 transferiert wird und anschließend, aufgrund der strukturellen Veränderung des Hb von R- zum T-Zustand, freigesetzt wird [Stamler et al., 1997]. Im Gegensatz zu Stamler et al. konnten Gladwin et al. beide Reaktionsschritte unter physiologischen Bedingungen nicht experimentell verifizieren, noch den intramolekularen Transfer des Stickstoffmonoxids vom Häm zum Cys β 93 und in umgekehrter Richtung nachweisen [Gladwin et al., 2003; Xu et al., 2003].

Es wurde jedoch gezeigt, dass der beschriebene NO-Cys β 93 Transfer durch die Gabe von unphysiologischen Mengen von Nitrit ausgelöst werden kann [Gladwin et al., 2003; Xu et al., 2003]. Die von Stamler beobachteten Daten könnten somit durch diesen pharmakologischen Effekt erklärt werden.

Da in verschiedenen experimentellen Ansätzen keine Hinweise für einen physiologischen, allosterisch kontrollierten, intramolekularen Transfer von NO erhalten wurden, fehlt die experimentelle Bestätigung für diesen entscheidenden Teil des Stamler-Modells.

1.5.3.2 Entstehung von SNO-Hb

Bei Untersuchungen am Menschen unter Einatmung von NO-Gas wurde gezeigt, dass vorwiegend Methämoglobin und Nitrat (80 μ m Blutspiegel), nur 1 μ m NO-Hb und kaum

feststellbare Konzentrationen an SNO-Hb gebildet werden [Gladwin et al., 2000]. Auch andere Untersuchungen zeigten, dass Stickstoffmonoxid unter physiologischen Bedingungen die Bildung des Oxy-Häm-Komplexes (Bindung an oxygeniertem Häm) präferiert [Doyle and Hoekstra, 1981; Herold et al., 2001].

Weitere Studien postulieren, dass es keinen nennenswerten Unterschied in der NO-Bindungsaktivität des menschlichen Hämoglobins in R und T Zustand gibt [Huang et al., 2001; Huang et al., 2002].

Die Bolusgabe von NO zu sauerstoffenthaltenden Hämoglobinlösungen führt zu einer unverhältnismäßig hohen Bildungsrate von NO-Hb und Nitrit. Unter physiologischen Konzentrationen von NO würden nahezu 100% des NO Methämoglobin und Nitrat bilden [Han et al., 2002; Joshi et al., 2002; Zhang and Hogg, 2002].

1.5.3.3 SNO-Hb Konzentrationen und Gradienten in der Zirkulation von Nagetieren und des Menschen

Die vorliegenden Daten zur SNO-Hb-Konzentration sind sehr kontrovers. In Untersuchungen der Arbeitsgruppen (AG) um Stamler wurden hohe SNO-Hb Konzentrationen in der arteriellen Zirkulation von Nagetieren (31 nm) und des Menschen (bis zu 7 µm) [Stamler et al., 1992; Jia et al., 1996; Stamler et al., 1997] gemessen. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten diese Daten nicht bestätigen und fanden kaum messbare Mengen an SNO-Hb in menschlichem Plasma und Erythrozyten (≤ 40 nm) [Gladwin et al., 2000; Gladwin et al., 2000; Jourdeuil et al., 2000; Marley et al., 2000; Gladwin et al., 2002].

Ebenso konnten die von Stamler et al. beschriebenen arterio-venösen Gradienten (arteriell 0,3-7 µm SNO-Hb, venöse nicht messbar) in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden [Jia and Stamler, 1999; McMahon et al., 2002].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse stellen wesentliche Teile der SNO-Hb-Hypothese in Frage.

1.5.3.4 Dilatation durch SNO-Hb

Einer der einleuchtenden Aspekte der SNO-Hb Hypothese ist, dass SNO-Hb in Verbindung mit Glutathion (GSH) eine Vasodilatation auslöst. Diese Dilatation wird durch Hypoxie potenziert [McMahon and Stamler, 1999; McMahon et al., 2002].

Weiterführende Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen deuten allerdings darauf hin, dass der beschriebene Effekt unabhängig von der Oxygenierung zu sein scheint [Patel et al., 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass SNO-Hb in der Anwesenheit von 1mM GSH eine Relaxation des Aortenrings auslöst. Die Relaxation ist in seiner Stärke ebenfalls unabhängig von der Oxygenierung [McMahon et al., 2000; Deem et al., 2001; Deem et al., 2002; Gladwin et al., 2002].

Die beschriebenen Hypoxie-induzierten Anstiege der Gefäßdilatation durch die NO-Abgabe des SNO-Hb wären somit eher durch die Potenzierung der NO-Donoren (S-Nitrosoglutathion, Nitrit und Nitroglycerin) unter Hypoxie zu erklären, als durch eine allosterische strukturelle Veränderung des Hämoglobins.

1.5.3.5 Verfügbarkeit von SNO/NO-Hb für glatte Muskelzellen der Blutgefäße

SNO-Hb bewirkte in Anwesenheit von GSH in in vitro Untersuchungen eine Gefäßrelaxation. Dieses Ergebnis wurde dahingehend interpretiert, dass das Autoscavenging von NO limitiert ist und NO aus SNO-Hb eine Vasodilatation auslösen kann [Wolzt et al., 1999].

Die Diffusionsbarrieren für NO aus der SNO-Hb-Verbindung beinhalten jedoch eine große Schwierigkeit des SNO-Hb-Modells. Es ist bekannt, dass Sauerstoff und NO in die Erythrozyten hinein diffundieren können. Aus den Erythrozyten heraus kann dies jedoch nur Sauerstoff. Dieses Problem wird im Stamler-Modell mittels eines speziellen Transports über den Anion-Austauscher (AE1) gelöst [Pawloski et al., 2001]. Dieser Austauscher kann SNO problemlos durch die Erythrozytenmembran schleusen. NO müsste jedoch zusätzlich zur Erythrozytenmembran die erythrozytenfreie Zone an den Gefäßwänden, das Gefäßendothel und die Zellmembran der Gefäßmuskulatur überwinden. Diese Diffusionsfaktoren reduzieren die biologische Aktivität des SNO-Hb beträchtlich. Umgekehrt ist das endothelial produzierte NO durch diese diffusionsbedingten Barrieren vor dem Autoscavenging durch das Häm zum Teil geschützt, d.h. die diffusionsbedingten Barrieren reduzieren die NO -> Häm Reaktion um den Faktor 1000 [Coin and Olson, 1979; Liu et al., 1998; Vaughn et al., 1998]. Aufgrund dessen sind die endothelial produzierten NO-Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen ausreichend genug, um die NO-Versorgung der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand sicherzustellen. In diesem Modell ist keine besondere NO-Konservierung, noch ein außergewöhnlicher Transport des NO notwendig, um die elementaren Aufgaben in der Regulation des Blutflusses zu bewältigen. [Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro et al.,

1987; Palmer et al., 1987; Palmer et al., 1988; Butler et al., 1998; Liao et al., 1999; Vaughn et al., 2000; Huang et al., 2001].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die endotheliale NO-Produktion, die Destruktion des NO durch das Hämoglobin (Autoscapenging) und die Diffusionsbarrieren die Bioverfügbarkeit des NO regulieren.

1.5.3.6 Endotheliale NO-Produktion

Infusionen von NOS-Inhibitoren produzieren einen Blutflussrückgang um 25-30% [Amezcuca et al., 1989; Rees et al., 1989; Chu et al., 1991; Dirnagl et al., 1993; Panza et al., 1993; Quyyumi et al., 1995; Gladwin et al., 2000]. Dies zeigt die Bedeutung endothelialer bzw. perivaskulärer NO-Produktion für die Regulation des Blutflusses.

Bei einer Insuflation von 4 μ M NO-Gas pro Minute in die Pulmonalgefäße würde man eine Bildung von SNO-Hb und einen Blutflussanstieg erwarten. Es wurde jedoch kein Effekt auf den peripheren Blutfluss registriert. Eine Erhöhung des Blutflusses durch Inhalation von NO (80 p.p.m.) war unter kompletter Inhibition der NOS experimentell nachzuweisen. Unter diesen Bedingungen bildet NO jedoch Nitrit und geht mit Methämoglobin in Bindung. Ein signifikanter SNO-Hb Anstieg konnte nicht beobachtet werden. Das entstehende Nitrit könnte somit die beobachtete Vasodilatation auslösen [Gladwin et al., 2000; Cannon et al., 2001; Schechter et al., 2002].

Der Gefäßtonus scheint unter physiologischen Bedingungen eher durch die lokale NO-Produktion der gefässsständigen NOS als durch die NO-Lieferung des SNO-Hb reguliert zu sein.

1.5.3.7 Initiale Hypoxie?

Ein interessanter Aspekt der von Stamler et al. aufgestellten Hypothese ist, dass die Abgabe von O₂ und NO simultan mit dem Verbrauch von O₂ durch das Hirngewebe ansteigen müsste. Das hieße, unter erhöhtem O₂-Verbrauch würde unmittelbar mit O₂ auch NO freigesetzt, und dies könnte eine zeitlich eng gekoppelte Vasodilatation mit Anstieg des regionalen Blutflusses bewirken. Das Stamler-Modell ist somit ein Modell, welches die extrem enge Kopplung von CBF und neuronaler Aktivität bei erhöhtem O₂-Metabolismus erklären könnte. Es wird aber immer noch kontrovers diskutiert, ob sich zu Beginn erhöhter neuronaler Aktivität eine initiale, kurzzeitige Hypoxie des Gewebes entwickelt [Lindauer et al., 2001].

Es existieren experimentelle Hinweise auf eine, in den ersten Millisekunden nach neuronaler Aktivierung auftretende, lokale relative Hypoxie [Thompson et al., 2003], welche durch die Diffusionszeit des Sauerstoffs ins Gewebe bedingt sein könnte. Gleichzeitig wurde ein kurzzeitiger Anstieg an NO registriert [Buerk et al., 2003].

Im von Stamler et al. postulierten Modell der Blutflussregulation steht die bei erhöhtem O₂-Metabolismus mit dem O₂-Abgabe verbundene NO-Freisetzung im Zentrum. Eine Gewebehypoxie müsste nicht zwingend nachweisbar sein, da die Anlieferung mit O₂ den Verbrauch umgehend abdecken dürfte.

1.6 Fragestellung

Im „Stamler-Modell“ kommen Hämoglobin und Stickstoffmonoxid die entscheidenden Rollen in der neurovaskulären Kopplung zu. Hämoglobin würde den Sensor für Sauerstoffverbrauch und gleichzeitig den Lieferanten des Blutflussregulators NO darstellen. Die von Stamler et al. beschriebene Regulation des Blutflusses wäre ein rein endovaskulärer Mechanismus, der vollkommen unabhängig von extravaskulären Veränderungen und Einflüssen funktionieren könnte und auf alle Organsysteme übertragbar wäre. Dies stellt eine vollkommen neue Aufgabe für das wohl am genauesten erforschte und in seinen Funktionen bekannteste Protein Hämoglobin dar.

Der Sauerstoffbedarf und seine Abgabe würden über den Sauerstoffgradienten vermittelt werden. Die Sauerstoffanlieferung würde über die NO-induzierte Vasodilatation der Widerstandsgefäße und den daraus resultierenden Blutflussanstieg reguliert werden.

Das von Stamler et al. postulierte Modell beruht auf in vitro Untersuchungen des Hämoglobins und in vivo Versuchen zur relaxierenden Wirkung von SNO-Hb. Allerdings haben Stamler et al. die verschiedenen Teile ihrer Hypothese nur jeweils einzeln und nicht im Zusammenspiel aller Einflussfaktoren überprüft und bestätigt. Verschiedene experimentelle Gegenbeweise stellen das SNO-Hb Modell deutlich in Frage. Somit ist völlig unklar, ob das Modell im Ganzen auf die komplexe Physiologie eines Lebewesens übertragbar ist.

Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz der SNO-Hb-Hypothese wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, der es erlaubt, die grundlegende Hypothese des „Stamler-Modells“ in vivo zu untersuchen.

Wie schon beschrieben, zeigen Stamler et al. in ihren Versuchen unter hyperbarer Hyperoxygenierung (3 ATA, 100% Sauerstoff), dass der peri-arterioläre O₂-Gradient und damit die Differenz zwischen arteriellem und venösem Hämoglobinsättigungsgrad eliminiert

ist. Unter diesen Bedingungen dürfte die Sauerstoffversorgung des Hirngewebes unter Ruhe und unter physiologischer Aktivierung allein über physikalisch gelösten Sauerstoff bewältigt werden. Es dürfte sich somit keine Deoxygenierung des Hämoglobins entwickeln und bei Gültigkeit des von Stamler et al. beschriebenen Mechanismus keine Blutflussreaktion auf neuronale Aktivität entstehen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher die Gültigkeit der von Stamler et al. postulierten Hypothese im Modell der somatosensorischen Stimulation an der anästhesierten Ratte.

Wir entschieden uns für die Analyse des Blutflusses in einem Areal des sensorischer Kortex der Ratte, dessen neuronale Aktivität durch gezielte elektrische Stimulation der Vorderpfote angeregt wird. Mit diesem Versuchsansatz kann die physiologische Blutflussreaktion auf Stimulation, die neurovaskuläre Kopplung, analysiert werden.

Das Stamler-Modell kann in dem Versuchsaufbau überprüft werden, indem die funktionelle Stimulation unter hyperbarer Hyperoxygenierung durchgeführt wird. Nach der von Stamler et al. vorgeschlagenen Theorie sollte unter hyperbarer Hyperoxygenierung (3 ATA, 100% Sauerstoff) Hämoglobin weder den gebundenen Sauerstoff noch das gebundene NO abgeben. Dadurch sollten keine Vasodilatation und kein Blutflußanstieg nach funktioneller Stimulation auftreten.

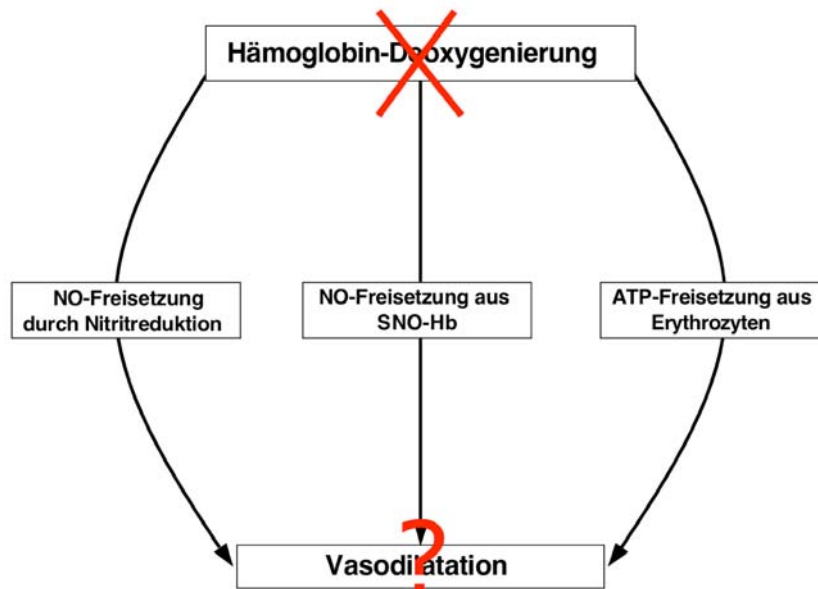


Abb. 6: Verhinderung der Hämoglobin-Deoxygenierung soll nach dem Stamler-Modell die Vasodilatation unterbinden.

Hypothese der vorliegenden Arbeit:

Auf der Grundlage der dargestellten Befunde aus der Literatur formulierten wir folgende Arbeitshypothese für die vorliegende Arbeit:

Hämoglobin-Deoxygenierung-abhängige Mechanismen sind wesentlich an der Blutflussregulation während erhöhter neuronaler Aktivität beteiligt.

2 Material und Methoden

Dieser Abschnitt behandelt zunächst die Grundlagen der Experimente, d.h. die Versuchsmodelle auf denen diese Arbeit basiert. Im Anschluss daran wird genauer auf den Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung eingegangen.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die funktionelle Aktivierung des cerebralen Kortex und die resultierenden Blutflussantworten im aktivierten Areal. Diese wurden am Tiermodell Ratte durch somatosensorische Stimulation des Vorderpfotenareals hervorgerufen. Die Blutfluss- und Blutoxygenierungsantworten wurden zum einen mittels Laser-Doppler-Flussmessung (LDF) und zum anderen mittels optischer Spektroskopie untersucht.

2.1 Funktionelle Stimulation des Vorderpfoten-Areals der Ratte

Zur Beantwortung der Fragestellung ist ein Versuchsaufbau erforderlich, der die physiologischen Bedingungen des menschlichen Kortex möglichst exakt widerspiegelt.

Zur Erforschung der Mechanismen der neurovaskulären Kopplung und der Einflüsse diskutierter Mediatoren bieten sich grundsätzlich verschiedene Versuchsmodelle an.

In vitro Modelle bieten die Möglichkeit, z.B. an der isolierten Arterie, unterschiedliche Mediatoren auf ihre Vasoaktivität zu prüfen. In diesem Modell ist jedoch keine funktionelle Stimulation möglich. Die Übertragbarkeit der in vitro gewonnen Information auf die physiologischen Vorgänge in einem lebenden Organismus ist oft nur unvollständig gegeben. In vitro Modelle sind somit zur Bearbeitung der von Stamler et al. aufgestellten Hypothese nur unzureichend geeignet.

Mit Hilfe akuter Hirnschnitte könnte die Überprüfung unterschiedlicher Mediatoren sowie deren Reaktion auf elektrische Stimulation durchgeführt werden. Diesem Modell fehlt jedoch der intravaskuläre Perfusionsdruck und somit eine wichtige Einflussgröße für den cerebralen Blutfluss.

Eine weitere Methode, um mögliche Mechanismen der neurovaskulären Kopplung zu überprüfen, stellen in vivo Modelle dar. In diesen Modellen ist eine funktionelle Stimulation möglich. Die Übertragbarkeit der z.B. bei Maus/Ratte gewonnen Daten auf den Menschen ist aufgrund der Vergleichbarkeit in der Dynamik der Blutfluss-/ Oxygenierungs-Antworten und der Hämoglobin-Struktur gegeben. Somit kann in einer in vivo Versuchsreihe dem komplexen System der neurovaskulären Kopplung am ehesten entsprochen werden.

Ein in vivo Modell kommt für die Messung und räumliche Charakterisierung der Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation nur dann in Frage, wenn eine fokale Stimulationsantwort vorliegt. Das aktivierte Areal muss gut von der Umgebung abgrenzbar sein. Es ist notwendig, dass dieses Areal mit optischen Methoden von der kortikalen Oberfläche zugänglich ist, und dass konstante Antworten erhalten werden. Um dies zu gewährleisten, ist es von Vorteil wenn die Verbindung zwischen Sensororgan und kortikalen Neuronen möglichst kurz ist und eine geringe Anzahl von Synapsen enthält.

Für diese Arbeit wurde die elektrische Stimulation des Vorderpfotenareals bei männlichen Wistar-Ratten herangezogen. Die Ratte verfügt über eine dem menschlichen Homunculus entsprechende topische Zuordnung innerhalb des somatosensorischen Kortex (Abb. 7). Der Whisker-Barrell-Kortex stellt das somatosensorische Areal der Schnauzhaare der Ratte dar und ist das größte Areal.

Aktivität im Vorderpfoten-Areal kann durch sensorische elektrische Stimulation der Vorderpfote erzeugt werden. Die Stimulationsdauer kann ebenfalls sehr genau und kurz dosiert werden.

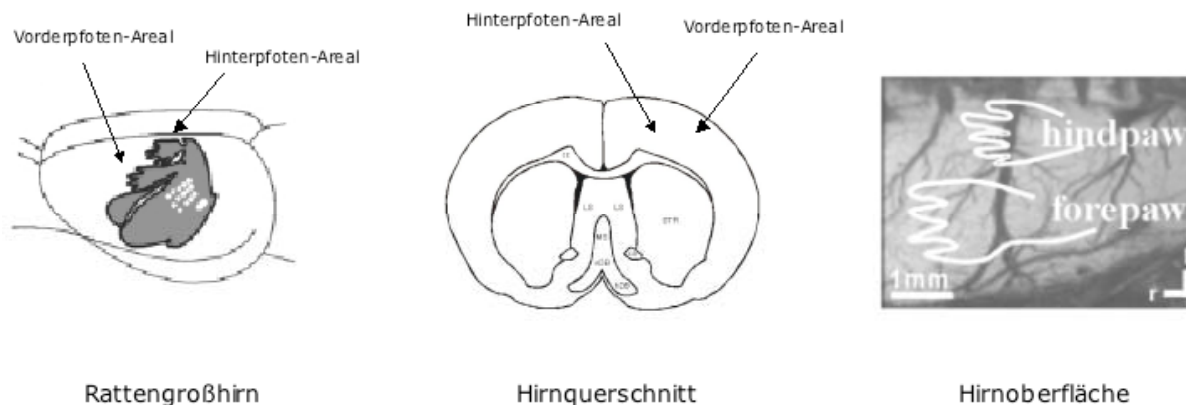


Abb. 7: Neuronale Somatotopie im Kortex der Ratte [Godde et al., 2002]

2.2 Berechnung der Sauerstoffsättigung unter 3 ATA und 100%O₂

Das Modell zur Erzeugung und Berechnung einer absoluten Sauerstoffsättigung des Gewebes mittels hyperbarer Hyperoxygenierung wurde in der Einleitung schon angesprochen. In diesem Abschnitt wird der wissenschaftliche Hintergrund dieses Modells kurz erläutert.

Die hyperbare Hyperoxygenierung koppelt die Sauerstoffversorgung des Hirngewebes vom Hämoglobin ab und bewirkt eine Sauerstoffversorgung ausschließlich über im Blut gelösten Sauerstoff. Die hyperbare Hyperoxygenierung bewirkt einen Anstieg des Gewebe pO₂ von ca. 30 mmHg (unter 20%O₂ bei 1 ATA; Spezies Ratte) auf 250-600 mmHg (100%O₂ bei 2-4

ATA) [Jamieson and Vandenbrenk, 1963; Demchenko et al., 2005]. Die Menge des im Blut physikalisch gelösten Sauerstoffs unter Normalbedingungen (21% O₂ bei 1 ATA, arterielle O₂ Sättigung des Hämoglobins ca. 95%, arterieller pO₂ 90-100 mmHg, Hämoglobin-Gehalt 15g / 100ml nach Hüfner) beträgt 0,3 ml O₂ / 100ml. Unter diesen Bedingungen sind 20 ml O₂ / 100 ml Blut an Hämoglobin gebunden. Die Differenz der arterio-venösen Hämoglobin-O₂-Sättigung im Gehirn unter Ruhebedingungen beträgt ca. 25-30%. Dies entspricht 5,0-6,0 ml O₂ / 100ml Blut [Vovenko, 1999]. Durch die hyperbare Hyperoxygenierung wird die Hämoglobin-O₂-Sättigung von 95% auf 100% erhöht. Die Menge des physikalisch gelösten Sauerstoffs im Blut steigt bei einem arteriellen pO₂ von ca. 2250 mmHg auf 6,5-7,0 ml O₂ / 100ml Blut an (von 0,3ml O₂ / 100ml s. oben). Dieser Anstieg würde nicht nur den Sauerstoffbedarf unter Ruhebedingungen, sondern ebenfalls den um 20% ansteigenden Bedarf unter funktioneller Aktivierung abdecken.

Unter den Bedingungen der hyperbaren Hyperoxygenierung (100%O₂ bei 3 ATA) dürfte keine Deoxygenierung des Hämoglobins entstehen und somit keine von der Hämoglobin-Deoxygenierung abhängige Blutflussregulation wirksam sein.

2.3 Laser-Doppler-Flussmessung und Reflexions-Spektroskopie

Wir verwendeten zwei unterschiedliche Messmethoden zur Beobachtung der neurovaskulären Kopplung. Zum einen wurde der CBF mittels Laser-Doppler-Flussmessung (LDF) gemessen. Zum anderen wurden gleichzeitig der CBF und die Hb-Oxygenierung mittels einer Kombination aus LDF und optischer Reflektions-Spektroskopie aufgezeichnet.

2.3.1 Laser-Doppler-Flussmessung

LDF ist eine etablierte Methode zur Messung des regionalen zerebralen Blutflusses. Die LDF kann im Tierexperiment minimal-invasiv angewendet werden, hat daher einen geringen Einfluss auf die Physiologie des Versuchstiers und stellt somit die geeignete Messmethode für die Versuchsreihen dar [Dirnagl et al., 1989].

Die Grundlage der LDF bildet der so genannte Doppler-Shift. Dieser entsteht, wenn Photonen von bewegten Objekten, wie in diesem Fall Erythrozyten, gestreut werden und sich daher ihre Frequenz verschiebt. Das auf die umgebenden ortsständigen Zellen treffende Licht wird dagegen ohne Frequenzänderung reflektiert. Die Bandbreite des Doppler-Shifts ist proportional zur Geschwindigkeit der bewegten Zellen (LD-velocity), die Amplitude

proportional zur Konzentration der bewegten Erythrozyten (LD-CRBC) [Nilsson et al., 1980; Barfod et al., 1997].

Die LD-Technik besitzt eine hohe zeitliche Auflösung, verfügt dabei aber in der von uns verwendeten Konfiguration über eine sehr limitierte räumliche Auflösung im Bereich von 1 mm³. Die Messsonde verfügt über zwei optische Kanäle, einen Sender- und einen Empfänger-Kanal. Der Durchmesser der Kanäle beträgt 80µm, die Distanz zwischen den Kanälen 250µm. Der Laser hat eine Wellenlänge von 780nm und eine Leistung von 3 mW. Das Sample-Volume wird durch die Geometrie der Lichtleiter sowie durch die optischen Eigenschaften des Gewebes bestimmt. Für einen typischen Streukoeffizienten von $\mu_2' = 0,5-1,0\text{mm}^{-1}$ beträgt das Samplevolumen ca. 0,1-0,5 mm³.

Die rCBF-Veränderung kann aus der unterschiedlichen Reflektionen von sich bewegenden Blutzellen und dem unbewegten Umgebungsgewebe über folgende Formel berechnet werden.

$$rCBF = \int_{v \text{ low}}^{v \text{ high}} v * PSD(v) dv$$

PSD ist die Power Spektral Dichte; rCBF wird in arbiträren Einheiten angegeben

Die LDF-Methode ist für prozentuale Veränderungen des CBF in physiologischen Bereichen des CBF valide. Absolute CBF-Messungen sind mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Des Weiteren lässt sich mit der LDF keine Aussage über die Hämoglobin-Oxygenierung treffen.

Um eine Aussage über das Verhältnis von oxy-, deoxy-Hämoglobin und die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins treffen zu können, wurden zusätzlich spektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

2.3.2 Spektroskopie

Als Spektroskopie werden in erster Linie Verfahren bezeichnet, welche die Absorption oder Emission von Licht untersuchen. Mit Hilfe eines Spektrometers wird dabei ein Lichtspektrum (Intensität des absorbierten oder ausgestrahlten Lichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge) aufgezeichnet.

Die Spektroskopie beruht auf den Wechselwirkungen von Licht und im Medium befindlichen lichtabsorbierenden Molekülen (Chromophoren). Eingestrahlt Licht wird von diesen

Chromophoren durch Absorption und Streuung spezifisch abgeschwächt. Diese Abschwächung lässt Rückschlüsse auf ihre Konzentration im jeweiligen Medium zu.

Versuche von Grinvald und Wiesel im Jahre 1986 [Grinvald et al., 1986] konnten zeigen, dass bei Untersuchungen im Hirngewebe oxygeniertes und deoxygeniertes Hämoglobin die relevanten Chromophoren darstellen.

Die Schwierigkeit bei quantitativen spektroskopischen Untersuchungen, d.h. die Kalkulation der Chromophor-Konzentrationen, stellt die Streuung und Absorption der Photonen im Gewebe dar.

In jedem nicht streuenden, konstant absorbierenden Medium beschreibt das Lambert-Beer Gesetz den Zusammenhang zwischen Extinktion und der Konzentration einer lichtabsorbierenden Substanz.

$$(1) \quad E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

- E = Extinktion des Lichts im Medium
- ϵ = Extinktionskoeffizient (abhängig vom Medium)
- c = Konzentration der lichtabsorbierenden Substanz
- d = die Schichtdicke des Mediums

In streuenden Medien ist eine Veränderung des Lambert-Beer Gesetzes für quantitative spektroskopische Analysen erforderlich.

Die Lichtintensität wird durch Streuverluste und Absorption abgeschwächt. Die Streuung des Lichtes hängt von der Gewebezusammensetzung sowie der Eindringtiefe ab. Die Eindringtiefe wird durch die Wellenlänge des Lichtes bestimmt. Tief eindringendes Licht (höhere Wellenlängen) ist somit einem größeren Streuungsfaktor ausgesetzt und legt aufgrund dessen einen längeren Weg durch das Gewebe zurück.

Die Schichtdicke d bestimmt die Länge des zurückzulegenden Weges (die Pfadlänge). Dies ist für unterschiedliche Gewebe und Wellenlängen verschieden, somit kann keine einheitliche Korrektur der Absorption durchgeführt werden.

Die Einführung eines wellenlängenabhängigen Korrekturfaktors, des so genannten Differential Pathlength Factor (DPF) [Kohl et al., 2000; Lindauer et al., 2001] kann den Einfluss des Streuverlustfehlers minimieren. Der DPF hängt von den optischen Eigenschaften des Gewebes und der Wellenlänge ab. Vernachlässigt man diese Wellenlängenabhängigkeit, so hat das den Effekt, als rechne man mit falschen Extinktionskoeffizienten. Die gemessene

Abschwächung wird mittels eines Algorithmus mit vorgegebenen Extinktionsspektren verglichen. Die lineare Anpassung, als „fit“ bezeichnet, soll die errechneten den gemessenen Spektren möglichst nahe bringen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zur Berechnung der für das Gewebe und die Wellenlänge des Lichtes spezifische Differential Pathlength Factor (DPF(λ)) verwendet wird. Das modifizierte Lambert-Beer Gesetz lautet folglich:

$$(2) \quad E = (\epsilon \cdot c \cdot d \cdot \text{DPF}(\lambda))$$

Da der DPF und die Streungsverluste nicht absolut quantifizierbar sind, ist es nicht möglich absolute Chromophorenkonzentrationen zu messen. Man kann jedoch Konzentrationsveränderungen messen. Dies ist möglich, da man davon ausgehen kann, dass sich die nicht messbaren Einflussgrößen wie z.B. der Streungsverlust, innerhalb der Messung nicht verändern. Man erhält die Differenz der Konzentrationänderungen des gemessenen Chromophors.

2.3.3 Messung und Berechnung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins

Die Messung der Hb-Sättigung wurde ebenfalls mit Hilfe der Spektroskopie durchgeführt. Für die Berechnung der Hb-Sättigung wurde der von Kohl-Bareis et. al [Kohl-Bareis et al., 2005] entwickelte Algorithmus verwendet.

$$A(\lambda) = \log_{10} (I_{\text{ref}}(\lambda) / I(\lambda))$$

A(λ) = Abschwächung des Lichtes

I(λ) = Mess-Spektrum

I_{ref}(λ) = Referenz-Spektrum

Die Schwierigkeit in der Berechnung der Sauerstoffsättigung des Hb mit Hilfe der Spektroskopie liegt in der Übersetzung von gewonnenen Gewebe-Absorptions-Spektren in Hb-Konzentrationen.

2.3.4 Aufbau und Konstruktion der Kombinations-Sonde

Für die Blutfluss- und Hb-Konzentrations-Messungen wurde die Microfiber-Spektroskopie in Kombination mit LDF verwendet.

Die Messsonde verfügt über zwei Haupt-Kanäle. Einen zur Messung des CBF durch LDF und einen anderen zur Messung der Hb-Konzentration und Hb-Oxygenierung mittels Reflexions-Spektroskopie. Die zwei Haupt-Kanäle unterteilt in vier optischen Kanäle (je ein Sender und ein Empfänger), sind in einer X-Form in der Sonde angeordnet. Alle vier Kanäle wurden in einen Metallmantel von 1,5mm Durchmesser gefasst. Sie untersuchen annähernd das gleiche Gewebevolumen, wenn man die unterschiedlichen Eindringtiefen außer Acht lässt.

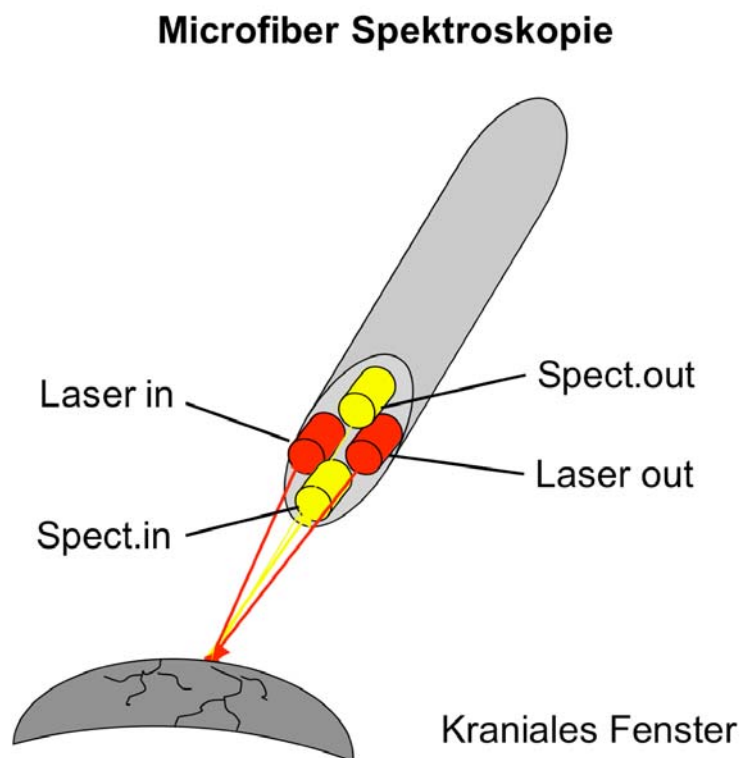


Abb. 8: Schematisch dargestellter Querschnitt durch die Microfiber-Spektroskopie/LDF-Sonde

Die Sender sowie Empfänger der jeweiligen Lichtquelle sind rautenförmig angeordnet. Diese Sonde ermöglicht, im Gewebe an ein und demselben Punkt simultan die Veränderungen des cerebralen Blutflusses mittels LDF und die Konzentrationsveränderungen von oxy- und deoxy-Hb mittels Spektroskopie zu messen

In der Spektroskopieeinheit der Messsonde erzeugt eine Weiss-Licht LED (LXHL-LW5C; Luxeon, USA) Licht im Wellenlängenbereich zwischen 450 und 750nm. Diese ist an eine einzelne optische Sonde mit einem Durchmesser von 200µm gekoppelt. Die Detektor-Sonde (200µm Durchmesser) befindet sich in einer Distanz von 120µm zur LED-Sonde. Daraus resultiert eine Mittelpunkt zu Mittelpunkt Distanz von 320 µm. Reflektiertes Licht wird über

ein an die Detektor-Sonde angeschlossenes USB-basiertes Spektrometer (USB2000, Ocean Optics, USA) mit 600 Gitterlinien/mm und einer Blazewellenlänge von 500nm aufgezeichnet. Ein Farbfilter (UG 40, Schott GmbH, Germany) unterdrückt das Signal des LDF-Kanals im Spektrometer. Der effektiv verwendete Wellenlängenbereich liegt zwischen 400 und 700nm. Ein Referenz-Spektrum wurde vor jedem Versuch mit einer Bariumsulfat ummantelten Sonde aufgezeichnet. Die im Folgenden aufgezeichneten Spektren wurden durch das Referenz-Spektrum geteilt, um die Wellenlängenabhängigkeiten der Lichtquelle, die Übertragungsunterschiede der Sonden und die Empfängersensitivität zu eliminieren.

In der LDF-Einheit der Kombinations-Sonde erzeugt, wie in der Single-LDF-Sonde, eine Laserdiode Licht mit einer Wellenlänge von 780nm, und einer Leistung von 3 mW. Das Licht wird über eine 50µm Sonde auf das Gewebe transportiert. Das reflektierte und gestreute Licht wurde von einer zweiten 50µm Sonde aufgefangen und an eine Photodiode (C5460-01; Hamamatsu Photonics, Japan) abgegeben. Das ausgeworfene Signal konnte mittels einer PCMCIA-Karte (PC-Card DAS 16/16; Measurement Computing Inc., USA) von einem analogen Signal in ein digitales Signal umgewandelt werden.

Die Daten-Sammlung sowie die Auswertung des Blutflusses, der Hb-Konzentrationen und der Sauerstoff-Sättigung wurden über ein mit Labview (Labview Version 6.1; National Instruments, USA) programmiertes System durchgeführt. Die gesamte Datenanalyse (Rohdaten sowie analysierte Daten) wurde für detaillierte offline Analysen gespeichert.

2.4 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

2.4.1 Liste der verwendeten Materialien :

1. Versuchstiere: männliche Wistar-Ratten (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland), 285-360g Körpergewicht. Experimente wurden entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchführt (mit der Genehmigung G 0133/02 bei LAGeSo Berlin).
2. Material für Präparation, Narkose, Physiologie und Messungen:
 - Respirator: Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland
 - Atemgasmonitor: CO₂-Monitor EGMI, Carl Heyer GmbH, Bad Ems, Deutschland, (endexpiratorische Messung von CO₂ und N₂O sowie Atemfrequenz)
 - Blutgasanalyse: AVL Compact 2 Blood Gas Analyzer, Bad Homburg, Deutschland, (Analyse von Blut aus der A. femoralis. Gemessen wurden pO₂, pCO₂, pH)

- Narkose: Isofluran (Vapor 19.3, Drägerwerk, Deutschland), N₂O, α -Chloralose und Urethan über Perfusorsystem
- Heizplatte: Eigenbau, Labor für experimentelle Neurologie der Charite, Berlin, Deutschland
- RFT Biomonitor, Zwönitz, Deutschland
- Blutdruckmessung, arteriell: Transducer and Transbridge Amplifier, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
- Elektrische Stimulation der Vorderpfote : Neuropack 2, Nihon Kohden, Tokyo, Japan

3. Messinstrumente:

- Laser-Doppler-Flowmetry (LDF): Blood Perfusion Monitor BPM, Vasamedics, St. Paul, MN, USA
- Aufzeichnung der somatosensory evoked potentials (SEP): Neuropack 2, Nihon Kohden, Tokyo, Japan
- LDF/Spektroskopie-Sonde, M. Kohl-Bareis, RheinAhrCampus, Koblenz, Deutschland

4. Datenanalyse:

- MatLab, MathWorks, Natick, MA, USA
- Labview, Labview Version 6.1; National Instruments, USA
- SPSS 11.0

2.4.2 Präparation

Die männlichen, zwischen 285-360g schweren Wistar-Ratten wurden über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran betäubt. Die Körpertemperatur wurde über eine rektal eingeführte Sonde kontinuierlich ermittelt.

Die Narkoseeinleitung lief per Maskenbeatmung bis auf eine Tracheotomieintubation übergegangen wurde. Die Tracheotomie wurde über einen ca. 2cm langen Hautschnitt zwischen dem dritten und vierten Ringknorpel der Trachea durchgeführt. In den Trachealschnitt wurde ein Plastikschauch (1,67mm ID, 2,42mm OD) eingeführt. Dieser wurde an der Trachea fixiert und mit dem Kleintierrespirator verbunden. Der Hautschnitt wurde mit einer Hautnaht verschlossen. Das Beatmungsvolumen betrug ca. 4ml. Das Tier wurde mit 0,8-1,5% Isofluran in 70% N₂O und 30% Sauerstoff und einer Frequenz zwischen 50-60/min beatmet.

Die Beatmungsparameter, endexpiratorischer CO₂ und N₂O sowie Frequenz, wurden kontinuierlich beobachtet und wurden im physiologischen Rahmen gehalten.

Zur arteriellen Blutdruckmessung und für einen intravenösen Zugang wurden die A.femoralis und V. femoralis freipräpariert und jeweils mit einem Plastikschauch (0,58mm ID, 0,96mm OD) kanüliert. Zusätzlich zur kontinuierlichen Blutdruckmessung wurde regelmäßig eine arterielle Blutgasbestimmung (BGA) durchgeführt. Die V. femoralis wurde nach ihrer Kanülierung bis zur Umstellung auf die i.v.-Narkose mit α -Chloralose und Urethan, mit Kochsalzlösung perfundiert.

Zur Fixierung des Schädelknochens wurde der Kopf der Ratte durch in die äußeren Gehörgänge eingeführte Metallstifte in einem stereotaktischen Rahmen eingespannt. Um den Schädelknochen freizulegen, wurde die Haut mit Lidocain unterspritzt und der M. temporalis abpräpariert. Über dem Vorderpfoten-Areal wurde der Knochen mittels Bohrung unter ständiger Kühlung mit NaCl-Lösung ausgedünnt. Der Knochen musste bis auf eine hauchdünne Restschicht entfernt werden, ohne dabei das darunter liegende Gehirn zu verletzen, somit konnten die Messungen mittels LDF und Microfiber Spektroskopie durch die ausgedünnte Schädeldecke hindurch, ohne zu großen Signalverlust durchgeführt werden. Zur Herstellung eines einwandfreien Kontaktes der Messsonden mit der Schädeloberfläche musste ein kontinuierlicher Flüssigkeitsfilm zwischen Sonde und Knochen bestehen. Dies gewährleistete ein um das ausgedünnte Areal befestigter Wachswall, der die Wand für eine mit NaCl aufgefüllte Kammer bildete.

Nach vollendeter Präparation wurde die Narkose auf ein intravenöses Anästhetikum umgestellt (40mg/kg Körpergewicht (KG) α -Chloralose mit 400mg/kg KG Urethane als i.v. Bolusinjektion, gefolgt von einer kontinuierlichen i.v. Infusion von bis zu 1ml/h in identischer Dosierung).

Als Anästhetikum für die Präparation verwendet man Isofluran, da es über eine starke analgetische Wirkung verfügt. Es ist jedoch aufgrund des deutlichen vasodilatatorischen Einflusses und der Induktion ausgeprägter Schwankungen des Ruheblutflusses für den Zeitraum der Blutflussmessungen nicht geeignet.

Für die Messungen entschieden wir uns daher für eine α -Chloralose- und Urethan-Narkose, da trotz einer Verringerung der Ruheaktivität unter dieser Form der Anästhesie somatosensorisch evozierte Potentiale (SEP) erzeugt werden können und Blutflussantworten entstehen [Lindauer et al., 1993].

Die Silberball-Elektroden zur Ableitung der neuronalen Aktivität wurden durch Erhitzen eines 0,25mm dicken Silber-Drahtes erzeugt. Eine der Elektroden wurde auf der ausgedünnten Schädeldecke und die Referenz-Elektrode auf der Nackenmuskulatur der Ratte platziert.

2.5 Ziel der Versuche

Das Ziel der Versuche war die Messung der cerebralen Blutflussantworten auf elektrische Vorderpfoten-Stimulation unter hyperbarer Hyperoxygenierung (100% O₂ + 3ATA). Unter diesen Bedingungen wird der Sauerstoffbedarf gänzlich über physikalisch gelösten Sauerstoff abgedeckt und es dürfte keine Hämoglobin Deoxygenierung auftreten.

Dieser einfache und stringente Versuchsaufbau bietet die Möglichkeit, die von Stamler et al. aufgeworfene Hypothese zur neurovaskulären Kopplung unter in vivo Bedingungen zu überprüfen.

2.6 Versuchsaufbau

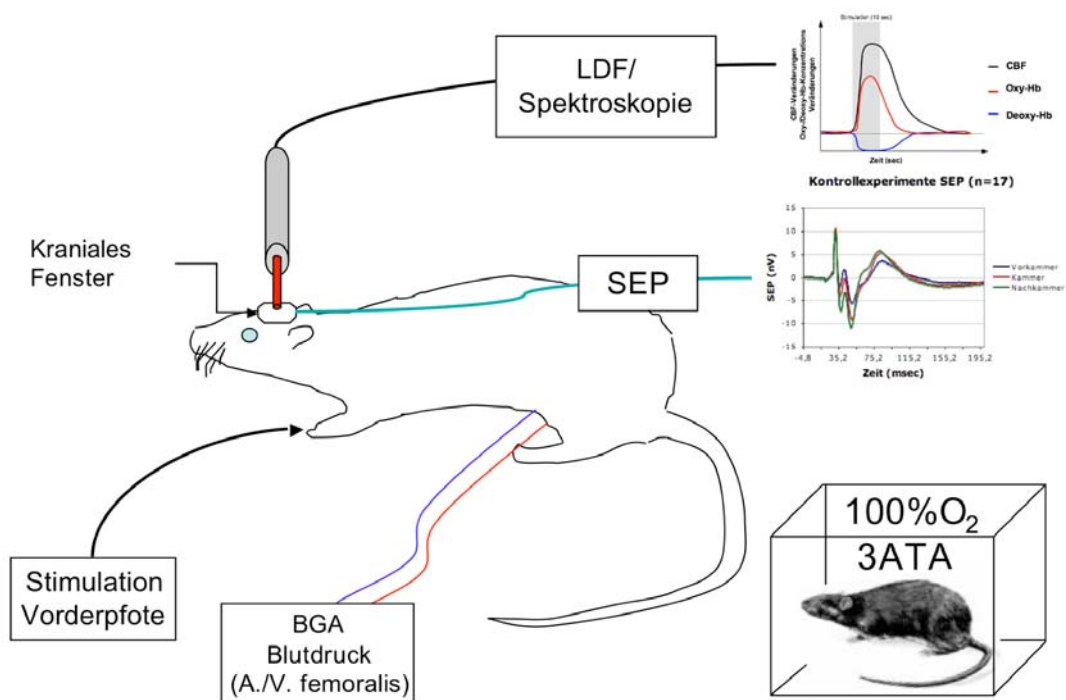


Abb. 9: Versuchsaufbau

Die Abbildung zeigt den Aufbau der Versuche zur Messung des cerebralen Blutflusses (LDF) sowie der Konzentrationsveränderungen von oxy- und deoxy-Hämoglobin (Spektroskopie). Die Messsonde wird über dem Vorderpfoten-Areal angebracht. Die Stimulationsnadeln wurden in der Vorderpfote platziert. Die neuronale Aktivität (SEP) wird über Silberball-Elektroden, welche auf dem Schädelknochen fixiert waren, abgeleitet. Die hyperbare Hyperoxygenierung (100% O₂/3ATA) wird innerhalb der Druckkammer (rechts unten dargestellt) erzeugt.

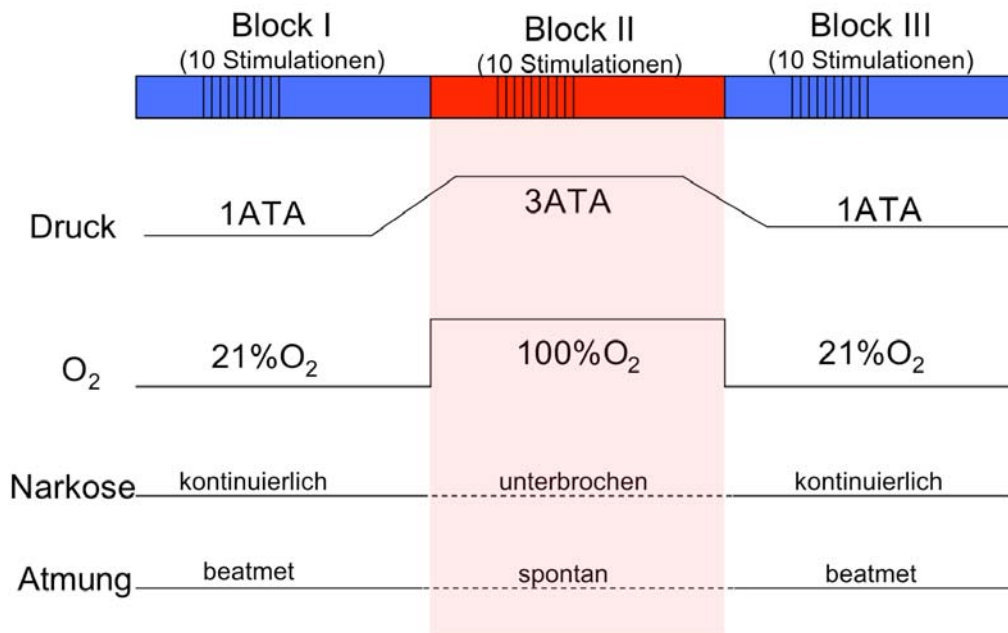
2.7 Versuchsdurchführung

Nach vollendeter Operation und Narkoseumstellung der Versuchstiere wurden die Stimulationsnadel im Zwischenzehenraum der Vorderpfote, die SEP-Elektrode und die Messsonde platziert. Die Messsonde wurde mittels eines Mikromanipulators justiert. Die exakte Lage des Vorderpfoten-Areals wurde durch Testung der Blutflussantwort auf die elektrische Stimulation ermittelt. Nach Fixierung der Messsonde oberhalb des ausgedünnten Schädelknochens wurde mit der Messung begonnen. Vor und nach jedem Mess-Block wurden die Blutgase kontrolliert. Die Physiologie-Parameter Temperatur und Blutdruck wurden kontinuierlich gemessen. Die Grundvoraussetzung für den Start eines Versuchs war die Einstellung der physiologischen Parameter (BGA, RR, Temp.) im Normbereich und ein konstanter cerebraler Ruheblutfluss.

Die Messungen begannen mit einem Stimulationsblock unter normobaren Bedingungen (21% O₂/1ATA), um eine für jedes Tier neu ermittelte „Baseline“, einen Ausgangswert, zu erhalten. Im Anschluss daran wurde der zweite Stimulationsblock unter hyperbarer Hyperoxygenierung (100%O₂/3ATA) absolviert. Zum Abschluss einer Versuchsreihe wurde erneut ein Stimulationsblock unter normobaren Bedingungen durchgeführt. Zwischen den Stimulationsblöcken lagen jeweils 20 min.

Es wurden 10 elektrische Stimulationen über 10sec mit einer Intensität von 1-1,4 mA, einer Frequenz von 3Hz und einer Dauer des Einzelstimulus von 0,3ms in jedem Block durchgeführt. Das Interstimulations-Intervall betrug 60s. Exakt dieser Stimulationsablauf wurde unter hyperbarer Hyperoxygenierung und unter normobaren Bedingungen ausgeführt.

HBO-Versuche

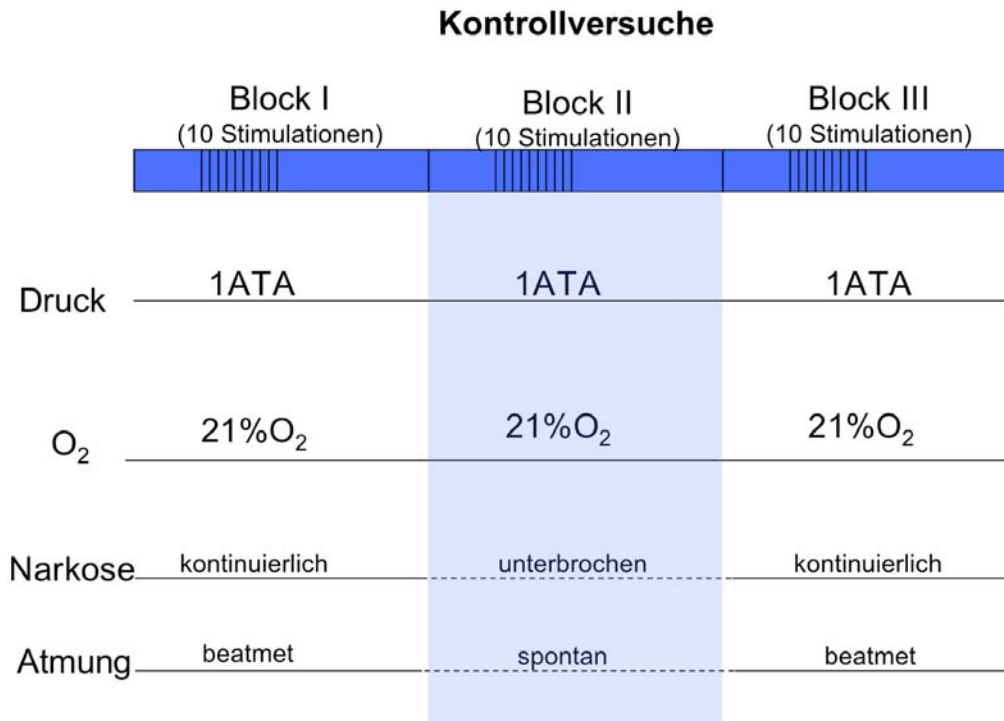


- 10 Stimulationen mit 10s Stimulationsdauer, 3Hz Frequenz, 1-1,4mA Intensität, 0,3ms/Stimulation, Interstimulation-Intervall 60s, pro Block
- hyperbarer Hyperoxygenierung (3 ATA+100% O₂)
- Beatmet und an i.v. Narkose angeschlossen außerhalb der Kammer und dekonnektiert innerhalb der Kammer

Unter HBO konnte, aufgrund des Drucks innerhalb der Kammer, welcher keine intravenöse Injektion zuließ, keine kontinuierliche Narkose durchgeführt werden. Die Versuchstiere mussten sich spontan atmend in der Druckkammer aufhalten. Die gewählte i.v. Narkose verfügt über eine lange Halbwertszeit und so konnte eine stabile Narkosetiefe für den gesamten Zeitraum der HBO gewährleistet werden. Die unbeatmeten Tiere zeigten unter HBO einen direkten Übergang zur spontan Atmung, so dass sie während des Aufenthalts in der Druckkammer keine Beatmung benötigten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die eventuellen Einflüsse der Narkose- sowie der unterbrochenen Beatmung auf die Messergebnisse überprüft. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Messergebnisse aufgrund der 3 aufeinander folgenden Stimulations-Blöcke verändern. Die Kontrollversuche und HBO-Versuche liefen unter den identischen Bedingungen ab. Es wurden ebenfalls drei Stimulationsblöcke durchgeführt. Block II wurde

unter normobaren Bedingungen, jedoch unter Spontanatmung, sowie ohne kontinuierliche Narkose durchgeführt.



- 10 Stimulationen mit 10s Stimulationsdauer, 3Hz Frequenz, 1-1,4mA Intensität, 0,3ms/Stimulation, Interstimulation-Interval 60s, pro Block
- normobare Normoxygenierung (1 ATA+21%O₂)
- Beatmet und an i.v. Narkose angeschlossen außerhalb der Kammer und dekonnektiert innerhalb der Kammer

Es wurden 17 Kontrollversuche mit LDF, 10 HBO-Versuche mit LDF, 5 Kontrollversuche mit der Kombination LDF/Spektroskopie, sowie 6 HBO-Versuche LDF/Spektroskopie durchgeführt und ausgewertet.

2.8 Somatosensorisch evozierte Potentiale (SEP)

Zur Darstellung der neuronalen Aktivität wurden die somatosensorisch evozierten Potentiale herangezogen.

Die erzeugten Potentiale wurden über die auf der ausgedünnten Schädeldecke platzierte Silberelektrode und die auf der Nackenmuskulatur befestigte Referenzelektrode abgeleitet.

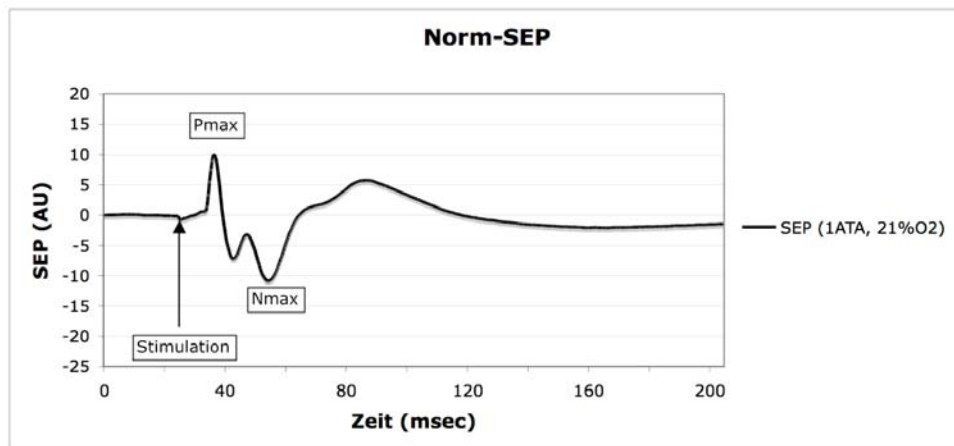


Abb. 10: Norm-SEP

Die Abbildung zeigt ein beispielhaftes SEP des Vorderpfoten-Areals der Ratte mit Markierung des stärksten positiven (Pmax) und des größten negativen Ausschlages (Nmax).

2.9 Datenanalyse

2.9.1 Statistische Auswertung

Hier sollte die Frage untersucht werden, ob sich die Ausprägung der Blutflussantworten unter HBO von der unter normobaren Bedingungen signifikant unterscheidet.

Der Vergleich der Flächen unterhalb der Blutflusskurven (Area under the curve), der Zeit bis zum Erreichen des CBF-Maximums (Time to peak), der Zeit bis zum Erreichen des CBF-Ausgangsniveaus (Time to zero) und CBF-Maximum (CBF-Peak) innerhalb der Untersuchungsgruppen (Kontrollen und HBO) wurde mit Hilfe eines gepaarten t-Tests durchgeführt. Gruppenübergreifende Vergleiche (Kontrollgruppen mit HBO-Gruppen) wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests analysiert. Dem Test liegt die Annahme zugrunde, dass die Messwerte einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen.

Eine Trennschärfe (Power) des Tests von 0.7 und ein p-Wert von 0.05 wurden zum Verwerfen der Nullhypothese vorausgesetzt. Zur Fehlerkorrektur bei multipler Testung wurde die Korrektur nach Bonferroni angewendet. Für die statistische Auswertung wurde SPSS 11.0 verwendet.

2.9.2 Analyse der Spektroskopie-Daten

Die Daten der Spektroskopie wurden online mit dem beschriebenen „fit“ sowie dem DPF bearbeitet und ausgewertet [Kohl et al., 2000]. Die LDF-Daten-Auswertung wurde anschließend offline durchgeführt (siehe 2.3).

2.9.3 Analyse der LDF-Daten

Für die Analyse der LDF-Daten wurde der Ruheblutfluss über 10sec gemittelt und mit 100% als Ausgangswert in die Berechnung der Blutflussantwort einbezogen. Die CBF-Antwort stellte sich somit als $100\%+X$ dar.

2.9.4 Berechnung der Area under the curve (AUC)

Zur Berechnung der Fläche unterhalb der Blutflusskurven (Area under the curve) wurde die in der Mathematik als numerische Quadratur bzw. numerische Integration bezeichnete Analysemethode herangezogen. Die numerische Quadratur bietet die Möglichkeit ein Integral ohne eine Stammfunktion zu berechnen. In diesem Verfahren wird die Fläche unterhalb der Kurve in einfache geometrische Formen z.B. Rechtecke unterteilt. Über die Berechnung der Summe aller Flächen wird eine Annäherung an das zu berechnende Integral erreicht.

2.9.5 Berechnung der SEP-Amplituden

Zur Berechnung der SEP-Amplituden wurde der Spitzenwert des ersten negativen Ausschlages (n) mit dem Spitzenwert des ersten positiven Ausschlages (p) verglichen. Die Differenz dieser beiden Werte gibt Auskunft über den Verlauf und die Ausprägung des SEP und ermöglicht so eine relative Vergleichbarkeit nach Normierung auf die Ausgangsantwort. Eine Vergleichbarkeit der Absolutwerte ist aufgrund der nicht 100% identischen Applikation der SEP-Elektroden nicht gewährleistet.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die physiologischen Parameter der Versuchstiere dargelegt, um auf dieser Grundlage die angewandten Methoden darzustellen und anschließend die Ergebnisse der hyperbaren Hyperoxygenierung darzulegen.

3.1 Physiologie der Versuchstiere

Während der Versuche wurden kontinuierlich über einen Monitor mit Alarmfunktion der Blutdruck, die Temperatur und der endexpiratorische pCO₂ gemessen. Periodisch wurde aus dem arteriellen Zugang (A. femoralis) Blut entnommen und der arterielle pH, pCO₂ und pO₂ ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden mit den Normwerten der Ratte (HF: 250-450 /min; art. pO₂: 93 mmHg (70-100); art. pCO₂: 39,9 mmHg (36-44); pH: 7.35 (7.26-7.44); Temp. 37,5- 39,9 C; RR art. 88-184 mmHg, entnommen aus: The laboratory rat; P.E. Sharp, M.C. LaRegina), verglichen.

3.1.1 Werte aus den Versuchstieren

LDF	Block	Temp. (°C)	Exp. CO ₂ (mmHg)	Blutdruck (mmHg)	pH	art. PCO ₂ (mmHg)	art. PO ₂ (mmHg)
Kontrollen (n=17)	Vorkammer	37,4 ± 0,6	38 ± 3	118 ± 17	7,44 ± 0,07	36 ± 4	119 ± 32
	Kammer	37,5 ± 0,3	n/a	118 ± 19	7,38 ± 0,04	42 ± 7	100 ± 22
	Nachkammer	37,8 ± 0,4	39 ± 3	119 ± 18	7,41 ± 0,05	35 ± 4	128 ± 22
HBO (n=10)	Vorkammer	37,9 ± 0,3	38	127 ± 15	7,45 ± 0,04	39 ± 3	109 ± 3
	Kammer	n/a	n/a	n/a	7,37 ± 0,03	44 ± 4	> 742
	Nachkammer	36,4 ± 0,4	38 ± 4	142 ± 11	7,46 ± 0,04	33 ± 8	142 ± 11

Tab. 1: Physiologie der Versuchstiere

Die Tabelle beinhaltet die Mittelwerte der Physiologie-Daten mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus den Laser-Doppler-Flussmessungen (LDF)

LDF/Spekt.		Temp. (°C)	Exp. CO ₂ (mmHg)	Blutdruck (mmHg)	pH	art. PCO ₂ (mmHg)	art. PO ₂ (mmHg)
Kontrollen (n=5)	Vorkammer	37,5 ± 0,1	42 ± 2	147 ± 20	7,41 ± 0,04	37 ± 3	107 ± 20
	Kammer	37,6 ± 0,3	n/a	133 ± 26	7,41 ± 0,03	39 ± 6	97 ± 18
	Nachkammer	37,7 ± 0,3	42 ± 0	144 ± 17	7,43 ± 0,03	40 ± 4	119 ± 30
HBO (n=6)	Vorkammer	37,7 ± 0,6	42 ± 2	128 ± 10	7,42 ± 0,03	40 ± 3	117 ± 15
	Kammer	n/a	n/a	n/a	7,34 ± 0,04	52 ± 4	> 742
	Nachkammer	37,3 ± 0,2	45 ± 6	130 ± 21	7,39 ± 0,02	44 ± 5	119 ± 17

Tab. 2: Physiologie der Versuchstiere

Die Tabelle beinhaltet die Mittelwerte der Physiologie-Daten mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus den Messungen mit LDF und Spektroskopie (Spekt.).

Die physiologischen Parameter der Versuchstiere lagen alle in den Normwertbereichen. Der endexpiratorische CO₂, der Blutdruck sowie die Temperatur konnten während des Aufenthaltes in der Druckkammer nicht gemessen werden. Auffällig war ein im Vergleich zu den Stimulationsblöcken vor dem Aufenthalt in der Kammer stets leicht erhöhter pCO₂ während der hyperbaren Hyperoxygenierung.

Das verwendete Blutgasmessgerät kann nur pO₂-Werte bis 742mmHg analysieren. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen pO₂-Werte unter HBO können wir jedoch davon ausgehen, dass der pO₂ 2400mmHg erreicht. Unter HBO wurde kein Anhalt für einen Tremor und keine Erhöhung der Krampfneigung beobachtet.

3.2 Kontrollversuche LDF

Die Kontrollversuche wurden aus zwei verschiedenen Gründen durchgeführt. Zum einen, um einen eventuellen Effekt der unter HBO unterbrochenen Narkose auf die cerebralen Blutflussantworten zu überprüfen, zum anderen, um die Veränderungen des CBF durch die Spontanatmung zu kontrollieren.

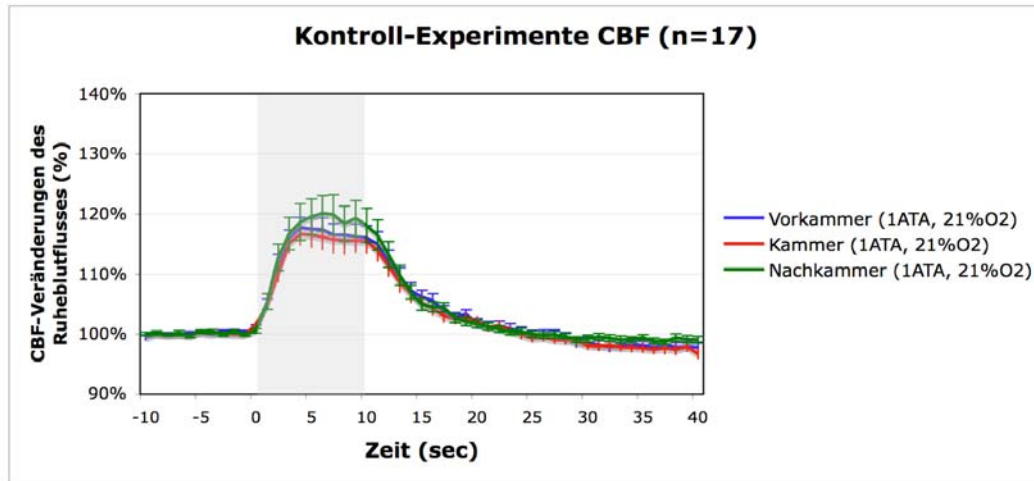


Abb. 11: Kontrollversuche cerebraler Blutfluß

Messung des cerebralen Blutflusses mittels Laser-Doppler-Flussmessung unter normobarer Normoxie. Die Abbildung zeigt den nach Stimulation ansteigenden Blutfluss im Vorderpfoten-Areal der Ratte. Die graue Schattierung markiert den Zeitraum der elektrischen Stimulation. Die Narkose und die Beatmungsmaschine sind während des Versuchs wie unter hyperbarer Hyperoxygenierung dekonnektiert.

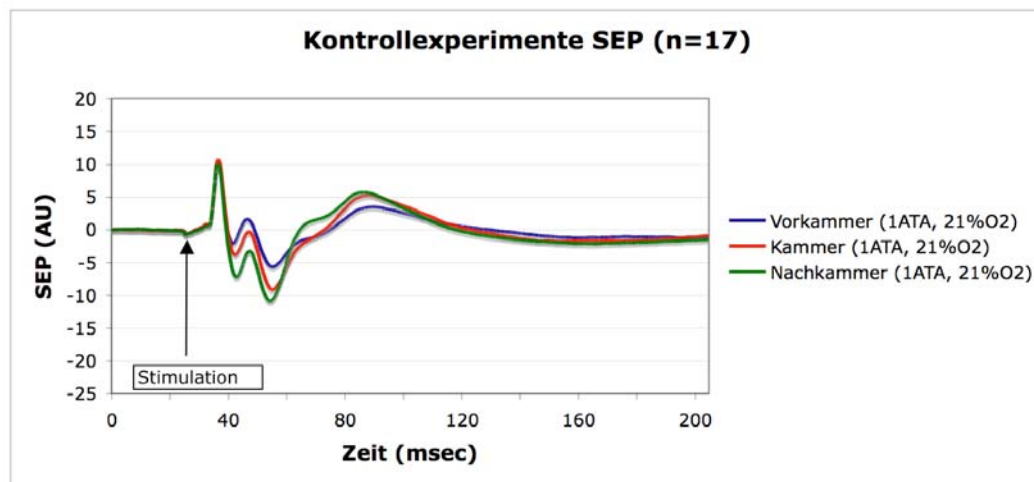


Abb. 12: Kontroll-Versuche SEP

Die Abbildung zeigt die somatosensorisch evozierten Potentiale unter Kontrollbedingungen, ausgelöst durch die elektrische Stimulation der Vorderpfote mit 1-1,4 mA. Zur Kontrolle der elektrischen Aktivität wurden die somatosensorisch evozierten Potentiale (SEP) gemessen. Die Registrierung der SEP während der Kontrollversuche sollte ebenfalls Veränderungen der neuronalen Aktivität durch das Versuchsmodell ausschließen.

Die Kontrollen (n=17) zeigen einen einheitlichen Anstieg des cerebralen Blutflusses ca. 1-2 sec. nach Beginn der Stimulation. Die Ableitungen der SEP deuten auf eine intakte neuronale Aktivität hin. Die Intensität der Blutflussantworten entsprach den beschriebenen und erwarteten cerebralen Blutflussantworten auf funktionelle Stimulation (Blutflussanstieg um ca. 15-20%). Die cerebrale Blutflussantwort des Kontrollblocks innerhalb der Kammer unterschied sich nicht signifikant von der aus den Stimulationsblöcken vor und nach dem Aufenthalt in der Kammer. Daraus kann eine Beeinflussung der cerebralen Blutflussantworten durch die Unterbrechung der Narkose sowie die versuchsbedingte Dekonnektierung der Beatmung ausgeschlossen werden. Der Ruheblutfluss veränderte sich über den gesamten Versuchsverlauf nicht.

3.3 Ergebnisse der hyperbaren Hyperoxygenierung LDF

Die folgenden Messungen des CBF unter HBO dienten der Überprüfung des von Stamler et al. postulierten Modells der neurovaskulären Kopplung.

Unter hyperbarer Hyperoxygenierung würde die Sauerstoffversorgung von Hämoglobin abgekoppelt und nur über physikalisch gelösten Sauerstoff gewährleistet. Aufgrund dessen stellt die HBO eine geeignete Methode dar, die von der Deoxygenierung des Hämoglobins abhängigen Modelle zu überprüfen. Es dürfte unter HBO keine Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation nachzuweisen sein, wenn diese von der Deoxygenierung des Hb abhängig ist. Die Versuche zeigten die folgenden Ergebnisse:

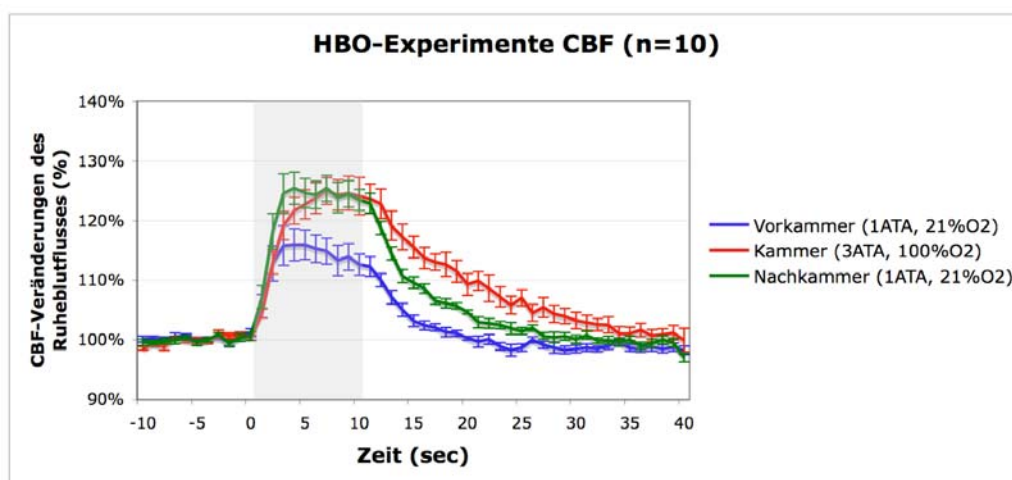


Abb. 13: HBO Experimente CBF

Messung des cerebralen Blutflusses über dem Vorderpfoten-Areal, mittels Laser-Doppler-Flussmessung

Die Abbildung zeigt einen ausgeprägten Blutflussanstieg unter hyperbarer Hyperoxygenierung mittels 100%O₂ und 3 ATA (rote Kurve).

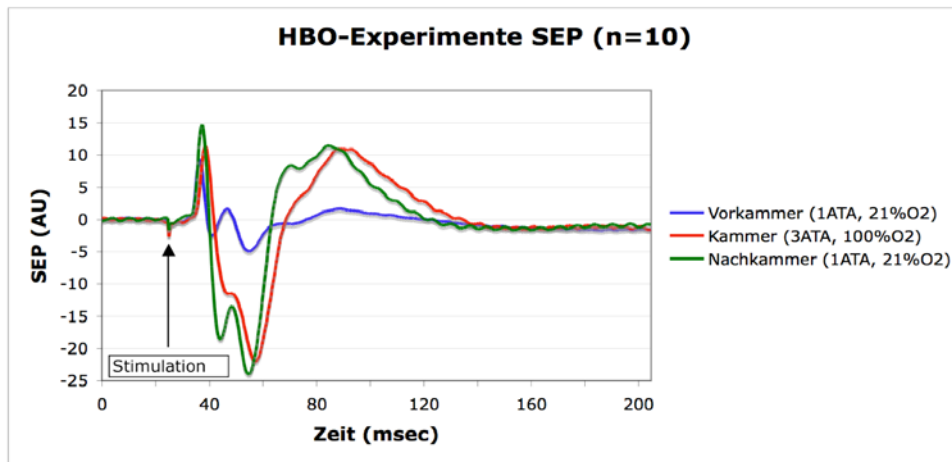


Abb. 14: HBO-Experimente SEP

Diese Abbildung zeigt die somatosensorisch evozierten Potentiale unter hyperbarer Hyperoxygenierung, ausgelöst durch die elektrische Stimulation mit 1-1,4 mA.

Entgegen der formulierten Hypothese wurde keine Abnahme der cerebralen Blutflussantworten unter HBO, sondern eine Zunahme gemessen. Die Versuchstiere (n=10) zeigten in den Messungen unter HBO eine konstante Vergrößerung der CBF-Antworten um ca. 20-25% im Vergleich zu den Messungen unter normobaren Bedingungen bei gleichartiger deutlicher Erhöhung der SEP-Amplitude. Der Ruheblutfluss blieb unter HBO unverändert.

3.3.1 Area under the curve (AUC)

Zum Vergleich der Blutflusskurven wurde die Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve, von Stimulationsbeginn bis zum ersten Absinken der Kurve auf ein Niveau unterhalb des Ruheblutflusses, herangezogen. Diese Analyse lässt eine spezifischere Deutung der Blutflusskurven zu und kann statistisch überprüft werden.

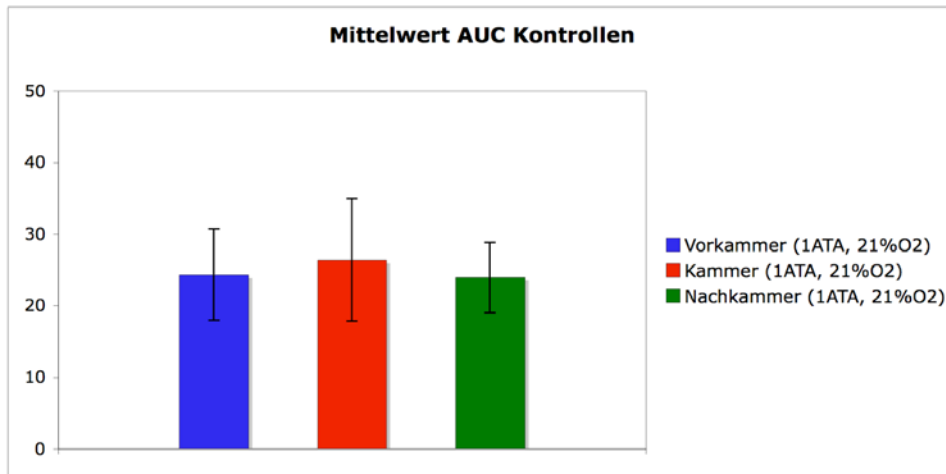


Abb. 15: Mittelwerte der AUC unter Kontrollbedingungen

Die Graphik zeigt die Mittelwerte der AUC Kontrollen aus 16 Versuchstieren. Der Mittelwertzuwachs während des Kammerblocks im Vergleich zum Stimulationsblock vor dem Kammerblock ist mit einem p von 0,4103 nicht signifikant (Vergleich Vorkammer zu Nachkammer p= 0,8129).

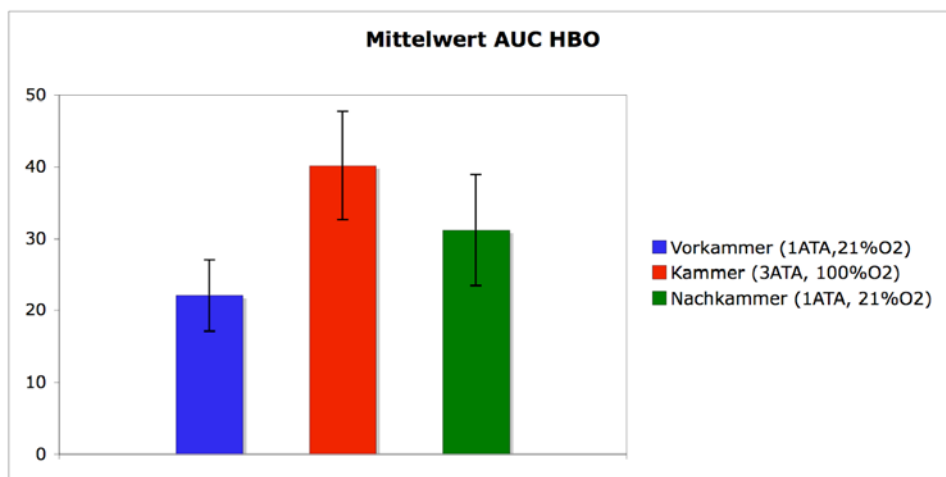


Abb. 16: Mittelwerte der AUC unter hyperbarer Hyperoxygenierung

Die Darstellung der Mittelwerte der AUC bietet die Möglichkeit verschiedene Blutflusskurven untereinander zu vergleichen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte der AUC unter HBO aus 9 Versuchstieren. Der Vergleich des Mittelwertzuwachses unter HBO mit dem Stimulationsblock vor der HBO zeigt einen signifikanten Unterschied (p= 0,0006). Der Mittelwert der AUC des Stimulationsblocks im Anschluss an die HBO ist ebenfalls erhöht (Vergleich Vorkammer mit Nachkammer p= 0,0006).

Die Berechnung der AUC zeigt einen signifikanten Zuwachs der cerebralen Blutflussantwort unter HBO im Vergleich zum Stimulationsblock vor der HBO, aber auch zum Kammerblock der Kontrollversuche. Die AUC im Nachkammerblock hat im Vergleich zum Vorkammerblock deutlich zugenommen. Diese deutet daraufhin, dass der Auslöser der Blutflussantwortvergrößerung teilweise erhalten bleiben könnte oder zumindest noch Einfluss auf den Blutfluss nimmt.

3.3.2 Blutflusshöhepunkt (Peak)

Die Betrachtung der über die Versuche gemittelten Blutfluss-Höhepunkte (sog. peak) wurde herangezogen, um den Verlauf der Kurven deutlicher darzustellen und die Unterschiede herauszuarbeiten.

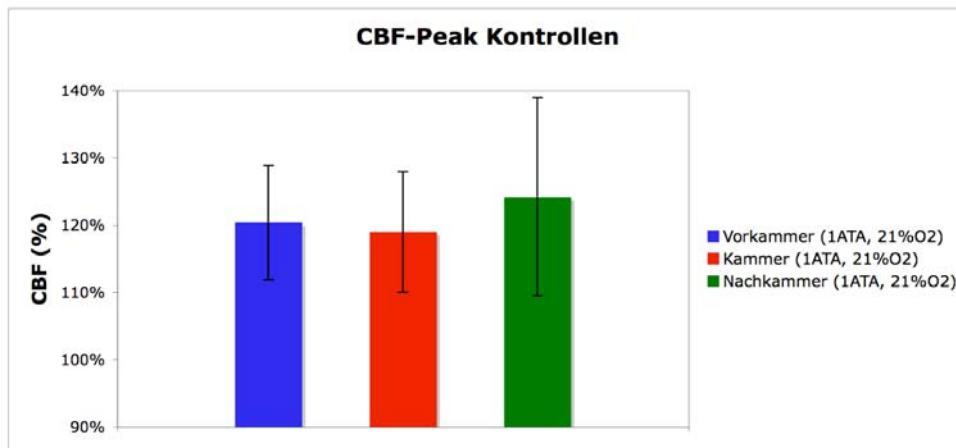


Abb. 17: Mittelwerte der Blutflusshöhepunkte (peak) unter Kontrollbedingungen

Die Graphik zeigt die Mittelwerte der Blutflusshöhepunkte aus 16 Versuchstieren unter Kontrollbedingungen. Der Mittelwertzuwachs während des Kammerblocks im Vergleich zum Stimulationsblock vor dem Kammerblock ist mit einem p von 0,4526 nicht signifikant (Vergleich Vorkammer zu Nachkammer p= 0,1788).

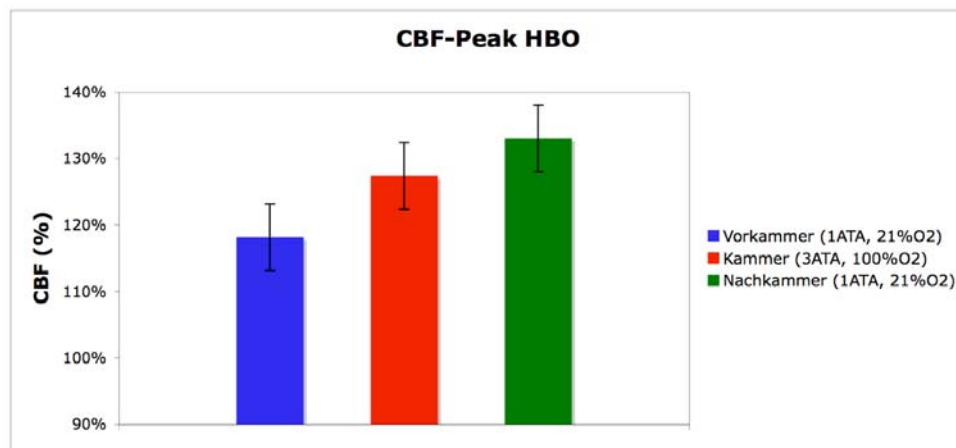


Abb. 18: Mittelwerte der Blutflusshöhepunkte (peak) unter HBO

Die Graphik zeigt die Mittelwerte der Blutflusshöhepunkte aus 9 HBO-Versuchen. Der Mittelwertzuwachs während der HBO im Vergleich zum Stimulationsblock vor dem Kammerblock ist mit einem p von 0,0593 nicht signifikant (Vergleich Vorkammer zu Nachkammer p= 0,0329).

Die Betrachtung der Mittelwerte der Blutflusshöhepunkte zeigt, dass nicht nur die Größe der AUC unter HBO deutlich zunimmt, sondern auch die Blutflussmaxima im Vergleich zum Stimulationsblock direkt vor der HBO zunehmen. Die Blutflussmaxima im an die HBO anschließenden Stimulationsblock sind ebenfalls vergrößert.

3.3.3 Zeit bis zur maximalen Blutflussantwort (Time to peak)

Um die Verläufe der Blutflusskurven in ihrer Ganzheit zu beschreiben ist die zeitliche Komponente von großer Wichtigkeit. Aufgrund dessen wurden die Blutflusskurven nach der benötigten Zeit von Stimulationsbeginn bis zum Erreichen ihres Maximalwertes (peak) und bis zum erneuten Absinken unterhalb des Ruheniveaus analysiert.

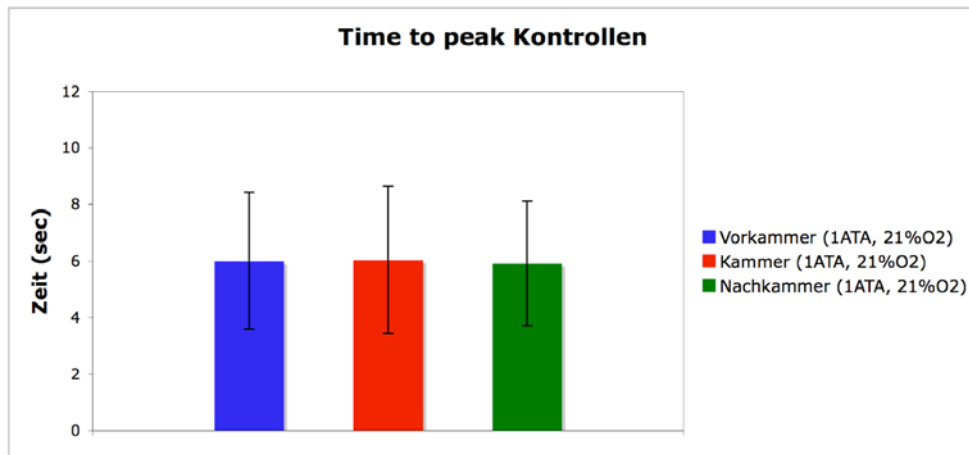


Abb. 19: Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen des Blutflusshöhepunktes nach Stimulationsbeginn unter Kontrollbedingungen

Die Graphik zeigt die Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen des peaks aus 16 Kontrollversuchen. Die Vergleiche der Mittelwerte ergibt keine signifikante Verzögerung ($p=0,9611$).

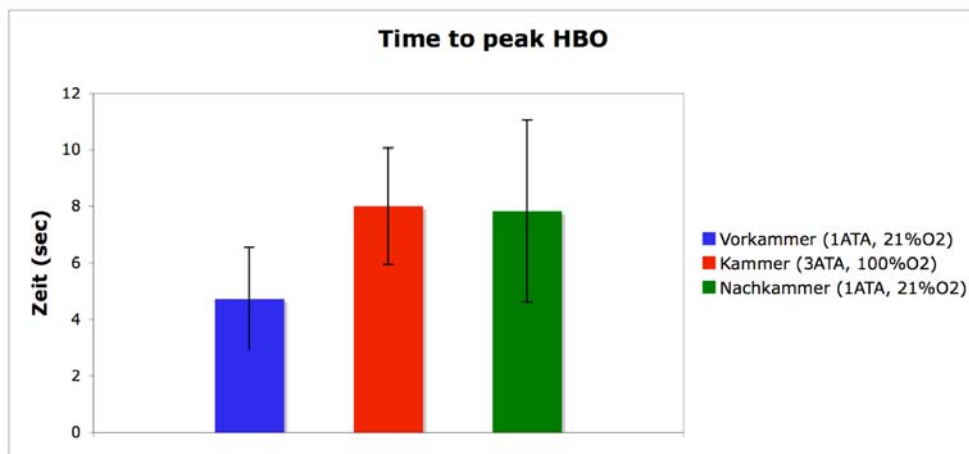


Abb. 20: Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen des Blutflusshöhepunktes nach Stimulationsbeginn unter HBO

Die Graphik zeigt die Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen des peaks aus 9 Versuchstieren unter HBO. Die Verzögerung des Erreichens des peaks unter HBO im Vergleich zum Stimulationsblock vor der HBO ist mit einem p von 0,0111 signifikant (Vergleich Vorkammer zu Nachkammer $p=0,0021$).

3.3.4 Zeit bis zum Absinken auf Ausgangsniveau (Time to zero)

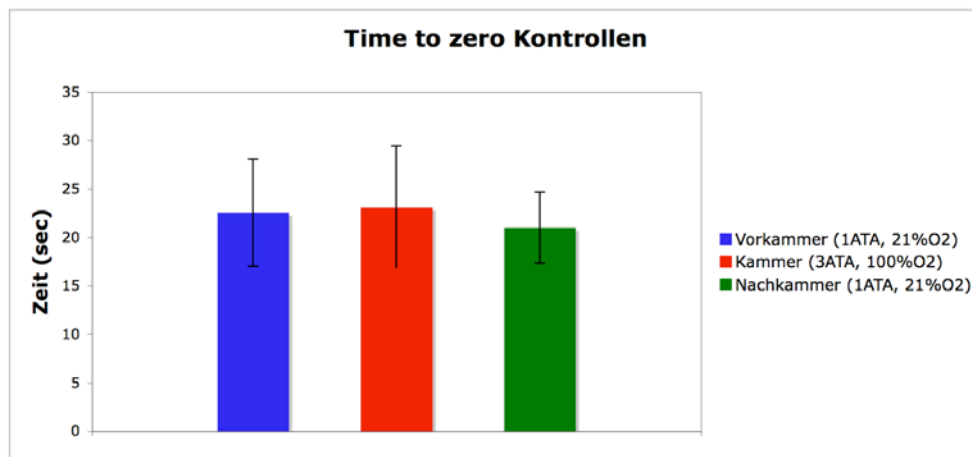


Abb. 21: Mittelwerte der Zeit bis zum Absinken des Blutflusses auf ein Niveau unterhalb des Ruheblutflusses

Die Graphik zeigt keinen signifikanten Unterschied im Abfall der Blutflusskurven.

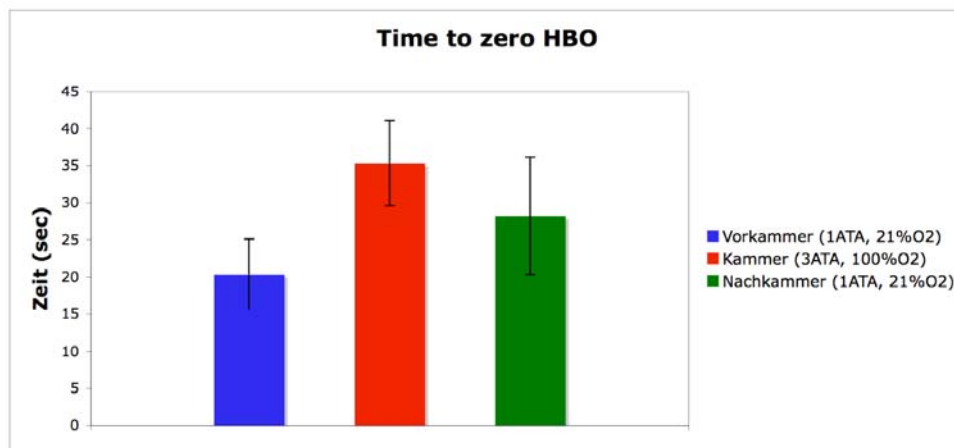


Abb. 22: Mittelwerte der Zeit bis zum Absinken des Blutflusses auf ein Niveau unterhalb des Ruheblutflusses

Die Graphik zeigt eine deutliche Verzögerung im Abfall der Blutflusskurven nach der HBO ($p=0,0005$) und im abschließenden Stimulationsblock. Die HBO Daten würden eventuell noch deutlicher ausfallen, da in 4 der 10 Versuchstiere der Blutfluss bei Beendigung der Aufzeichnung (nach 40 sec) noch nicht das Ruhenniveau unterschritten hatte, kann der Zeitraum für diese Tiere und somit für die gesamte Gruppe nicht exakt berechnet werden (Vergleich Vorkammer zu Nachkammer $p= 0,0054$).

Die Betrachtung der zeitlichen Verläufe der Blutflusskurven zeigt einen deutlich verzögerten Anstieg der Blutflusskurven unter HBO und im anschließenden Block, im Vergleich zu den Stimulationsblöcken vor der HBO. Dagegen wurde in den Kontrollversuchen keine Verzögerung im Anstieg beobachtet

Ein ähnliches Verhalten lässt sich bei dem Abfall der Blutflusskurven beobachten. Der Blutfluss unter HBO und in den Anschluss-Blöcken fällt signifikant langsamer ab. In vier von

zehn Versuchstieren ist der Abfall so langsam, dass bei Beendigung der Aufzeichnung das Ruhenniveau noch nicht erreicht ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Blutflussantwort unter HBO nicht nur konstant vorhanden, sondern sogar vergrößert ist, verzögert den peak erreicht und einen langsameren Abfall aufweist.

3.3.5 Vergleich der neuronalen Antworten

Zum Vergleich der neuronalen Aktivität der Versuchstiere unter Kontrollbedingungen und unter HBO wurden die SEP-Amplituden der Stimulationsblöcke vor und in der Druckkammer in Bezug zueinander gesetzt.

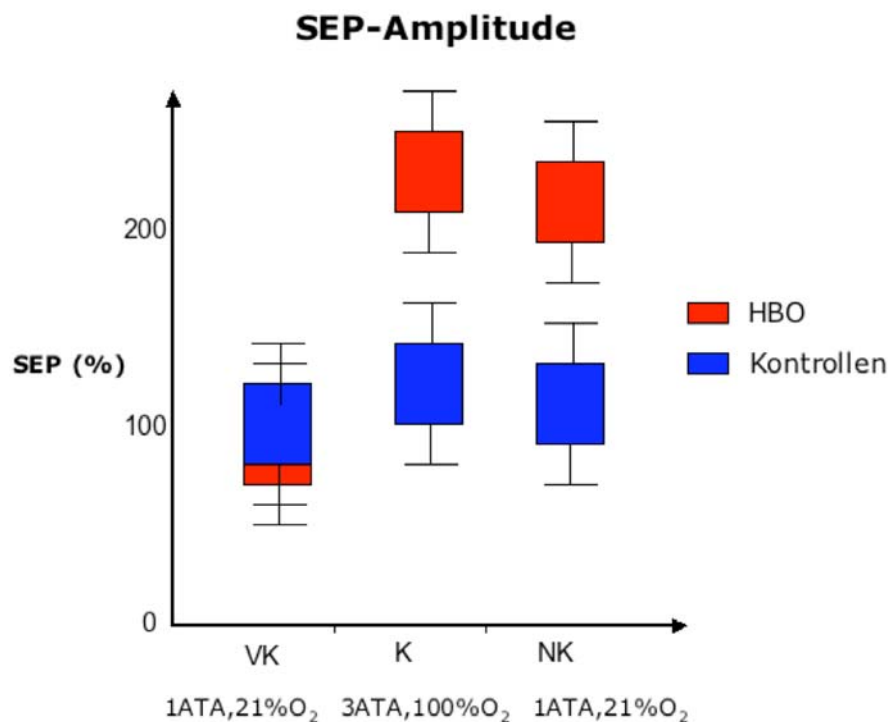


Abb. 23: Die Abbildung zeigt die Veränderung der SEP-Amplituden

In den HBO-Versuchen ist ein sehr viel deutlicherer Zuwachs der neuronaler Aktivität unter HBO zu beobachten. In den Kontrollversuchen steigt die SEP-Amplitude in der Kammer um 27% an, während sie in den HBO-Versuchen um 134% zunimmt.

Die vergleichende Analyse der neuronalen Aktivität unter HBO und in den Kontrollversuchen ergab eine deutlich vergrößerte neuronale Aktivität unter HBO (s. Abb. 23). Beim Vergleich der neuronalen Aktivität mit dem CBF unter HBO zeigte sich eine statistisch signifikanter

Zuwachs der neuronalen Aktivität und des CBF. Die Betrachtung der Einzel-Kurven zur Beurteilung der Korrelation von neuronaler Aktivität und CBF ergab ein inhomogenes Bild. CBF-Antworten konnten jedoch unter HBO immer beobachtet werden.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die hyperbare Hyperoxygenierung einen Einfluss auf die Vergrößerung der neuronalen- sowie der Blutflussantwort hat. Aufgrund der beschränkten Fallzahl kann noch keine genauere Aussage über die Konstanz der beschriebenen Veränderungen getroffen werden.

3.4 LDF/Spektroskopie-Versuche

3.4.1 Kontrollversuche LDF/ Spektroskopie

Im Anschluss an diese Versuche wurde eine zweite Versuchsreihe zur Validierung einer Entstehung von deoxy-Hämoglobin unter HBO mit einer Kombinationsmessung von LDF und Spektroskopie begonnen. Dieser Versuchsansatz wurde verwendet, um simultan in einem Versuchstier die Blutflussantwort zu messen und zusätzlich eine Aussage über das Verhalten von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin sowie der Hämoglobinsättigung treffen zu können. Diese Analyse erlaubt Aussagen über das unter HBO erzeugte Sauerstoffmilieu zu treffen und sie in Relation zu den Blutflussantworten zu setzen.

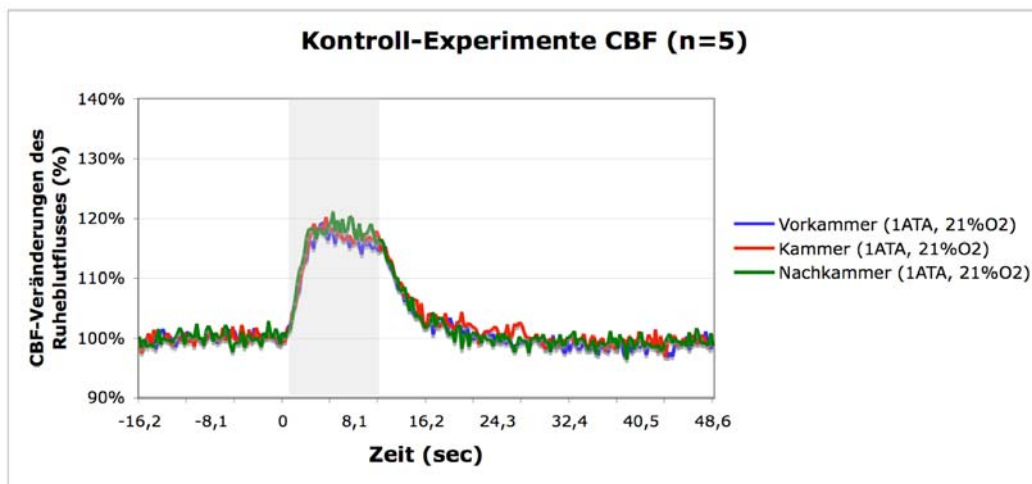


Abb. 24: Kontrollversuche cerebraler Blutfluß

Die Abbildung zeigt die Reaktion des cerebralen Blutflusses auf funktionelle Stimulation. Die gewonnenen Daten entsprechen denen aus den LDF-Versuchsreihen. CBF-Antwort um ca. 20 %.

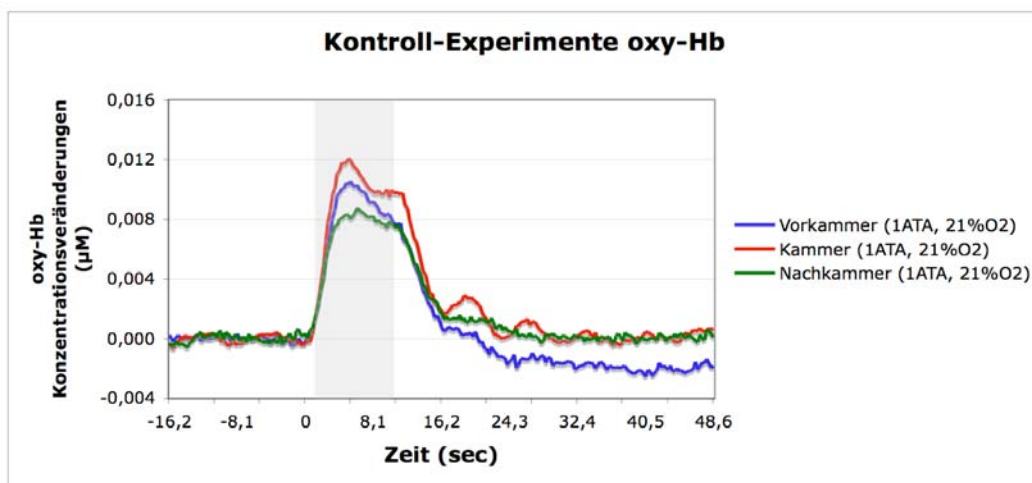


Abb. 25: Kontrolleexperimente oxy-Hämoglobin

Man kann in den Kurven des oxygenierten Hämoglobins gut den Anstieg in allen drei Settings beobachten. Es entwickelt sich ein etwas deutlicher ausgeprägter oxy-Hb Anstieg in der Kammer (rote Kurve).

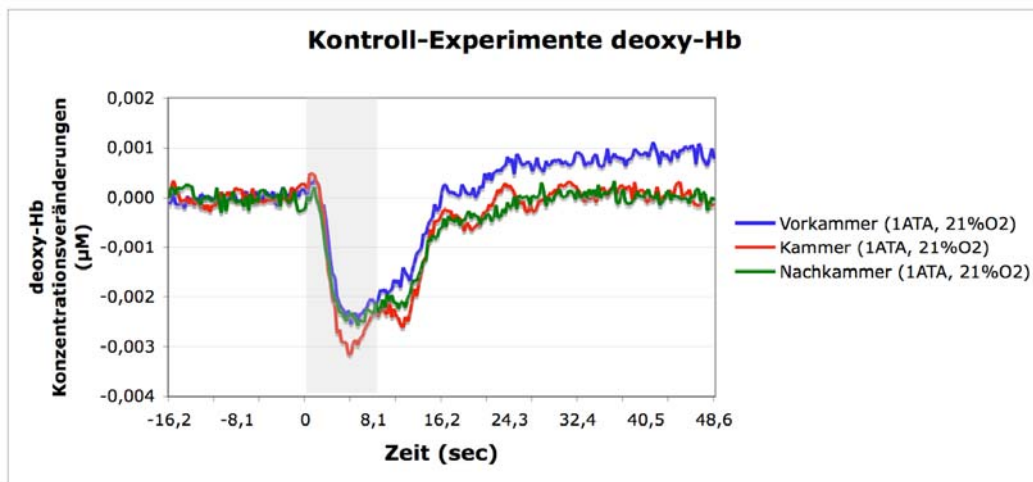


Abb. 26: Kontrolleexperimente deoxy-Hämoglobin

Diese Abbildung zeigt den gleichmäßigen Abfall der Konzentration des deoxygenierten Hämoglobins in allen drei Settings.

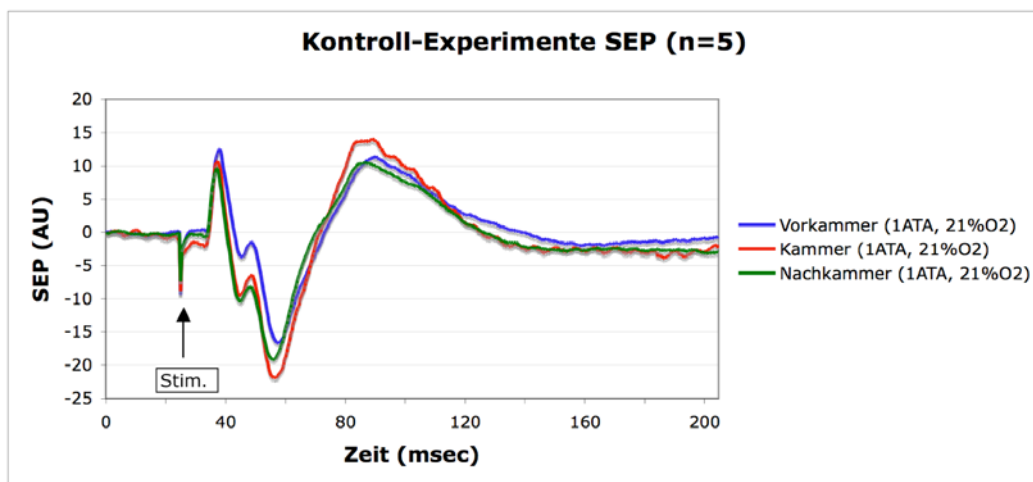


Abb. 27: Kontrolleexperimente SEP

Die Abbildung zeigt die somatosensorisch evozierten Potentiale unter Kontrollbedingungen, ausgelöst durch die elektrische Stimulation der Vorderpfote mit 1-1,4 mA.

Die Kontrollversuche mit der Kombination aus LDF und Spektroskopie zeigten die erwarteten Veränderungen. Die Blutflussreaktion ist identisch mit den vorherigen Versuchsreihen und die Konzentration des oxygenierten Hämoglobins steigt unter funktioneller Stimulation an (Abb. 25) und im Gegenzug sinkt die Konzentration des deoxygenierten Hämoglobins (Abb. 26). Dies geschieht aufgrund der Auswaschung des deoxy-Hämoglobins durch den massiven Blutflussanstieg, welcher oxygeniertes Blut mit sich führt. Die neuronale Aktivität stellt sich in den Kontrollversuchen gleichartig dar (Abb. 27). Diese Messungen decken sich mit den bekannten Beschreibungen der CBF-Reaktionen auf funktionelle Stimulation.

3.4.2 Hyperbare Hyperoxygenierungs-Versuche LDF/ Spektroskopie

Die Versuchsreihen unter HBO mit simultaner Aufzeichnung des cerebralen Blutflusses und der Veränderungen von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin bei elektrischer Stimulation der Vorderpfote wurden identisch wie die Einzel-LDF-Messungen durchgeführt.

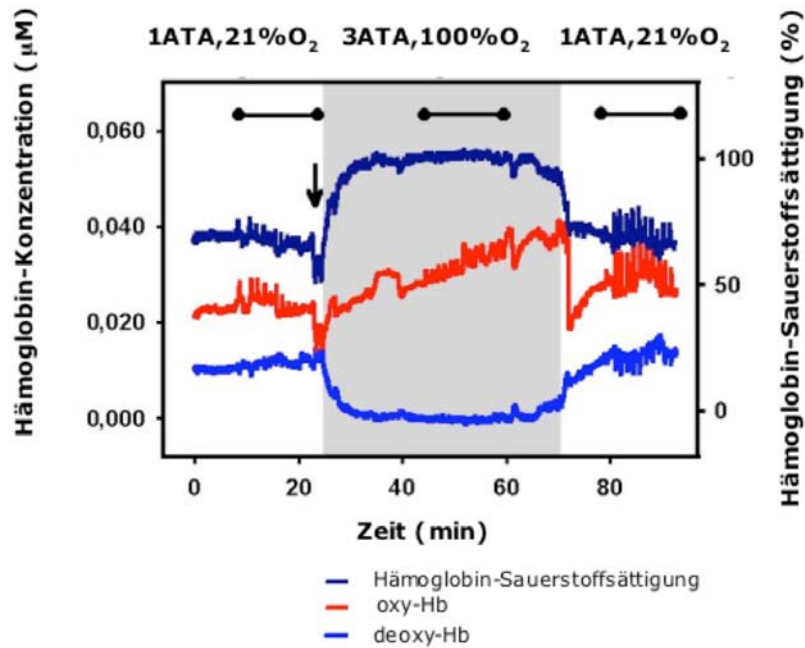


Abb. 28: Hb-Sauerstoffsättigung, oxy- und deoxy-Hb, CBF

Die Grafik zeigt die auf 100% ansteigende Hb-Sauerstoffsättigung, sowie die Verläufe der Konzentrationsveränderungen von oxy- und deoxy-Hb.

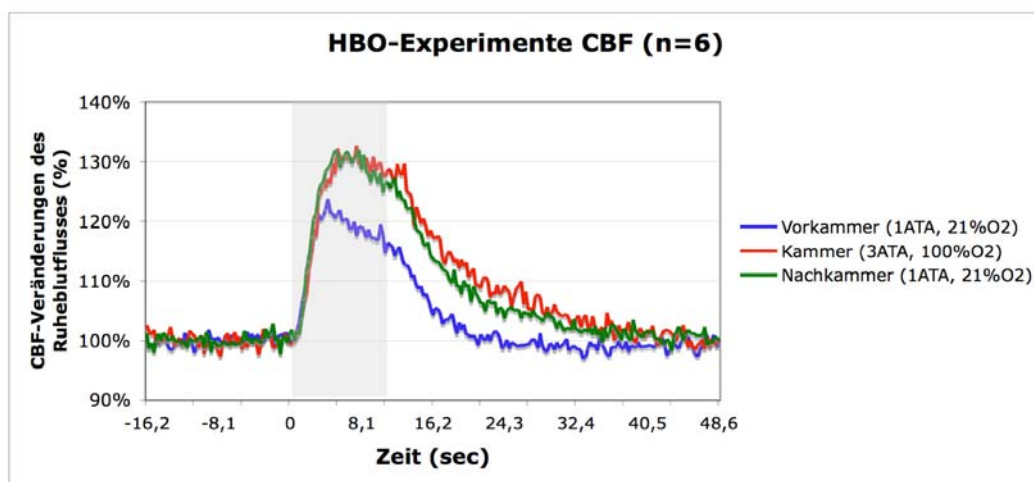


Abb. 29: HBO-Experimente cerebraler Blutfluß

Die Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation verhält sich unter hyperbarer Hyperoxygenierung, gemessen mittels LDF/Spektroskopie identisch mit den vorherigen Versuchsreihen. Vor der hyperbaren Hyperoxygenierung wird ein Anstieg der Blutflussantwort um ca. 20% beobachtet, unter und nach HBO um ca. 25%

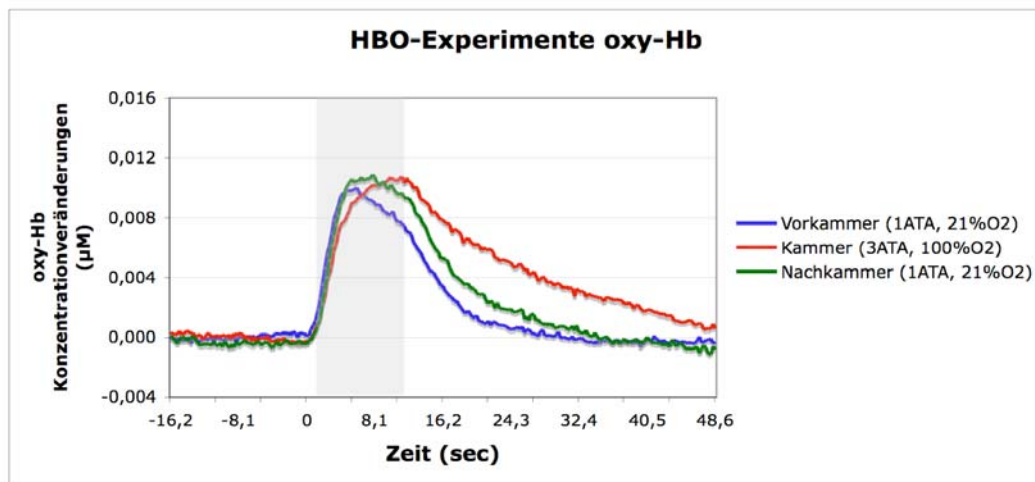


Abb. 30: HBO-Experimente oxy-Hämoglobin-Konzentration

Diese Grafik zeigt die mittels Spektroskopie registrierte Konzentrationsveränderung des oxygenierten Hämoglobins. Es ist keine signifikante Verringerung der oxy-Hb-Konzentration unter hyperbarer Hyperoxygenierung zu beobachten (rote Kurve). Es wird sogar ein leichter Konzentrationszuwachs registriert.

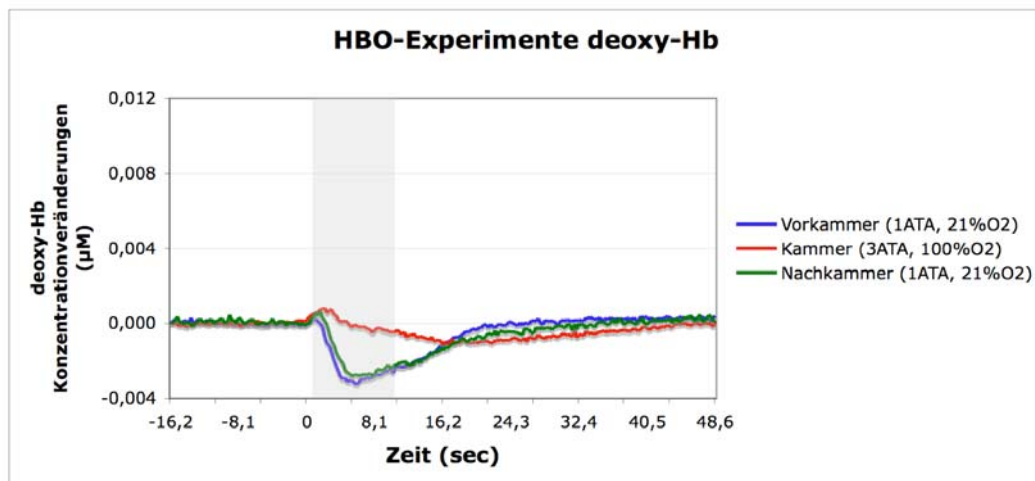


Abb. 31: HBO-Experimente deoxy-Hämoglobin

Diese Abbildung zeigt den minimierten Abfall der deoxy-Hb-Konzentration unter hyperbarer Hyperoxygenierung (rote Kurve). In den ersten Sekunden nach Stimulationsbeginn ist ein geringer Anstieg des deoxy-Hb Signals zu beobachten.

Zu Erläuterung der Konzentrationsveränderungen des oxygenierten und des deoxygenierten Hämoglobins werden hier kurz die erwarteten Reaktionen in Zusammenhang mit den gewonnenen Daten gesetzt. Die oxy-Hb-Konzentration nimmt unter funktioneller Stimulation aufgrund der Blutflussreaktionen auch bei 100% Sauerstoffsättigung zu. Die deoxy-Hb-Konzentration dürfte sich unter diesen Bedingungen kaum verändern, da im ganzen Körper, d.h. in jedem Gewebe des Versuchstieres, keine deoxy-Hb-Entstehung möglich ist. Es kann keine deoxy-Hb von extrazerebral in die cerebralen Gefäße einströmen und somit kann kein

Einschwemmungseffekt entstehen. Unter HBO sollte somit keine deoxy-Hb-Veränderung aufzuzeichnen sein.

Die folgenden Graphiken dienen der genaueren Analyse der oxy- und deoxy-Hb-Konzentrationsveränderungen unter HBO.

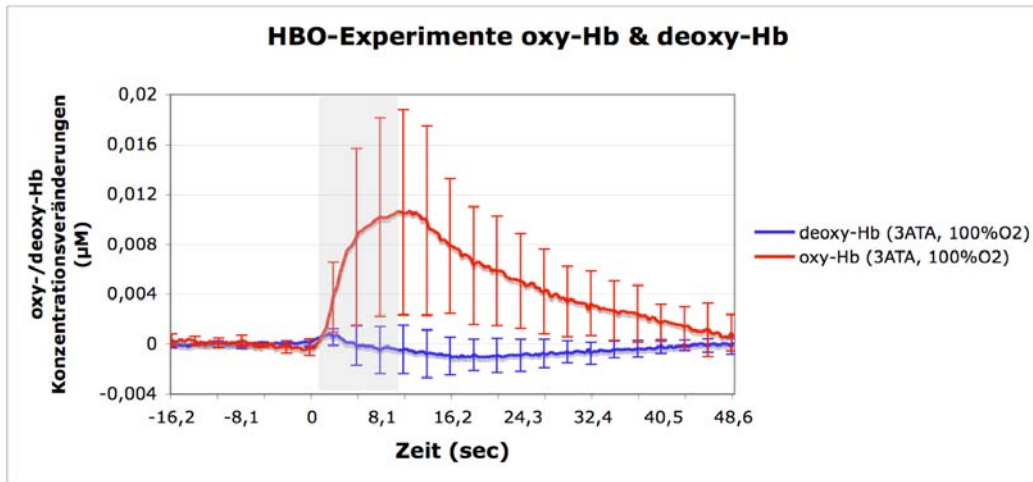


Abb. 32: HBO-Experimente oxy-Hb & deoxy-Hb

Die Graphik zeigt die unterschiedlichen Verläufe der Kurven des oxygenierten und des deoxygenierten Hämoglobins unter 100 % Sauerstoff und 3 ATA. Der Verlauf der oxy-Hb Kurve ist im Vergleich zu den Kontrollen nur minimal verändert. Veränderungen des deoxy-Hämoglobins sind dagegen nur in geringem Maße nachweisbar und deuten somit auf eine nahezu 100 % Abdeckung des Gewebes mit Sauerstoff hin.

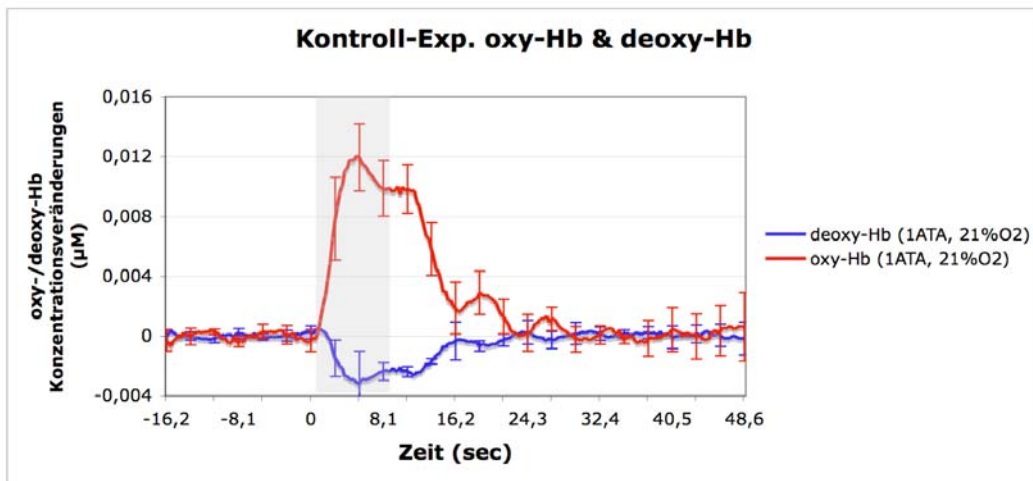


Abb. 33: Kontroll-Experimente oxy-Hb & deoxy-Hb

Die Graphik zeigt die unterschiedlichen Verläufe der Kurven des oxygenierten und des deoxygenierten Hämoglobins unter 21 % Sauerstoff und 1 ATA. Der Verlauf der oxy-Hb Kurve ist im Vergleich zu den HBO Versuchen nur minimal verändert. Das deoxygenierte Hämoglobin dagegen fällt aufgrund des starken Volumenanstiegs ab.

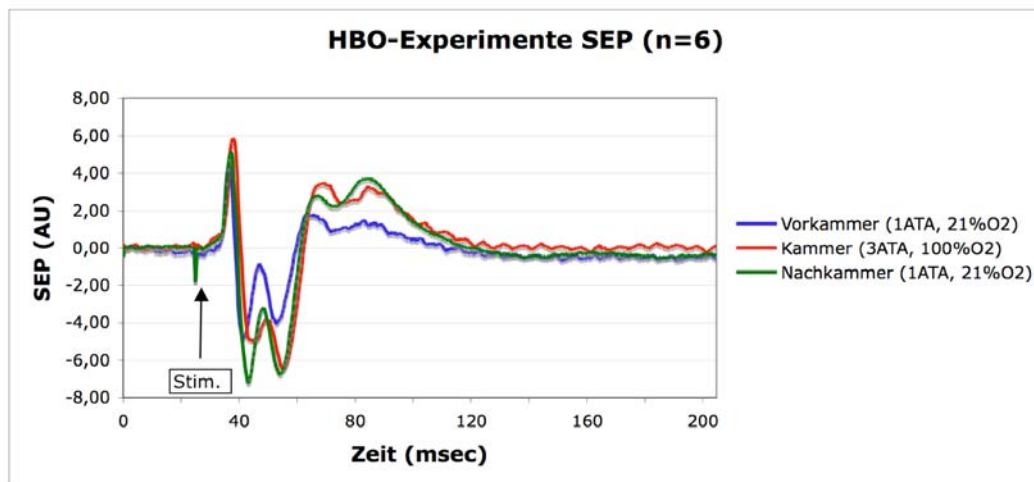


Abb. 34: HBO-Experimente SEP

Die Graphik stellt die neuronale Aktivität als Reaktion auf die elektrische Stimulation dar. In jedem der drei Stimulationsbedingungen ist eine neuronale Aktivität nachweisbar. Somit wird gezeigt, dass wie erwünscht das Vorderpfoten-Areal elektrisch stimuliert wird.

Die Messungen mit der LDF/Spektroskopie-Kombination bestätigten die Ergebnisse der Versuchsreihen mit den reinen LDF- Messungen.

Die CBF-Antwort unter HBO, gemessen mit der LDF-Sonde des Kombinationssensors, ist konstant in allen Versuchstieren nachweisbar. Die Größen der Blutflussreaktion entsprechen genau den in den ersten Versuchsreihen gemessenen Werten.

Die zusätzlich mittels Spektroskopie gewonnenen Daten zu oxy- und deoxy-Hämoglobin passen exakt zu den bisherigen Ergebnissen und widerlegen das Stamler-Modell. Entgegen dessen Voraussagen bleibt die Blutflussreaktion unter HBO erhalten, es entsteht signifikant weniger deoxy-Hämoglobin, der starke deoxy-Hb-Konzentration Abfall ist unter hyperbarer Hyperoxygenierung verschwunden und die oxy-Hb-Konzentration steigt aufgrund der Blutflussreaktion deutlich an.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Hämoglobin-Deoxygenierung für den Prozess der neurovaskulären Kopplung keine entscheidende Bedeutung besitzt. Wir konnten beobachten, dass unter hyperbarer Hyperoxygenierung (100%O₂, 3 ATA) eine vollkommene Sauerstoffsättigung des Hämoglobins vorliegt. Die funktionelle Stimulation unter HBO konnte keine Deoxygenierung des Hämoglobins auslösen. Das entscheidende Resultat ist der Nachweis, dass die Blutflussantworten auf funktionelle Stimulation unter HBO erhaltenbleiben. Die Versuche zeigen, dass unter vollkommener Sauerstoffsättigung des Blutes die Entstehung von deoxy-Hb verhindert wird und dies keinen Effekt auf die Blutflussantwort im Vorderpfoten-Areal der Ratte hat.

Im Folgenden wird zunächst das verwendete Versuchsmodell kritisch bewertet. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse dieser Arbeit nochmals kurz dargestellt und in Relation zu anderen Arbeiten auf diesem Gebiet gesetzt.

4.1 Versuchsmodell

Die Spezies Ratte als Versuchsobjekt wurde gewählt, da sie eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber Versuchen an anderen Spezies und am Menschen aufweist.

Die Grundvoraussetzung war eine weitgehende Übertragbarkeit der Ergebnisse des Versuchsmodells auf die Regulationsmechanismen des cerebralen Blutflusses beim Menschen. Man geht davon aus, dass die Kopplung der neuronalen Aktivität und des cerebralen Blutflusses in Nagetieren identisch ist mit der Regulation beim Menschen und somit die Übertragbarkeit gewährleistet ist.

Für die Wahl des Versuchsmodells war es weiterhin entscheidend, dass Blutfluss und Konzentrationsveränderungen von oxy- und deoxy-Hämoglobin simultan messbar sind. Dies wäre mittels MRT und optischer Spektroskopie am Menschen nur eingeschränkt möglich gewesen. Eine weitere Bedingung der Modellentwicklung bestand darin, eine hyperbare Hyperoxygenierung zu ermöglichen. Dies wäre ebenfalls in einem Versuchsaufbau mit menschlichen Probanden schwer umsetzbar, da ohne klinische Indikation eine hyperbare Hyperoxygenierung die Probanden einem zu hohen Risiko aussetzt und somit ethisch nicht vertretbar wäre. Außerdem müsste eine sehr große Druckkammer entwickelt werden um MRT Untersuchungen unter HBO durchführen zu können. Im Endeffekt wären Versuche am Menschen aufgrund der enormen Kosten und des Aufwandes nicht realisierbar. Das Tiermodell ist somit für diesen Versuchsansatz die einzig umsetzbare Lösung.

Die Spezieswahl fiel auf die Ratte, da die meisten Erfahrungen in der Untersuchung des cerebralen Blutflusses in diesem Modell gemacht wurden. Für zukünftige Untersuchungen wäre zu überlegen, ob die genetisch zugängliche Spezies Maus ein besseres Modell darstellt. In diesem Modell wäre es möglich, durch das genetische Ausschalten bestimmter Rezeptoren (z.B. der P2Y) und Signale deren Einfluss genauer zu beurteilen. Die Versuche an der Maus würden allerdings eine sehr viel diffizilere Präparation sowie kleinere Sonden erfordern. Es muss also für jede Fragestellung eine Abwägung zwischen Aufwand und Nutzen erfolgen.

Die Entscheidung fiel auf das Vorderpfoten-Areal als Mess-Areal, da es elektrisch über einen kurzen Zeitraum sehr exakt stimuliert werden kann und über ein präpariertes kraniales Fenster für die Blutflussmessungen sehr gut zu erreichen ist. Das Vorderpfoten-Areal ist ein etabliertes und hoch standardisiertes Modell, und somit stehen ausreichend Vorergebnisse zur Einordnung der gewonnenen Messergebnisse zur Verfügung.

Versuche am Tiermodell bieten viele Vorteile, allerdings haben sie den Nachteil, dass diese unter Narkose durchgeführt werden müssen. Es musste also eine Narkoseform gefunden werden, die eine absolute Schmerzfreiheit der Versuchstiere gewährleistet und gleichzeitig die Messparameter nicht beeinflusst.

Die Isofluran-Narkose zu Beginn der Präparation sorgt für eine sichere, tiefe Anästhesie während der Präparation. Der Einfluss der Isofluran-Narkose auf die Messparameter ist hoch, da sie deutliche Schwankungen des Ruheblutflusses bewirkt. Aus diesem Grund wird nach Beendigung der Präparation auf die i.v. Narkose mit α -Chloralose und Urethan umgeschaltet. Die α -Chloralose/Urethan-Narkose hat kaum Einfluss auf neuronale Aktivität und die cerebrale Blutflussantwort. Die evozierten Potentiale und die Blutflussantworten bleiben daher weitgehend erhalten [Lindauer et al., 1993]. Nach einem festgelegten Zeitintervall, welches die Abatmung des Isoflurans gewährleistet und somit die Einflüsse auf den Blutfluss und die neuronale Aktivität minimiert, kann unter der α -Chloralose/Urethan-Narkose mit den Messungen begonnen werden.

Die Vorderpfoten-Stimulation im Rattenmodell ist nach Abwägung der Vor- und Nachteile das am besten geeignete Modell zur Überprüfung der Hb-deoxygenierungs-abhängigen CBF-Regulations-Mechanismen.

Für die Blutflussmessung wurde die LDF verwendet. Diese Methode verfügt über eine hohe zeitliche Auflösung, berechnet aber keine absoluten Blutflusswerte, sondern nur die Abweichungen von den gemessenen Ruheblutflüssen. Zur Bestimmung von absoluten oxy- und deoxy-Hb Werten, sowie der Sauerstoffsättigung des Hb, wurde die Mikrofaser-

Spektroskopie herangezogen, welche in Zusammenarbeit mit Kohl-Bareis und Mitarbeiter (RheinAhrCampus Remagen University of Applied Sciences Koblenz), etabliert wurde. Die Untersuchungsmethoden werden unter Punkt 4.3 in der Methoden-Kritik diskutiert.

4.2 Ergebnisse der HBO-Versuche

Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse und ihre Auffälligkeiten erläutert und mit der Literatur verglichen.

4.2.1 Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation unter hyperbarer Hyperoxygenierung

Die HBO zeigte in unseren Messungen keinen Einfluss auf den Ruheblutfluss. Des Weiteren konnte in allen Versuchsreihen eine Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Erwartungen aus der Stamler-Hypothese wurde keine Reduktion der CBF-Antworten beobachtet.

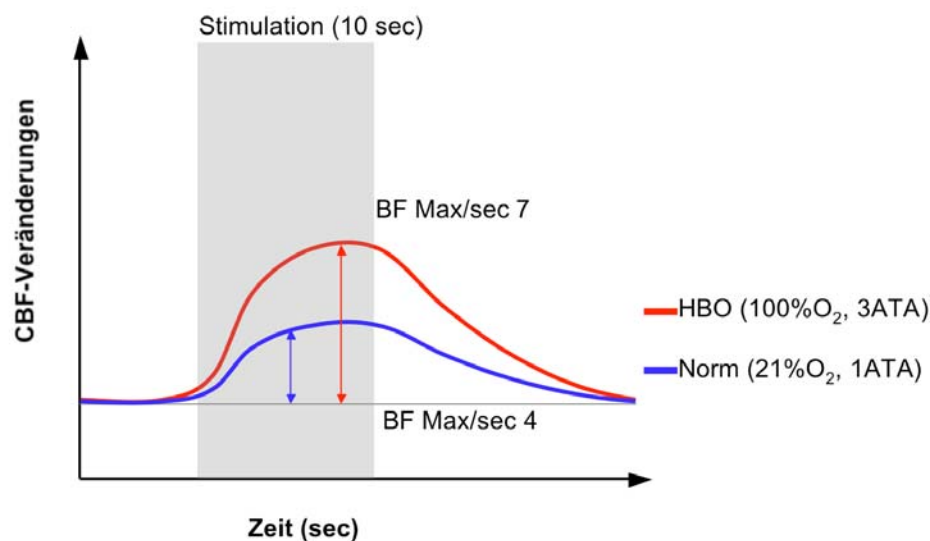


Abb. 35: Blutflussantworten unter HBO und unter normobaren Bedingungen

Vergrößerung der Blutflussantwort unter HBO mit verzögertem Erreichen des Maximums (rote und blaue Senkrechte).

In unseren Versuchen waren die Blutflussantworten unter hyperbarer Hyperoxygenierung im Mittel aller Versuchsreihen sogar stärker ausgeprägt (+52,39 % ± 18,91% AUC) als die Antworten unter Normalbedingungen. Zudem war unter hyperbarer Hyperoxygenierung eine

Verzögerung im Erreichen der Blutflussantwort-Höhepunkte (VK $4,72 \pm 1,82$ sec; K $8 \pm 2,06$ sec; $p=0,011$) und ein verzögertes Absinken des Blutflusses auf das Ausgangsniveau (VK $20,33 \pm 4,74$ sec; K $35,33 \pm 5,77$; $p=0,0005$) auffällig.

Diese Ergebnisse widerlegen eindeutig den Einfluss der Hämoglobin-Deoxygenierung auf die neurovaskuläre Kopplung im Gehirn. Für die Regulation des cerebralen Blutflusses unter physiologischen Bedingungen kann ein deoxy-Hb-abhängiger Mechanismus keine entscheidende Rolle spielen. Diese Arbeit legt die Regulation des Blutflusses über ein vielschichtiges Netzwerk von verschiedenen parenchymalen Mediatoren und Modulatoren nahe.

4.2.2 Vergleich mit der Literatur

4.2.2.1 HBO-Einfluss auf Ruheblutfluss und CBF-Antworten

Eine Reihe von experimentellen Ansätzen haben Ergebnisse geliefert, die ein Absinken des Ruheblutflusses um 26-39% bei hyperbarer Hyperoxygenierung bis zu 3 ATA [Demchenko et al., 1998; Demchenko et al., 2000] erwarten ließen. Es wurde beschrieben, dass HBO bis 3 ATA eine Vasokonstriktion auslöst [Bergo and Tyssebotn, 1992], und dass kurze Perioden von hyperbarer Hyperoxygenierung (1-5 ATA) einen Blutflussabfall induzieren [Torbati et al., 1978]. Zudem war im Gehirn des Menschen [Lambertsen et al., 1953; Omae et al., 1998] sowie von Versuchstieren [Jacobson et al., 1963; Bergo and Tyssebotn, 1992] eine HBO-induzierte Vasokonstriktion und ein Abfall des cerebralen Blutflusses nachgewiesen worden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass der Ruheblutfluss unter starker HBO (>3 ATA) ansteigt. HBO von 5 ATA bewirkten einen kurzzeitigen Abfall des CBF, der dem Schutz des Hirngewebes vor der exzessiven Gewebeoxygenierung dienen könnte. Nach dem CBF-Abfall folgte jedoch ein ausgeprägter CBF-Anstieg [Demchenko et al., 2005]. Der CBF-Anstieg könnte an eine vermehrte NO-Produktion gekoppelt sein. Dies könnte daraufhin deuten, dass der NO-Anstieg an den Mechanismus des CBF-Anstieges gebunden ist [Sato et al., 2001].

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen HBO-Effekten, wurde in allen unseren Versuchsreihen unter HBO kein veränderter Ruheblutfluss beobachtet. Wir können allerdings nicht ausschließen, dass es in anderen Gehirnarealen zu den beschriebenen Anstiegen unter HBO kommt.

Zur funktionellen Stimulation unter HBO liegen keine Vergleichsdaten in der Literatur vor. Nach der Hypothese des Stamler-Modells wäre jedoch ein Fehlen oder eine ausgeprägte

Verminderung der Blutflussreaktion zu erwarten gewesen. Diese Erwartung wurde nicht bestätigt.

4.2.3 Vergrößerung der Blutflussantworten aufgrund von Hyperexzitabilität?

Ein Grund für die vergrößerten Blutflussantworten könnte die vermehrte Erregbarkeit des ZNS unter hyperbarer Hyperoxygenierung sein. Es ist bekannt, dass eine Sauerstoffgabe unter erhöhtem atmosphärischem Druck toxische Effekte auf das zentrale Nervensystem auslösen kann. Die toxische Wirkung zeigt sich in der Entstehung von vermehrter elektrischer Entladung im EEG, abnormer motorischer Aktivität wie Tremor und Reflexsteigerung bis hin zu Krampfanfällen. Begleitet ist die Erhöhung der Exzitabilität von einem Anstieg des cerebralen Blutflusses [Demchenko et al., 2000; Elayan et al., 2000; Demchenko et al., 2001; Zhang et al., 2004; Demchenko et al., 2005]. Diese Effekte sind jedoch erst unter 4-5 ATA zu beobachten. In unseren HBO Versuchen unter 3ATA konnte kein Tremor oder eine erhöhte Krampfneigung festgestellt werden.

Der Vergleich von Blutflussantwort und neuronaler Antwort in den Versuchstieren lässt einen möglichen Einfluss der HBO auf die Blutflussreaktion durch eine verstärkte Erregbarkeit des ZNS vermuten. Die vermehrte Aktivität des ZNS unter HBO könnte prinzipiell den in unseren Versuchen auftretenden Zuwachs der SEP-Amplituden und der Blutflussantworten erklären. Die Existenz bzw. Entwicklung der CBF-Antworten unter HBO und damit die beobachtete intakte deoxy-Hb-unabhängige neurovaskuläre Kopplung wird dadurch nicht in Frage gestellt. Die durch den Zuwachs an neuronaler Aktivität unter HBO vergrößerten Blutflussantworten sprechen eindeutig gegen das Modell der deoxy-Hb-abhängigen neurovaskulären Kopplung. Nach diesem Modell wäre unter HBO weder der stimulationsinduzierte Blutfluss, noch dessen Erhöhung durch vermehrte Erregbarkeit möglich gewesen.

4.2.3.1 Hyperexzitabilität durch NO

Es konnte gezeigt werden, dass HBO über NMDA-Rezeptor vermittelte Mechanismen die NO-Synthase aktiviert und damit einen Anstieg der NO-Konzentration im Gewebe bewirkt. Zusammen mit dem Anstieg der Sauerstoff-Konzentration könnte dies zu einer über den Sauerstoff-Anstieg vermittelten Nitrit-induzierten Hyperexzitabilität führen [Thom et al., 2003]. Es ist möglich, dass der NO-Anstieg seinen toxischen Effekt durch verschiedene Mechanismen auslöst. Zum einen wird vermutet, dass die Toxizität von Glutamat und Asparat

verstärkt wird [Dawson et al., 1991]. Des Weiteren kann eine ATP-Depletion und eine Störung des aktiven intrazellulären Transportsystems ausgelöst werden. All diese Veränderungen könnten zu einer Membranpotentialverschiebung bis zu Depolarisation mit Krämpfen führen.

Dies könnte die beobachtete Vergrößerung der stimulationsabhängigen elektrischen Aktivität unter HBO erklären.

4.2.3.2 *Hyperexzitabilität durch Azidose*

Der Kohlendioxid (CO₂) Gehalt des Gewebes wird konstant über die Atemfrequenz und den Blutfluss reguliert. Klinische Studien sowie experimentelle Untersuchungen konnten Effekte des CO₂-Gehaltes auf die neuronale Erregbarkeit nachweisen. Ein Abfall des CO₂-Gehaltes (Hypokapnie) bewirkt einen Anstieg der neuronalen Erregbarkeit. Hyperkapnie bewirkt im Gegensatz dazu einen Abfall neuronaler Erregbarkeit.

CO₂-induzierte Veränderungen des pH-Wertes, welche die extrazellulären Adenosin- und ATP-Konzentrationen beeinflussen, könnten ausschlaggebend für den Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit sein. Unter Hyperkapnie steigen die Adenosin-Level an. Adenosin A₁-Rezeptoren werden aktiviert. Daraus resultiert ein Abfall der neuronalen Aktivität. Diese Effekte beruhen auf der Veränderung des extrazellulären pH-Wertes durch Hyperkapnie. Die Blockierung der CO₂-induzierten pH-Wert-Veränderungen oder alleinige Änderung des intrazellulären pH-Wertes verringern die Ausschüttung von Adenosin und somit die Inhibition der exzitatorischen Potentiale [Dulla et al., 2005].

Da Hyperkapnie zu einer Reduzierung neuronaler Erregbarkeit führt, kann in der unter HBO entstehenden Hyperkapnie nicht der Grund für die verstärkte neuronale Erregbarkeit in unseren Versuchen liegen. Zudem wurde in unseren Experimenten nur eine Tendenz zur Hyperkapnie beobachtet (s. 4.2.3.5).

4.2.3.3 *Hyperexzitabilität durch weitere Mediatoren*

Ein weiterer Grund für die durch hyperbare Hyperoxygenierung ausgelöste Hyperexzitabilität könnte ein Abfall der extrazellulären GABA (Gamma-Aminobuttersäure)-Konzentration sein [Zhang et al., 2004].

Allein die Erhöhung des atmosphärischen Drucks kann zu einer Erhöhung der kortikalen Potentiale führen [Kaufmann et al., 1981]. Die Veränderung des Blutflusses wird nicht alleine

durch den Druck, sondern durch die Kombination mit der erhöhten Sauerstoffkonzentration ausgelöst [Elayan et al., 2000]. Allerdings bedarf es für eine Steigerung der Exzitabilität bei normoxischer Druckerhöhung einer deutlich höheren Drucksteigerung als bei hyperoxischer Druckerhöhung, was für einen kausalen Zusammenhang zwischen exzessivem O₂-Druck und neuronaler Aktivität spricht.

Ein weiteres Indiz für eine erhöhte neuronale Aktivität unter HBO ist der nachgewiesene höhere Bedarf an Anästhetika während hyperbarer Druckapplikation. Dies wurde unter dem Begriff „pressure reversal of anaesthesia“ beschrieben [Kendig et al., 1988].

Unter HBO war zudem neben einem Anstieg des cerebralen Blutflusses und dem Anstieg des Gewebe-NO-Spiegels auch eine erhöhte Sauerstoffradikalkonzentration nachzuweisen [Demchenko et al., 2001; Demchenko et al., 2002; Demchenko et al., 2003], welche ebenfalls an der Hyperexzitabilität beteiligt sein könnte.

Alle diese Mechanismen könnten mitverantwortlich für die Hyperexzitabilität und die daraus resultierende Erhöhung der SEP-Amplitude sowie Vergrößerung der Blutflussantwort unter hyperbarer Hyperoxygenierung sein.

4.2.3.4 *Vermehrter Blutfluss durch HBO*

Die hyperbare Hyperoxygenierung hat in unseren Messungen keinen Einfluss auf den Ruheblutfluss. Die vergrößerten Blutflussantworten auf funktionelle Stimulation unter HBO könnte einerseits durch die Hyperexzitabilität und andererseits durch Effekte auf vaskulärer Ebene erklärt werden.

4.2.3.5 *Hyperkapnie-Einfluss auf den cerebralen Blutfluss*

Ein Grund für die vergrößerten Blutflussantworten könnte eine Hyperkapnie unter HBO sein. Die während der gesamten Versuchsreihen gemessenen physiologischen Parameter befanden sich in den Normwertbereichen. Es war jedoch eine signifikante Tendenz zur Hyperkapnie unter der hyperbaren Hyperoxygenierung zu beobachten (pCO₂ 36±4mmHg vor der HBO, pCO₂ 44±4mmHg unter HBO).

Zur der Entstehung gibt es mehrere Erklärungsansätze:

- Der Übergang zur Spontanatmung unter hyperbarer Hyperoxygenierung könnte eine verminderte Abatmung des CO₂ auslösen.

- Eine weitere mögliche Ursache könnte eine zu geringe Durchflutung der Druckkammer mit frischem Sauerstoff sein. Dies wurde jedoch durch einen konstant hohen Durchfluss von Sauerstoff, auch unter hyperbaren Bedingungen, ausgeschlossen.

Kann die schwache, im Bereich physiologischer Normwerte sich bewegende Hyperkapnie, die beobachtete Zunahme des cerebralen Blutflusses erklären? Eine Erhöhung des cerebralen Blutflusses unter moderater Hyperkapnie ist allgemein bekannt. Hyperkapnie ist ein potenter vasodilatatorischer Stimulus in der cerebralen Zirkulation von Säugetieren. Die Hyperkapnie könnte somit durchaus einen Auslöser für die Blutflusserhöhung unter hyperbarer Hyperoxygenierung darstellen.

Es gibt einige mögliche Mediatoren und Modulatoren, die eine Blutflusserhöhung unter Hyperkapnie bahnen könnten. Ihr jeweiliger Einfluss und ihr Zusammenspiel sind jedoch noch ungeklärt.

Iadecola et al. [Iadecola and Zhang, 1996] konnten zeigen, dass zur vollen Entfaltung der Dilatation der cerebralen Gefäße unter Hyperkapnie NO und cGMP erforderlich sind. Ebenso könnte die NO-Synthase (NOS) eine Rolle in der Hyperkapnie-abhängigen Dilatation spielen, da die NOS-Inhibition einen Abfall des CBF unter Hyperkapnie bewirkt. Es wurde jedoch gezeigt, dass auch bei totaler NOS-Inhibition eine, wenn auch stark verringerte, Vasodilatation unter Hyperkapnie stattfinden kann. Dies verdeutlicht, dass eine durch Hyperkapnie induzierte NOS-Aktivierung nicht der alleinige Mechanismus und NO nur ein permissiver Faktor des Blutflussanstiegs zu sein scheinen.

Wang et al. [Wang et al., 1999] konnten verschiedene Prinzipien für die hyperkapnische Dilatation der cerebralen Gefäße feststellen.

- Erstens konnte beschrieben werden, dass NO (aus nNOS) und vasodilatierende Prostaglandine (PG), hauptsächlich Prostacyclin, gemeinsam die Vasodilatation unterstützen. Die Applikation des NOS-Inhibitors 7-NI und des COX Inhibitors Indomethacin reduzierte die hyperkapnische Gefäßreaktion um 80%.
- Zweitens wird die Hyperkapnie von einem signifikanten Anstieg von cGMP und cAMP im Liquor begleitet. cGMP und cAMP könnten als „second messenger“ für NO und PG angesehen werden. Ihr Anstieg wurde ebenfalls komplett durch die Gabe von 7-NI und Indomethacin geblockt.
- Drittens konnte in Neuronen-Kulturen ein transientser NO-abhängiger cGMP-Anstieg unter erhöhtem CO₂-Gehalt beobachtet werden. Es wurde kein cAMP-Anstieg gemessen.

Diese in vitro Daten lassen vermuten, dass eine Hyperkapnie die NO-Produktion der Neurone stimuliert.

Die genaue Rolle der einzelnen Stoffe in dem komplexen Kreislauf der hyperkapnischen Gefäßreaktion konnte bis heute nicht geklärt werden. Die Hyperkapnie könnte somit einen Modulator der neurovaskulären Kopplung darstellen und für die veränderte Ausprägung der Blutflussantwort mitverantwortlich sein.

4.3 Methoden-Kritik

Die Experimente konnten zeigen, dass unter HBO eine deoxy-Hb-Entstehung nahezu vollständig unterbunden wird. Die deoxy-Hb-Konzentrationsveränderungen unter HBO unterliegen minimalen Schwankungen. Bei der Analyse der spektroskopisch gemessenen oxy-Hämoglobin- und deoxy-Hämoglobin-Konzentrationsveränderungen konnte unter HBO ein geringfügig veränderter Anstieg der oxy-Hb-Konzentration sowie initial ein minimaler, jedoch signifikanter Anstieg der deoxy-Hb-Konzentration und anschließend ein leichtes Absinken festgestellt werden.

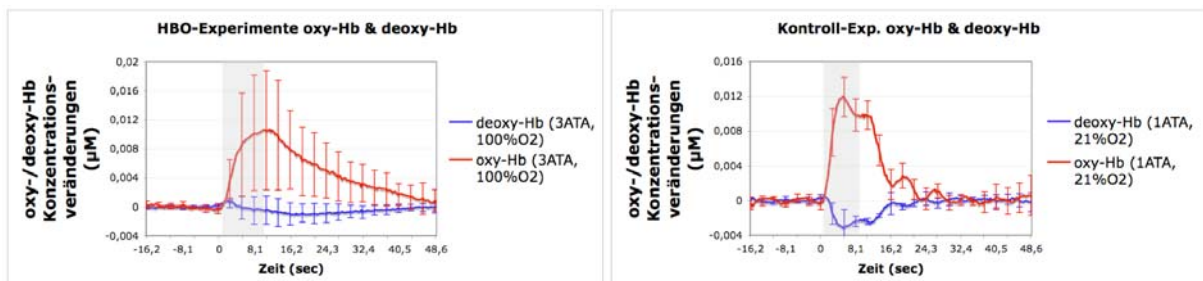


Abb. 36: Oxy- und deoxy-Hb Konzentrationen unter HBO und normobaren Bedingungen

Minimaler deoxy-Hb-Anstieg ist zu Beginn der Stimulation unter HBO und anschließend ein leichtes Absinken der deoxy-Hb Konzentration nachzuweisen. Unter normobaren Bedingungen wurde ein Abfall der deoxy-Hb Konzentration und ein starker oxy-Hb-Anstieg gemessen.

Für die Entstehung des deoxy-Hb-Anstieges unter hyperbarer Hyperoxygenierung gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten.

1. Die ausgewählten Bedingungen zur Herstellung einer HBO mittels 3 ATA und 100% Sauerstoff könnten nicht ausgereicht haben, um den Sauerstoffbedarf über physikalisch gelösten Sauerstoff vollkommen abzudecken (siehe Material und Methoden). Dies hätte zur Folge, dass keine effiziente Hyperoxygenierung des Blutes entstanden wäre. Bei Gültigkeit der „Stamler-Hypothese“ müssten die CBF-Antworten in diesem Fall zumindest deutlich reduziert sein. Nach allen vorliegenden

Untersuchungen sollte die HBO mittels 3 ATA und 100% O₂ eine 100 % Sauerstoffsättigung des Blutes bedingen und somit eine Abgabe des Sauerstoffs vom Hämoglobin verhindern können [Jamieson and Vandenbrenk, 1963; Vovenko, 1999].

2. Könnte das deoxygenierte Hämoglobin von extrazerebralen Gefäßen oder Gefäßen außerhalb des Vorderpfoten-Areals eingeschwemmt werden? Da sich die hyperbare Hyperoxygenierung auf den gesamten Körper des Versuchstiers auswirkte ist dies sehr unwahrscheinlich. Der deoxy-Hb Anstieg ist somit weder durch Verbrauch noch durch Einschwemmung erklärbar.
3. Die wahrscheinlichste Erklärung für die geringe Abweichungen der deoxy-Hb Konzentration von der Nulllinie ist eine fehlerhafte Berechnung der deoxy-Hb-Konzentration. Die Berechnung der Sauerstoffsättigung des Hb sowie die oxy- und deoxy-Hb Konzentrationen beruht auf einem Algorithmus, welcher die berechneten Konzentrationen möglichst genau an die tatsächlichen Größen annähert. Der Algorithmus und somit die Annäherung an die tatsächlichen Werte verfügt jedoch über eine Ungenauigkeit von ca. +/- 10-20%. Da der gemessene deoxy-Hb Anstieg relativ klein ist und im Bereich der Fehlerrate der deoxy-Hb Messungen liegt, gehen wir davon aus, dass es sich bei dem beobachteten Anstieg um einen Mess- bzw. Berechnungsfehler handelt.

Für diese Arbeit lässt sich somit zum einen festhalten, dass unter HBO kein relevanter deoxy-Hämoglobin-Anstieg entsteht. Wenn ein minimaler deoxy-Hb-Anstieg tatsächlich existieren würde, so hätte dies jedoch keinen Einfluss auf die Schlussfolgerungen aus unseren Ergebnissen. Unter der Annahme, dass der Blutfluss über einen deoxy-Hb-abhängigen Mechanismus geregelt werden würde, hätte man unter HBO, aufgrund der möglicherweise noch geringen Menge an entstehendem deoxy-Hb und der damit verbundenen geringeren Menge an freigesetztem NO, eine zumindest deutlich verkleinerte Blutflussantwort beobachten müssen.

Die intakte neurovaskuläre Kopplung unter HBO zeigt eindeutig, dass die deoxy-Hb-Entstehung keine wesentliche Rolle spielt.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die aus dieser Arbeit hervorgehenden Erkenntnisse über die Einflüsse des Sauerstofftransportes und die Veränderungen durch hyperbare Hyperoxygenierung lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Die Konzentrationsmessungen von deoxy-Hämoglobin und oxy-Hämoglobin, sowie der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins weisen nach, dass es unter hyperbarer Hyperoxygenierung (100% O₂ und 3 ATA) zu einer vollständigen Sauerstoffsättigung des Hämoglobins kommt. Damit wurde gezeigt, dass die gewählte Intensität der HBO effektiv genug ist, um die Sauerstoffversorgung des Hirngewebes weitestgehend vom Hämoglobin abzukoppeln. Der Sauerstoffbedarf des Hirngewebes wurde nahezu ausschließlich über physikalisch gelösten Sauerstoff abgedeckt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, dass Hämoglobin-Deoxygenierungs-abhängige Mechanismen eine entscheidende Rolle in der cerebralen Blutflussregulation haben. Entgegen der formulierten Hypothese erzeugte die funktionelle Stimulation unter HBO konstant reproduzierbare Blutflussantworten. Was bedeuten unsere Ergebnisse für die beschriebenen Modelle der neurovaskulären Kopplung? Wir konnten eindeutig zeigen, dass die Hämoglobin-Deoxygenierung für die Blutflussregulation des Vorderpfoten-Areals in unseren Versuchen keine Rolle spielt. Mit dieser Erkenntnis widerlegen wir jedoch nicht nur das SNO-Hb Modell von Stamler et al., sondern auch alle weiteren diskutierten Wege, die von der Hämoglobin-Deoxygenierung abhängen.

Der beobachtete Zuwachs an neuronaler Aktivität unter HBO bot aufgrund seiner Inhomogenität Anlass für Folgeuntersuchungen:

Die Folgeuntersuchungen der Arbeitsgruppe wurden unter veränderter Narkose (45mg/kg Körpergewicht (KG) α -Chloralose-HBC-complex als i.v. Bolusinjektion, gefolgt von einer kontinuierlichen i.v. Infusion 45mg/kg KG/h) durchgeführt und zeigen eine unter normobaren und hyperbaren Bedingungen nahezu identisch ausgeprägte neuronale Aktivität und CBF Antworten. Diese Daten untermauern somit die Ergebnisse der ersten Versuchsreihen.

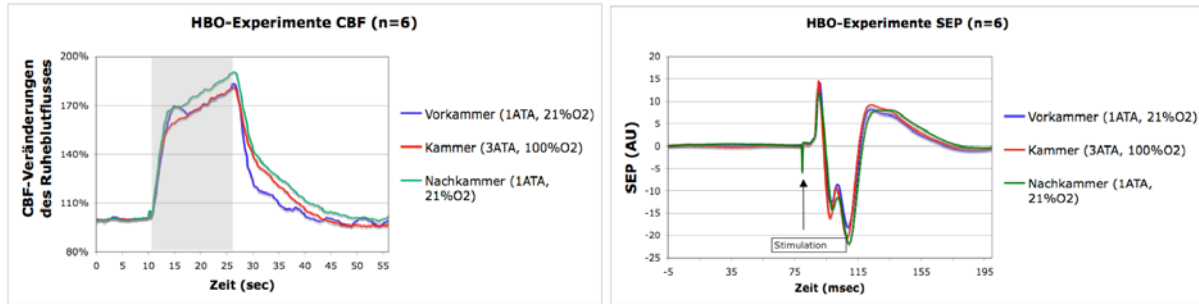


Abb. 37: Die Abbildung zeigt die CBF-Antworten (li.) und die SEP-Antworten (re.) der Folgeversuche unter veränderte Narkose.

Die CBF-Antworten sind unter HBO voll ausgeprägt und die neuronale Aktivität stellt sich homogen dar (siehe Abb. 13 und 14 zum Vergleich mit erhöhtem des Blutflusses und vermehrter neuronaler Aktivität unter HBO)

Die Verzögerung im Erreichen des CBF-Höhepunktes (Time to peak) unter HBO könnte ein Hinweis für den Einfluss des Modells auf die initiale CBF-Antwort sein. Für die Ausprägung der gesamten CBF-Antwort scheinen parenchymale Mechanismen verantwortlich zu sein.

Weitere Folgeuntersuchungen werden die Frage nach dem Einfluss einer Hb-Deoxygenierung unter extrem hypoxischen Bedingungen zu klären haben. Studien an Patienten mit Sichelzellanämie konnten zeigen, dass die hohe Konzentration an freiem Hb, welches durch die Zerstörung der Erythrozyten freigesetzt wurde, eine Vasokonstriktion auslöst [Doherty et al., 1998; Sloan et al., 1999; Reiter et al., 2002]. Dies könnte ein Beweis für den unter normalen Bedingungen durch Autoscavenging verhinderten Einfluss des NO aus SNO-Hb auf den Blutfluss sein. Das SNO-Hb Modell könnte somit als ein Mechanismus in pathologischen Zuständen betrachtet werden. Zur Überprüfung der Relevanz des Stamler-Modells unter pathophysiologischen Bedingungen könnten Versuche mit stärkeren metabolischen Stimuli (z.B. cortical spreading depression) und erhöhtem Sauerstoffverbrauch durchgeführt werden.

Unsere Beobachtungen legen einen vielschichtigen, über mehrere Mediatoren regulierten Mechanismus der neurovaskulären Kopplung nahe. Das Zusammenspiel der in der Einleitung zusammenfassend dargelegten Mechanismen ist nach wie vor in seiner Gesamtheit unverstanden und wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

Das heutige Verständnis der Gehirnfunktion beruht zu einem großen Teil auf der Entwicklung funktioneller Bildgebungsmethoden. Dabei kann ein Anstieg der Aktivität von Nervenzellen indirekt durch einen erhöhten cerebralen Blutfluss (CBF) nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und cerebralem Blutfluss wird als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet. Die molekulare Grundlage dieser Kopplung ist bislang nur unvollständig verstanden.

Eine vorherrschende Hypothese geht davon aus, dass die neurovaskuläre Kopplung von der Deoxygenierung des Hämoglobins abhängig sei. Unsere Versuche verfolgten das Ziel, diese Hypothese zu überprüfen und den Einfluss der Hämoglobin-Deoxygenierung auf die Neurovaskuläre Kopplung *in vivo* zu analysieren.

Zur Überprüfung deoxy-Hämoglobin (deoxy-Hb)-abhängiger Regulationsmechanismen haben wir die kortikalen Blutflussantworten auf somatosensorische Stimulation der Ratte unter normobaren (1 Atmosphäre of absolut pressure (ATA), 21%O₂) und zum anderen unter hyperbaren Bedingungen (mittels 3 ATA, 100%O₂) gemessen. Die hyperbare Hyperoxygenierung verhindert, aufgrund der ausgeprägten Sauerstoffsättigung unter 3 ATA und 100%O₂, die von dem Sauerstoffbedarf abhängige Deoxygenierung des Hämoglobins. Ein an die Hämoglobin-Deoxygenierung gekoppelter Mechanismus würde unter hyperbarer Hyperoxygenierung außer Kraft gesetzt und eine Zunahme der Blutflussantwort auf die somatosensorische Stimulation verhindern.

Zur Analyse der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verwendeten wir die optische Mikrofaser-Spektroskopie. Wir konnten zeigen, dass unter den hyperbaren Bedingungen eine 100%ige Hb-O₂ Sättigung eintritt und sich die Konzentration des deoxy-Hb unter Stimulation nicht mehr verändert. Somit können wir davon ausgehen, dass die hyperbare Hyperoxygenierung (mittels 3 ATA, 100%O₂) für die Unterbindung der Hämoglobin-Deoxygenierung ausreicht.

Für die Messung der Blutflussantworten zogen wir die Laser-Doppler-Flussmessung heran. Unter hyperbaren Bedingungen konnte eine reproduzierbare, und im Vergleich zu Messungen unter normobaren Bedingungen sogar vergrößerte, CBF-Antwort auf somatosensorische Stimulation nachgewiesen werden.

Durch diese Ergebnisse wird eindeutig gezeigt, dass die Hämoglobin-Deoxygenierung und nachgeschaltete Mechanismen für die Regulation der Neurovaskulären Kopplung nicht verantwortlich sein können.

Literaturverzeichnis

- Akgoren, N., et al. (1996). "Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis." Brain Res **710**(1-2): 204-14.
- Amezcuca, J. L., et al. (1989). "Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit." Br J Pharmacol **97**(4): 1119-24.
- Barfod, C., et al. (1997). "Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation." Acta Physiol Scand **160**(2): 123-32.
- Bergfeld, G. R. and T. Forrester (1992). "Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia." Cardiovasc Res **26**(1): 40-7.
- Bergo, G. W. and I. Tyssebotn (1992). "Cerebral blood flow distribution during exposure to 5 bar oxygen in awake rats." Undersea Biomed Res **19**(5): 339-54.
- Bryan, R. M., Jr., et al. (2005). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin." Anesthesiology **102**(6): 1261-77.
- Buerk, D. G., et al. (2003). "Temporal dynamics of brain tissue nitric oxide during functional forepaw stimulation in rats." Neuroimage **18**(1): 1-9.
- Burnstock, G. (1987). "Local control of blood pressure by purines." Blood Vessels **24**(3): 156-60.
- Burnstock, G. (2006). "Vessel tone and remodeling." Nat Med **12**(1): 16-7.
- Butler, A. R., et al. (1998). "Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature." Biochim Biophys Acta **1425**(1): 168-76.
- Buxton, R. B. and L. R. Frank (1997). "A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation." J Cereb Blood Flow Metab **17**(1): 64-72.
- Caesar, K., et al. (1999). "Modification of activity-dependent increases in cerebellar blood flow by extracellular potassium in anaesthetized rats." J Physiol **520 Pt 1**: 281-92.
- Cannon, R. O., 3rd, et al. (2001). "Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery." J Clin Invest **108**(2): 279-87.
- Chen, D. (1994). "[Increased blood pressure during hypoglycemia in patients with IDDM]." Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao **16**(3): 214-7.
- Chesler, M. and R. P. Kraig (1987). "Intracellular pH of astrocytes increases rapidly with cortical stimulation." Am J Physiol **253**(4 Pt 2): R666-70.
- Chu, A., et al. (1991). "Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs." J Clin Invest **87**(6): 1964-8.

- Close, L. A., et al. (1994). "Reoxygenation-induced relaxation of coronary arteries. A novel endothelium-dependent mechanism." Circ Res **74**(5): 870-81.
- Cohen, R. A., et al. (1997). "Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4193-8.
- Cohen, R. A., et al. (1999). "Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx." Circ Res **84**(2): 210-9.
- Coin, J. T. and J. S. Olson (1979). "The rate of oxygen uptake by human red blood cells." J Biol Chem **254**(4): 1178-90.
- Cosby, K., et al. (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." Nat Med **9**(12): 1498-505.
- Dawson, V. L., et al. (1991). "Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6368-71.
- Deem, S., et al. (2001). "Effects of S-nitrosation of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction and nitric oxide flux." Am J Respir Crit Care Med **163**(5): 1164-70.
- Deem, S., et al. (2002). "Effects of S-nitrosation and cross-linking of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs." Circ Res **91**(7): 626-32.
- Demchenko, I. T., et al. (2003). "Oxygen seizure latency and peroxynitrite formation in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthases." Neurosci Lett **344**(1): 53-6.
- Demchenko, I. T., et al. (1998). "Measurement of cerebral blood flow in rats and mice by hydrogen clearance during hyperbaric oxygen exposure." Undersea Hyperb Med **25**(3): 147-52.
- Demchenko, I. T., et al. (2000). "Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen." J Appl Physiol **88**(4): 1381-9.
- Demchenko, I. T., et al. (2001). "Nitric oxide production is enhanced in rat brain before oxygen-induced convulsions." Brain Res **917**(2): 253-61.
- Demchenko, I. T., et al. (2005). "Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure." J Cereb Blood Flow Metab **25**(10): 1288-300.
- Demchenko, I. T., et al. (2002). "Regulation of the brain's vascular responses to oxygen." Circ Res **91**(11): 1031-7.
- Dietrich, H. H., et al. (2000). "Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(4): H1294-8.
- Dietrich, H. H., et al. (1996). "Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): H1109-16.
- Dirnagl, U., et al. (1989). "Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model." J Cereb Blood Flow Metab **9**(5): 589-96.

- Dirnagl, U., et al. (1993). "Nitric oxide synthase blockade enhances vasomotion in the cerebral microcirculation of anesthetized rats." Microvasc Res **45**(3): 318-23.
- Dirnagl, U., et al. (1993). "Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats." Neurosci Lett **149**(1): 43-6.
- Dirnagl, U., et al. (1994). "Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide." Am J Physiol **267**(1 Pt 2): H296-301.
- Doherty, D. H., et al. (1998). "Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin." Nat Biotechnol **16**(7): 672-6.
- Doyle, M. P. and J. W. Hoekstra (1981). "Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins." J Inorg Biochem **14**(4): 351-8.
- Dulla, C. G., et al. (2005). "Adenosine and ATP link PCO₂ to cortical excitability via pH." Neuron **48**(6): 1011-23.
- Elayan, I. M., et al. (2000). "Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain." J Neurophysiol **83**(4): 2022-9.
- Ellsworth, M. L., et al. (1995). "The erythrocyte as a regulator of vascular tone." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): H2155-61.
- Emmi, A., et al. (2000). "Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes." J Neurosci **20**(10): 3915-25.
- Filosa, J. A., et al. (2006). "Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain." Nat Neurosci **9**(11): 1397-1403.
- Fox, P. T. and M. E. Raichle (1986). "Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(4): 1140-4.
- Fox, P. T., et al. (1988). "Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity." Science **241**(4864): 462-4.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Gerrits, R. J., et al. (2002). "Ca²⁺-activated potassium (K(Ca)) channel inhibition decreases neuronal activity-blood flow coupling." Brain Res **948**(1-2): 108-16.
- Gjedde, A., et al. (2002). "Oxidative and nonoxidative metabolism of excited neurons and astrocytes." J Cereb Blood Flow Metab **22**(1): 1-14.
- Gladwin, M. T., et al. (2003). "Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm." Nat Med **9**(5): 496-500.
- Gladwin, M. T., et al. (2000). "Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 9943-8.

- Gladwin, M. T., et al. (2000). "Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11482-7.
- Gladwin, M. T., et al. (2002). "S-Nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O₂/NO-linked allosteric function." J Biol Chem **277**(31): 27818-28.
- Godde, B., et al. (2002). "Age-related changes in primary somatosensory cortex of rats: evidence for parallel degenerative and plastic-adaptive processes." Neurosci Biobehav Rev **26**(7): 743-52.
- Gonzalez-Alonso, J., et al. (2002). "Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP." Circ Res **91**(11): 1046-55.
- Gow, A. J., et al. (1999). "The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9027-32.
- Gow, A. J. and J. S. Stamler (1998). "Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions." Nature **391**(6663): 169-73.
- Grinvald, A., et al. (1986). "Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals." Nature **324**(6095): 361-4.
- Han, T. H., et al. (2002). "Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7763-8.
- Harder, D. R., et al. (1998). "Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites." Stroke **29**(1): 229-34.
- Herold, S., et al. (2001). "Kinetic and mechanistic studies of the NO*-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin." Biochemistry **40**(11): 3385-95.
- Huang, Y., et al. (2002). "Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation." Biotechnol Prog **18**(1): 101-7.
- Huang, Z., et al. (2001). "Nitric oxide binding to oxygenated hemoglobin under physiological conditions." Biochim Biophys Acta **1568**(3): 252-60.
- Iadecola, C. (1992). "Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia?" Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 3913-6.
- Iadecola, C. and F. Zhang (1996). "Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine." Am J Physiol **271**(4 Pt 2): R990-1001.
- Ignarro, L. J., et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9.
- Irikura, K., et al. (1994). "Importance of nitric oxide synthase inhibition to the attenuated vascular responses induced by topical L-nitroarginine during vibrissal stimulation." J Cereb Blood Flow Metab **14**(1): 45-8.

- Jacobson, I., et al. (1963). "The Effects Of Oxygen Under Pressure On Cerebral Blood-Flow And Cerebral Venous Oxygen Tension." Lancet **18**: 549.
- Jamieson, D. and H. A. Vandembrenk (1963). "Measurement Of Oxygen Tensions In Cerebral Tissues Of Rats Exposed To High Pressures Of Oxygen." J Appl Physiol **18**: 869-76.
- Jia, L., et al. (1996). "S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control." Nature **380**(6571): 221-6.
- Jia, L. and J. S. Stamler (1999). "Dual actions of S-nitrosylated derivative of vasoactive intestinal peptide as a vasoactive intestinal peptide-like mediator and a nitric oxide carrier." Eur J Pharmacol **366**(1): 79-86.
- Joshi, M. S., et al. (2002). "Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10341-6.
- Jourd'heuil, D., et al. (2000). "Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood." Free Radic Biol Med **28**(3): 409-17.
- Kaufmann, P. G., et al. (1981). "Enhancement of cortical evoked potentials by high atmospheric pressures of helium." Brain Res Bull **7**(4): 379-84.
- Kelm, M., et al. (1988). "Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **154**(1): 236-44.
- Kendig, J. J., et al. (1988). "Pressure reversal of anaesthesia: a synaptic mechanism." Br J Anaesth **60**(7): 806-16.
- Ko, K. R., et al. (1990). "Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex." Am J Physiol **259**(6 Pt 2): H1703-8.
- Kohl, M., et al. (2000). "Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals." Phys Med Biol **45**(12): 3749-64.
- Kohl-Bareis, M., et al. (2005). "System for the measurement of bloodflow and oxygenation in tissue applied to neurovascular coupling in brain." Proc. SPIE **5859**: 58590F.
- Lambertsen, C. J., et al. (1953). "Oxygen toxicity; effects in man of oxygen inhalation at 1 and 3.5 atmospheres upon blood gas transport, cerebral circulation and cerebral metabolism." J Appl Physiol **5**(9): 471-86.
- Liao, J. C., et al. (1999). "Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8757-61.
- Lindauer, U., et al. (1999). "Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): H799-811.
- Lindauer, U., et al. (2001). "No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation." Neuroimage **13**(6 Pt 1): 988-1001.

- Lindauer, U., et al. (1993). "Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anesthetics." Am J Physiol **264**(4 Pt 2): H1223-8.
- Liu, X., et al. (1998). "Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes." J Biol Chem **273**(30): 18709-13.
- Lopez-Barneo, J. (1996). "Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions." Trends Neurosci **19**(10): 435-40.
- Lopez-Barneo, J., et al. (1997). "Oxygen sensing by ion channels." Kidney Int **51**(2): 454-61.
- Lou, H. C., et al. (1987). "The concept of coupling blood flow to brain function: revision required?" Ann Neurol **22**(3): 289-97.
- Malonek, D. and A. Grinvald (1996). "Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping." Science **272**(5261): 551-4.
- Marley, R., et al. (2000). "A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols." Free Radic Res **32**(1): 1-9.
- McCullough, W. T., et al. (1997). "Arteriolar responses to extracellular ATP in striated muscle." Am J Physiol **272**(4 Pt 2): H1886-91.
- McMahon, T. J., et al. (2000). "Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin." J Biol Chem **275**(22): 16738-45.
- McMahon, T. J., et al. (2002). "Nitric oxide in the human respiratory cycle." Nat Med **8**(7): 711-7.
- McMahon, T. J. and J. S. Stamler (1999). "Concerted nitric oxide/oxygen delivery by hemoglobin." Methods Enzymol **301**: 99-114.
- Nagababu, E., et al. (2003). "Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction." J Biol Chem **278**(47): 46349-56.
- Nilsson, G. E., et al. (1980). "Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow." IEEE Trans Biomed Eng **27**(10): 597-604.
- Niwa, K., et al. (2000). "Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex." J Neurosci **20**(2): 763-70.
- Ogawa, S., et al. (1990). "Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields." Magn Reson Med **14**(1): 68-78.
- Omae, T., et al. (1998). "Effects of high atmospheric pressure and oxygen on middle cerebral blood flow velocity in humans measured by transcranial Doppler." Stroke **29**(1): 94-7.
- Palmer, R. M., et al. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-6.

- Palmer, R. M., et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-6.
- Panza, J. A., et al. (1993). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension." Circulation **87**(5): 1468-74.
- Patel, R. P., et al. (1999). "Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin. Effects on oxygen binding and transnitrosation." J Biol Chem **274**(22): 15487-92.
- Paulson, O. B. and E. A. Newman (1987). "Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?" Science **237**(4817): 896-8.
- Pawloski, J. R., et al. (2001). "Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity." Nature **409**(6820): 622-6.
- Peng, X., et al. (2002). "Suppression of cortical functional hyperemia to vibrissal stimulation in the rat by epoxygenase inhibitors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(5): H2029-37.
- Prichard, J., et al. (1991). "Lactate rise detected by 1H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5829-31.
- Quyyumi, A. A., et al. (1995). "Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis." J Clin Invest **95**(4): 1747-55.
- Rees, D. D., et al. (1989). "A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation." Br J Pharmacol **96**(2): 418-24.
- Reiter, C. D., et al. (2002). "Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease." Nat Med **8**(12): 1383-9.
- Roy, C. S. and C. S. Sherrington (1890). "On the Regulation of the Blood-supply of the Brain." J Physiol **11**(1-2): 85-158 17.
- Rubio, R., et al. (1975). "Relationship between adenosine concentration and oxygen supply in rat brain." Am J Physiol **228**(6): 1896-902.
- Sato, T., et al. (2001). "Changes in nitric oxide production and cerebral blood flow before development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats." Brain Res **918**(1-2): 131-40.
- Schechter, A. N., et al. (2002). "NO solutions?" J Clin Invest **109**(9): 1149-51.
- Sloan, E. P., et al. (1999). "Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial." Jama **282**(19): 1857-64.
- Sprague, R. S., et al. (1996). "ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation." Am J Physiol **271**(6 Pt 2): H2717-22.
- Stamler, J. S., et al. (1992). "Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7674-7.

- Stamler, J. S., et al. (1997). "Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient." Science **276**(5321): 2034-7.
- Thom, S. R., et al. (2003). "Stimulation of perivascular nitric oxide synthesis by oxygen." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(4): H1230-9.
- Thompson, J. K., et al. (2003). "Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex." Science **299**(5609): 1070-2.
- Torbati, D., et al. (1978). "Blood flow in rat brain during exposure to high oxygen pressure." Aviat Space Environ Med **49**(8): 963-7.
- Vaucher, E. and E. Hamel (1995). "Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry." J Neurosci **15**(11): 7427-41.
- Vaughn, M. W., et al. (2000). "Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption." J Biol Chem **275**(4): 2342-8.
- Vaughn, M. W., et al. (1998). "Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation." Am J Physiol **274**(5 Pt 2): H1705-14.
- Villringer, A., et al. (1994). "Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study." Circ Res **75**(1): 55-62.
- Vovenko, E. (1999). "Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats." Pflugers Arch **437**(4): 617-23.
- Wang, Q., et al. (1999). "Possible obligatory functions of cyclic nucleotides in hypercapnia-induced cerebral vasodilation in adult rats." Am J Physiol **276**(2 Pt 2): H480-7.
- Wolf, T., et al. (1997). "Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats." Brain Res **761**(2): 290-9.
- Wolzt, M., et al. (1999). "Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity." J Biol Chem **274**(41): 28983-90.
- Xu, X., et al. (2003). "Measurements of nitric oxide on the heme iron and beta-93 thiol of human hemoglobin during cycles of oxygenation and deoxygenation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11303-8.
- Zhang, S., et al. (2004). "The close relationship between decreases in extracellular GABA concentrations and increases in the incidence of hyperbaric oxygen-induced electrical discharge." Acta Med Okayama **58**(2): 91-5.
- Zhang, Y. and N. Hogg (2002). "Mixing artifacts from the bolus addition of nitric oxide to oxymyoglobin: implications for S-nitrosothiol formation." Free Radic Biol Med **32**(11): 1212-9.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Benjamin Rohrer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung von Hämoglobin-Deoxygenierungs-abhängigen Mechanismen der neurovaskulären Kopplung im cerebralen 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.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und für die Betreuung während meiner Promotion möchte ich PD Dr. Ute Lindauer herzlich danken. Sie hat mich jederzeit und in jeder Hinsicht unterstützt.

Prof. U. Dirnagl danke ich für die Ermöglichung der Doktorarbeit, die Überlassung der Infrastruktur und das stets gute und motivierende Arbeitsklima.

Dr. Christoph Leithner danke ich für die außerordentliche Unterstützung und Beratung in den letzten Jahren und insbesondere für die konstruktive Kritik in der Phase des Zusammenschreibens.

Dr. Heike Sellien, Dr. Georg Royl, Prof. Mathias Kohl-Bareis möchte ich für die gute Zusammenarbeit sowie bei allen Mitarbeitern für die stete Unterstützung danken.

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