

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

DISSERTATION

Ursprung und Charakteristik aktivitätsinduzierter
Sauerstoffpartialdruckveränderungen und Blutflussantworten
im zerebellären Kortex der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nikolas Offenhauser

aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
2. Prof. Dr. med. U. Heinemann
3. Prof. Dr. med. W. Kuschinsky

Datum der Promotion: 04. 07. 2008

Für meine Eltern

*“Man was created of the Earth, and lives by virtue of the air,
for there is in the air a secret food for life ... whose invisible
congealed spirit is better than the whole Earth.”*

Michael Sendivogius, 1604

Abstract

Die biologischen Grundlagen der neurometabolisch-neurovaskulären Kopplung des Gehirns sind nicht hinreichend bekannt. Lokale Änderungen der Nervenzellaktivität sind begleitet von regionalen Änderungen des zerebralen Blutflusses (CBF) und bedienen die Bedürfnisse eines gesteigerten Metabolismus in aktivierten Gehirnregionen und bilden zugleich die Grundlage funktionell-bildgebender Verfahren des Gehirns. Es ist derzeit ein intensives Bestreben die Mechanismen und die Art der neuronalen Aktivität zu klären, die diesen CBF Anstieg vermitteln und die Frage nach den individuellen metabolischen Kosten der an der Signaltransduktion beteiligten Prozesse und Zelltypen und die Art ihrer Energiegewinnung zu klären. In welchem Umfang exzitatorische neuronale Aktivierung zu einem gesteigerten Sauerstoffmetabolismus führt und in welcher Relation zum CBF, wird ebenso kontrovers diskutiert wie die Frage nach dem Regulationsprinzip und dem initialen Auslöser der Kopplungskaskade. Die Bedeutung inhibitorischer Einflüsse auf Energieverbrauch und CBF wurde bisher kaum untersucht.

Ziel der vorgestellten Arbeiten war es, die neurophysiologische Grundlage aktivitätsinduzierter metabolischer und hämodynamischer Antworten im zerebellären Kortex der Ratte zu spezifizieren. Es wurde die Bedeutung von Variationen der synaptischen exzitatorischer Aktivität im Vergleich zur Veränderung der Aktionspotentialrate für die Induktion der CBF Antworten und den Sauerstoffverbrauch untersucht, die Relation der Antworten zueinander, sowie deren Beeinflussbarkeit durch Veränderungen des synaptischen inhibitorischen Tonus.

Die kombinierte, dynamische Erfassung von Veränderungen des CBF, des Gewebs-sauerstoffpartialdruckes (tpO_2) und der neuronalen Aktivität (mittels Laser-Doppler Flussmessung, Sauerstoff- und Glas-Mikroelektroden; Kletterfaser-Stimulation) ermöglichte es, die Beziehung der Signalantworten zueinander zu etablieren und die Abhängigkeit des tpO_2 Signals von Sauerstoffverbrauch und CBF Antwort zu demonstrieren. Durch pharmakologische Disinhibition konnten wir zeigen, dass im Zerebellum der Blutfluss unabhängig von der spontanen Aktionspotentialrate in Purkinje-Zellen ist und Aktionspotentialrate und hämodynamische Antwort in aktivierten Hirnregionen somit nicht proportional sein müssen. Blutflussanstieg und Sauerstoffverbrauch bedurften andererseits der postsynaptischen Aktivierung neuronaler ionotroper Glutamatrezeptoren. Zugleich erfuhren die stimulationsinduzierten Anstiege im CBF und Sauerstoffverbrauch eine gleichsinnige Modifikation bei Variation des inhibitorischen synaptischen Tonus.

Zusammen liefern diese Studien experimentelle Evidenz für die hypothetisierte Vorwärts-vermittelte (engl.: Feed-forward) Regulation der neurometabolischen und neurovaskulären Kopplung und weisen auf eine in Folge der glutamatergen Signaltransduktion an exzitatorischen Synapsen initiierte neuronale Signalkaskade hin, die letzten Endes sowohl in der Steigerung des Blutfluss mündet, als auch im Anstieg des Sauerstoffmetabolismus.

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (Liquor)
Ag/AgCl	Silber / Silberchlorid
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
BOLD	Blood oxygenation level dependent
CBF	zerebraler Blutfluss
CMRO ₂	zerebrale Sauerstoffmetabolismusrate
CNQX	6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	γ -Aminobuttersäure
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
LDF	Laser-Doppler Flussmessung
LFP	Lokales Feldpotential
Σ LFP	summiertes Lokales Feldpotential
μ m	Mikrometer
mA	Milliamper
mM	Millimol
MUA	Multi-unit activity (Aktionspotentiale mehrerer Neurone)
7-NI	7-Nitroindazol
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
PET	Positronenemissionstomographie
s, ms	Sekunden, Millisekunden
tpO ₂	Gewebssauerstoffpartialdruck

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:

1.	Einleitung	7
2.	Zielstellung	10
3.	Methodik	12
4.	Ergebnisse	14
5.	Diskussion	17
6.	Literaturverzeichnis	24

Anhang:

-	Selbständigkeitserklärung	32
-	Anteilerklärung	33
-	Lebenslauf	34
-	Publikationsliste	35
-	Danksagung	36
-	Verwendete Publikationen:	37 ff.

Studie 1

Thomsen, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2004).
Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient
for cerebral blood flow in rat cerebellum.
J.Physiol. 560: 181-189.

Studie 2

Offenhauser, N., Thomsen, K., Caesar, K., Lauritzen, M. (2005).
Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex:
interplay of postsynaptic activation and blood flow.
J.Physiol. 565: 279-294.

Studie 3

Caesar, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2008).
Gamma-aminobutyric acid modulates local brain oxygen consumption
and blood flow in rat cerebellar cortex.
J.Cereb.Blood Flow Metab. 5: 906-915.

1. Einleitung

Die Gestaltung und Funktion des Gehirns ist maßgeblich geprägt durch den enormen basalen Energiebedarf (Laughlin, 2001). Energetisch am kostspieligsten ist die neuronale Verarbeitung und Weiterleitung von Information (Attwell & Laughlin, 2001; Lennie, 2003). Die Limitiertheit energetischer Reserven zeigt sich eindrücklich in der bekannten Suszeptibilität des Gehirns gegenüber Anoxie (Hossmann, 1994) und bedingt zur Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität des Gehirns die Notwendigkeit einer kontinuierlichen, adäquaten Versorgung mit Sauerstoff und Glukose über den Blutstrom. Dies findet Ausdruck in der zeitlichen und räumlichen Korrelation zwischen Variationen der neuronalen Aktivität und begleitenden Veränderungen des Metabolismus und des CBF (Raichle *et al.*, 1976; Lassen *et al.*, 1978; Sokoloff, 1977; Batini *et al.*, 1981; Kuschinsky *et al.*, 1983; Lauritzen, 2001). Der Ursprung und die Mechanismen, die diesem als neurometabolisch-neurovaskuläre Kopplung bezeichneten Phänomen zugrunde liegen, sind nicht hinreichend bekannt.

Neuere Hypothesen gehen davon aus, dass anstelle eines rückgekoppelten Mechanismus der direkt über Veränderungen im Energiesubstrat-Spiegel oder -verbrauch reguliert wird, aktivitätsinduzierten CBF Antworten ein Vorwärts-vermittelter (engl.: Feed-forward) Mechanismus zugrunde liegt und determiniert wird von der Art der aktivierten neuronalen Elemente und Schaltkreise (Abbildung 1), (Bonvento *et al.*, 2002; Uludag *et al.*, 2004; Lauritzen, 2005). Die neurovaskuläre Kopplung vermag hiernach als Substratlieferant für den energetischen Mehrbedarf unter Aktivierung dienen, ist aber nicht unmittelbar durch diesen Verbrauch reguliert. In die dynamische Blutflussregulation involviert sind neuronale (Mathiesen *et al.*, 1998), gliale (Mulligan & MacVicar, 2004) und vaskuläre (Faraci & Heistad, 1998) Mechanismen, der entscheidende initiale Auslöser konnte bisher jedoch noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Ein besonderes Interesse gilt daher der Klärung der Frage welche Art neuronaler Aktivität und welche spezifischen Prozesse im Rahmen der Signalübertragung den Ursprung der Kopplungskaskade darstellen (Jueptner & Weiller, 1995; Iadecola, 2004).

Im Hinblick auf die neurometabolische Kopplung besteht eine andauernde Kontroverse darüber, wie Neuronen in kurzzeitig aktivierten Hirnregionen ihren gesteigerten metabolischen Bedarf decken (Barinaga, 1997). Im Mittelpunkt steht dabei die Frage ob und in welchem Ausmaß der gesteigerte neuronale Energiebedarf mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einhergeht (Raichle *et al.*, 1976; Fox *et al.*, 1988; Malonek & Grinvald, 1996; Thompson *et al.*, 2003). Diese Kernfrage hat vielschichtige Aspekte: So ist ungeklärt, in welchem Verhältnis dieser Sauerstoffmehrverbrauch zu dem deutlichen und einheitlichen Anstieg von CBF und Glukosemetabolismus steht, was die Hauptenergiequelle (nicht-aerobe Glykolyse oder oxidativer Metabolismus) unter Aktivierung darstellt und was das neuronale

Energiesubstrat ist (Laktat oder Glukose) (Fox *et al.*, 1988; Pellerin & Magistretti, 1994; Hyder *et al.*, 1996; Hyder *et al.*, 1997; Magistretti *et al.*, 1999). Ebenso ist die zeitliche Kaskade umstritten, in welcher oxidative und nicht oxidative Mechanismen möglicherweise gemeinsam auftreten (Mintun *et al.*, 2002; Kasischke *et al.*, 2004). Funktionell betrachtet ist es von Bedeutung, ob das während neuronaler Aktivierung zu beobachtende Missverhältnis zwischen geringem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und massiver Blutflussantwort bedeutet, dass CBF und CMRO₂ ungekoppelt sind (Fox & Raichle, 1986), oder ob es sich um eine enge nichtlineare Beziehung handelt, bei der ein überproportionaler Blutflussanstieg notwendig ist, um auch einen nur geringen Sauerstoffmehrabbedarf des aktivierten Gewebes decken zu können (Buxton & Frank, 1997; Vafae & Gjedde, 2000). Insgesamt ist es somit derzeit ein intensives Bestreben spezifische Aussagen machen zu können, welche einzelnen an der Signaltransduktion beteiligten neuronalen Prozesse welchen Anteil am Energieverbrauch und der Induktion der Blutflussantworten haben und deren Beziehung zueinander zu etablieren.

Die Klärung der dargestellten Fragen der neurometabolisch-neurovaskulären Kopplung ist zugleich Vorbedingung für die neurophysiologisch korrekte Interpretation von Daten, welche mittels bildgebender Verfahren des Gehirns wie fMRT, PET und NIRS gewonnen werden. Eine rasant wachsende Anzahl von Studien bedient sich dieser Methoden um das menschliche Gehirn und seine Aktivität nicht-invasiv darzustellen (Raichle, 1998). In auffällender Diskrepanz hierzu ist die biologische Basis der studierten Signale nicht geklärt und die Relation der Signalveränderungen in Bezug zu Art und Ausmaß der unterliegenden neuronalen Aktivitätsveränderung, der Einfluss von Veränderungen der Ruheaktivität und der inhibitorischen Aktivität nicht etabliert (Gusnard & Raichle, 2001; Arthurs & Boniface, 2002).

Die Grundlage der untersuchten Signalveränderungen bilden zumeist lokale Änderungen in zerebralem Blutfluss, Blutvolumen oder Blutoxygenierung (Ogawa *et al.*, 1992; Villringer & Dirnagl, 1995). In dem meistgenutzten Verfahren, dem BOLD-fMRT, wird die Signalgröße bestimmt vom Ausmaß des Sauerstoffverbrauchs im Verhältnis zur Blutflussantwort (Abbildung 1), (Raichle, 1998; Schwarzbauer & Heinke, 1999; Ances *et al.*, 2008) und der komplexe Ursprung der Signalveränderungen bedingt, dass die einfache Interpretation der gewonnenen Signale als äquivalent der aufgetretenen neuronalen Aktivität nicht möglich ist (Abbildung 1), (Villringer & Dirnagl, 1995; Raichle, 1998). Hierfür bedarf es der genauen Kenntnis der Relation zwischen neuronaler Aktivität und der begleitenden Blutflussantwort sowie des Verhältnisses zwischen Blutflussantwort und CMRO₂ Anstieg und der zeitlichen Dynamik dieser Veränderungen zueinander (Buxton *et al.*, 2004; Obata *et al.*, 2004).

Diese Beziehungen und Wechselwirkungen sind bisher nicht etabliert und bedürfen zur Klärung Methoden die zugleich neben der Erfassung der neuronalen Aktivität, Sauerstoffverbrauch und CBF dynamisch im Verlauf der Aktivierung und im Verhältnis zueinander abbilden können. Am

bedeutsamsten ist es jedoch auch hier, die Art der neuronalen Aktivität selbst zu klären, die die hämodynamischen oder metabolischen Signalantworten determiniert (Jueptner & Weiller, 1995; Lauritzen, 2001; Arthurs & Boniface, 2002). Erst wenn dies gelingt, wird sich zeigen, ob funktionell bildgebende Verfahren des Gehirns geeignet sein werden, verlässliche Einblicke in komplexe Hirnfunktion wie Lernen, Gedächtnis und Verhalten zu ermöglichen (Nemeroff *et al.*, 1999; Nair, 2005).

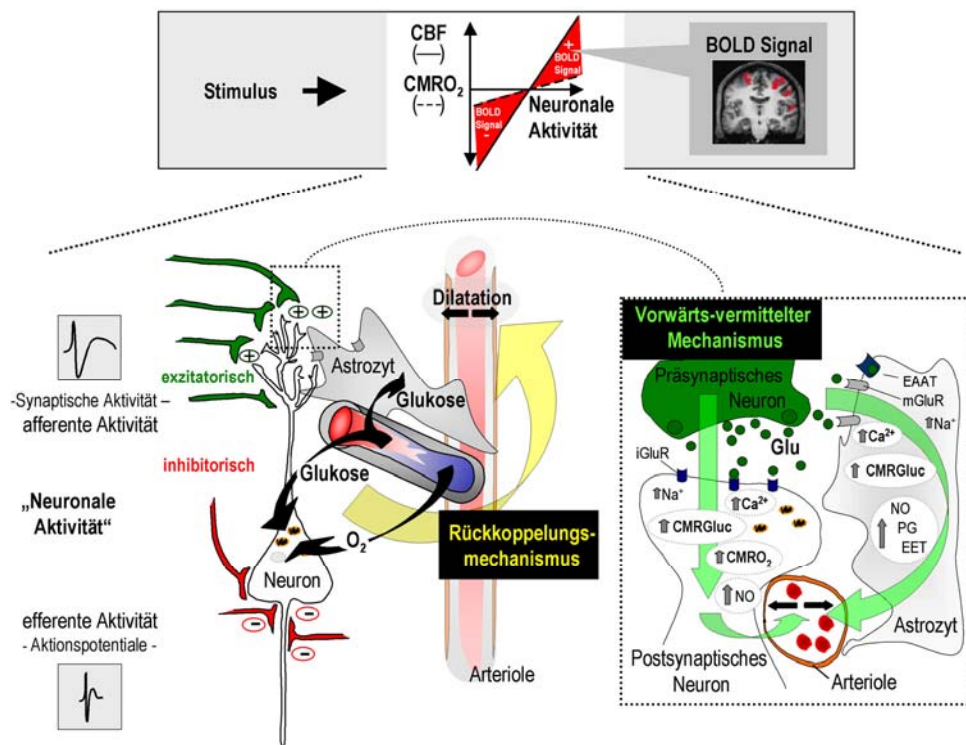


Abbildung 1: Neurometabolisch-neurovaskuläre Kopplung.

Sensorische, motorische oder kognitive Stimuli sind begleitet von lokalen Änderungen der neuronalen Aktivität und vergesellschaftet mit regionalen Veränderungen des Blutflusses und des Sauerstoffverbrauchs. Das Missverhältnis zwischen massiven CBF Anstieg und geringem Sauerstoffmehrverbrauch in aktivierten Hirnregion bildet die Grundlage des BOLD Signals der fMRT. Die obere Teilabbildung illustriert die Abhängigkeit der Signalgröße von dem Ausmaß der neuronalen Aktivierung, der Größe der Blutflussantwort und der Veränderung im Sauerstoffverbrauch (modifiziert nach Raichle, 1998; fMRT Bild aus: Kim, 2003).

Die Relevanz der spezifischen Prozesse der neuronalen Signalweiterleitung und -verarbeitung (synaptische Erregung, Inhibition, Aktionspotentialveränderungen) für die Induktion der hämodynamischen und metabolischen Antworten ist bis heute ungeklärt und die neurophysiologische Grundlage der Signalantworten nicht hinreichend bekannt.

Die Ionen-Verschiebungen im Rahmen der synaptischen Aktivierung und der Aktionspotentiale, sowie der Neurotransmitter-Kreislauf bedingen einen erhöhten neuronalen und glialen Energiebedarf und resultieren in einer Zunahme des Substratverbrauchs. Der gesteigerten Sauerstoff- und Glukoseaufnahme im aktivierten Hirngewebe wurde lange Zeit eine entscheidende Rolle in der dynamischen Blutflussregulation zugesprochen und ein rückgekoppelter Mechanismus angenommen worden, der diesen Mehrverbrauch detektiert und in eine Gefäßdilatation der zuführenden Arteriolen übersetzt. Einen alternativen Regulationsweg stellt die parallele Steigerung des Metabolismus und des CBF über einen Vorwärts-vermittelten Mechanismus dar. Eine mögliche Signalkaskade einer solchen Vorwärts-vermittelten Regulation an exzitatorischen Synapsen ist schematisch im rechten Abschnitt dargestellt. Auslöser ist die Ausschüttung von Glutamat (Glu) in den synaptischen Spalt und bewirkt die postsynaptische Aktivierung neuronaler ionotroper Glutamatrezeptoren (iGluR, z.B.: AMPA-Rezeptoren) die in einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (Ca^{2+}) resultiert und der Produktion vasoaktiver Mediatoren (Stickstoffmonoxid; NO). Neuronale Aktivität ist zudem begleitet von Ionen-Verschiebungen, die teilweise als direkter Mediator einer Gefäßweiterung dienen können (z.B.: Kalium, nicht dargestellt). Astrozytär kommt es unter anderem durch Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren ebenfalls zum Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und initiiert die Bildung von Mediatoren wie NO, Prostaglandinen (PG) und Epoxyeicosatriensäure (EETs). Im Rahmen der Glutamataufnahme über astrozytäre Glutamattransporter (EAAT) kommt es zudem zu einer Erhöhung des intrazellulären Natriums (Na^+) und in Folge des Energiebedarfs für die Wiederherstellung der Ionen-Homöostase und für den Glutamat-Kreislauf zu einer gesteigerten Glykolyse in Astrozyten. In Neuronen führt die Ca^{2+} induzierte Erhöhung der oxidativen Phosphorylierung zu gesteigertem Sauerstoff- und Glukoseverbrauch (CMRGluc: Zerebrale Glukosemetabolismusrate; $CMRO_2$: Zerebrale Sauerstoffmetabolismusrate), (teilweise modifiziert nach Bonvento *et al.*, 2002).

2. Zielstellung

Ziel der dargestellten Arbeiten war es die neurophysiologische Grundlage aktivitätsinduzierter metabolischer und hämodynamischer Antworten zu spezifizieren und die Beziehung zwischen neuronaler Aktivität, tpO_2 und CBF im zerebellären Kortex der Ratte grundlegend zu charakterisieren.

Studie 1: Diente der Klärung der Frage welche Art neuronaler Aktivität (afferente, synaptische Aktivität; engl.: Input-activity vs. efferente Aktivität; engl.: Output-activity, Ausgangsaktivität) den Blutflussantworten in aktivierten Hirnregionen zugrunde liegt. Hierfür wurde der Effekt einer isolierten Steigerung des neuronalen Outputs (Aktionspotentialrate; engl.: Spike-rate) auf den CBF untersucht. Die pharmakologisch induzierte Dissoziation des axonalen Outputs von dem exzitatorischen synaptischen Input erlaubte diese Schritte der neuronalen Signalweiterleitung in ihrer Bedeutung für die Induktion hämodynamischer Antworten getrennt zu evaluieren.

Studie 2: Ziel der folgenden Studie war es dann, die Grundlage aktivitätsinduzierter Veränderungen des Sauerstoffmetabolismus im aktivierten Hirngewebe zu spezifizieren und dynamisch anhand von Sauerstoffpartialdruckveränderungen (tpO_2) zu erfassen. Diese sollten zugleich im Kontext der begleitenden Blutflussantworten und unter verschiedenen Graden der neuronalen Aktivität beurteilt werden und der Ursprung der spezifischen Signalkomponenten der aktivitätsinduzierten tpO_2 Veränderungen geklärt werden. Hierfür wurden nach Etablierung der Methode zur tpO_2 Messung, drei getrennte Versuchsreihen (a-c) durchgeführt:

a): Diente der Etablierung der Beziehung zwischen exzitatorischer synaptischer Aktivität und den in der aktivierten Region auftretenden lokalen Veränderungen des tpO_2 und CBF und erlaubte Rückschlüsse auf den Anstieg im Sauerstoffverbrauch in der aktivierten Region.

Die Studien b und c dienten der Überprüfung der auf dem Boden der Ergebnisse des ersten Teils formulierten Hypothesen und spezifizierten die physiologische Grundlage der in der aktivierten Region auftretenden initialen relativen Gewebsdeoxygenierung und der nachfolgenden Hyperoxygenierung.

b) Untersuchte hierfür die Hypothese, dass eine verminderte O_2 Zufuhr zu der aktivierten Region durch selektive Hemmung der Blutflussantwort (NO-Synthase Inhibition) zu einer Verstärkung der initialen Gewebsdeoxygenierung und Abschwächung der relativen Gewebshyperoxygenierung führt.

c) Diese Serie von Experimenten testete anschließend die Hypothese, dass der beobachtete aktivitätsinduzierte Anstieg des lokalen Sauerstoffmetabolismus neuronalen Ursprungs ist und abhängt von der exzitatorischen postsynaptischen Aktivität in Purkinje-Zellen. Hierfür wurde der Effekt einer lokalen AMPA-Rezeptorblockade auf die neuronale Aktivität und die induzierten tpO_2 und CBF Signale untersucht.

Studie 3: Nachdem die dominierende Rolle exzitatorischer synaptischer Signalübertragung für die neurovaskuläre und neurometabolische Kopplungskaskade gezeigt werden konnte, war es das Ziel, den Einfluss von Variationen im inhibitorischen Niveau auf die durch exzitatorische synaptische Erregungsübertragung induzierten Blutflussantworten und den Sauerstoffmetabolismus zu untersuchen. Dies diente zugleich Hinweise dafür zu finden, ob metabolische und hämodynamische Antworten eine gleichsinnige Beeinflussung durch Veränderungen des GABAergen Einflusses erfahren und somit metabolische und vaskuläre Antworten möglicherweise identischen Regulationsmechanismen unterliegen.

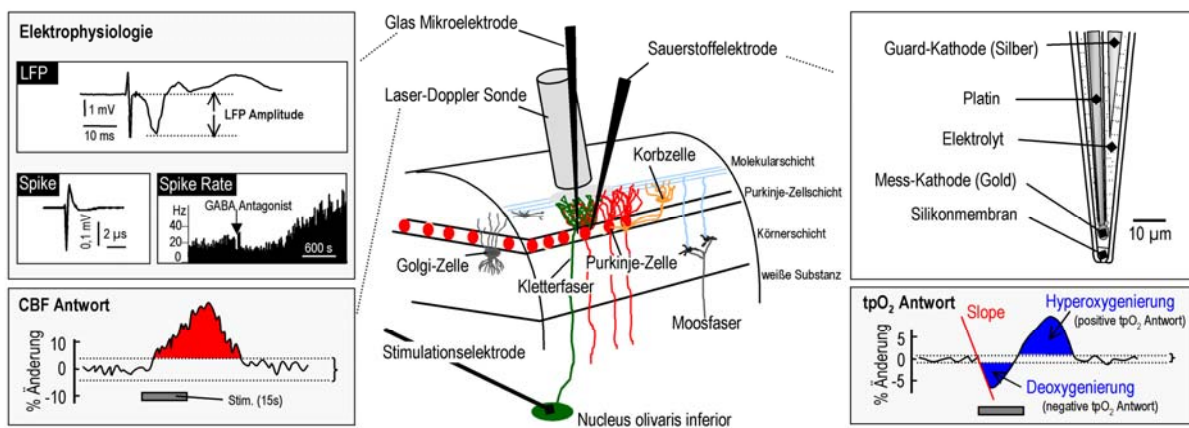


Abbildung 2: Versuchsaufbau und funktionelle Organisation des zerebellären Kortex.

Schematische Darstellung des zerebellären Kortex mit Illustration der aufgezeichneten Signalparameter, Platzierung der Laser-Doppler Sonde zur Blutflussmessung und der Stimulations- und Messelektroden für die elektrophysiologischen und tpO_2 Messungen (modifiziert nach Lauritzen, 2001).

Die Kleinhirnrinde, bestehend aus drei Schichten, enthält insgesamt nur fünf Typen von Neuronen (Purkinje-Zellen, Körnerzellen, Korbzellen, Sternzellen und Golgi-Zellen). Die spezifische geometrische Anordnung macht den zerebellären Kortex zu einem Idealmodell für elektrophysiologische Studien und Untersuchungen zur neurovaskulären Kopplung (Lauritzen, 2001). Der grundlegende Schaltkreis ist organisiert um die Purkinje-Zellen, die die einzigen Ausgangsneurone der Kleinhirnrinde darstellen. Purkinje-Zellen besitzen intrinsische Schrittmacher-Aktivität (Hounsgaard, 1979) und stehen unter permanenter GABAerger inhibitorischer Kontrolle (tonische Inhibition) durch Stern- und Korbzellen in der Molekularschicht, sowie durch Golgi-Zellen in der Körnerschicht. Die Purkinje-Zell Aktivität wird von zwei exzitatorischen afferenten Systemen beeinflusst: Einem exzitatorischen monosynaptischen Input über die Kletterfasern und einem disynaptischen Input über das Moosfaser-Körnerzell-Purkinje-Zell System (kombinierter direkt exzitatorischer und indirekt inhibitorischer Input), (Llinas et al., 2004). Veränderung der neuronalen Aktivität erfolgte in den Studien dieser Arbeit durch die elektrische Stimulation des glutamatergen Kletterfaser-Purkinje-Zell Systems oder pharmakologische Modifikation des inhibitorischen Tonus.

Oben rechts: Elektrodenspitze der zur Sauerstoffpartialdruckmessung verwendeten Clark-Elektrode (modifiziert nach Revsbech, 1989). Eine Besonderheit ist die integrierte Guard-Kathode, welche ebenfalls polarisiert ist und den Sauerstoff im Elektrolytreservoir verbraucht und die Langzeitstabilität der Messungen bedingt. Nicht dargestellt ist die $Ag/AgCl$ Anode, welche weiter entfernt von der Elektrodenspitze im Elektrolytmedium platziert ist.

Unten rechts: Illustration einer charakteristischen tpO_2 Stimulationsantwort unter 15 s, 10 Hz Kletterfaser-Stimulation. Die farblich markierten Flächen kennzeichnen einige der zur Bestimmung der Antwortgröße berechneten Parameter (Größe der Gewebsdeoxygenierung, Hyperoxygenierung). Der initiale Sauerstoffverbrauch wurde anhand der Geschwindigkeit der initialen Deoxygenierung erfasst und als Steilheit (Slope) der frühen Phase der tpO_2 Antwort gemessen.

Links oben: Signale der elektrophysiologischen (extrazellulären) Messungen von der Ebene der Purkinje-Zellschicht. Das LFP zeigt das initiale Stimulationsartefakt gefolgt von der Negativität im Rahmen synaptischer Purkinje-Zell Aktivierung. Darunter ist ein spontanes einfaches Purkinje-Zell Aktionspotential (Spike) dargestellt, sowie der Anstieg der Spike Rate unter pharmakologischer Disinhibition.

Links unten: Illustration des CBF Anstiegs im aktivierten Areal unter 15 s, 10 Hz Kletterfaser-Stimulation (Stim.) und der Berechnung der Antwortgröße (rote Fläche).

3. Methodik

Bei den dargestellten Untersuchungen handelt es sich um *in vivo* Experimente an anästhesierten Wistar-Ratten. Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit der Konvention der Europäischen Union zum Schutz von Wirbeltieren für experimentelle und andere wissenschaftliche Zwecke durchgeführt. Alle Studien wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin und dem Institut für Medizinische Physiologie der Universität Kopenhagen (Dänemark) durchgeführt. Die verwendete Methodik ist - bis auf die tpO_2 Messungen, welche erst ab der Studie 2 etabliert wurden - weitestgehend identisch und wird daher zusammen vorgestellt. Gemeinsam ist allen drei Studien auch das verwendete Modell-System: Die neuronale Aktivierung des zerebellären Kortex. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, der funktionellen Organisation des zerebellären Kortex und der typischen Signalparameter gibt Abbildung 2 (Seite 11). Nach Implementierung eines offenen kraniellen Fensters über der Vermis-Region des Kleinhirns wurde an beatmeten Tieren unter Überwachung des arteriellen Blutdrucks, der Blutgase und der Körpertemperatur, zeitgleich synaptische Aktivität („Input-Aktivität“), Spike-Aktivität („Output Aktivität“), CBF und tpO_2 unter verschiedenen Graden neuronaler Aktivierung (Kletterfaser-Stimulation) und ggf. nach pharmakologischer Intervention gemessen.

Kletterfaser-Stimulation: Für die neuronale Aktivierung des zerebellären Kortex wurde eine bipolare Stimulationselektrode (0,25 mm Kontaktentfernung) stereotaktisch in der unteren Olive, dem Ursprung der Kletterfasern, positioniert (Mathiesen *et al.*, 1998) und Stimuli mit Frequenzen zwischen 0,5 und 20 Hz als Blockpuls (Dauer: 0,2 ms, Stromstärke: 0,15 mA) appliziert. Die Stimulationsdauer betrug 15 (Studie 2, 3) bzw. 60 Sekunden (Studie 1). Kletterfaser-Stimulation ist vielfach für Fragestellungen der neurovaskulären Kopplung eingesetzt worden (Mathiesen *et al.*, 1998; Mathiesen *et al.*, 2000; Yang & Iadecola, 1998; Caesar *et al.*, 2003a; Caesar *et al.*, 2003b).

Elektrophysiologische Messungen: Aktionspotentiale (engl.: Spikes) der Purkinje-Zellen sowie extrazelluläre lokale Feldpotentiale (LFPs) als Indikatoren der neuronalen Aktivität (Mathiesen *et al.*, 1998) wurden im Bereich der Mittellinie der Vermis-Region (Folia 5, 6) des zerebellären Kortex mittels Glaselektroden (Impedanz 2-3 M Ω ; Spitzen-Durchmesser \sim 2 μ m) gemessen (Tiefe 300-600 μ m, Ebene der Purkinje-Zell Schicht; Verstärkung und Frequenzfilterung: CyberAmp 380, Axon Instruments, Union City, Kalifornien, USA; Aufzeichnung, Datenanalyse: Spike 2 Software mit Power 1401 Interface, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien). Die korrekte Positionierung erfolgte anhand elektrophysiologischer Kriterien (Mathiesen *et al.*, 1998). Als Indikator der neuronalen synaptischen Aktivität wurde das summierte LFP berechnet (Mathiesen *et al.*, 1998).

Messung des tpO_2 und Berechnung des Sauerstoffverbrauchs im zerebellären Kortex: Für die Sauerstoffpartialdruckmessungen wurden miniaturisierte Clark-Elektroden verwendet (siehe Abbildung

2; OX-10, Unisense A/S, Aarhus, Dänemark; Revsbech, 1989). Angeschlossen wurden die Elektroden an ein Picoammeter (PA2000, Unisense) mit einer Polarisierungsspannung von -0,8 Volt (getrennt für Mess- und Guard-Kathode). Der Stromfluss hängt linear ab vom Sauerstoffpartialdruck an der Elektrodenspitze (Fatt, 1976) und konnte nach erfolgter Zwei-Punkt-Kalibrierung direkt umgerechnet werden. Die Bestimmung der $CMRO_2$ unter Aktivierung in Studie 3 erfolgte anhand der erfassten tpO_2 und relativen CBF Veränderungen, gemäß der von Gjedde publizierten Berechnung (Gjedde, 2005) und unter Verwendung in der Literatur beschriebener Werte für den absoluten Ruheblutfluss, die basale $CMRO_2$ und Kenngrößen des Sauerstofftransportes in das Gewebe (Zhu *et al.*, 2002).

Blutflussmessung mittels Laser-Doppler Flowmetry (LDF): Die Erfassung des regionalen zerebellären Blutflusses unter Ruhebedingungen und während neuronaler Aktivierung (Stimulation) erfolgte mittels LDF (Wellenlänge 780 nm, Faserabstand: 250 μ m; Periflux 4001 Master, PeriMed, Järfälla, Schweden). Die LDF ist eine etablierte Methode zur nicht-invasiven, kontinuierlichen Blutflussmessung mit hoher zeitlicher Auflösung (Dirnagl *et al.*, 1989; Fabricius *et al.*, 1997) und ermöglicht relative Veränderung gegenüber einem Ruhe- bzw. Kontrollblutfluss zu berechnen (Fabricius & Lauritzen, 1996; Fabricius *et al.*, 1997).

Pharmaka: Studie 1 und 3: $GABA_A$ Rezeptorantagonisten: Bicuculline-Methiodide (0,5 mM); Picrotoxin (0,5 mM). $GABA_A$ Rezeptoragonist: Muscimol (0,2 mM). Vasodilatator: Adenosin (0,5 mM). Alle Substanzen wurden gelöst in aCSF topisch superfundiert.

Studie 2: Neuronaler NO-Synthase Inhibitor: 7-Nitroindazol (7-NI; 40mg/kg Körpergewicht i.p.).

AMPA-Rezeptorantagonist: CNQX (0,5 mM; topische Superfusion in aCSF).

Datenauswertung und Statistik: Für die Datenauswertung wurden einander entsprechende und zeitgleich vom selben umschriebenen Kortexareal erfasste Signalveränderungen des CBF, tpO_2 (bzw. kalkulierte $CMRO_2$) und der LFP verwendet. Mehrere Komponenten (Größe, Steilheit, Beginn) der stimulationsinduzierten Signalantwort wurden bestimmt anhand gemittelter Antworten repetitiver Stimulationen. Weiterhin wurden Veränderungen der Signalparameter unter Ruhebedingungen (ohne Stimulation; engl.: Baseline) analysiert und verglichen.

Zur Untersuchung, ob die Signalantworten durch die jeweilige pharmakologische Intervention eine signifikante Änderung erfahren, wurde eine Varianzanalyse wiederholter Messungen durchgeführt (ANOVA), gefolgt von einer Bonferroni *post hoc* Analyse (SigmaStat). In der Studie 1 wurden die Daten vor einer zwei- oder dreifaktoriellen Varianzanalyse zunächst logarithmisiert um die Normalverteilung sicherzustellen. Effekte vor und nach einer einzigen Behandlung (NO-Synthase Inhibition) wurden mittels t-Test für verbundene Stichproben untersucht. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikante Änderung betrachtet. Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler dargestellt (Studie 2 und 3). Logarithmisierte Daten in Studie 1 sind als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall angegeben.

4. Ergebnisse

Erhöhung der Spike-Rate unter Disinhibition führt nicht zu einem Anstieg des CBF (*Studie 1*)

Pharmakologisch induzierte Disinhibition resultierte in einem massiven und signifikanten Anstieg der spontanen Spike-Aktivität um 200-300%, während der Blutfluss auf unverändertem Niveau verblieb. Die pharmakologische Modulation am GABA_A-Rezeptorkomplex erfolgte durch Superfusion von Bicuculline oder Picrotoxin und führte zu einer Abschwächung des inhibitorischen GABAergen Einflusses auf die Purkinje-Zellen. Getrennte Experimente für GABA_A Antagonisten unterschiedlicher Wirkprinzipien und die topische Applikation belegten, dass es sich um lokale und GABA vermittelte Effekte handelt.

Zum Ausschluss einer eingeschränkten vaskulären Reaktivität unter GABA_A Antagonisten, wurde zusätzlich unter Picrotoxin und Bicuculline die dilatatorische Kapazität der Blutgefäße bei Superfusion des Endothelium-unabhängigen Vasodilatators Adenosin untersucht. Die Adenosin induzierte maximale Blutflussantwort war unter Disinhibition im Vergleich zur Kontrollbedingung unverändert.

Zusammengenommen impliziert dies, dass im Zerebellum in neuronal aktiven Hirnregionen Veränderungen der Spike-Aktivität nicht zwangsläufig zu signifikanten CBF Veränderungen führen müssen.

Die Kopplung zwischen synaptischer Aktivität und CBF ist unter Disinhibition erhalten (*Studie 1*)

Unter Picrotoxin induzierter Disinhibition war die stimulationsinduzierte synaptische Aktivität an der Kletterfaser-Purkinje-Zell Synapse (erfasst als Σ LFP) erhalten und für alle Stimulationsfrequenzen nicht signifikant unterschiedlich zu der Aktivierung unter Kontrollbedingungen. Ebenso waren die durch synaptische Aktivierung induzierten Blutflussantworten unter Picrotoxin nicht signifikant verringert. Auch unter Bicuculline zeigte sich die neurovaskuläre Kopplung (Beziehung zwischen Ausmaß der synaptischen Aktivität und Größe der begleitenden Blutflussantwort) unverändert. Dies belegte, dass die neurovaskuläre Kopplung in dieser Präparation nicht gestört ist durch die pharmakologische Disinhibition und dass Steigerungen in der exzitatorischen synaptischen Aktivierung von Purkinje-Zellen - im Gegensatz zum Ansteigen des axonalen (Spiking) Output – korrelieren mit Anstiegen der Blutflussantwort.

Korrelation zwischen synaptischer Aktivität und den CBF und tpO₂ Antworten (*Studie 2a*)

Die simultane Erfassung von Änderungen der neuronalen Aktivität, des Blutflusses und des tpO₂ vom selben aktivierten Areal des zerebellären Kortex ermöglichte es erstmals für einen breiten Grad an Aktivierung, die Beziehung zwischen synaptischer Aktivität und tpO₂- und CBF-Antworten zu

bestimmen. Kletterfaser-Stimulation induzierte tpO_2 und CBF Veränderungen zeigten eine klare Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz und der synaptischen Aktivität. Die CBF Antworten waren charakterisiert durch einen monophasischen Anstieg, der mit steigender Stimulationsfrequenz zunimmt. Die tpO_2 Antworten hingegen variierten zwischen isoliertem Sauerstoffpartialdruckabfall bei niedriger und biphasischem Verlauf bei stärkerer Aktivierung (initiale Gewebsdeoxygenierung gefolgt von einer langsamer einsetzenden und länger anhaltenden Gewebshyperoxygenierung). Es zeigte sich, dass die neuronale Aktivität linear korreliert ist mit der Steilheit (engl.: Slope) der initialen Gewebsdeoxygenierung, dem Parameter der die Entzugsrate von Sauerstoff im Gewebe (-k) angibt und somit den lokalen Sauerstoffmeherverbrauch (vor einsetzen der Blutflussantwort) in der aktivierten Region widerspiegelt. Das Ausmaß der Gewebsdeoxygenierung über die gesamte Stimulationsperiode hingegen zeigte eine nichtlineare Beziehung zur synaptischen Aktivität und erreichte ab mittlerem Aktivierungsniveau ein Plateau. Zusammen deuteten diese Beobachtungen darauf hin, dass die prinzipiell biphasischen tpO_2 Veränderungen bedingt sind i) in dem Anstieg des Sauerstoffmetabolismus in der aktivierten Region, und ii) von einer gesteigerten Sauerstoffversorgung durch den CBF Anstieg, welcher dazu führt, dass der initiale tpO_2 Abfall abgekürzt und letztlich umgekehrt wird in eine Hyperoxygenierung. Dies wurde in den folgenden Experimenten (Studie 2 b, c) überprüft.

Die Hemmung der Blutflussantwort vergrößert die Gewebsdeoxygenierung (*Studie 2b*)

Die Applikation des irreversiblen Inhibitors der neuronalen NO-Synthase (7-NI), bewirkte eine signifikante Reduktion der stimulationsinduzierten CBF Antworten (-60.3%). Vergesellschaftet war dies mit einer mehr als vierfachen Zunahme der Größe des aktivitätsinduzierten tpO_2 Abfalls (+403.4%) und einer signifikanten Abnahme der Gewebshyperoxygenierung um 78.1%. Bedeutsam ist, dass die synaptische Aktivität nicht signifikant differierte zwischen Kontrollstimulationen und Stimulationen nach 7-NI. Die erfassten Signalveränderungen waren somit nicht auf eine Änderung der Stärke der zugrunde liegenden Aktivierung zurückzuführen. Auch die Steilheit der initialen Gewebsdeoxygenierung war nicht signifikant verändert und zeigte, dass dieser Parameter nicht signifikant von der Blutflussantwort beeinflusst ist.

AMPA-Rezeptor Blockade attenuiert synaptische Erregung, CBF und tpO_2 Antworten (*Studie 2c*)

Hauptziel dieser Teilstudie war es zu klären, ob der aktivitätsinduzierte Anstieg des lokalen Sauerstoffmetabolismus von der postsynaptischen Aktivität in Purkinje-Zellen abhängt. Während transientser CNQX Superfusion erfuhren die evozierte synaptische Aktivität und die CBF Antwort eine signifikante Reduktion (Abnahme $\sum LFP$: 68.9%; CBF: 69%). Dies ging einher mit einer signifikanten

Abschwächung der negativen und positiven tpO_2 -Signale (Gewebsdeoxygenierung: -81.3%; Hyperoxygenierung: -84.4%). Die Reduktion aller vier Parameter war in der Auswaschphase reversibel. Dass durch AMPA-Rezeptorblockade zusammen mit der Reduktion der postsynaptischen Aktivität auch der Sauerstoffmetabolismus (erfasst anhand der Gewebsdeoxygenierung) herabgesetzt wird, wurde bestätigt in einer Gruppe von Tieren in denen nach vorheriger Gabe von 7-NI eine Superfusion mit CNQX erfolgte. Es wurde somit in diesen Experimenten der Einfluss der postsynaptischen Glutamat-Rezeptor Blockade auf das durch die CBF-Hemmung mit 7-NI demaskierte - und somit zunächst vergrößerte - negative tpO_2 Areal untersucht. Auch in dieser Teil-Studie erfuhr die aktivitätsinduzierte Gewebsdeoxygenierung eine der Reduktion der synaptischen Aktivität entsprechende Verringerung (Gewebsdeoxygenierung -94.9%; Σ LFP -84.7%).

Modifikation evozierter $CMRO_2$ und CBF Antworten bei Variation GABAerger Inhibition (*Studie 3*)

Ausgehend von den Befunden der vorhergehenden Studien wurde in einem weiteren Schritt der Einfluss eines erhöhten und erniedrigten inhibitorischen Niveaus auf den durch exzitatorische Erregung induzierten Sauerstoffverbrauch und CBF untersucht.

Aktivierung bzw. Blockade des $GABA_A$ Rezeptors erfolgte durch Superfusion von Muscimol (verstärkte Inhibition) bzw. Bicuculline (Disinhibition). Erhöhte Inhibition führte zu einer Reduktion der spontanen Aktionspotentialrate von über 90% ohne Einfluss auf Ruheblutfluss und tpO_2 . Die aktivitätsinduzierten CBF Antworten erfuhren eine Reduktion um bis zu 80,5%. Das bedeutsamste Resultat war, dass GABA Rezeptor vermittelte Inhibition der Purkinje-Zellen zu einer Reduktion der unter Kletterfaser-Purkinje-Zell Stimulation normalerweise auftretenden initialen Gewebsdeoxygenierung um 72% führte. Kalkulation des zerebellären Sauerstoffverbrauchs bestätigte als Ursache dieser Reduktion eine signifikante Abnahme (-68,4%) im aktivitätsinduzierten Sauerstoffverbrauch unter verstärkter Inhibition. Interessanterweise war die Amplitude der Depolarisationsphase des LFP gering aber signifikant vergrößert unter Muscimol und zeigte, dass die synaptische Erregung erhalten geblieben ist. Disinhibition führte zu einer Wiederherstellung des gehemmten Sauerstoffverbrauchs und der CBF Antwort und einem nun triphasischen tpO_2 Signal unter Stimulation, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen späten tpO_2 Abfall, welcher ursächlich auf die Kombination eines CBF Abfalls zu diesem Zeitpunkt und einem erhöhten Sauerstoffverbrauch zurückzuführen war. Variation des inhibitorischen Tonus führte somit zu einer signifikanten und gleichsinnigen Modifikation metabolischer ($CMRO_2$) und hämodynamischer (CBF) Antworten synaptischer Erregung.

5. Diskussion

Das Wissen, wie aktive Nervenzellen des Gehirns ihren permanent hohen Energiebedarf decken, und wie dieser Energiebedarf verlässlich und präzise über die Versorgung mit dem Blutfluss gedeckt wird, ist eine Grundvoraussetzung um pathophysiologische Ereignisse und Erkrankungen wie Ischämien, Anoxien oder neurodegenerative Erkrankungen verstehen und zukünftig zielgerichteter behandeln zu können (Ames, III, 2000). An der Aufrechterhaltung einer adäquaten zerebralen Perfusion sind systemische Mechanismen (Blutdruckveränderungen), globale zerebrale Regulationsmechanismen (zerebrale Autoregulation) und strukturelle Adaptationsvorgängen (Angiogenese) beteiligt. Dynamische Regulationsmechanismen etablieren lokalisierte Veränderungen des CBF entsprechend der funktionellen Aktivität und der metabolischen Bedürfnisse einzelner Hirnregionen und wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die bemerkenswerte Fähigkeit des Gehirns eine enge Korrelation zwischen Anstieg der Nervenzellaktivität, des Metabolismus und des CBF aufrechtzuerhalten – die neurometabolische und neurovaskuläre Kopplung – bildet zugleich die Grundlage funktionell-bildgebender Verfahren des Gehirns wie PET, fMRT und NIRS (Villringer & Dirnagl, 1995; Raichle, 1998).

Die Klärung der Fragen nach den individuellen metabolischen Kosten der an der Signaltransduktion beteiligten Prozesse und Zelltypen, der Art der Energiegewinnung und des Energiesubstrates derer sich aktivierte Neurone bedienen und welche Mechanismen und welche neuronalen und glialen Zelltypen in aktivierten Hirnregionen den CBF so deutlich und verlässlich ansteigen lassen, betrifft gleichermaßen Grundlagen der Hirnphysiologie und die Interpretation von Daten, die mittels nicht-invasiver Bildgebungsverfahren gewonnen werden (Kida & Hyder, 2006).

Eine der Hauptkontroversen betrifft die Unklarheit über die Art der neuronalen Aktivität selbst welche den Ursprung der neurovaskulären Kopplung und somit auch die Basis des BOLD Signals bildet (Arthurs & Boniface, 2002; Nair, 2005; Lauritzen, 2001). Die Frage, ob die hämodynamische Antwort vorwiegend durch Prozesse im Rahmen der synaptischen Signalübertragung zu einer Gehirnregion (Input) oder durch eine Erhöhung der Aktionspotentialrate (Output Aktivität) in dem aktivierten Areal definiert wird, wurde bisher zumeist nur indirekt untersucht. Studien mit kombinierten elektrophysiologischen und hämodynamischen (CBF, BOLD fMRT) Messungen fanden sowohl Korrelationen zwischen hämodynamischen Antworten und synaptischer Aktivität (Mathiesen *et al.*, 1998; Logothetis *et al.*, 2001; Sheth *et al.*, 2004) als auch Korrelationen zwischen hämodynamischen Signalen und Spike-Aktivität (Rees *et al.*, 2000; Heeger *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Mukamel *et al.*, 2005). Obwohl Logothetis *et al.* unter Aktivierung des visuellen Kortex zeigen konnten, dass LFP besser als Spike-Aktivität mit der BOLD Antwort korrelieren, waren in dieser Untersuchung auch Output

Aktivität (MUA) und BOLD fMRT Antwort korreliert (Logothetis *et al.*, 2001). Bedingt durch die Tatsache, dass LFP und Veränderungen der Aktionspotentialrate in aktivierten Hirnregionen oftmals korrelieren (Devor *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004) ist die Klärung der Frage was die Blutflussantwort tatsächlich determiniert letztendlich nur möglich in Paradigmen, in denen es gelingt diese verlässlich zu trennen. Der zerebelläre Kortex ist hierfür eine ideales Modell, da es pharmakologisch möglich ist, eine Disinhibition mit der Folge einer Erhöhung der Aktionspotentialrate (Spike-Aktivität) durchzuführen, ohne epileptische Aktivität zu induzieren (Lauritzen, 2001).

Dies bildete den Ausgangspunkt der Studie 1. Wir konnten durch Blockade des inhibitorischen Einflusses auf die Purkinje-Zellen erstmals zeigen, dass eine massive Erhöhung der Aktionspotentialrate der Haupteffektorzellen und einzigen Ausgangsneurone einer Gehirnregion - ohne begleitende Änderung des synaptischen Inputs - nicht zu einer Veränderung des CBF führt. Ein Effekt, der nicht auf eine gestörte vaskuläre Reaktivität zurückzuführen war. Weiterhin führte exzitatorische synaptische Aktivierung der gleichen Neuronenpopulation in denselben Experimenten unverändert zu einem CBF Anstieg. Darüber hinaus konnten wir in Studie 3 zeigen, dass der basale CBF (und tpO_2) auch durch eine isolierte Reduktion der Aktionspotentialrate um über 90% nicht signifikant verändert wird. Zusammen demonstrieren diese Untersuchungen, dass im Zerebellum der Blutfluss unabhängig von der spontanen Spike-Aktivität in Purkinje-Zellen ist. Dies impliziert, dass Veränderungen der Spike-Aktivität nicht *per se* zu geändertem CBF führen und umgekehrt der Blutfluss in Regionen gesteigerter Aktivität unverändert sein kann. Spike-Aktivität und hämodynamische Antwort müssen somit nicht proportional oder gekoppelt sein (Heeger *et al.*, 2000; Lauritzen, 2001). Da im Gegensatz hierzu die Kopplung zwischen synaptischer Aktivität und CBF - auch unter Dissoziation des CBF von der Aktionspotentialrate - bestehen blieb, stützen die Untersuchungsergebnisse dieser Dissertation die These, dass der Blutfluss determiniert wird durch Prozesse im Rahmen der Integration des synaptischen Inputs zu einer Hirnregion (Übersichtsarbeiten siehe Lauritzen, 2005; Raichle & Mintun, 2006).

In der Studie 2 konnten wir darüber hinaus Evidenz dafür liefern, dass auch der Anstieg im aktivitätsinduzierten Sauerstoffmetabolismus von der Aktivität in postsynaptischen AMPA-Rezeptoren abhängt. Die Ergebnisse der tpO_2 Messungen unter Aktivierung und Blockade ionotroper Glutamatrezeptoren zeigten, dass nicht nur die neurovaskuläre (Mathiesen, 1998; Yang & Iadecola, 1998; Dunbar *et al.*, 2004) sondern auch die neurometabolische ($CMRO_2$) Kopplung der synaptischen Aktivität folgt. Insgesamt Ergebnisse die mit tpO_2 und LFP Messungen unter direkter kortikaler Stimulation vereinbar sind (Metzger, 1977) und gestützt werden durch eine kürzlich vorgestellte Untersuchung mit tpO_2 Messungen im visuellen Kortex (Viswanathan & Freeman, 2007).

Die besondere postsynaptische Lokalisation von Enzymen des oxidativen Metabolismus (Wong-Riley, 1989) und immunhistologische Studien, die keine Hinweise astrozytärer Aktivierung unter Stimulation von Purkinje-Zellen fanden (Tian & Bishop, 2002), bekräftigen den neuronalen Ursprung des gestiegenen Sauerstoffmetabolismus in unseren Experimenten. Dies bedeutet erstmalige *in vivo* Evidenz für den von Kaschiske et al. an hippocampalen Hirnschnittuntersuchungen erbrachten Nachweis, dass postsynaptische Aktivitätserhöhung mit einem raschen Anstieg des oxidativen Metabolismus in Neuronen einhergeht (Kaschiske *et al.*, 2004) und ist vereinbar mit dem ebenfalls im Schnittpräparat zu beobachtenden Anstieg des mitochondrialen Sauerstoffmetabolismus in Neuronen, ausgelöst durch mitochondriale Ca^{2+} Veränderungen bei synaptischer Aktivierung (Kann *et al.*, 2003; Hayakawa *et al.*, 2005).

Diese Befunde wiederum stehen der Theorie einer dominierenden initialen nicht-aeroben glykolytischen Energiegewinnung gefolgt von verspätet einsetzendem oxidativen Metabolismusanstieg entgegen (Frahm *et al.*, 1996; Mintun *et al.*, 2002). Unsere Daten stützen vielmehr die Hypothese, dass initiale Anstiege des deoxygenierten Hämoglobin und entsprechend der so genannte initial dip des BOLD Signals (negatives BOLD Signal) und Sauerstoffpartialdruckabfälle im Gewebe das Resultat eines unmittelbar gesteigerten neuronalen Sauerstoffverbrauchs in der aktivierten Region sind (Silver, 1978; Menon *et al.*, 1995; Vanzetta & Grinvald, 1999; Kim *et al.*, 2000; Ances *et al.*, 2001; Devor *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003; Sheth *et al.*, 2004). Nicht beantwortet werden kann die Frage, ob unter transientem Aktivitätsanstieg in der Tat Laktat neuronal aufgenommen und oxidativ verstoffwechselt wird (Pellerin & Magistretti, 2003) oder neuronaler oxidativer Glukosemetabolismus, wie unter basalen Bedingungen, auch unter Aktivierung den Haupt ATP-Lieferant darstellt (Hyder *et al.*, 1996; Sibson *et al.*, 1998; Hoge *et al.*, 1999).

Weiterhin zeigte unsere Studie anhand der Geschwindigkeit der Abfälle des tpO_2 unter Aktivierung (Slope), dass der initiale Sauerstoffmehrverbrauch linear korreliert mit dem Anstieg der synaptischen neuronalen Aktivität. Dies ist vereinbar mit Ergebnissen von Studien, die über indirektere Methoden als der tpO_2 Messung versucht haben, den Sauerstoffverbrauch unter Aktivierung zu berechnen und der neuronalen Aktivität gegenüberzustellen (Hyder *et al.*, 2002; Sheth *et al.*, 2004). Divergent sind unsere Befunde hier zu der Studie von Seth et al. im somatosensorischen Kortex, die nahe legt, dass die $CMRO_2$ erst ab einem gewissen Grad der Aktivierung ansteigt. Unsere tpO_2 Messungen deuten darauf hin, dass der Sauerstoffverbrauch ohne Schwellenwert für die Aktivierung, unmittelbar mit Ansteigen der Aktivität zunimmt. Durch die erstmals für einen breiten Bereich der neuronalen Aktivierung durchgeführte simultane Erfassung der synaptischen Aktivität, des CBF und der Sauerstoffpartialdruckveränderungen gelang es uns zudem, die Korrelation und die wechselseitige

Beeinflussung zwischen diesen Parametern umfassend zu charakterisieren. Dies zeigte, dass die CBF Antwort supralinear mit der synaptischen Aktivität ansteigt, eine Korrelation die auch in einer Reihe neuerer Untersuchungen für den somatosensorischen Kortex gezeigt werden konnte (Devor *et al.*, 2003; Sheth *et al.*, 2004; Hewson-Stoate *et al.*, 2005) und impliziert, dass hämodynamische Antwort und neuronale Aktivität über ein weites Aktivierungsspektrum erfasst, nicht linear korreliert sein müssen. Des Weiteren deuten unserer Ergebnisse daraufhin, dass CBF und Sauerstoffverbrauch ebenfalls nicht linear korreliert zu sein scheinen, welches ebenso humane PET und fMRT Studien nahe legen (Vafae & Gjedde, 2000; Uludag *et al.*, 2004), jedoch im Gegensatz zu humanen und tierexperimentellen Studien steht, die eine lineare Beziehung zwischen CBF und CMRO₂ Veränderungen vermuten lassen (Hoge *et al.*, 1999; Sheth *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2005). Bis auf die Studie von Seth *et al.* ermangelt es den genannten Studie an einer Erfassung der neuronalen Aktivität, so dass eine Einschätzung der tatsächlichen Veränderungen des Aktivierungsniveaus nicht möglich ist. Interessanterweise sind unserer Studien in Übereinstimmung mit mathematischen Modellen, die den Sauerstofftransport ins Gewebe unter CMRO₂ und CBF Veränderungen analysieren. Diese ergaben vielfach eine supralineare Beziehung zwischen CBF und Sauerstoffverbrauch, um in Anbetracht eines diffusionslimitierten Sauerstofftransportes ins Gewebe (Gjedde *et al.*, 1991) die Bedürfnisse eines gestiegenen oxidativen Metabolismus adäquat über den gesteigerten Blutfluss zu bedienen (Buxton & Frank, 1997; Hudetz, 1999; Vafae & Gjedde, 2000; Secomb *et al.*, 2000). Zugleich bestätigen die gemessenen biphasischen tpO₂ Antworten dem gemäß der Modelle erwarteten tpO₂ Verlauf unter Aktivierung (Valabregue *et al.*, 2003; Huppert *et al.*, 2007).

Da der Sauerstoffverbrauch vor Veränderungen des CBF anzusteigen vermochte und auch unter gehemmter CBF Antwort ansteigen konnte, liegt es allerdings nahe, dass der tpO₂ unter Ruhebedingungen fernab ist von Werten um Null, wie initial hypothetisiert worden war (Buxton & Frank, 1997; Vafae & Gjedde, 2000). Die Studien dieser Arbeit liefern daher experimentelle Evidenz für die modifizierte Hypothese, dass unter normalen Bedingungen eine Sauerstoffreserve im Gewebe existiert, die unter geringen Graden der Aktivierung bzw. initial im Verlauf für einen gesteigerten Sauerstoffmetabolismus zur Verfügung steht (Buxton, 2001; Mintun *et al.*, 2001).

Die etablierte nicht lineare Korrelation zwischen neuronaler Aktivität und dem Ausmaß der Deoxygenierung (über die gesamte Stimulationsdauer gemessen) impliziert, dass die Größe der Deoxygenierung und somit möglicherweise auch der initial dip im BOLD fMRT nicht als angemessener Indikator des unterliegenden Sauerstoffverbrauchs oder gar der neuronalen Aktivität dienen kann (Sheth *et al.*, 2003) und bietet einen Erklärungsansatz, warum intravaskuläre Deoxygenierung möglicherweise nicht verlässlich detektiert werden kann (Lindauer *et al.*, 2001; Ances, 2004). Eine

massive O₂ Zufuhr durch den gestiegenen Blutfluss als Ursache einer abgekürzten Gewebs- oder Hämoglobindeoxygenierung und der folgenden Hyperoxygenierung ist vielfach hypothetisiert worden (Silver, 1978; Thompson *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004) und konnte durch die selektive Hemmung der CBF Antwort in Studie 2 verifiziert werden. Die Möglichkeit den Sauerstoffmetabolismus unter Aktivierung durch Attenuierung der CBF Antwort zu demaskieren, konnte mittlerweile durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Fukuda *et al.*, 2006a; Fukuda *et al.*, 2006b; Nagaoka *et al.*, 2006).

Das Hauptaugenmerk humaner und tierexperimenteller Studien zu den Grundlagen der neurometabolischen und neurovaskulären Kopplung richtet sich vorwiegend auf Mechanismen exzitatorischer Signaltransduktion, auf die der Großteil des Energiebedarfs neuronalen Kommunikation entfällt (Attwell & Laughlin, 2001; Lennie, 2003) und die die Grundlage klassischer Aktivierungsparadigmen bilden. Zusätzlich bedarf es jedoch eines umfassenderen Verständnisses inhibitorischer Einflüsse auf die Kopplung (Jueptner & Weiller, 1995; Arthurs & Boniface, 2002; Hyder *et al.*, 2006; Buzsaki *et al.*, 2007). Globale Variation der Inhibition moduliert den basalen CBF und Glukoseverbrauch (Kelly & McCulloch, 1983) und lokale inhibitorische synaptische Aktivität induziert einen Anstieg im Glukosemetabolismus (Nudo & Masterton, 1986) und verdeutlicht die Relevanz energetischer Kosten GABAergen Neurotransmission (Patel *et al.*, 2005).

Ausgehend von den Beobachtungen, dass Steigerung des inhibitorischen Niveaus im Zerebellum durch GABA_A-Agonisten zu einer Dissoziation der synaptischen Aktivität von der begleitenden Blutflussantwort führt (Caesar *et al.*, 2003a), war es Ziel unserer dritten Studie zu untersuchen, ob Variationen des inhibitorischen GABAergen Einflusses auch den Sauerstoffmetabolismus durch exzitatorische Erregung signifikant verändern. Stimulation unter verstärktem inhibitorischem Einfluss führt zu einem Anstieg des postsynaptischen LFP (Caesar *et al.*, 2003a). Da die energetische Hauptlast auf die Wiederherstellung, der im Rahmen der exzitatorischen Signaltransduktion auftretende Ionenverschiebung entfällt (Lennie, 2003), war von uns ein gesteigerter Sauerstoffmetabolismus antizipiert worden, welcher zudem bei gleichzeitig auftretender Reduktion der CBF Antwort ideal anhand der tpO₂ Messung detektierbar sein müsste.

Unsere Untersuchungen erbrachten jedoch das unerwartete Ergebnis, dass erhöhte Inhibition den Sauerstoffverbrauch dramatisch verringert. Insgesamt zeigte Studie 3, dass der Sauerstoffverbrauch durch exzitatorische synaptische Erregung eine Erniedrigung bzw. Erhöhung gemäß der Variation im GABAergen Tonus erfuhr, welche interessanterweise begleitet war von einer entsprechenden Veränderung der Blutflussantwort. Dies demonstrierte zum ersten Mal, dass tonische synaptische Inhibition in der Lage ist, den Sauerstoffverbrauch in aktivierten Hirnregionen entscheidend zu modulieren und, dass CBF und Sauerstoffverbrauch eine gleichsinnige Regulation bei Veränderungen

des GABAergen Einflusses der aktivierten Neuronenpopulation erfahren. Dies unterstreicht die Bedeutung inhibitorischer Einflüsse in der Regulation der neurovaskulären (Cauli *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005) und neurometabolischen Kopplung (Patel *et al.*, 2005; Nasrallah *et al.*, 2007) und liefert Evidenz für die Hypothese, dass der Initiierung und Regulation aktivitätsinduzierter Veränderungen des CBF und des oxidativem Metabolismus identische zelluläre Mechanismen unterliegen (Bonvento *et al.*, 2002; Lauritzen, 2005).

Kritisch anzumerken ist, dass es ungeklärt ist, ob diese im zerebellären Kortex der Ratte erhobenen Befunde auch auf Aktivierungsparadigmen und die Kopplungskaskade des zerebralen Kortex übertragbar sind. Das Zerebellum ist gekennzeichnet durch eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Anoxie und Kletterfaser-Purkinje-Zell Synapsen gehören zu den stärksten exzitatorischen Verbindungen des Nervensystems (Llinas, 2004). Die unterschiedliche Relevanz spezifischer ionotroper Glutamatrezeptoren und einzelner Mediatoren, wie zum Beispiel dem NO, in der CBF Regulation könnten hier auf Unterschiede in den Kopplungsmechanismen zwischen zerebellärem und zerebralem Kortex hindeuten (Yang & Iadecola, 1997; Lindauer *et al.*, 1999; Mathiesen *et al.*, 1998; Nielsen & Lauritzen, 2001).

Zusammenfassend ist es uns gelungen, die Beziehung zwischen stimulationsinduzierten Änderungen der neuronalen Aktivität des tpO_2 und CBF im zerebellären Kortex umfassend zu charakterisieren und den Ursprung der Signalveränderungen zu spezifizieren. Die Studien dieser Dissertation liefern zugleich experimentelle Evidenz für eine Feed-forward Regulation der neurometabolischen und neurovaskulären Kopplung. Anstiege des Blutflusses und des Sauerstoffverbrauchs bedurften der postsynaptischen Aktivierung von AMPA-Rezeptoren zerebellärer Purkinje-Zellen und ein isolierter Anstieg oder Abfall der Aktionspotentialrate ohne begleitende Änderung des exzitatorischen synaptischen Inputs führte nicht zu einer CBF Veränderung. Dies entspricht der Hypothese, dass glutamaterge Signaltransduktion an exzitatorischen Synapsen den Schlüsselschritt in der Induktion hämodynamischer und metabolischer Antworten darstellt (Bonvento *et al.*, 2002; Uludag *et al.*, 2004; Lauritzen, 2005). Entsprechend dieser Hypothesen hängt der Grad der CBF Antwort weder von dem basalen Blutfußniveau ab, noch von dem Grad der energetischen Belastung, sondern von dem Ausmaß der exzitatorischen Neurotransmission und dem basalen Aktivitätsniveau. Dies deckt sich mit unseren Untersuchungen zum Einfluss des inhibitorischen Tonus auf die stimulationsinduzierten Antworten, die eine gleichsinnige Regulation von CBF und Sauerstoffverbrauch zeigten und somit sowohl der Idee einer Abhängigkeit der vaskulären Antwort vom basalen neuronalen Aktivitätsniveau entsprechen (Uludag *et al.*, 2004), als auch der hypothetisierten gemeinsamen Regulation von CBF und metabolischer Antwort (Bonvento *et al.*, 2002).

Ob in der Tat die durch synaptische Erregung induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Veränderungen in Neuronen das Bindeglied bei der Induktion metabolischer und hämodynamischer Antworten sind, wie hypothetisiert wurde (Lauritzen, 2005), bedarf der Klärung. Alternative durch synaptische Glutamatfreisetzung ausgelöste Signalwege wären die astrozytäre Glutamataufnahme und der begleitende intrazelluläre Natrium Anstieg, denen gleichfalls eine Rolle in der Regulation von Blutfluss und Glukosemetabolismus zugeschrieben wird (Pellerin & Magistretti, 2003; Gurden *et al.*, 2006).

Obwohl ein Regulationsprinzip, das Sauerstoffmetabolismus und Blutfluss gemeinsam an die synaptische Aktivität koppeln würde, intuitiv Sinn zu machen scheint, da es die Prozesse der Informationsweiterleitung mit der höchsten energetischen Belastung (Lennie, 2003; Attwell & Gibb, 2005) unmittelbar verknüpft - durch identische auslösende Mechanismen - mit dem Prozess der Substratbereitstellung, so ist auch in diesem Szenario die physiologische Aufgabe der CBF Regulation weiterhin unbekannt (Raichle & Mintun, 2006). Es bleibt zu klären, ob die Eigenschaft die metabolischen Bedürfnisse gesteigerter Aktivität unmittelbar mit der Gewährleistung der adäquaten Versorgung zu vereinen, eine physiologische Notwendigkeit darstellt oder ein Epiphänomen zellulärer Signalkaskaden.

6. Literaturverzeichnis

- Ames, A., III (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 34: 42-68.
- Ances, B. M. (2004). Coupling of changes in cerebral blood flow with neural activity: what must initially dip must come back up. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 24: 1-6.
- Ances, B. M., Buerk, D. G., Greenberg, J. H., & Detre, J. A. (2001). Temporal dynamics of the partial pressure of brain tissue oxygen during functional forepaw stimulation in rats. *Neurosci.Lett.* 306: 106-110.
- Ances, B. M., Leontiev, O., Perthen, J. E., Liang, C., Lansing, A. E., & Buxton, R. B. (2008). Regional differences in the coupling of cerebral blood flow and oxygen metabolism changes in response to activation: Implications for BOLD-fMRI. *Neuroimage* 4: 1510-1521.
- Arthurs, O. J. & Boniface, S. (2002). How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? *Trends Neurosci.* 25: 27-31.
- Attwell, D. & Gibb, A. (2005). Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat.Rev.Neurosci.* 6: 841-849.
- Attwell, D. & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 21: 1133-1145.
- Barinaga, M. (1997). Neuroscience: What Makes Brain Neurons Run? *Science* 276: 196-198.
- Batini, C., Buisseret-Delmas, C., & Conrath-Verrier, M. (1981). Harmaline-induced tremor. I. Regional metabolic activity as revealed by [¹⁴C]2-deoxyglucose in cat. *Exp.Brain Res.* 42: 371-382.
- Bonvento, G., Sibson, N., & Pellerin, L. (2002). Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci.* 25: 359-364.
- Buxton, R. B. (2001). The elusive initial dip. *Neuroimage* 13: 953-958.
- Buxton, R. B. & Frank, L. R. (1997). A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17: 64-72.
- Buxton, R. B., Uludag, K., Dubowitz, D. J., & Liu, T. T. (2004). Modeling the hemodynamic response to brain activation. *Neuroimage* 23 Suppl 1: S220-S233.
- Buzsaki, G., Kaila, K., & Raichle, M. (2007). Inhibition and brain work. *Neuron* 56: 771-783.
- Caesar, K., Thomsen, K., & Lauritzen, M. (2003a). Dissociation of spikes, synaptic activity, and activity-dependent increments in rat cerebellar blood flow by tonic synaptic inhibition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 16000-16005.
- Caesar, K., Gold, L., & Lauritzen, M. (2003b). Context sensitivity of activity-dependent increases in cerebral blood flow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 4239-4244.
- Cauli, B., Tong, X. K., Rancillac, A., Serluca, N., Lambolez, B., Rossier, J., & Hamel, E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J.Neurosci.* 24: 8940-8949.
- Chen, Z., Silva, A. C., Yang, J., & Shen, J. (2005). Elevated endogenous GABA level correlates with decreased fMRI signals in the rat brain during acute inhibition of GABA transaminase. *J.Neurosci.Res.* 79: 383-391.

- Devor, A., Dunn, A. K., Andermann, M. L., Ulbert, I., Boas, D. A., & Dale, A. M. (2003). Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory cortex. *Neuron* 39: 353-359.
- Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., & Pulsinelli, W. (1989). Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 9: 589-596.
- Dunbar, R. L., Chen, G., Gao, W., Reinert, K. C., Feddersen, R., & Ebner, T. J. (2004). Imaging parallel fiber and climbing fiber responses and their short-term interactions in the mouse cerebellar cortex in vivo. *Neuroscience* 126: 213-227.
- Fabricsius, M., Akgoren, N., Dirnagl, U., & Lauritzen, M. (1997). Laminar analysis of cerebral blood flow in cortex of rats by laser-Doppler flowmetry: a pilot study. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17: 1326-1336.
- Fabricsius, M. & Lauritzen, M. (1996). Laser-Doppler evaluation of rat brain microcirculation: comparison with the [14C]-iodoantipyrine method suggests discordance during cerebral blood flow increases. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 16: 156-161.
- Faraci, F. M. & Heistad, D. D. (1998). Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol.Rev.* 78: 53-97.
- Fatt, I. (1976). *Polarographic Oxygen Sensors* CRC Press, Cleveland, Ohio.
- Fox, P. T. & Raichle, M. E. (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: 1140-1144.
- Fox, P. T., Raichle, M. E., Mintun, M. A., & Dence, C. (1988). Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241: 462-464.
- Frahm, J., Kruger, G., Merboldt, K. D., & Kleinschmidt, A. (1996). Dynamic uncoupling and recoupling of perfusion and oxidative metabolism during focal brain activation in man. *Magn.Reson.Med.* 35: 143-148.
- Fukuda, M., Moon, C. H., Wang, P., & Kim, S. G. (2006a). Mapping iso-orientation columns by contrast agent-enhanced functional magnetic resonance imaging: reproducibility, specificity, and evaluation by optical imaging of intrinsic signal. *J.Neurosci.* 26: 11821-11832.
- Fukuda, M., Wang, P., Moon, C. H., Tanifuji, M., & Kim, S. G. (2006b). Spatial specificity of the enhanced dip inherently induced by prolonged oxygen consumption in cat visual cortex: implication for columnar resolution functional MRI. *Neuroimage* 30: 70-87.
- Gjedde, A. (2005). In: *Blood-brain barriers: from ontogeny to artificial interfaces*, eds. Dermietzel, R. S. & Dermietzel, N. M., John Wiley & Sons Ltd., Hoboken.
- Gjedde, A., Ohta, S., Kuwabara, H., & Meyer, E. (1991). Is oxygen diffusion limiting for blood-brain transfer of oxygen? In: *Brain Work and Mental Activity*, eds. Lassen, N. A., Ingvar, D. H., Raichle, M. E., & Friberg, L., pp. 177-184. Munksgaard, Copenhagen.
- Gurden, H., Uchida, N., & Mainen, Z. F. (2006). Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* 52: 335-345.
- Gusnard, D. A. & Raichle, M. E. (2001). Searching for a baseline: Functional imaging and the resting human brain. *Nat. Rev.Neurosci.* 2: 685-694.
- Hayakawa, Y., Nemoto, T., Iino, M., & Kasai, H. (2005). Rapid Ca²⁺-dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons. *Cell Calcium* 37: 359-370.

- Heeger, D. J., Huk, A. C., Geisler, W. S., & Albrecht, D. G. (2000). Spikes versus BOLD: what does neuroimaging tell us about neuronal activity? *Nat.Neurosci.* 3: 631-633.
- Hewson-Stoate, N., Jones, M., Martindale, J., Berwick, J., & Mayhew, J. (2005). Further nonlinearities in neurovascular coupling in rodent barrel cortex. *Neuroimage* 24: 565-574.
- Hoge, R. D., Atkinson, J., Gill, B., Crelier, G. R., Marrett, S., & Pike, G. B. (1999). Linear coupling between cerebral blood flow and oxygen consumption in activated human cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 9403-9408.
- Hossmann, K. A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann.Neurol.* 36: 557-565.
- Hounsgaard, J. (1979). Pacemaker properties of mammalian Purkinje cells. *Acta Physiol.Scand.* 106: 91-92.
- Hudetz, A. G. (1999). Mathematical model of oxygen transport in the cerebral cortex. *Brain Res.* 817: 75-83.
- Huppert, T. J., Allen, M. S., Benav, H., Jones, P. B., & Boas, D. A. (2007). A multicompartiment vascular model for inferring baseline and functional changes in cerebral oxygen metabolism and arterial dilation. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 27: 1262-1279.
- Hyder, F., Chase, J. R., Behar, K. L., Mason, G. F., Siddeek, M., Rothman, D. L., & Shulman, R. G. (1996). Increased tricarboxylic acid cycle flux in rat brain during forepaw stimulation detected with $^1\text{H}[^{13}\text{C}]$ NMR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 7612-7617.
- Hyder, F., Patel, A. B., Gjedde, A., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Shulman, R. G. (2006). Neuronal-glia glucose oxidation and glutamatergic-GABAergic function. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 26: 865-877.
- Hyder, F., Rothman, D. L., Mason, G. F., Rangarajan, A., Behar, K. L., & Shulman, R. G. (1997). Oxidative glucose metabolism in rat brain during single forepaw stimulation: a spatially localized $^1\text{H}[^{13}\text{C}]$ nuclear magnetic resonance study. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17: 1040-1047.
- Hyder, F., Rothman, D. L., & Shulman, R. G. (2002). Total neuroenergetics support localized brain activity: implications for the interpretation of fMRI. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 10771-10776.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 5: 347-360.
- Ito, H., Ibaraki, M., Kanno, I., Fukuda, H., & Miura, S. (2005). Changes in cerebral blood flow and cerebral oxygen metabolism during neural activation measured by positron emission tomography: comparison with blood oxygenation level-dependent contrast measured by functional magnetic resonance imaging. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 25: 371-377.
- Jones, M., Hewson-Stoate, N., Martindale, J., Redgrave, P., & Mayhew, J. (2004). Nonlinear coupling of neural activity and CBF in rodent barrel cortex. *Neuroimage* 22: 956-965.
- Jueptner, M. & Weiller, C. (1995). Review: does measurement of regional cerebral blood flow reflect synaptic activity? Implications for PET and fMRI. *Neuroimage* 2: 148-156.
- Kann, O., Schuchmann, S., Buchheim, K., & Heinemann, U. (2003). Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *Neuroscience* 119: 87-100.
- Kasischke, K. A., Vishwasrao, H. D., Fisher, P. J., Zipfel, W. R., & Webb, W. W. (2004). Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305: 99-103.
- Kelly, P. A. & McCulloch, J. (1983). The effects of the GABAergic agonist muscimol upon the relationship between local cerebral blood flow and glucose utilization. *Brain Res.* 258: 338-342.

- Kida, I. & Hyder, F. (2006). Physiology of functional magnetic resonance imaging: energetics and function. *Methods Mol.Med.* 124: 175-195.
- Kim, D. S., Duong, T. Q., & Kim, S. G. (2000). High-resolution mapping of iso-orientation columns by fMRI. *Nat.Neurosci.* 3: 164-169.
- Kim,S.G. (2003). Progress in understanding functional imaging signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 3550-3552.
- Kuschinsky, W., Suda, S., Bungler, R., Yaffe, S., & Sokoloff, L. (1983). The effects of intravenous norepinephrine on the local coupling between glucose utilization and blood flow in the rat brain. *Pflugers Arch.* 398: 134-138.
- Lassen, N. A., Ingvar, D. H., & Skinhoj, E. (1978). Brain function and blood flow. *Sci.Am.* 239: 62-71.
- Laughlin, S. B. (2001). Energy as a constraint on the coding and processing of sensory information. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11: 475-480.
- Lauritzen, M. (2001). Relationship of spikes, synaptic activity, and local changes of cerebral blood flow. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 21: 1367-1383.
- Lauritzen, M. (2005). Opinion: Reading vascular changes in brain imaging: is dendritic calcium the key? *Nat.Rev.Neurosci.* 6: 77-85.
- Lennie, P. (2003). The cost of cortical computation. *Curr.Biol.* 13: 493-497.
- Lindauer, U., Megow, D., Matsuda, H., and Dirnagl, U. (1999). Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am.J.Physiol.* 277: H799-H811.
- Lindauer, U., Royl, G., Leithner, C., Kuhl, M., Gold, L., Gethmann, J., Kohl-Bareis, M., Villringer, A., & Dirnagl, U. (2001). No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation. *Neuroimage* 13: 988-1001.
- Liu, Z. M., Schmidt, K. F., Sicard, K. M., & Duong, T. Q. (2004). Imaging oxygen consumption in forepaw somatosensory stimulation in rats under isoflurane anesthesia. *Magn.Reson.Med.* 52: 277-285.
- Llinas, R. R., Walton, K. D., & Lang, E. J. (2004). Cerebellum. In: *The Synaptic Organization of the Brain*, ed. Shepherd, G. M., pp. 271-309. Oxford University Press, Oxford.
- Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., & Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412: 150-157.
- Magistretti, P. J., Pellerin, L., Rothman, D. L., & Shulman, R. G. (1999). Energy on demand. *Science* 283: 496-497.
- Malonek, D. & Grinvald, A. (1996). Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping. *Science* 272: 551-554.
- Mathiesen, C., Caesar, K., Akgoren, N., & Lauritzen, M. (1998). Modification of activity-dependent increases of cerebral blood flow by excitatory synaptic activity and spikes in rat cerebellar cortex. *J.Physiol.* 512: 555-566.
- Mathiesen, C., Caesar, K., & Lauritzen, M. (2000). Temporal coupling between neuronal activity and blood flow in rat cerebellar cortex as indicated by field potential analysis. *J.Physiol.* 523: 235-246.
- Menon, R. S., Ogawa, S., Hu, X., Strupp, J. P., Anderson, P., & Ugurbil, K. (1995). BOLD based functional MRI at 4 Tesla includes a capillary bed contribution: echo-planar imaging correlates with previous optical imaging using intrinsic signals. *Magn.Reson.Med.* 33: 453-459.

- Metzger, H. (1977). The influence of electrical stimulation on cortex PO₂ level in the rat brain. *Adv.Exp.Med.Biol.* 94: 713-720.
- Mintun, M. A., Lundstrom, B. N., Snyder, A. Z., Vlassenko, A. G., Shulman, G. L., & Raichle, M. E. (2001). Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 6859-6864.
- Mintun, M. A., Vlassenko, A. G., Shulman, G. L., & Snyder, A. Z. (2002). Time-related increase of oxygen utilization in continuously activated human visual cortex. *Neuroimage* 16: 531-537.
- Mukamel, R., Gelbard, H., Arieli, A., Hasson, U., Fried, I., & Malach, R. (2005). Coupling between neuronal firing, field potentials, and fMRI in human auditory cortex. *Science* 309: 951-954.
- Mulligan, S. J. & MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431: 195-199.
- Nagaoka, T., Zhao, F., Wang, P., Harel, N., Kennan, R. P., Ogawa, S., & Kim, S. G. (2006). Increases in oxygen consumption without cerebral blood volume change during visual stimulation under hypotension condition. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 26: 1043-1051.
- Nair, D. G. (2005). About being BOLD. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 50: 229-243.
- Nasrallah, F. A., Griffin, J. L., Balcar, V. J., & Rae, C. (2007). Understanding your inhibitions: modulation of brain cortical metabolism by GABA(B) receptors. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 27: 1510-1520.
- Nemeroff, C. B., Kilts, C. D., & Berns, G. S. (1999). Functional brain imaging: twenty-first century phenology or psychobiological advance for the millennium? *Am.J.Psychiatry* 156: 671-673.
- Nielsen, A. and Lauritzen, M. (2001). Coupling and uncoupling of activity-dependent increases of neuronal activity and blood flow in rat somatosensory cortex. *J.Physiol.* 533: 773-785.
- Nudo, R. J. & Masterton, R. B. (1986). Stimulation-induced [¹⁴C]2-deoxyglucose labeling of synaptic activity in the central auditory system. *J.Comp.Neurol.* 245: 553-565.
- Obata, T., Liu, T. T., Miller, K. L., Luh, W. M., Wong, E. C., Frank, L. R., & Buxton, R. B. (2004). Discrepancies between BOLD and flow dynamics in primary and supplementary motor areas: application of the balloon model to the interpretation of BOLD transients. *Neuroimage* 21: 144-153.
- Ogawa, S., Tank, D. W., Menon, R., Ellermann, J. M., Kim, S. G., Merkle, H., & Ugurbil, K. (1992). Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89: 5951-5955.
- Patel, A. B., de Graaf, R. A., Mason, G. F., Rothman, D. L., Shulman, R. G., & Behar, K. L. (2005). The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102: 5588-5593.
- Pellerin, L. & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91: 10625-10629.
- Pellerin, L. & Magistretti, P. J. (2003). Food for thought: challenging the dogmas. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 23: 1282-1286.
- Raichle, M. E. (1998). Behind the scenes of functional brain imaging: a historical and physiological perspective. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 765-772.

- Raichle, M. E., Grubb, R. L., Jr., Gado, M. H., Eichling, J. O., & Ter Pogossian, M. M. (1976). Correlation between regional cerebral blood flow and oxidative metabolism. In vivo studies in man. *Arch.Neurol.* 33: 523-526.
- Raichle, M. E. & Mintun, M. A. (2006). Brain work and brain imaging. *Annu.Rev.Neurosci.* 29: 449-476.
- Rees, G., Friston, K., & Koch, C. (2000). A direct quantitative relationship between the functional properties of human and macaque V5. *Nat.Neurosci.* 3: 716-723.
- Revsbech, N.P. (1989). An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol.Oceanogr.* 34: 474-478.
- Schwarzbauer, C. & Heinke, W. (1999). Investigating the dependence of BOLD contrast on oxidative metabolism. *Magn.Reson.Med.* 41: 537-543.
- Secomb, T. W., Hsu, R., Beamer, N. B., & Coull, B. M. (2000). Theoretical simulation of oxygen transport to brain by networks of microvessels: effects of oxygen supply and demand on tissue hypoxia. *Microcirculation* 7: 237-247.
- Sheth, S., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., & Toga, A. W. (2003). Evaluation of coupling between optical intrinsic signals and neuronal activity in rat somatosensory cortex. *Neuroimage* 19: 884-894.
- Sheth, S. A., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., & Toga, A. W. (2004). Linear and nonlinear relationships between neuronal activity, oxygen metabolism, and hemodynamic responses. *Neuron* 42: 347-355.
- Sibson, N. R., Dhankhar, A., Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Shulman, R. G. (1998). Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 316-321.
- Silver, I. A. (1978). Cellular microenvironment in relation to local blood flow. In: *Cerebral Vascular Smooth Muscle and its Control*, ed. CIBA Foundation Symposium, Vol. 5: 49-67. Elsevier, Excerpta-Medica/North Holland.
- Smith, A. J., Blumenfeld, H., Behar, K. L., Rothman, D. L., Shulman, R. G., & Hyder, F. (2002). Cerebral energetics and spiking frequency: The neurophysiological basis of fMRI. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 10765-10770.
- Sokoloff, L. (1977). Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *J.Neurochem.* 29: 13-26.
- Thompson, J. K., Peterson, M. R., & Freeman, R. D. (2003). Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex. *Science* 299: 1070-1072.
- Thompson, J. K., Peterson, M. R., & Freeman, R. D. (2004). High-resolution neurometabolic coupling revealed by focal activation of visual neurons. *Nat.Neurosci.* 7: 919-920.
- Tian, J. B. & Bishop, G. A. (2002). Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum. *J.Chem.Neuroanat.* 23: 157-170.
- Uludag, K., Dubowitz, D. J., Yoder, E. J., Restom, K., Liu, T. T., & Buxton, R. B. (2004). Coupling of cerebral blood flow and oxygen consumption during physiological activation and deactivation measured with fMRI. *Neuroimage* 23: 148-155.
- Vafaee, M. S. & Gjedde, A. (2000). Model of blood-brain transfer of oxygen explains nonlinear flow-metabolism coupling during stimulation of visual cortex. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 20: 747-754.
- Valabregue, R., Aubert, A., Burger, J., Bittoun, J., & Costalat, R. (2003). Relation between cerebral blood flow and metabolism explained by a model of oxygen exchange. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 23: 536-545.

- Vanzetta, I. & Grinvald, A. (1999). Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286: 1555-1558.
- Villringer, A. & Dirnagl, U. (1995). Coupling of brain activity and cerebral blood flow: Basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc.Brain Metab.Rev.* 7: 240-276.
- Viswanathan, A. & Freeman, R. D. (2007). Neurometabolic coupling in cerebral cortex reflects synaptic more than spiking activity. *Nat.Neurosci.* 10: 1308-1312
- Wong-Riley, M. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 12: 94-101.
- Yang, G. and Iadecola, C. (1997). Obligatory role of NO in glutamate-dependent hyperemia evoked from cerebellar parallel fibers. *Am.J.Physiol.* 272: R1155-R1161.
- Yang, G. & Iadecola, C. (1998). Activation of cerebellar climbing fibers increases cerebellar blood flow: role of glutamate receptors, nitric oxide, and cGMP. *Stroke* 29: 499-507.
- Zhu, X. H., Zhang, Y., Tian, R. X., Lei, H., Zhang, N., Zhang, X., Merkle, H., Ugurbil, K., & Chen, W. (2002). Development of ¹⁷O NMR approach for fast imaging of cerebral metabolic rate of oxygen in rat brain at high field. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 13194-13199.

Anhang

Selbständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Nikolas Offenhauser, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Ursprung und Charakteristik aktivitätsinduzierter Sauerstoffpartialdruckveränderungen und Blutflussantworten im zerebellären 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.“

Berlin, 24. Februar 2008

Nikolas Offenhauser

Anteilsklärung

Die Studien dieser Promotion wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen der Abteilung für Experimentelle Neurologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin und dem Institut für Medizinische Physiologie der Universität Kopenhagen, Dänemark durchgeführt.

Der Promovend Nikolas Offenhauser hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: 40 Prozent

Thomsen, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2004).

Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *J.Physiol.* 560: 181-189.

Beitrag: Beteiligung an dem Entwurf des Studienprotokolls, Durchführung sämtlicher Experimente mit Picrotoxin und einzelner Bicuculline Versuche, Beteiligung an der Datenauswertung und statistischen Analyse, Beitrag zum Manuskriptentwurf.

Publikation 2: 85 Prozent

Offenhauser, N., Thomsen, K., Caesar, K., Lauritzen, M. (2005).

Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *J.Physiol.* 565: 279-294.

Beitrag: Etablierung der tpO₂ Messung, Entwurf des Studienprotokolls und der Versuchsplanung, Durchführung sämtlicher Experimente, Datenauswertungen und statistischer Analysen, Schreiben des Manuskripts, Einreichung der Arbeit und Bearbeitung der Reviewer Fragen.

Publikation 3: 30 Prozent

Caesar, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2008).

Gamma-aminobutyric acid modulates local brain oxygen consumption and blood flow in rat cerebellar cortex. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 5: 906-915. Epub ahead of print 2007, Nov. 14.

Beitrag: Durchführung von Pilotexperimenten, Beteiligung an der Versuchsplanung und Durchführung einzelner Versuche, Beteiligung an der Datenauswertung und dem Schreiben des Manuskripts sowie Bearbeitung der Reviewer Fragen.

Berlin, 24. Februar 2008

Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl

Nikolas Offenhauser

Lebenslauf und Publikationsliste

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

Publikationsliste

Royl, G., Fuchtemeier, M., Leithner, C., Megow, D., Offenhauser, N., Steinbrink, J., Kohl-Bareis, M., Dirnagl, U., Lindauer, U. (2008). Hypothermia effects on neurovascular coupling and cerebral metabolic rate of oxygen. *Neuroimage*, in press, available online 7 February 2008

IF: 5,5

Caesar, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2008). Gamma-aminobutyric acid modulates local brain oxygen consumption and blood flow in rat cerebellar cortex. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 5: 906-915. (Epub ahead of print 2007, Nov 14).

IF: 4,8

Schuh-Hofer, S., Siekmann, W., Offenhauser, N., Reuter, U., Arnold, G. (2006). Effect of hyperoxia on neurogenic plasma protein extravasation in the rat dura mater. *Headache* 46: 1545-1551.

IF: 2,7

Royl, G., Leithner, C., Sellien, H., Muller, J. P., Megow, D., Offenhauser, N., Steinbrink, J., Kohl-Bareis, M., Dirnagl, U., Lindauer, U. (2006). 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.

IF: 2,3

Offenhauser, N., Thomsen, K., Caesar, K., Lauritzen, M. (2005). Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *J.Physiol.* 565: 279-294.

IF: 4,4

Offenhauser, N., Zinck, T., Hoffmann, J., Schiemann, K., Schuh-Hofer, S., Rohde, W., Arnold, G., Dirnagl, U., Jansen-Olesen, I., Reuter, U. (2005). CGRP release and c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis of the rat following glyceryltrinitrate infusion. *Cephalalgia* 25: 225-236.

IF: 6,1

Thomsen, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2004). Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *J.Physiol* 560: 181-189.

IF: 4,4

Σ IF: 30,2

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotionsarbeit in der Abteilung für Experimentelle Neurologie und für seine Beratung und Unterstützung bei der Projektgestaltung.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Martin Lauritzen der mir die Möglichkeit gegeben hat, während des über zweijährigen Auslandsaufenthaltes die Experimente dieser Studien in seinem Labor und seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich danke für die fundierte Vermittlung elektrophysiologischer Arbeitstechniken und mehr noch, für die begeisterte und motivierende Betreuung während meiner Zeit in Dänemark. Diese trug entscheidend zum guten Gelingen dieser Studien bei und machte systematisches wissenschaftliches Arbeiten zu einer ständigen freudvollen Befriedigung von Neugier.

Kirsten Thomsen, Kirsten Caesar, Henning Piigaard Hansen und Lilian Grøndahl danke ich für die Unterstützung bei der Erlernung der Modelle und Techniken, die gute Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Projekten und die gute Atmosphäre während meiner Zeit in Kopenhagen.

Jesper Grøndahl möchte ich für die technische Hilfe bei der Etablierung der Sauerstoffpartialdruckmessung danken und für die MATLAB Programmierung zur Unterstützung der Datenauswertung.

Meine tiefste Dankbarkeit gebührt meiner Familie.

Danke Nanni, Jonathan und Elias, dass ihr mich auf meinem Weg nach Dänemark nicht nur begleitet, sondern unentwegt und unerlässlich unterstützt habt.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, für ihren unermüdlichen Beistand.

Studie 1:
Thomsen, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2004).
Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient
for cerebral blood flow in rat cerebellum.
J.Physiol. 560: 181-189.

Studie 2:

Offenhauser, N., Thomsen, K., Caesar, K., Lauritzen, M. (2005).
Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex:
interplay of postsynaptic activation and blood flow.
J.Physiol. 565: 279-294.

Studie 3:

Caesar, K., Offenhauser, N., Lauritzen, M. (2008).

Gamma-aminobutyric acid modulates local brain oxygen consumption and blood flow in rat cerebellar cortex.

J.Cereb.Blood Flow Metab. 5: 906-915.