

Aus dem
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Aspekte der neurovaskulären Kopplung, cerebralen Durchblutungsmessung und frühen ischämischen Hirnschädigung im Tiermodell

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie

von

Dr. med. Christoph Leithner

eingereicht: August 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Nikolaus Plesnila

2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Kleinschnitz

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	3
2. Einleitung	4
2.1. Sauerstoffversorgung des Gehirns	4
2.2. Physiologische Anpassung der Sauerstoffversorgung: neurovaskuläre Kopplung	4
2.3. Die Hämoglobin-NO-Hypothese	5
2.4. Sauerstoffminderversorgung: Pathophysiologie des Hirninfarktes	6
2.5. Methoden der cerebralen Durchblutungsmessung im Tiermodell der cerebralen Ischämie	6
2.6. Vorhersage von Hirninfarkt-Volumina durch frühe multimodale MRT	8
3. Fragestellungen	10
4. Publikationen	11
4.1. Pharmakologische Entkopplung der aktivitätsinduzierten Zunahme der cerebralen Durchblutung (CBF) von der aktivitätsinduzierten Zunahme des cerebralen Sauerstoffverbrauchs (CMRO ₂)	11
4.2. Unabhängigkeit der neurovaskulären Kopplung von der Deoxygenierung des Hämoglobins	24
4.3. Ein MRT Protokoll zur Bestimmung der cerebralen Durchblutung im murinen Schlaganfall-Modell	37
4.4. Bestimmung des 'Brain-Blood Partition Coefficient' von Wasser der Maus mittels MRT	52
4.5. Die Vorhersage des Infarkt-Volumens durch frühe MRT in einem Maus-Modell des Schlaganfalls hängt von der Ischämie-Dauer und dem Zeitpunkt der Bildgebung ab	57
5. Diskussion	66
5.1. Pharmakologische Inhibition der neurovaskulären Kopplung	66
5.2. Neurovaskuläre Kopplung und hyperbare Oxygenierung	68
5.3. Durchblutungsquantifizierung mittels FAIR-MRT	69
5.4. Infarktprädiktion durch frühe multimodale MRT im MCAO-Modell	71
6. Zusammenfassung	74
7. Literaturverzeichnis	75
Danksagung	80
Eidesstattliche Erklärung	81

1. Abkürzungen

ADC	apparent diffusion coefficient
ADP	Adenosindiphosphat
ASL	arterial spin labeling
ATA	atmospheres absolute (absoluter Druck in Atmosphären)
ATP	Adenosintriphosphat
BOLD	blood oxygen level dependent
CBF	cerebral blood flow (cerebrale Durchblutung)
CBV	cerebral blood volume (cerebrales Blutvolumen)
CMRO ₂	cerebral metabolic rate of oxygen
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DSC	dynamic susceptibility contrast
DWI	diffusion weighted imaging
EET	epoxyeicosatrienoic acid
FAIR	Flow Sensitive Alternating Inversion Recovery
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomografie
IAP	Iodoantipyrin
IR	inward rectifier
LASCA	Laser speckle contrast analysis
MRT	Magnetresonanztomografie
NO	Stickstoffmonoxid
PET	Positronenemissionstomografie
SPECT	Single positron emission computed tomography

2. Einleitung

2.1. Sauerstoffversorgung des Gehirns

Das Gehirn ist eines der metabolisch aktivsten Organe des Körpers. Ein großer Teil der Energie wird für die Aktivität der Nervenzellen verbraucht, insbesondere für die Wiederherstellung des Membranpotentials nach dem Ablauf eines Aktionspotentials sowie für die synaptische Erregungsübertragung. Die Aufrechterhaltung der Integrität der Zellen und andere, nicht unmittelbar an der Informationsverarbeitung beteiligte Prozesse, verbrauchen deutlich weniger Energie.^{1,2} Universeller Energieträger ist Adenosintriphosphat (ATP), das im Gehirn fast ausschließlich durch aeroben Metabolismus von Glukose gewonnen wird.

Da Sauerstoff schlecht in Wasser löslich ist und keine relevanten Konzentrationen Sauerstoffbindender Proteine im Hirngewebe vorhanden sind, kann der im Hirngewebe gelöste Sauerstoff die ATP-Produktion nur für einen extrem kurzen Zeitraum (etwa eine Sekunde lang) sicher stellen, wenn der Transport von Sauerstoff über den Blutkreislauf ausfällt.³ Daher haben sich in der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, die eine ununterbrochene, bedarfsadaptierte Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff ermöglichen. Ein wesentlicher Prozess ist die sogenannte Autoregulation der cerebralen Durchblutung,^{4,5} d.h. die Anpassung des Gefäßdurchmessers der hirnversorgenden Arterien an den systemischen Blutdruck, so dass über einen weiten Blutdruck-Bereich die cerebrale Durchblutung konstant bleibt.

2.2. Physiologische Anpassung der Sauerstoffversorgung: neurovaskuläre Kopplung

Ein weiterer zentraler, noch in vielen Teilen unverstandener Mechanismus ist die neurovaskuläre Kopplung.^{6,7} Mit diesem Begriff wird die Anpassung der regionalen cerebralen Durchblutung an die lokale Nervenzellaktivität bezeichnet. Steigt die Nervenzellaktivität an, so nimmt die regionale Durchblutung zu. Da das Ausmaß der Blutflusszunahme das Ausmaß der Zunahme des Sauerstoffverbrauchs überschreitet, resultiert eine lokale Hyperoxygenierung des Hirngewebes mit Zunahme des oxygenierten Hämoglobins und Abnahme des deoxygenierten Hämoglobins.⁸

Besondere Bedeutung hat die neurovaskuläre Kopplung durch die Entwicklung moderner, meist MRT-basierter Verfahren zur in-vivo Darstellung der regionalen Hirnaktivität erlangt. Die so genannte funktionelle MRT (fMRT) stellt die Hirnaktivität indirekt anhand der lokalen Durchblutungs- oder Blutoxygenierungsmessung dar. Ein häufig verwendetes Verfahren wird als BOLD (blood oxygen level dependent) fMRT bezeichnet, hierbei wird die lokale Abnahme des deoxy-Hämoglobins zur Darstellung der Hirnaktivität verwendet.⁹ Für ein korrekte Ableitung

der zugrundeliegenden Veränderungen der regionalen neuronalen Aktivität aus Durchblutungs- oder Blutoxygenierungsmessungen ist ein detailliertes Verständnis der neurovaskulären Kopplung wichtig.

Die Mechanismen, die bei Zunahme der Nervenzellaktivität zu einer Zunahme des rCBF führen, sind in vielen Details nach wie vor unverstanden. Es ist wahrscheinlich, dass mehrere parallele Signalwege existieren⁷ und unterschiedliche Zelltypen (Neurone, Interneurone, Gliazellen, Perizyten u.a.) involviert sind.¹⁰⁻¹⁴ In-vivo- und in-vitro-Experimente haben gezeigt, dass Stickstoffmonoxid (NO) vasodilatatorische Effekte besitzt und ein wesentlicher Mediator der Blutflussregulation ist. Tierexperimentelle Studien konnten belegen, dass eine Blockade der NO-Produktion (durch Inhibition der neuronalen NO-Synthase) das Ausmaß des relativen Anstiegs der Durchblutung (CBF) auf neuronale Aktivitätszunahme halbiert, wobei NO als Modulator, nicht Mediator der Durchblutungszunahme fungiert.¹⁵ Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Cyclooxygenase (sowohl der COX-1 als auch der COX-2) die Durchblutungszunahme vermindern, aber nicht vollständig aufheben kann.^{16,17} Infolge der neuronalen Aktivitätssteigerung wird vermehrt ATP in ADP und Adenosin gespalten. Tierexperimentelle Studien belegen, dass Adenosin ebenfalls eine cerebrale Gefäßdilatation bewirkt.¹⁸ Ein weiterer, an der neurovaskulären Kopplung beteiligter Signaltransduktionsweg ist die Synthese von EET (epoxyeicosatrienoic acid) über die Cytochrom-P450-Epoxygenase.¹⁹ Vermehrte Nervenzellaktivität führt zur Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration. In-vitro und in-vivo-Studien konnten eine Beteiligung unterschiedlicher Kaliumkanäle an der Regulation des Blutflusses nachweisen.²⁰

2.3. Die Hämoglobin-NO-Hypothese

Hämoglobin bindet nicht nur Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, sondern kann auch NO binden. Stamler und Kollegen konnten zeigen, dass die Affinität des Hämoglobins für die Bindung von NO (an die als ‚βCys93‘ bezeichnete Stelle des Hämoglobins) im oxygenierten Zustand größer ist als im deoxygenierten.²¹ Die Autoren fanden Belege dafür, dass die Deoxygenierung des Hämoglobins mit einer Abgabe von NO in den Blutstrom verbunden ist. Erhöhter Sauerstoffverbrauch im Gewebe könnte daher über die vermehrte Deoxygenierung von Hämoglobin zu einer vermehrten Freisetzung von NO und somit zu einer Vasodilatation und erhöhter Durchblutung führen. Mehrere tierexperimentelle in-vitro und in-vivo-Studien stützen diese Theorie. Die Durchblutungsregulation über an Hämoglobin gebundenes NO wäre ein universeller, von im Gewebe produzierten Mediatoren unabhängiger Mechanismus. In ähnlicher

Weise könnte die NO-Freisetzung aus Nitrit durch die Nitrit-Reduktase-Aktivität des deoxy-Hämoglobins unabhängig von Gewebefaktoren eine Adaptation der Durchblutung an den Sauerstoffverbrauch bewirken.^{22,23} Auch eine Freisetzung von ATP aus Erythrozyten infolge einer Deoxygenierung des Hämoglobins und hierdurch vermittelte Vasodilatation wird diskutiert.²⁴ Die Bedeutung der experimentellen Hinweise für eine an die Deoxygenierung von Hämoglobin gekoppelte Durchblutungsregulation ist allerdings umstritten.^{23,25-29}

2.4. Sauerstoffminderversorgung: Pathophysiologie des Hirninfarktes

Beim Hirninfarkt kommt es zu einem plötzlichen Verschluss einer hirnversorgenden Arterie entweder durch lokale Thrombose oder Embolie eines Thrombus aus einem proximal gelegenen Gefäßsegment oder der Herzen. Häufigste Ursachen sind arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwände und kardiale Embolien bei (intermittierendem) Vorhofflimmern. Durch den Gefäßverschluss sinkt die cerebrale Durchblutung in dem durch die Arterie versorgten Hirnareal. Das Ausmaß der Minderperfusion hängt dabei von der zusätzlichen Versorgung dieses Hirnareals über Kollateralgefäße ab. Je nach Ausmaß der Minderperfusion unterscheidet man eine Zone der benignen Oligämie (Durchblutung vermindert, Überleben des Gewebes aber nicht unmittelbar gefährdet), die Penumbra (Durchblutung kritisch vermindert, Gewebe noch nicht irreversibel geschädigt, aber drohende irreversible Gewebeschädigung falls keine Verbesserung der Durchblutung eintritt) und den Infarktkern (Durchblutung bereits so lange kritisch vermindert, dass eine irreversible Schädigung des Gewebes eingetreten ist). Entscheidend sind dabei zwei Faktoren: Dauer und Ausmaß der Minderperfusion. Die kritische Grenze des CBF liegt bei etwa 20-30 ml Blut/(100g Hirngewebe*min) - fällt der CBF unter diese Grenze treten in Abhängigkeit von der Schwere und Dauer der Minderperfusion irreversible Schäden auf,³⁰⁻³² entweder durch unmittelbares Absterben der Zellen (Nekrose) oder im Verlauf von Stunden bis Tagen über eine Kaskade sekundärer Schädigungsmechanismen.³³

2.5. Methoden der Blutflussmessung im Tiermodell der cerebralen Ischämie

Ein wesentlicher Bestandteil der Entwicklung von Therapien gegen Hirninfarkte ist das detaillierte Verständnis der Pathophysiologie der Gewebeschädigung während und nach einer Phase der Minderperfusion. Die Messung der cerebralen Durchblutung ist daher ein wichtiges Grundinstrument für die experimentelle Schlaganfallforschung. Gleichzeitig ist die exakte Quantifizierung der Durchblutung in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung trotz

jahrzehntelanger Forschung weiterhin schwierig. Es stehen invasive und nicht-invasive, in-vivo und ex-vivo Verfahren zu Verfügung, z.B. experimentell Laser-Doppler- oder Laser-Speckle-Verfahren,^{34,35} autoradiographische Verfahren, experimentell und klinisch computertomografische Verfahren³⁶ und PET/SPECT.^{37,38} Ein besonders attraktives nicht-invasives Verfahren ist die Magnetresonanztomografie (MRT). Die Durchblutungsmessung mittels MRT kann mit intravenös appliziertem Kontrastmittel als sogenannte DSC (dynamic susceptibility contrast) MRT oder als ‚arterial spin labeling‘ (ASL) MRT durchgeführt werden, wobei auf unterschiedliche Art magnetisch angeregtes Blut als ‚endogenes Kontrastmittel‘ verwendet wird.³⁹ Die nicht (exogen) Kontrastmittel basierten Verfahren bieten den Vorteil der Durchführbarkeit ohne Anlage eines venösen Zugangs und die Möglichkeit, die CBF-Messung mehrfach in kurzen Abständen zu wiederholen.

Eine nicht Kontrastmittel basierte MRT-Methode zur CBF-Messung ist die sogenannte FAIR (flow sensitive alternating inversion recovery) Sequenz.⁴⁰ Grundlage der FAIR-MRT ist die Beeinflussung der Magnetisierung in einer dünnen Mess-Schicht (‚Slice‘) des Hirngewebes durch einfließende Wasserprotonen. Wird zuvor ein magnetischer Anregungsimpuls nur im Bereich der Mess-Schicht (‚imaging slice‘) appliziert, so fließen mit dem cerebralen Blutfluss magnetisch angeregte Wasserprotonen aus der Mess-Schicht heraus und nicht magnetisch angeregte in die Mess-Schicht hinein. Je höher die cerebrale Durchblutung ist, desto rascher nimmt so die Magnetisierung der Mess-Schicht ab. Wurde zuvor nicht nur die Mess-Schicht magnetisch angeregt, sondern ein großes umliegendes Volumen, so werden aus der Schicht herausfließende magnetisch angeregte Wasserprotonen durch ebenso magnetisch angeregte ersetzt, so dass die Magnetisierung vom Blutfluss unabhängig bleibt. Die Bestimmung des CBF erfolgt dann über einen Vergleich der Geschwindigkeit der Magnetisierungsänderung (Zeitkonstante T₁) zwischen den beiden Anregungsarten: Im Mausmodell ergibt sich dabei der Vorteil, dass aufgrund der geringen Größe der Mäuse der gesamte Körper magnetisch angeregt werden kann und so eine nahezu ideale, CBF-unabhängige Messung der T₁ des Hirngewebes durchgeführt werden kann.⁴¹ Die Formel zur Berechnung des CBF mittels FAIR-MRT ist

$$(1) \quad CBF = \lambda \times \left(\frac{1}{T_{1sel}} - \frac{1}{T_{1non sel}} \right)$$

Bestimmung des cerebralen Durchblutung mittels FAIR-MRT: CBF - cerebral blood flow, λ - ‚brain blood partition coefficient‘ für Wasser, T_{1sel} - Relaxationszeit T₁ bei selektiver Anregung des Imaging-Slices, T_{1non sel} - Relaxationszeit T₁ bei nichtselektiver Anregung des Imaging-Slices.

Dabei bezeichnet λ den Verteilungskoeffizienten von Wasser zwischen Blut und Hirngewebe (brain blood partition coefficient). Dieser beträgt beim Menschen 0.9 ml/g. Er kann auf verschiedene Arten experimentell bestimmt werden, in vivo mittels protonengewichteter MRT und ex-vivo mittels Messung des Wassergehaltes im Hirngewebe. Die in-vivo-Bestimmung mittels MRT ermöglicht es dabei, regionale Unterschiede darzustellen. Relevante regionale Unterschiede fanden sich im Gehirn des Menschen: In der grauen Substanz lag der BBPC für Wasser bei 0.99 ml/g, in der weißen Substanz bei 0.82 ml/g.⁴²

2.6. Vorhersage von Hirninfarkt-Volumina durch frühe multimodale MRT

Neben der Durchblutungsmessung, die das Ausmaß einer kritischen Minderperfusion des Gehirngewebes in der Frühphase des Hirninfarktes erfassen kann, ist die frühe Darstellung der bereits eingetretenen Gewebeschädigung von entscheidender Bedeutung für die frühe Charakterisierung des Hirninfarktes. Sowohl in der klinischen Routine als auch in der Schlaganfall-Forschung hat sich die diffusionsgewichtete MRT als Marker der frühen schweren ischämischen Gewebeschädigung durchgesetzt. Die diffusionsgewichtete MRT ('diffusion weighted imaging', DWI) beruht auf der Messung der Diffusionseigenschaften der Wasserprotonen im Gewebe.⁴³ Es kann der apparente Diffusionskoeffizient (apparent diffusion coefficient, ADC) gemessen werden. Die Ursachen für die Reduktion des ADC während einer Ischämie sind pathophysiologisch nicht ganz verstanden, einen wesentlichen Beitrag leistet wahrscheinlich die Zellschwellung, die infolge des Versagens der Na/K-ATPase entsteht.^{44,45} Diese tritt bereits wenige Minuten nach Eintritt einer schweren Minderperfusion des Gewebes auf. Daher ist die DWI/ADC-MRT ein besonders früher Marker für eine schwere, häufig irreversible Gewebeschädigung. Allerdings sind insbesondere tierexperimentell vorübergehende Normalisierungen des ADC nach Reperfusion beschrieben, trotz späteren Nachweises eines Hirninfarktes in der entsprechenden Region.^{46,47}

Einige tierexperimentelle Schlaganfallstudien konnten an Ratten zeigen, dass die Größe der frühen ADC-Läsion gut mit der Größe des finalen Hirninfarktes korreliert.^{48,49} Dabei beeinflussen die Dauer der Ischämie und der Messzeitpunkt in Relation zum Beginn der Ischämie die Genauigkeit, mit der das spätere Hirninfarktvolumen vorhergesagt werden kann. Die Kombination unterschiedlicher Informationen (insbesondere CBF und ADC) über die frühe Ischämie und Anwendung komplexer mathematischer Modelle kann möglicherweise der Vorhersagegenauigkeit weiter verbessern.^{48,50-52}

Eine möglichst genaue frühe Prädiktion der Hirninfarktvolumina könnte einen wichtigen Beitrag

zur experimentellen Schlaganfallforschung leisten. Viele Faktoren haben dazu beigetragen, dass eine erfolgreiche Translation von Ergebnissen der experimentellen Schlaganfallforschung in die Klinik in den letzten Jahren nicht stattgefunden hat.⁵³⁻⁵⁵ Zu diesen zählen unter anderem methodische Mängel wie niedrige Tierzahlen, fehlende Verblindung, Fehlen von klaren, prädefinierten Kriterien für den Ein- und Ausschluss von Tieren in die Auswertung einer Studie,⁵⁶ Publikations-Bias (negative Studien werden häufig nicht publiziert) und schlecht begründete Wirksamkeitshypothesen (niedrige a-priori Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis).⁵⁷ Ein möglicher Ko-Faktor ist die Variabilität der Größe der in experimentellen Schlaganfallstudien induzierten Hirninfarkte.⁵⁸ Diese kommt unter anderem durch eine hohe Variabilität der Gefäßarchitektur zustande,^{58,59} und kann durch Modifikation der Technik, Standardisierung der Prozedur und Training der Operateure nur bedingt reduziert werden. Für präklinische Schlaganfalltherapie-Studien, bei denen die Therapie nach Beginn der Ischämie erfolgt, könnte eine frühe genaue Charakterisierung der Ischämie dazu beitragen, einen möglichen Einfluss der hohen Variabilität des induzierten Schlaganfallvolumens auf die Beurteilung des untersuchten Therapieeffektes zu reduzieren.

3. Fragestellungen

- 1) Ist eine kombinierte Blockade bekannter Singaltransduktionswege der neurovaskulären Kopplung in der Lage, den CBF-Anstieg infolge neuronaler Aktivierung vollständig zu verhindern? Ist die physiologische Zunahme des Sauerstoffverbrauchs infolge neuronaler Aktivierung trotz Blockade des physiologischen CBF-Anstiegs möglich?
- 2) Ist die Abgabe von an Hämoglobin gebundenem NO infolge der Deoxygenierung des Hämoglobins während der kapillären Passage durch das Gehirn an der Durchblutungsregulation beteiligt? Lässt sich die neurovaskuläre Kopplung blockieren, wenn unter hyperbarer Oxygenierung keine Deoxygenierung des Hämoglobins mehr stattfindet?
- 3) Kann die ‚flow sensitive alternating inversion recovery‘ (FAIR)-MRT die Durchblutung im Gehirn der Ratte in vivo quantifizieren? Wie verhalten sich die mittels dieser in-vivo-Methode errechneten CBF-Werte zu den mit der ¹⁴C-Autoradiografie ex vivo bestimmten Werten?
- 4) Ist der ‚Blood-Brain Partition Coefficient‘ für Wasser, der zur Berechnung des CBF mittels FAIR-MRT verwendet wird, für Mäuse und Menschen gleich oder unterschiedlich?
- 5) Wie genau lässt sich mittels früher, multimodaler MRT-Bildgebung (diffusionsgewichtete MRT, Blutflussmessung, u.a.) in einem Schlaganfall-Modell der Maus das Volumen von Hirninfarkten vorhersagen? Wie stark hängt die Vorhersage vom Zeitpunkt der Messung und von der Dauer der Ischämie ab? Kann diese Information zur Verbesserung der Qualität tierexperimenteller Schlaganfallstudien verwendet werden?

4. Publikationen

4.1. Pharmakologische Entkopplung der aktivitätsinduzierten Zunahme der cerebralen Durchblutung (CBF) von der aktivitätsinduzierten Zunahme des cerebralen Sauerstoffverbrauchs (CMRO₂)

Leithner C, Roysl G, Offenhauser N, Fächtemeier M, Kohl-Bareis M, Villringer A, et al. Pharmacological uncoupling of activation induced increases in CBF and CMRO₂. J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Feb;30(2):311–22. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2009.211>

Frühere Studien aus der eigenen und anderen Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass mehrere Signalkaskaden an der neurovaskulären Kopplung, d.h. der regionalen Dilatation der kleinen Arterien und Arteriolen infolge erhöhter neuronaler Aktivität, beteiligt sind. In dieser Arbeit untersuchten wir tierexperimentell mit optischen Methoden, ob eine parallele Inhibition der bekannten Signalkaskaden in der Lage ist, die neurovaskuläre Kopplung vollständig zu blockieren und ob ein erhöhter Sauerstoffverbrauch trotz Blockade des CBF-Anstiegs möglich ist.

Wir implantierten in Narkose 24 Ratten ein kraniales Fenster und konnten mittels Laser-Doppler-Flussmessung und optischer Spektroskopie die Veränderungen des CBF, CBV sowie der Konzentration von oxy- und deoxy-Hämoglobin nach elektrischer Vorderpfotenstimulation mit unterschiedlichen Stimulationsintensitäten bestimmen. Aus den Veränderungen von CBF, CBV und deoxy-Hämoglobin berechneten wir die Änderung der CMRO₂. Bekannte Signalkaskaden der neurovaskulären Kopplung blockierten wir durch Superfusion von Inhibitoren der NO-Synthase, Adenosin-Rezeptoren, Cyclooxygenase, CYP-450 Epoxygenase sowie der ‚Inward Rectifier‘ (IR)- Kaliumkanäle.

Die kombinierte Blockade war in der Lage, die Blutflussantwort um zwei Drittel zu reduzieren. Eine Beeinträchtigung der neuronalen Aktivitätsänderung fanden wir anhand der Messung der evozierten Potenziale nicht. Die stimulationsbedingte Zunahme der CMRO₂ blieb ebenfalls unverändert.

Im Widerspruch zu einem physiologischen Modell der neurovaskulären Kopplung deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die überraschend starke Durchblutungszunahme nach neuronaler Aktivierung nicht notwendige Voraussetzung ist für die moderate Zunahme des Sauerstoffverbrauchs.

4.2. Unabhängigkeit der neurovaskulären Kopplung von der Deoxygenierung des Hämoglobins

Lindauer U, Leithner C*, Kaasch H, Rohrer B, Foddis M, Füchtemeier M, et al. Neurovascular coupling in rat brain operates independent of hemoglobin deoxygenation. J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Apr;30(4):757–68. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2009.259> *equal contribution.*

Tierexperimentelle Studien und in-vitro-Untersuchungen konnten in den letzten Jahren eine interessante Eigenschaft des Hämoglobins herausarbeiten: Die Bindungsaffinität für Stickstoffmonoxid verändert sich mit der Oxygenierung: Im oxygenierten Zustand ist die Affinität groß, im deoxygenierten Zustand gering. Stickstoffmonoxid kann daher mit Abgabe des Sauerstoffs ebenfalls vom Hämoglobin abgegeben werden. Prinzipiell stünde somit ein universeller Mechanismus der Durchblutungsregulation zur Verfügung: Steigt der Sauerstoffverbrauch in einem Gewebe, wird vermehrt Sauerstoff von Hämoglobin abgegeben, damit auch vermehrt NO. Das NO könnte zu einer Dilatation der kleinen Arterien/Arteriolen führen und der Blutfluss damit (adaptiert an den Sauerstoffverbrauch) steigen.

Diese hochkarätig publizierte Hypothese überprüften wir experimentell als möglichen Mechanismus der neurovaskulären Kopplung. 35 Ratten wurde unter Narkose ein kraniales Fenster implantiert. Unter normobaren, normoxischen sowie hyperbaren (3 ATA), hyperoxischen Bedingungen bestimmten wir die Blutflussantwort im somatosensorischen Kortex auf elektrische Vorderpfotenstimulation mittels Laser-Doppler-Flussmessung. Parallel wurden die Konzentrationsänderung von oxy- und deoxy-Hämoglobin mit optischer Spektroskopie und die evozierten Potenziale als Maß für die evozierte neuronale Aktivität gemessen.

Trotz erfolgreicher Ausschaltung der Deoxygenierung des Hämoglobins unter hyperbaren, hyperoxischen Bedingungen – das Gehirn wird unter diesen Bedingungen über physikalisch im Blut gelösten Sauerstoff versorgt – fanden wir unveränderte Blutflussantworten und unveränderte evozierte Potenziale.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Abgabe von NO während der Deoxygenierung des Hämoglobins keinen wesentlichen Beitrag zur neurovaskulären Kopplung leistet.

4.3. Ein MRT Protokoll zur Bestimmung der cerebralen Durchblutung im murinen Schlaganfall-Modell

Leithner C, Gertz K*, Schröck H, Priller J, Prass K, Steinbrinck J, et al. A flow sensitive alternating inversion recovery (FAIR)-MRI protocol to measure hemispheric cerebral blood flow in a mouse stroke model. Exp Neurol. 2008. Mar;210(1):118-27. * equal contribution <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.003>*

Ob Gehirngewebe eine Phase der Durchblutungsstörung überlebt oder ob ein Schlaganfall entsteht, hängt kritisch vom Ausmaß und der Dauer der Minderperfusion ab. Die Quantifizierung der cerebralen Durchblutung (CBF) ist ein daher wichtiges Instrument für die experimentelle Schlaganfallforschung. Gleichzeitig ist eine Quantifizierung des CBF in vivo eine große Herausforderung. Gut etabliert sind für die Messung am Menschen nuklearmedizinische Verfahren, die allerdings auf das experimentelle Schlaganfallmodell der Maus aufgrund der geringen Größe des Mäusegehirns nicht einfach übertragbar sind. Zahlreiche Studien verwenden daher das ex-vivo-Verfahren der ¹⁴C-IAP-Autoradiografie. Eine serielle Messung ist aufgrund des ex-vivo Charakters dieser Technik aber nicht möglich.

Mit der MRT steht eine attraktive, drei-dimensionale, hochauflösende Bildgebung des Gehirns zur Verfügung. Durch geeignete Wahl der Anregungs- und Messparameter kann die Signalintensität vom CBF abhängig gemacht werden. Am Menschen wurde ein nicht Kontrastmittel-abhängiges Verfahren, die ‚flow sensitive alternating inversion recovery‘ (FAIR)-MRT entwickelt, das eine Quantifizierung des CBF erlaubt.

Wir testeten in einem 7-Tesla-Tier-MRT die Quantifizierung des CBF mittels FAIR im Schlaganfallmodell der Maus. Eine breite Variation des CBF wurden durch Verschluss der A. cerebri media und unterschiedliche Narkosearten erreicht. Unter gleichen Bedingungen wurde der CBF mittels ¹⁴C-IAP-Autoradiografie bestimmt.

Der Vergleich beider Methoden zeigte eine lineare Beziehung zwischen den mittels FAIR-MRT und ¹⁴C-IAP-Autoradiografie quantifizierten Werten der cerebralen Durchblutung. Die FAIR-MRT-Werte lagen dabei ca. 30% über den Werten der Autoradiografie. Mit dem von uns verwendeten Setup war eine verlässliche Quantifizierung nur mit über eine Hemisphäre gemittelten Werten möglich.

4.4. Bestimmung des 'Brain-Blood Partition Coefficient' von Wasser der Maus mittels MRT

Leithner C, Müller S, Fuchtemeier M, Lindauer U, Dirnagl U, Roysl G. Determination of the brain-blood partition coefficient for water in mice using MRI. J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Nov;30(11):1821–4. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2010.160>

Der Vergleich der über die FAIR-MRT und der über die ¹⁴C-IAP-Autoradiografie bestimmten cerebralen Durchblutung hatte in einem vorangegangenen Projekt (siehe 4.3.) höhere Werte für die FAIR-MRT ergeben. Die Berechnung des CBF über die FAIR-MRT-Methode verwendet eine Konstante, den ‚Brain-Blood Partition Coefficient‘ (BBPC) für Wasser. Dieser ist für Menschen bestimmt worden, da die CBF-Messung mittels Positronen-Emissions-Tomografie (PET) beim Menschen ebenfalls auf den BBPC zurückgreift. Ob dieser Wert sich zwischen Mensch und Maus unterscheidet war nicht bekannt.

Wir bestimmten den BBPC für Wasser mit zwei unterschiedlichen Methoden: In vivo mittels protonengewichteter MRT – hierzu wurden parallel zur Messung von Mäusegehirnen Wasser-Deuterium-Kalibrationsproben gemessen. Ex-vivo bestimmten wir den Wassergehalt des Mäusegehirns durch Wiegen der Gehirne vor und nach Trocknung.

Die Ergebnisse beider Methoden zeigten übereinstimmend, dass keine wesentliche Abweichung des über das gesamte Gehirn gemittelten ‚brain-blood partition coefficients‘ für Wasser zwischen Mensch und Maus besteht (Mensch: 0.9 ml/g, Maus: 0.89-0.93 ml/g).

Die Bestimmung mittels MRT ermöglichte uns eine dreidimensionale Darstellung des BBPC im Gehirn der Maus: Im Gegensatz zum Menschen fanden sich keine größeren Unterschiede zwischen Hirnregionen. Ursache hierfür ist die im Vergleich zum menschlichen Gehirn weitgehend homogene Zusammensetzung der unterschiedlichen Regionen im Gehirn der Maus (von kleinen Regionen abgesehen), ohne eine zum Menschen analoge Trennung zwischen grauer und weißer Substanz. Im Gegensatz zum Menschen bedeutet dies, dass eine Anpassung der CBF-Berechnung an den BBPC der jeweiligen Hirnregion bei der Maus nicht notwendig ist.

4.5. Die Vorhersage des Infarkt-Volumens durch frühe MRT in einem Maus-Modell des Schlaganfalls hängt von der Ischämie-Dauer und dem Zeitpunkt der Bildgebung ab

Leithner C, Fuchtemaier M, Jorks D, Müller S, Dirnagl U, Rojl G. Infarct volume prediction by early MRI in a murine stroke model depends on ischemia duration and time of imaging. Stroke 2015 Nov;46(11):3249-3259. <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007832>

Zahlreiche tierexperimentelle Studien konnten für verschiedene neuroprotektive Substanzen eine Wirksamkeit in der akuten Schlaganfall-Therapie nachweisen. Eine erfolgreiche Anwendung bei Schlaganfall-Patienten gelang dennoch nicht. Eine mögliche Ursache besteht darin, dass experimentelle Schlaganfallstudien meist nicht nach den gleichen strengen Qualitätskriterien (Randomisierung, Verblindung etc.) durchgeführt werden wie klinische Studien, positive Studien häufiger publiziert werden als negative und somit Zufallsbefunde und Übertreibungen der Effektstärke wahrscheinlich häufig vorkommen.⁵⁷

Ein Grund dafür, dass trotz fehlender Wirksamkeit einer Substanz Behandlungs- und Placebo-Gruppe überhaupt deutlich unterschiedliche Infarktgrößen aufweisen können, liegt in der trotz der Standardisierung des experimentellen Schlaganfalls (MCAO-Modell mit definierter Dauer und Lokalisation des Gefäßverschlusses) deutlichen Variabilität der Infarktgrößen (Standardabweichung häufig ca. 30% der mittleren Infarktgröße). Ursachen hierfür sind unter anderem die variable Gefäßanatomie, Schwankungen in der Effektivität der MCAO (Erfahrung und Geschick des Operateurs) und Variabilität der sekundären Schadenskaskaden. Eine Möglichkeit, die Variabilität der im MCAO-Modell induzierten Infarktgrößen zu kontrollieren ist die frühe Darstellung der Ischämie mittels MRT. Hierfür kommen unterschiedliche Sequenzen, insbesondere die diffusionsgewichtete MRT (mit ADC-Quantifizierung) und die Perfusionsbildgebung in Betracht.

An insgesamt 83 Mäusen mit unterschiedlichen Dauern der MCAO (45 und 90 Minuten) und unterschiedlichen Zeitpunkten der MRT (während der MCAO, 3 Stunden und 6 Stunden nach Beginn der MCAO) untersuchten wir, wie stark die Größe der frühen ischämischen Läsion die spätere Infarktgröße determiniert und welche MR-Sequenz sich für die Vorhersage der Infarktgröße am besten eignet.

Wir fanden, dass die Größe der ADC-Läsion während der MCAO oder 6 Stunden nach Beginn der MCAO die finale Infarktgröße bei einer Dauer der MCAO von 90 Minuten weitgehend determiniert. Aufgrund einer transienten ADC-Normalisierung korreliert das Volumen der ADC Läsion drei Stunden nach Beginn einer 90 minütigen MCAO deutlich schlechter mit der finalen Infarktgröße. Bei MCAO von 45 Minuten Dauer besteht für alle Zeitpunkte eine deutlich schlechtere Korrelation von früher ADC-Läsion und finaler Infarktgröße.

Unsere Daten könnten zur Verbesserung der Interpretation von experimentellen Schlaganfallstudien beitragen: Durch frühe Bestimmung der initialen Ausdehnung der durch MCAO induzierten Ischämie, entweder während der MCAO oder sechs Stunden danach, könnte ein möglicher Confounder (unterschiedliches Volumen der induzierten Ischämie) erkannt werden, der zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen beitragen kann.

5. Diskussion

Die hier vorgestellten Arbeiten beschäftigen sich mit verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Aspekten der cerebralen Durchblutung: Physiologisch ist dieser an die Aktivität der Nervenzellen im Gehirn gekoppelt, ein Phänomen, dass als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet wird. Besondere Aufmerksamkeit hat die neurovaskuläre Kopplung mit der Entwicklung der funktionellen MRT zu Beginn der 1990er Jahre erlangt, da die wichtigsten MRT-Techniken zur Darstellung der Hirnaktivität diese nicht direkt messen können, sondern die daran gekoppelten Veränderungen der Durchblutung oder der Blutoxygenierung bestimmen. Ein detailliertes Verständnis der neurovaskulären Kopplung bildet daher die Grundlage der Interpretation von Ergebnissen der fMRT-Studien. Pathophysiologische Bedeutung hat die cerebrale Durchblutung insbesondere, da eine starke Reduktion des CBF (meist durch thrombotischen oder embolischen Verschluss einer hirnversorgenden Arterie) die Ursache von Schlaganfällen ist. Techniken zur Darstellung des cerebralen Blutflusses, insbesondere in-vivo anwendbare Techniken, sind daher ein wichtiges Instrument der experimentellen Schlaganfallforschung. Die MRT bietet dabei einzigartige Möglichkeiten, die Veränderungen des Blutflusses und parallel damit einhergehende, frühe ischämische Gewebeveränderungen räumlich und zeitlich hoch aufgelöst in vivo darzustellen.

5.1. Pharmakologische Inhibition der neurovaskulären Kopplung

Die Mechanismen, die die sehr rasche Blutflussantwort auf eine neuronale Aktivierung einer Hirnregion vermitteln, sind trotz zahlreicher tierexperimenteller Studien nicht vollständig verstanden. Unterschiedliche Signalkaskaden wurden identifiziert: NO, ein potenter Vasodilatator in der systemischen Zirkulation ist auch im Gehirn an der Durchblutungsregulation beteiligt. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren über den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat kann die neuronale NO-Synthese aktivieren.⁶⁰ Die Blutflussantwort auf funktionelle Stimulation wird unter Blockade der NO-Synthese deutlich kleiner,⁶¹ dabei fungiert NO als Modulator der Blutflussantwort.¹⁵ Adenosin fällt beim Abbau energiereicher Adenosin-Nucleotide bei erhöhtem Stoffwechsel von Zellen an und ist auch im Gehirn an der Durchblutungsregulation und der neurovaskulären Kopplung beteiligt.^{62,63} Eine weitere Signalkaskade der Kopplung neuronaler Aktivität an cerebrale Durchblutung läuft unter

Beteiligung metabotroper Glutamat-Rezeptoren auf Astrozyten ab, die zur Freisetzung von Arachidonsäure und über CYP-450-Epoxygenase zur Bildung von EET (epoxyeicosatrienoic acid) und über Cyclooxygenase zur Bildung von Prostaglandinen führen.⁶⁴ Eine Hemmung dieser Signaltransduktionswege führte tierexperimentell ebenfalls zu einer Reduktion der CBF-Antworten auf neuronale Aktivierung.^{16,17,19,65} Eine wichtige Rolle für die Vasodilatation im Rahmen der neurovaskulären Kopplung konnte experimentell auch für Inward-Rectifier Kalium-Kanäle gezeigt werden.⁶⁶

Wir konnten zeigen, dass auch eine kombinierte pharmakologische Inhibition dieser bekannten Signalkaskaden die neurovaskuläre Kopplung nicht vollständig ausschaltet.⁶⁷ Unsere Daten legen nahe, dass noch weitere Signalkaskaden beteiligt sein könnten.

Durch simultane Messung der Konzentrationsveränderungen von Oxy- und Deoxyhämoglobin und der cerebralen Durchblutung konnten wir vor und nach pharmakologischer Inhibition der neurovaskulären Kopplung die Veränderung des cerebralen Sauerstoffmetabolismus ($CMRO_2$) unter neuronaler Aktivitätssteigerung (elektrische Vorderpfotenstimulation) berechnen. Die dabei verwendete Methode zur Bestimmung der relativen $CMRO_2$ -Veränderung aus Messung der Änderungen von CBF, CBV und Oxygenierung mittels optischer Methoden hatten wir zuvor experimentell anhand des gut bekannten Zusammenhangs zwischen $CMRO_2$ und Körperkerntemperatur in einem Hypothermie-Modell validiert.⁶⁸ Es zeigte sich, dass trotz erheblicher Beeinträchtigung der neurovaskulären Kopplung - Verminderung des CBF-Anstieges auf neuronale Aktivierung um etwa zwei Drittel – die $CMRO_2$ unverändert zu den Ausgangsbedingungen ansteigen konnte. Dieser Befund legt nahe, dass der starke CBF-Anstieg und die Hyperoxygenierung des Gewebes nicht für die (relativ geringe) Zunahme der $CMRO_2$ benötigt wird, die durch die Steigerung der neuronalen Aktivität unter typischen experimentellen Bedingungen hervorgerufen wird. Unsere Daten sprechen daher gegen eine von Buxton und Kollegen entwickelte Hypothese („oxygen diffusion limitation model“): Eine Steigerung der $CMRO_2$ sei (aufgrund der limitierten Sauerstoff-Diffusion von den Kapillaren ins Gewebe) nur durch eine überproportional große Durchblutungssteigerung möglich.⁶⁹ Diese Hypothese hatte einen eleganten Erklärungsansatz geboten für die Hyperoxygenierung des Gewebes unter Steigerung der neuronalen Aktivität, die erstmalig in humanen PET-Experimenten beobachtet worden und als „fokale physiologische Entkopplung (von Durchblutung und Oxygenierung)“ bezeichnet worden war.⁸ Daten anderer Arbeitsgruppen stimmen gut mit denen von uns erhobenen Daten überein: So beobachteten z.B. Gjedde et al. und Rasmussen et al. ebenfalls intakte $CMRO_2$ -Antworten auf neuronale Aktivierung unter Inhibition der neurovaskulären Kopplung mit Indomethacin.^{70,71} Perthen und Kollegen fanden nach Einnahme von Koffein

einen Anstieg der $CMRO_2$ bei gleichzeitiger Reduktion des CBF.⁷² Diese und weitere Arbeiten^{73,74} ergeben zusammen mit unseren Daten deutliche Hinweise dafür, dass es nach neuronaler Aktivierung zu einer CBF-Antwort kommt, die in ihrem vollen Ausmaß nicht zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung notwendig ist.⁷⁵ Eine mögliche Erklärung dafür, dass die neurovaskuläre Kopplung mit überproportional großem CBF-Anstieg im Vergleich zu einer relativ geringen Zunahme des Sauerstoffverbrauchs evolutionär hoch konserviert ist, wäre eine Schutzfunktion für Umstände mit Verminderung der Sauerstoffversorgung des Gehirns, z.B. während Erkrankungen, die mit Phasen einer ausgeprägteren arteriellen Hypotonie (und damit Verminderung des cerebralen Blutflusses) oder arteriellen Hypoxie einhergehen.

5.2. Neurovaskuläre Kopplung und hyperbare Oxygenierung

Eine besonders faszinierende Hypothese zur Erklärung des CBF-Anstieges durch neuronale Aktivierung war gegen Ende der 1990er Jahre von Stamler und Kollegen vorgeschlagen worden: An Hämoglobin gebundenes NO werde durch Konformationsänderung des Hämoglobins beim Übergang von Oxy- in Deoxy-Hämoglobin freigesetzt.²¹ Da NO ein potenter Vasodilatator ist, stünde somit ein universeller Mechanismus zur Verfügung, der Vasodilatation und damit Blutversorgung an den Sauerstoffverbrauch koppeln könnte: Je mehr Sauerstoff ein Gewebe verbraucht, desto mehr NO würde von Hämoglobin freigesetzt, desto größer wäre die Vasodilatation und damit die Durchblutung. Reduktion des Sauerstoffverbrauchs bedeutete verminderte Deoxygenierung von Hämoglobin, verminderte NO-Freisetzung, Vasokonstriktion und somit Durchblutungsreduktion. Auch andere Eigenschaften des Hämoglobins ändern sich während der Deoxygenierung: Deoxy-Hämoglobin hat Nitrit-Reduktase-Eigenschaften und könnte so zur vermehrten NO-Bildung aus Nitrit führen.²² Die Freisetzung von ATP aus Erythrozyten hängt vom Deoxy-Hämoglobin-Gehalt ab, ATP kann ebenfalls eine Vasodilatation bewirken.²⁴

Um die Hypothese einer von der Deoxygenierung des Hämoglobins gesteuerten neurovaskulären Kopplung im Gehirn der Ratte zu testen, bedienten wir uns der hyperbaren Oxygenierung: Bei einem Druck von 3 Atmosphären und Beatmung mit 100% Sauerstoff ist soviel Sauerstoff physikalisch im Blut gelöst (nicht an Hämoglobin gebunden), dass eine vollständige Versorgung des Gehirns über physikalisch gelösten Sauerstoff möglich ist. Eine Deoxygenierung des Hämoglobins während der Passage durch das Gehirn findet dann nicht mehr statt, die venöse Sauerstoffsättigung im Gehirn beträgt 100%. Sollte die neurovaskuläre Kopplung über NO-

Abgabe von Hämoglobin im Moment der Deoxygenierung des Hämoglobins funktionieren, müsste eine hyperbare Oxygenierung die neurovaskuläre Kopplung blockieren. Tatsächlich konnten wir aber unter diesen Bedingungen unveränderte physiologische Blutflussantworten beobachten, sowohl auf funktionelle Stimulation als auch als (deutlich größere) Antwort auf eine ‚Spreading Depolarization‘.

Unsere Daten legen nahe, dass andere Mechanismen als die Abgabe von NO oder ATP während der Deoxygenierung des Hämoglobins die neurovaskuläre Kopplung vermitteln. Sie zeigen auch, dass die neurovaskuläre Kopplung im Gehirn nicht über einen einfachen O₂-Sensor-Mechanismus funktioniert, der eine Blutflusszunahme beim Erreichen kritisch niedriger Gewebe-Sauerstoffkonzentrationen bedingt. Die meisten Autoren gehen statt dessen aufgrund der akkumulierenden Evidenz heutzutage von einem ‚feed-forward‘ Mechanismus aus, der die neuronale Aktivitätssteigerung nicht über den Umweg des veränderten Metabolismus, sondern weitgehend unabhängig von diesem an den cerebralen Blutfluss koppelt.^{7,76}

5.3. Blutflussquantifizierung mittels FAIR-MRT

Die Quantifizierung der cerebralen Durchblutung ist ein wichtiges Instrument der experimentellen Schlaganfallforschung. Kritische Grenzen des CBF bestimmen abhängig von der Spezies, Lokalisation im Gehirn und Dauer der Minderperfusion, ob Hirngewebe eine Phase der Minderperfusion überlebt oder zugrunde geht und ein Hirninfarkt entsteht.⁷⁷

Mehrere Verfahren stehen zur experimentellen Messung der cerebralen Durchblutung im Kleintiermodell zur Verfügung. Besonders attraktiv sind magnetresonanztomografische Methoden, da sie eine hohe räumliche Auflösung auch in der Tiefe bieten und nichtinvasiv durchgeführt werden können. Ähnlich wie die Laser-Doppler-Flussmessung, die eine höhere zeitliche Auflösung bietet und mittels einer kleinen Sonde auf der Laborbank durchgeführt werden kann, bieten die meisten MRT-Verfahren nicht die Möglichkeit, den CBF in physikalischen Einheiten (ml Blut pro mg Hirngewebe pro Minute) zu quantifizieren.

Eines der MRT-Verfahren, die zur Quantifizierung der Durchblutung verwendet werden können, ist die FAIR-MRT (FAIR: flow sensitive alternating inversion recovery).⁷⁸ Die FAIR-MRT beruht auf einer doppelten Messung der T1-Relaxationszeit: Einmal mit Schicht-selektiver Magnetisierung – hierbei beeinflusst das Ausfließen magnetisch angeregter Wasserprotonen aus der Messschicht die T1-Relaxation flussabhängig – und einmal mit nicht-selektiver Magnetisierung - diese Messung ergibt eine flussunabhängige T1-Relaxationszeit. Aus beiden

Messungen kann näherungsweise der cerebrale Blutfluss berechnet werden (siehe Gleichung (1)).

Wir verglichen die Quantifizierung der cerebralen Durchblutung mittels FAIR-MRT unter Verwendung der von Kwong et al. vorgeschlagenen Gleichung (1) mit dem gut etablierten Verfahren der ¹⁴C-Iodoantipyrin-Autografiografie. Um die Messungen über einen weiten Bereich verschieden hoher CBF vergleichen zu können, führten wir diese unter unilateralem Verschluss der A. cerebri media (deutliche CBF-Reduktion in einer Hemisphäre, normaler CBF in der anderen Hemisphäre) und zwei verschiedenen Narkosearten durch. Unter Narkose mit Isofluran kommt es im Vergleich mit einer Narkose durch Etomidate dosisabhängig zu einer deutlichen Durchblutungssteigerung.^{79,80}

Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang der mittels FAIR-MRT und mittels ¹⁴C-Autoradiografie bestimmten CBF, wobei die ¹⁴C-Autoradiografie einen um ca. 30% höhere Werte berechnete.⁴¹

Wir konnten verschiedene mögliche Ursachen für die Überschätzung des CBF durch FAIR-MRT im Vergleich zur ¹⁴C-Autoradiografie identifizieren: Die von Kwong et al. vorgeschlagene und von uns verwendete Formel zur Berechnung des CBF berücksichtigt nicht die Differenz der T1-Relaxationszeit von Hirngewebe und Blut.⁸¹ Berechnungen unter Berücksichtigung dieses Effektes anhand von eigenen Messungen der T1 im Hirngewebe der Maus und im Blut bei 7T (in guter Übereinstimmung mit der Literatur⁸²) ergaben, dass etwa die Hälfte der beobachteten Differenz der CBF-Werte hierdurch erklärt sein könnte. Auch eine Änderung der T1-Relaxationszeit des Hirngewebes im frühen Verlauf der Ischämie könnte zur einer Überschätzung der CBF-Werte im ischämischen Gewebe beitragen.^{83,84} Hingegen spielen vermutlich die Effekte größer Arterien innerhalb der Mess-Schicht (Imaging Slice), die Hirngewebe außerhalb dieser Schicht versorgen und sogenannte ‚transit time‘ Effekte in unserem Setup keine wesentliche Rolle.^{41,85}

Eine weitere mögliche Ursache für die Differenz der CBF-Werte zwischen FAIR-MRT und ¹⁴C-IAP-Autoradiografie-Messung bestand darin, dass der Verteilungskoeffizient für Wasser zwischen Blut und Hirngewebe, der zur Berechnung des CBF mittels FAIR-MRT herangezogen war, für die Maus nicht bekannt war. Für ¹⁴C-Iodoantipyrin hatten Kollegen für verschiedene Spezies deutliche Unterschiede im Blut-Hirn-Verteilungsquotienten gefunden.⁸⁶⁻⁸⁸ Wir bestimmten den Hirn-Blut-Verteilungsquotienten für Wasser mithilfe einer protonengewichteten MRT-Messung in vivo (als Kalibrationsproben wurden kleine Röhren mit Wasser-Deuterium-Mischung in unterschiedlichem Mischungsverhältnis verwendet)⁸⁹ sowie ex-vivo durch Gewichtsbestimmung des Gehirns vor und nach Trocknung. Bei Verfahren zeigten

übereinstimmend, dass keine relevante Abweichung des (über das gesamte Gehirn gemittelten) Blut-Gehirn Verteilungsquotient für Wasser vom Wert bei der Maus zu dem beim Menschen bestand. Die Unterschiede der mittels ^{14}C -IAP-Autoradiografie und FAIR-MRT bestimmten CBF-Werte müssen also andere Ursachen haben.

Die in-vivo Bestimmung mittels MRT zeigte zudem, dass im Gegensatz zum menschlichen Gehirn⁴² im Gehirn der Maus keine ausgeprägte regionale Variabilität des Verteilungskoeffizienten für Wasser besteht. Die Ursache hierfür besteht sehr wahrscheinlich darin, dass im Gehirn des Menschen eine relativ scharfe Trennung zwischen Arealen hoher Nervenzelldichte (graue Substanz) einerseits und deutlichem Überwiegen von Faserbündeln (weiße Substanz) andererseits existiert. Dies ist im Gehirn der Maus nicht der Fall, eine regionale Anpassung des Hirn-Blut-Verteilungskoeffizienten ist daher bei der Berechnung des CBF mittels FAIR-MRT nicht notwendig.

5.4. Infarktprädiktion durch frühe multimodale MRT im MCAO-Modell

Die dreidimensionale, quantitative Darstellung der cerebralen Durchblutung mittels MRT ist ein vielversprechender Parameter zur frühen Vorhersage, ob ein minderdurchblutetes Gehirnareal überleben oder sich ein Hirninfarkt entwickeln wird. Die Prädiktion von Infarktvolumina anhand früher MRT ihrerseits kann ein hilfreiches Instrument zur Verbesserung der Beurteilung von Therapieeffekten in experimentellen Schlaganfallstudien sein.⁴⁸ Trotz Standardisierung der experimentellen Ischämie in Bezug auf Lokalisation und Dauer des Gefäßverschlusses weisen Hirninfarktvolumina in Kontrollgruppen experimenteller Schlaganfallstudien eine erhebliche Variabilität auf. Ein wesentlicher möglicher Faktor, der zu dieser Variabilität beiträgt, ist die Variabilität des Volumens der Ischämie während des experimentellen Gefäßverschlusses, z.B. aufgrund interindividueller Unterschiede in der Anatomie der hirnversorgenden Arterien.^{90,91} Zufällige Unterschiede des induzierten frühen Ischämievolumens könnten zu Unterschieden zwischen Infarktvolumina experimenteller Therapie- und Placebogruppen führen, die dann als Therapieeffekte fehlgedeutet werden. Die Darstellung der frühen Ischämie mittels MRT vor experimenteller Therapie könnte dazu beitragen, solche Fehler zu erkennen.

Unsere Daten zur frühen MRT im MCAO-Modell der Maus zeigen, dass das Ausmaß der frühen Ischämie das spätere Hirninfarktvolumen vorhersagen kann, wobei die Genauigkeit der Vorhersage vom Messzeitpunkt, der Ischämiedauer und der MR-Sequenz abhängig ist. Die genaueste Vorhersage der Infarktvolumina gelang mittels Bestimmung des apparent diffusion coefficient (ADC) bei längeren Ischämien (90 Minuten MCAO), wenn die Messung während der

MCAO oder 6 Stunden danach durchgeführt wurde. Eine transiente Normalisierung des ADC nach Reperfusion verhinderte eine gute Infarktprädiktion der MRT-Messung drei Stunden nach Beginn der MCAO. Für eine kürzere Dauer der MCAO (45 Minuten) gelang keine gute Vorhersage der finalen Infarktvolumina. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Gruppen im Rattenmodell fanden wir eine bessere Vorhersage finaler Infarktvolumina durch frühe ADC-Messung als durch frühe Bestimmung des CBF.⁹² Hierzu trägt sehr wahrscheinlich entscheidend bei, dass eine räumlich hochaufgelöste, ausreichend genaue CBF-Bestimmung mit sicherer Unterscheidung zwischen kritischer und nicht kritischer Minderperfusion mit der von uns und von anderen verwendeten MRT-Technik nicht möglich war.

Die transiente Normalisierung des ADC, die wir im Mausmodell fanden, bestätigte Daten aus dem Rattenmodell.^{46,47,51,93} Möglicherweise kommt es durch Wiederherstellung der Energieversorgung des Gewebes zu einer Wiederaufnahme der Aktivität der Na/K-ATPase und zunächst einer Rückbildung des zellulären Ödems. Eine vollständige Normalisierung neurochemischer Profile ist hiermit allerdings nicht verbunden.⁹⁴ Sekundäre Schädigungskaskaden führen dann zu einem verzögerten Zelltod, der möglicherweise durch neuroprotektive Therapien verhindert werden kann. Die transiente Normalisierung des ADC macht eine Vorhersage der Infarktvolumina zum Zeitpunkt dieser Normalisierung, also früh nach Reperfusion, mittels diffusionsgewichteter MRT schwierig. Unsere Daten zeigen, dass Zeitpunkte während der MCAO oder sechs Stunden nach Beginn der MCAO besser geeignet sind.

Die schlechtere Vorhersage der Infarktvolumina durch frühe ADC-Bestimmung bei 45minütiger MCAO bestätigt ebenfalls Daten anderer Gruppen im Rattenmodell, die eine bessere Prädiktion durch frühe MRT bei längeren Ischämiedauern fanden.⁵² Wir fanden Hinweise, dass in unserem Modell die anatomische Variabilität der A. communicans posterior bei C57/Bl6-Mäusen⁹⁵ eine Rolle spielt. Insbesondere in den Hirnschichten, die das Grenzgebiet zwischen A. cerebri media und posterior repräsentieren, konnten die finalen Infarktvolumina mittels früher ADC-Bestimmung bei 90minütiger Ischämie gut vorhergesagt werden, während trotz früher ADC-Veränderungen bei 45minütiger Ischämie in diesen Arealen keine Hirninfarkte entstanden. Auch das Überwiegen einer sekundären Zellschädigung beim 45-Minuten MCAO-Modell und eine interindividuelle Variabilität dieser sekundären Schäden könnte erklären, warum die Vorhersage der finalen Infarktgröße durch frühe MRT bei diesen Tieren nicht so genau möglich war wie bei einer 90-minütigen MCAO.

Eine potentielle Anwendung unserer Daten für die experimentelle Schlaganfallforschung besteht in der Kontrolle eines wichtigen möglichen Störfaktors für die Evaluation von Therapieeffekten:

Durch frühe MRT kann belegt werden, dass kein relevanter Unterschied im Volumen der frühen, über die MRT mittels ADC-Messung detektierbaren ischämischen Hirnschädigung zwischen Placebo und Therapiegruppe bestanden hat. Dabei zeigen unsere Daten, dass der Zeitpunkt der MRT-Messung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der MCAO und die Dauer der Ischämie bei der Planung einer experimentellen Schlaganfallstudie und Interpretation der gewonnenen Daten zur frühen ischämischen Hirnschädigung berücksichtigt werden sollten.

6. Zusammenfassung

Die hier vorgestellten Arbeiten untersuchen Aspekte der Durchblutungsregulation im Gehirn, der Techniken zur Darstellung von Durchblutung und Blutoxygenierung im Gehirn sowie der Darstellung der Folgen einer Verminderung des CBF. Wesentliche Erkenntnisse sind: Eine kombinierte Blockade bekannter Signalkaskaden der neurovaskulären Kopplung konnte den CBF-Anstieg um etwa zwei Drittel reduzieren, eine physiologische Zunahme des Sauerstoffverbrauchs im Hirngewebe war dennoch möglich. Die neurovaskuläre Kopplung ist daher wahrscheinlich nicht in ihrem ganzen Ausmaß zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung notwendig. Eine mögliche Erklärung ist ein Sicherheitsmechanismus, um eine Minderversorgung auch für den Fall pathologisch verminderten Sauerstoffangebotes zu gewährleisten. Die Hypothese einer Kopplung der Hirndurchblutung an die Deoxygenierung von Hämoglobin stellte sich als nicht zutreffend heraus, da die CBF-Antworten unter hyperbarer Oxygenierung mit Versorgung des Gewebes ausschließlich über physikalisch gelösten Sauerstoff unverändert vorhanden sind. Eine Quantifizierung der cerebralen Durchblutung über die Fluss-sensitive FAIR-MRT im murinen Schlaganfallmodell ist möglich, die errechneten Blutflusswerte liegen etwa 30% über denen durch Autoradiografie ex-vivo bestimmten. Der Verteilungskoeffizient für Wasser zwischen Hirn und Blut unterscheidet sich nicht relevant zwischen Maus und Mensch. Nach Blutflussverminderung durch Verschluss einer großen hirnversorgenden Arterie im experimentellen Schlaganfallmodell lassen sich früh Diffusionsstörungen von Wasser im Gehirn mittels MRT nachweisen, die, abhängig vom Zeitpunkt der MRT und Dauer der Ischämie, eine sehr genaue Vorhersage des späteren Hirninfarktolumens ermöglichen. Die frühe Darstellung der ischämischen Gewebeveränderungen mittels MRT könnten unter anderem genutzt werden, um in experimentellen Schlaganfallstudien gleiche große Volumina der induzierten Ischämien von Placebo und Behandlungsgruppe zu belegen.

7. Literaturverzeichnis

1. Attwell, D. & Laughlin, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1133–1145 (2001).
2. Engl, E. & Attwell, D. Non-signalling energy use in the brain. *J. Physiol. (Lond.)* n/a–n/a (2015). doi:10.1113/jphysiol.2014.282517
3. Leithner, C. & Royl, G. The oxygen paradox of neurovascular coupling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 19–29 (2014).
4. Paulson, O. B., Strandgaard, S. & Edvinsson, L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **2**, 161–192 (1990).
5. Meng, L., Hou, W., Chui, J., Han, R. & Gelb, A. W. Cardiac Output and Cerebral Blood Flow: The Integrated Regulation of Brain Perfusion in Adult Humans. *Anesthesiology* **123**, 1198–1208 (2015).
6. Lauritzen, M., Mathiesen, C., Schaefer, K. & Thomsen, K. J. Neuronal inhibition and excitation, and the dichotomic control of brain hemodynamic and oxygen responses. *NeuroImage* **62**, 1040–1050 (2012).
7. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243 (2010).
8. Fox, P. T. & Raichle, M. E. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1140–1144 (1986).
9. Ogawa, S. *et al.* Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5951–5955 (1992).
10. Fernandez-Klett, F., Offenhauser, N., Dirnagl, U., Priller, J. & Lindauer, U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 22290–22295 (2010).
11. Cauli, B. & Hamel, E. Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenergetics* **2**, 9 (2010).
12. Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P. & Attwell, D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700–704 (2006).
13. Filosa, J. A. & Iddings, J. A. Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2013). doi:10.1152/ajpheart.00359.2013
14. Iadecola, C. & Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* **10**, 1369–1376 (2007).
15. Lindauer, U., Megow, D., Matsuda, H. & Dirnagl, U. Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am. J. Physiol.* **277**, H799–811 (1999).
16. Bakalova, R., Matsuura, T. & Kanno, I. The cyclooxygenase inhibitors indomethacin and Rofecoxib reduce regional cerebral blood flow evoked by somatosensory stimulation in rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **227**, 465–473 (2002).
17. Niwa, K., Araki, E., Morham, S. G., Ross, M. E. & Iadecola, C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *Journal of Neuroscience* **20**, 763–770 (2000).
18. Dirnagl, U., Niwa, K., Lindauer, U. & Villringer, A. Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **267**, H296–301 (1994).
19. Peng, X., Zhang, C., Alkayed, N. J., Harder, D. R. & Koehler, R. C. Dependency of cortical functional hyperemia to forepaw stimulation on epoxygenase and nitric oxide synthase activities in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 509–517 (2004).
20. Longden, T. A., Hill-Eubanks, D. C. & Nelson, M. T. Ion channel networks in the control of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 492–512 (2016).
21. Stamler, J. S. *et al.* Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* **276**, 2034–2037 (1997).
22. Cosby, K. *et al.* Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* **9**, 1498–1505 (2003).

23. Liu, Y., Sun, C.-W., Honavar, J., Townes, T. & Patel, R. P. Role of the b93cys, ATP and adenosine in red cell dependent hypoxic vasorelaxation. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **5**, 21–31 (2013).
24. González-Alonso, J., Olsen, D. B. & Saltin, B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ. Res.* **91**, 1046–1055 (2002).
25. Stamler, J. S. Hemoglobin and nitric oxide. *N Engl J Med* **349**, 402–5– author reply 402–5 (2003).
26. Schechter, A. N. & Gladwin, M. T. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* **348**, 1483–1485 (2003).
27. Gaston, B. M. & Hare, J. M. Hemoglobin and nitric oxide. *N Engl J Med* **349**, 402–5– author reply 402–5 (2003).
28. Isbell, T. S. *et al.* SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation. *Nat Med* **14**, 773–777 (2008).
29. Zhang, R. *et al.* Hemoglobin β Cys93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 6425–6430 (2015).
30. Baron, J. C. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* **11 Suppl 1**, 2–8 (2001).
31. Jones, T. H. *et al.* Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J. Neurosurg.* **54**, 773–782 (1981).
32. Astrup, J., Siesjö, B. K. & Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723–725 (1981).
33. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
34. Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M. & Pulsinelli, W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **9**, 589–596 (1989).
35. Royl, G. *et al.* Functional imaging with laser speckle contrast analysis: vascular compartment analysis and correlation with laser Doppler flowmetry and somatosensory evoked potentials. *Brain Res.* **1121**, 95–103 (2006).
36. Heit, J. J. & Wintermark, M. Perfusion Computed Tomography for the Evaluation of Acute Ischemic Stroke: Strengths and Pitfalls. *Stroke* **47**, 1153–1158 (2016).
37. Raichle, M. E., Martin, W. R., Herscovitch, P., Mintun, M. A. & Markham, J. Brain blood flow measured with intravenous H₂(15)O. II. Implementation and validation. *J. Nucl. Med.* **24**, 790–798 (1983).
38. Heiss, W.-D. Radionuclide imaging in ischemic stroke. *J. Nucl. Med.* **55**, 1831–1841 (2014).
39. Shen, Q. & Duong, T. Q. Magnetic Resonance Imaging of Cerebral Blood Flow in Animal Stroke Models. *Brain Circ* **2**, 20–27 (2016).
40. Kim, S. G. & Tsekos, N. V. Perfusion imaging by a flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) technique: application to functional brain imaging. *Magn Reson Med* **37**, 425–435 (1997).
41. Leithner, C. *et al.* A flow sensitive alternating inversion recovery (FAIR)-MRI protocol to measure hemispheric cerebral blood flow in a mouse stroke model. *Exp. Neurol.* **210**, 118–127 (2008).
42. Herscovitch, P. & Raichle, M. E. What is the correct value for the brain--blood partition coefficient for water? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **5**, 65–69 (1985).
43. Thomsen, C., Henriksen, O. & Ring, P. In vivo measurement of water self diffusion in the human brain by magnetic resonance imaging. *Acta Radiol* **28**, 353–361 (1987).
44. Sotak, C. H. Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water and its relationship to cell volume changes in pathological states. *Neurochem. Int.* **45**, 569–582 (2004).
45. Le Bihan, D. Apparent diffusion coefficient and beyond: what diffusion MR imaging can tell us about tissue structure. *Radiology* **268**, 318–322 (2013).
46. Olah, L., Wecker, S. & Hoehn, M. Secondary Deterioration of Apparent Diffusion Coefficient

- After 1-Hour Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1474–1482 (2000). doi:10.1097/00004647-200010000-00009
47. van Lookeren Campagne, M. *et al.* Secondary Reduction in the Apparent Diffusion Coefficient of Water, Increase in Cerebral Blood Volume, and Delayed Neuronal Death After Middle Cerebral Artery Occlusion and Early Reperfusion in the Rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1354–1364 (1999). doi:10.1097/00004647-199912000-00009
 48. Wu, O. *et al.* Infarct prediction and treatment assessment with MRI-based algorithms in experimental stroke models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 196–204 (2006).
 49. Shen, Q., Ren, H., Fisher, M. & Duong, T. Q. Statistical prediction of tissue fate in acute ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **25**, 1336–1345 (2005).
 50. Huang, S., Shen, Q. & Duong, T. Q. Artificial neural network prediction of ischemic tissue fate in acute stroke imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 1661–1670 (2010).
 51. Shen, Q., Fisher, M., Sotak, C. H. & Duong, T. Q. Effects of reperfusion on ADC and CBF pixel-by-pixel dynamics in stroke: characterizing tissue fates using quantitative diffusion and perfusion imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 280–290 (2004).
 52. Shen, Q. & Duong, T. Q. Quantitative prediction of ischemic stroke tissue fate. *NMR Biomed* **21**, 839–848 (2008).
 53. O'Collins, V. E. *et al.* 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* **59**, 467–477 (2006).
 54. Dirnagl, U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 1465–1478 (2006).
 55. Prinz, F., Schlange, T. & Asadullah, K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov* **10**, 712–712 (2011).
 56. Holman, C. *et al.* Where Have All the Rodents Gone? The Effects of Attrition in Experimental Research on Cancer and Stroke. *PLoS Biol.* **14**, e1002331 (2016).
 57. Ioannidis, J. P. A. Why Most Published Research Findings Are False. *Plos Med* **2**, e124 (2005).
 58. Kanemitsu, H. *et al.* Differences in the Extent of Primary Ischemic Damage Between Middle Cerebral Artery Coagulation and Intraluminal Occlusion Models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 1196–1204 (2002).
 59. Zhang, H., Prabhakar, P., Sealock, R. & Faber, J. E. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 923–934 (2010).
 60. Busija, D. W., Bari, F., Domoki, F. & Louis, T. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of N-methyl-d-aspartate in cerebral cortex. *Brain Res Rev* **56**, 89–100 (2007).
 61. Stefanovic, B., Schwindt, W., Hoehn, M. & Silva, A. C. Functional uncoupling of hemodynamic from neuronal response by inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 741–754 (2007).
 62. Dirnagl, U., Niwa, K., Lindauer, U. & Villringer, A. Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **267**, H296–301 (1994).
 63. Ko, K. R., Ngai, A. C. & Winn, H. R. Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am. J. Physiol.* **259**, H1703–8 (1990).
 64. Gordon, G. R. J., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C. R. & Macvicar, B. A. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* **456**, 745–749 (2008).
 65. Shi, Y. *et al.* Interaction of mechanisms involving epoxyeicosatrienoic acids, adenosine receptors, and metabotropic glutamate receptors in neurovascular coupling in rat whisker barrel cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 111–125 (2008).
 66. Filosa, J. A. *et al.* Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat. Neurosci.* **9**, 1397–1403 (2006).
 67. Leithner, C. *et al.* Pharmacological uncoupling of activation induced increases in CBF and CMRO₂. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 311–322 (2010).
 68. Royl, G. *et al.* Hypothermia effects on neurovascular coupling and cerebral metabolic rate of oxygen. *NeuroImage* **40**, 1523–1532 (2008).
 69. Buxton, R. B. & Frank, L. R. A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**, 64–72 (1997).

70. Rasmussen, M. *et al.* No influence of the endothelin receptor antagonist bosentan on basal and indomethacin-induced reduction of cerebral blood flow in pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* **47**, 200–207 (2003).
71. Gjedde, A., Johannsen, P., Cold, G. E. & Østergaard, L. Cerebral metabolic response to low blood flow: possible role of cytochrome oxidase inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **25**, 1183–1196 (2005).
72. Perthen, J. E., Lansing, A. E., Liao, J., Liu, T. T. & Buxton, R. B. Caffeine-induced uncoupling of cerebral blood flow and oxygen metabolism: a calibrated BOLD fMRI study. *NeuroImage* **40**, 237–247 (2008).
73. Møller, K. *et al.* Cerebral blood flow, oxidative metabolism and cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with acute bacterial meningitis. *Acta Anaesthesiol Scand* **46**, 567–578 (2002).
74. Piilgaard, H. & Lauritzen, M. Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 1517–1527 (2009).
75. Leithner, C. & Royl, G. The oxygen paradox of neurovascular coupling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 19–29 (2014).
76. Phillips, A. A., Chan, F. H., Zheng, M. M. Z., Krassioukov, A. V. & Ainslie, P. N. Neurovascular coupling in humans: Physiology, methodological advances and clinical implications. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 647–664 (2016).
77. Heiss, W.-D., Sobesky, J. & Hesselmann, V. Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage. *Stroke* **35**, 2671–2674 (2004).
78. Kwong, K. K. *et al.* MR perfusion studies with T1-weighted echo planar imaging. *Magn Reson Med* **34**, 878–887 (1995).
79. Hendrich, K. S. *et al.* Cerebral perfusion during anesthesia with fentanyl, isoflurane, or pentobarbital in normal rats studied by arterial spin-labeled MRI. *Magn Reson Med* **46**, 202–206 (2001).
80. Robertson, S. C., Brown, P. & Loftus, C. M. Effects of etomidate administration on cerebral collateral flow. *Neurosurgery* **43**, 317–23– discussion 323–4 (1998).
81. Pell, G. S. *et al.* Implementation of quantitative FAIR perfusion imaging with a short repetition time in time-course studies. *Magn Reson Med* **41**, 829–840 (1999).
82. Guilfoyle, D. N., Dyakin, V. V., O'Shea, J., Pell, G. S. & Helpner, J. A. Quantitative measurements of proton spin-lattice (T1) and spin-spin (T2) relaxation times in the mouse brain at 7.0 T. *Magn Reson Med* **49**, 576–580 (2003).
83. Weber, R., Ramos-Cabrer, P. & Hoehn, M. Present status of magnetic resonance imaging and spectroscopy in animal stroke models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 591–604 (2006).
84. Barber, P. A. *et al.* Early T1- and T2-weighted MRI signatures of transient and permanent middle cerebral artery occlusion in a murine stroke model studied at 9.4T. *Neuroscience Letters* **388**, 54–59 (2005).
85. Zhou, J. & van Zijl, P. C. Effect of transit times on quantification of cerebral blood flow by the FAIR T(1)-difference approach. *Magn Reson Med* **42**, 890–894 (1999).
86. Vogel, J., Gehrig, M., Kuschinsky, W. & Marti, H. H. Massive inborn angiogenesis in the brain scarcely raises cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 849–859 (2004).
87. Els, T., Daffertshofer, M., Schroeck, H., Kuschinsky, W. & Hennerici, M. Comparison of transcranial Doppler flow velocity and cerebral blood flow during focal ischemia in rabbits. *Ultrasound Med Biol* **25**, 933–938 (1999).
88. Schröck, H. & Kuschinsky, W. Cerebrospinal fluid ionic regulation, cerebral blood flow, and glucose use during chronic metabolic alkalosis. *Am. J. Physiol.* **257**, H1220–7 (1989).
89. Roberts, D. A., Rizi, R., Lenkinski, R. E. & Leigh, J. S. Magnetic resonance imaging of the brain: blood partition coefficient for water: application to spin-tagging measurement of perfusion. *J. Magn. Reson. Imaging* **6**, 363–366 (1996).
90. Barone, F. C., Knudsen, D. J., Nelson, A. H., Feuerstein, G. Z. & Willette, R. N. Mouse Strain Differences in Susceptibility to Cerebral Ischemia Are Related to Cerebral Vascular Anatomy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**, 683–692 (1993).
91. Maeda, K., Hata, R. & Hossmann, K.-A. Differences in the cerebrovascular anatomy of

- C57black/6 and SV129 mice. *Neuroreport* **9**, 1317–1319 (1998).
92. Huang, S., Shen, Q. & Duong, T. Q. Quantitative prediction of acute ischemic tissue fate using support vector machine. *Brain Res.* **1405**, 77–84 (2011).
 93. Li, F. *et al.* Reversal of Acute Apparent Diffusion Coefficient Abnormalities and Delayed Neuronal Death following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Ann. Neurol.* 333–342 (1999).
 94. Lei, H., Berthet, C., Hirt, L. & Gruetter, R. Evolution of the neurochemical profile after transient focal cerebral ischemia in the mouse brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 811–819 (2009).
 95. Kitagawa, K. *et al.* Cerebral Ischemia After Bilateral Carotid Artery Occlusion and Intraluminal Suture Occlusion in Mice: Evaluation of the Patency of the Posterior Communicating Artery. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 570–579 (1998).

Danksagung

Ich bedanke mich für die inspirierende Zeit in Klinik und Forschung, große Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit bei den vielen verschiedenen klinischen und experimentellen wissenschaftlichen Projekten und spannende Diskussion bei Georg Royl, Ulrich Dirnagl, Ute Lindauer, Martina Füchtemeier, Heike Kaasch, Marco Foddis, Christoph Ploner, Matthias Endres, Christian Storm, Kaspar Josche Streitberger und Christian Endisch.

Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin, den 30. August 2016

Dr. med. C. Leithner