

**Aus der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie
(Prof. Dr. med. D.W. Richter)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Hypoxie-induzierte Spreading-Depression-Episoden in akuten
medullären Hirnstammschnitten der Ratte**

**INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Umer Chaudhry
aus Krumbach**

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Müller

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Dresbach

III: Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Einführung.....	1
1.2 Geschichte der SD-Entdeckung.....	2
1.3 Allgemeine Eigenschaften einer SD- Welle.....	3
1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der SD.....	3
1.5 Metabolische Änderungen in der Zelle während der SD-Ausbreitung.....	4
1.6 Physikalische und molekulare Grundlagen der intrinsischen optischen Signale	6
1.7 Der Vergleich einer SD und HSD in verschiedenen Hirnarealen.....	7
1.8 Zielsetzung.....	9

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Gewebe	10
2.2 Präparation der Hirnschnitte	10
2.3 Messaufbau	11
2.4 Allgemeines zur Arbeit mit der „Interface“-Messkammer	13
2.5 Artificielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)	14
2.6 pH-Wert-Einstellung.....	15
2.7 Chemische Substanzen	
2.7.1 Strychnin	15
2.7.2 Bicucullin	16
2.8 Elektrophysiologische Feldpotentialmessung	17
2.9 Aufbau der Messapparatur	17
2.9.1 Auslösen der Hypoxie-induzierten Spreading Depression.....	18
2.9.2 Statistik	19

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Experimente	20
3.2 Ausbreitungsmuster der Spreading Depression	21
3.3 Die anatomische Struktur der Gewebeschnitte.....	22
3.4 HSD in verschiedenen Hirnstammregionen	

3.4.1 HSD in neonatalen Ratten	23
3.4.2 Wiederholte Induktion der HSD im Hirnstamm	25
3.4.3 HSD in juvenilen Ratten.....	27
3.4.4 HSD in adulten Ratten	28
3.5 Modulation der Hirnstammschnitte mit 0,5 μ M Strychnin und 20 μ M Bicucullin	30
3.5.1 HSD in neonatalen Ratten mit Strychnin und Bicucullin	31
3.5.2 HSD in juvenilen Ratten mit Strychnin und Bicucullin	33
3.5.3 HSD in adulten Ratten mit Strychnin und Bicucullin	35
3.6 HSD in Slices adulter Ratten nach Behandlung mit 5 mM Fluoracetat.....	37
3.7 Intrinsische optische Signale (IOS).....	39
3.8 Intrinsische optische Signale in verschiedenen Hirnstammkernen	40
3.9 Bildsequenz der Entstehung und Ausbreitung einer HSD im neonatalen Hirnstammschnitt	41
4 Diskussion	
4.1 HSD-Auslösung im Hirnstamm	42
4.2 Die raumzeitliche Analyse durch intrinsische optische Signale (IOS).....	44
4.3 HSD-Auslösung im Hirnstamm adulter Ratten.....	44
4.4 Fluoracetatvergiftung der Gliazellen im Hirnstamm	45
4.5 Die Beteiligung GABA- und glycinerner Rezeptoren	46
4.6 Funktionelle Auswirkungen der HSD im Hirnstamm	
4.6.1 Migräne und Basilarismigräne	48
4.6.2 Der plötzliche Kindstod	49
5 Zusammenfassung	51
6 Abkürzungsverzeichnis	54
7 Literaturverzeichnis	55

1 Einleitung

1.1 Einführung

Eine Spreading Depression (SD) wurde erstmals 1944 durch den Brasilianer Aristides Leão im Kortex von Kaninchen beschrieben (Leão 1944). Unter Spreading Depression (SD) versteht man eine massive Membrandepolarisation von Neuronen und Gliazellen mit zeitweiligem Funktionsverlust. Nach Auslösung einer Spreading Depression kommt es zu einer plötzlichen Negativierung des extrazellulären DC-Potentials (des Elektroenzephalogramm-Potentials (EEG)) um 10-40 mV, welches unter normoxischen Bedingungen nach 1-2 min selbstständig wieder repolarisiert (Lauritzen 1994). Diese lokale, vorübergehende Auslöschung der neuronalen und glialen Aktivität breitet sich wellenförmig mit einer Geschwindigkeit von 3-5 mm pro Minute über das neuronale Gewebe innerhalb der ipsilateralen Hemisphäre aus (Leão 1944). Das Phänomen Spreading Depression, das u.a. mit Hilfe eines EEG oder mittels eines Elektrokortikogramms (ECoG) registriert werden kann, wird mit der Pathogenese von Migräne, Epilepsie und Apoplex in Verbindung gebracht (Somjen 2001).

Die Entstehung und Ausbreitung der Spreading Depression ist an einen enormen Anstieg der extrazellulären Kalium-Konzentration gekoppelt. Zugleich sinkt die Na^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -Konzentration im Extrazellulärraum. Dies lässt annehmen, dass K^+ gegen Na^+ und Ca^{2+} ausgetauscht wird und Cl^- dem Natriumionenfluss passiv folgt (Müller 2005). Die Neuronen und Gliazellen schwellen durch die gestörte Ionenverteilung an, wodurch sich der Extrazellulärraum zunehmend vermindert und das Ungleichgewicht der Ionenverteilung verstärkt wird (Hansen und Olsen 1980). Trotz jahrzehntelanger Forschung an verschiedenen Tiermodellen war die Existenz der Spreading Depression im menschlichen Gehirn lange Zeit umstritten. Erste klinische Studien mit elektrokortikographischen Ableitungen in der Umgebung von Hirnverletzungen bei neurochirurgischen Patienten konnten einen positiven Nachweis erbringen (Strong et al. 2002).

Im ersten Kapitel dieser Arbeit wird die Thematik um das Phänomen Spreading Depression eingeführt. Kapitel 2 stellt die experimentellen Methoden vor und benennt die verwendeten Materialien. Im Kapitel 3 werden die erzielten Ergebnisse vorgestellt, anschließend werden im Kapitel 4 diese Ergebnisse und ihre Bedeutung

diskutiert. Das letzte Kapitel fasst abschließend die wichtigsten Aussagen zusammen.

1.2 Geschichte der SD-Entdeckung

Die Spreading Depression (SD) wurde vor mehr als 65 Jahren von dem brasilianischen Forscher Aristides Leão entdeckt, der die epileptische Aktivität im Kortex des Kaninchens analysierte. Auf der kortikalen Oberfläche der Kaninchen wurde während dieser Experimente die sich langsam ausdehnende Abnahme der Amplitude des Elektroenzephalogrammes (EEG) festgestellt (Leão 1944). Die Experimente zeigten, dass alle kortikalen Antworten auf elektrische oder physiologische Stimuli gleichzeitig verschwinden (Grafstein 1956). Durch Leão wurde gezeigt, dass man die Spreading Depression reproduzieren und gut untersuchen kann. So ist es möglich, nicht nur mit elektrischen Impulsen, sondern auch mittels mechanischer Stimulation und der lokalen Anwendung einer KCl-Lösung eine SD zu erzeugen (Leão und Morrison 1945). Das Vorhandensein der SD wurde schon drei Jahre vor der eigentlichen Entdeckung des Phänomens von dem Physiologen K.S. Lashley prophezeit. Er untersuchte mögliche Ursachen für Migräne-Anfälle. Er ging von einer Welle aus, die sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 mm pro min über den Kortex ausbreitet (Lashley 1941). Im Säugetier-Kortex kann die SD durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Dazu gehören mechanische, elektrische, chemische und thermische Stimuli. Möglicherweise wurde die SD von anderen Forschern schon einige Male registriert, aber als ein Artefakt aufgrund von Gewebe- oder Zellschäden gewertet.

1.3 Allgemeine Eigenschaften einer SD-Welle

SD-Wellen können sowohl durch chemische Stimuli, wie z.B. durch die Applikation von KCl, als auch durch ein mechanisches Trauma erzeugt werden. In den Bereichen des ZNS sinkt die Anfälligkeit für SD in folgender Reihenfolge:

Hippokampus > Neokortex > subkortikale Nuclei > graue Substanz des Hirnstamms > Cerebellum (Bures et al. 1984) > Rückenmark (Czéh und Somjen 1990). SD breitet sich trotz Tetrodotoxin-Blockade mit einer Geschwindigkeit von ca. 1,5-7 mm/min durch die graue Substanz aus und stoppt an der Grenze zur weißen Substanz (Sugaya et al. 1975). Je höher ein Tier in der phylogenetischen Skala steht, desto komplexer ist der Kortex und desto problematischer wird die Erzeugung von SD. So wurde z.B. bei Experimenten mit Ratten und Kaninchen festgestellt, dass SD dort leichter zu induzieren waren als bei Experimenten mit Affen und Katzen (McLachlan und Girvin 1994).

1.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der SD

Während der SD-Ausbreitung sind Gliazellen und Neuronen stark depolarisiert. Am Anfang können die Aktionspotentiale noch erfasst werden, da die Gliazellen und Neuronen in der Anfangsphase noch aktiv sind. Dabei kann eine begleitende Umverteilung der Ionen zwischen extra- und intrazellulärem Raum registriert werden. K^+ strömt aus, während Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} und Wasser in die Zellen strömen. Die Folge ist eine Zellschwellung (Abbildung 1). Die elektrophysiologischen Eigenschaften der SD wurden seit der Entdeckung ausführlich untersucht. Das elektrische Signal weist nur eine Phase auf, welche im Raum der inneren plexiformen Schicht am größten ist. Zu Beginn ändert sich das extrazelluläre DC-Potential langsam und die maximale Depolarisation kommt erst nach 0,5-4 Sekunden zustande. Nach 1-2 Minuten repolarisieren die Zellen und hyperpolarisieren dann auch einige Minuten. Die Amplitude des DC-Signals beträgt - 10-25 mV. Diese Amplitude ist viel größer als die Amplitude anderer extrazellulärer elektrischer Signale, welche selten größer als -1 mV sind.

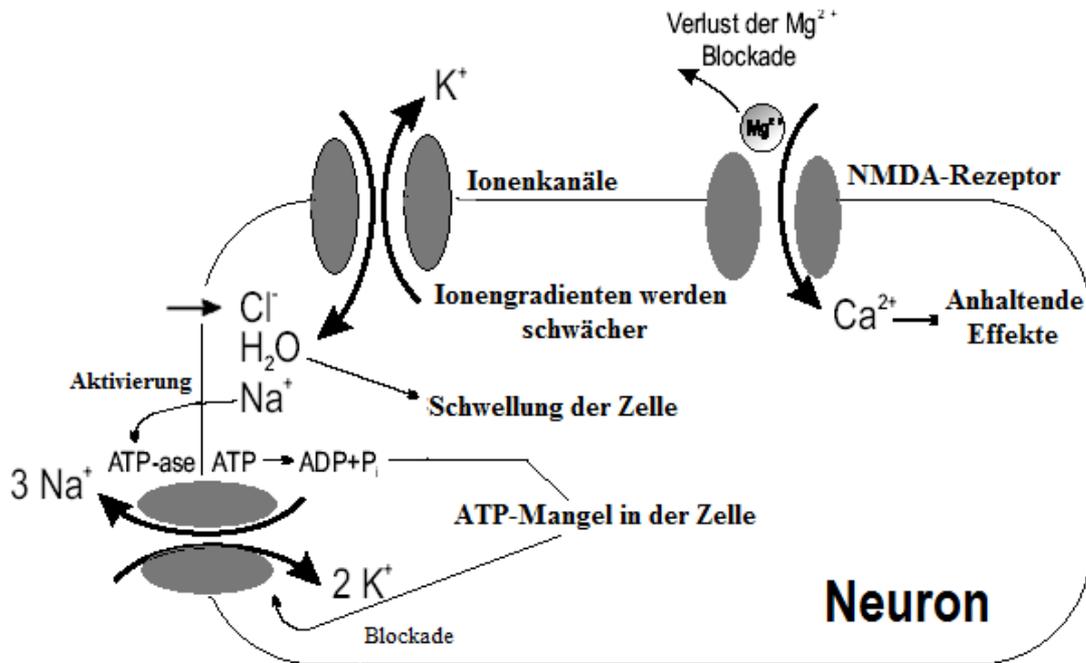


Abbildung 1 Modifizierte schematische Darstellung der Ionenbewegung während der SD-Ausbreitung (nach Klinke et al. 2005, S. 94)

Solche ausgeprägten Potentialdifferenzen werden nur bei hochgradig simultaner Depolarisation zahlreicher Neuronen generiert. In dieser Zeit sind die Neuronen nicht mehr erregbar. Das intrazelluläre Potential ändert sich gegenläufig zum extrazellulären. Es wurde auch gezeigt, dass sich solche Depolarisationen nicht nur in Neuronen abspielen. Deutliche Potentialdifferenzen von Gliazellen (Sugaya et al. 1975, Higashida et al. 1974, Collewijn und Harreveld 1966) fallen mit dem extrazellulären SD-Signal zusammen.

1.5 Metabolische Änderungen in der Zelle während der SD-Ausbreitung

Es gibt zwei Thesen zur Initiierung von SD *in vivo*. Beide Thesen besagen, dass sich eine SD-Welle ausdehnt, wenn depolarisierende Substanzen wie K⁺ und Glutamat (Harreveld 1978) aus Gliazellen oder Neuronen in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Im Regelfall ist die K⁺-Konzentration im extrazellulären Raum ca. 3-4 mM und intrazellulär ca. 140 mM. Nach intensiver Erregung oder unter Voraussetzungen, bei denen K⁺ nicht schnell genug aus dem Extrazellulärraum abtransportiert werden

kann, führt die Konzentrationserhöhung von K^+ zu einer neuronalen Depolarisation. Diese Depolarisation führt dann zu einer Erhöhung der Erregbarkeit der Membranen, woraufhin eine Kaskade von Prozessen initiiert wird.

Eine andere Möglichkeit zur Initiierung von SD *in vivo* ist die Anhäufung von Glutamat im extrazellulären Raum während der SD-Ausbreitung. Glutamat wird aus den präsynaptischen Vesikeln freigesetzt und von Glutamat-Transportern zurück in die Zellen (Gliazelle oder Neuron) gepumpt (Abbildung 2).

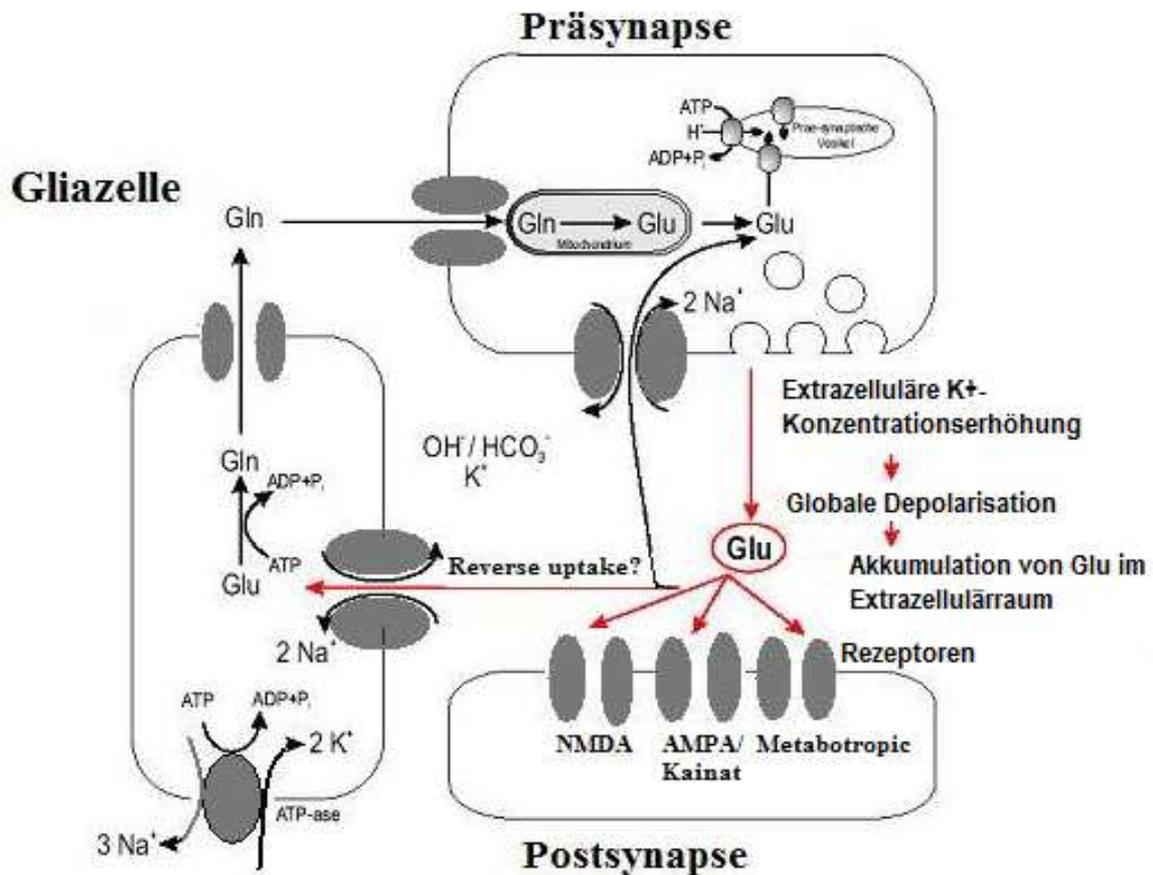


Abbildung 2 Modifizierte schematische Darstellung der Glutamatbewegung zwischen Neuronen, Gliazellen und Extrazellulärraum unter normalen Bedingungen und während der SD-Ausbreitung (nach Klinke et al. 2005, S. 616)

Durch die globale Zelldepolarisation während der SD-Ausbreitung werden die Na^+ - und K^+ -Gradienten vermindert. Als Folgeaktion wird die Transportrate der

Glutamat-Transporter in Neuronen und Gliazellen kleiner. Glutamat wird zwischen den Synapsen angehäuft und behindert die Informationsverarbeitung im ZNS. Einige Autoren vertreten sogar die Ansicht, dass diese Glutamat-Transporter umkehren und Glutamat aus der Zelle pumpen (Rossi et al. 2000).

Seit der SD-Entdeckung wird immer wieder diskutiert, welche Umstände die Dauer der SD determinieren und ob andauernde Effekte nach der Wellenausbreitung existieren. Inzwischen steht fest, dass die drastischen elektrophysiologischen Änderungen nur ein paar Minuten anhalten. Die entscheidende Frage ist, welche biochemischen Reaktionen die SD-Welle aktivieren oder inhibieren können. Während der SD-Ausbreitung werden etwa 10% der Blutglukose und ca. 50% des Blutsauerstoffs während der SD-Ausbreitung vom Gehirn verbraucht (Ueki et al. 1988). Es stellte sich bei den Versuchen heraus, dass als Folge der intramitochondrialen Oxidationserhöhung (Rosenthal und Somjen 1973) beachtliche Mengen Laktat (Anstieg um 200% (Gault et al. 1994)) erzeugt werden (Bures et al. 1974). Die Konzentration energiereicher intrazellulärer und extrazellulärer Substrate verringert sich deutlich: ATP sinkt auf 62%, die interstitielle Glukosekonzentration auf etwa 50% (Csiba et al. 1985) und Phosphokreatin auf 24%. Ebenfalls wurde ein auf 200-300% gesteigener Glukoseverbrauch gemessen (Gjedde et al. 1981, Nedergaard und Astrup 1986) sowie eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs um etwa 50% (Mayevsky und Weiss 1991). Eine Vielfalt von Neurotransmittern (Glutamat, Stickoxid (Goadsby et al. 1992)) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) werden freigesetzt. Auch die Konzentration des c-fos (nerve growth factor) und des Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ist erhöht.

1.6 Physikalische und molekulare Grundlagen der intrinsischen optischen Signale

Der experimentelle Teil dieser Arbeit beruht auf Messungen der elektrischen und optischen Signale einer SD. Das intrinsische optische Signal (IOS) zeigt die Änderungen der reflektierten Lichtstrahlen. Dadurch muss kein exogenes Kontrastmittel benutzt werden (Villringer und Chance 1997). Solch eine optische Registrierung ist eine nicht invasive und wertvolle Methode, die abhängig von der Erregung des Gewebes ist. Sie kann *in vivo* und *in vitro* verwendet werden, um

räumlich-zeitliche Änderungen der Aktivität im intakten Gewebe zu visualisieren. Ein Teil des auf das Gewebe fallenden Lichtes wird gebeugt, ein anderer absorbiert, ein weiterer Teil gestreut. Bei der Streuung werden die Lichtstrahlen in alle Richtungen reflektiert. Streuung beeinflusst die Reflektion und die Beugung in entgegengesetzte Richtungen. Je mehr ein Medium streut, desto mehr Lichtstrahlen werden reflektiert. Folglich werden weniger Lichtstrahlen gebeugt (Aitken et al. 1999).

Es gibt drei Mechanismen, die das IOS beeinflussen können:

- Änderungen im Blutfluss und Sauerstofftransport (Grinvald et al. 1988).
- Änderungen in Absorption oder Fluoreszenz der intrinsischen Chromophoren (Hämoglobin (Jöbsis 1977)), Cytochrom (LaManna et al. 1987) oder NADH (Chance und Willams 1955).
- Osmotische Änderungen im Volumen der Zelle (Schwellung oder Schrumpfung) (Aitken et al. 1999), Änderungen an Membranen während der Ausbreitung des Aktionspotentials (Stepnoski et al. 1991) und die morphologischen Änderungen während der Neurosekretion (Salzberg et al. 1993).

Abhängig von den biochemischen Mechanismen wie Änderungen des Zellvolumens, die in der Zelle stattfinden, können die optischen Signale nur Millisekunden oder Sekunden bis Minuten dauern.

1.7 Der Vergleich einer SD und HSD in verschiedenen Hirnarealen

Bei der SD kommt es zu einer Depolarisation von Neuronen und Glia, die sich von einem Punkt aus wellenartig durch das neuronale Gewebe ausbreitet. Zwischen den betroffenen Zellen und dem umgebenden Extrazellulärraum kommt es zu einer starken Verschiebung des Ionengleichgewichts. Aristides Leão beschrieb bereits 1944 das wiederauftretende und reversible physiologische Phänomen auf der Kortexoberfläche von Kaninchengehirnen (Leão 1944).

Eine SD kann durch diverse Stimuli ausgelöst werden. Dazu zählt z.B. die mechanische Belastung oder Beschädigung des Gewebes (Roitbak und Bobrov 1975, Somjen et al. 1992) oder die tetanische elektrische Stimulierung (Leão 1944). Zusätzlich kann eine SD durch eine Vielzahl von chemischen Einflüssen, beispielsweise Kalium (Reid et al. 1988) und Glutamat (Hossmann 2003), oder durch eine Hypoxie ausgelöst werden.

Obwohl eine SD in fast allen Bereichen des Zentralnervensystems ausgelöst werden kann, gibt es einige Bereiche, die besonders anfällig für eine SD sind. Dazu zählen vor allem die CA1-Region des Hippokampus und der Neokortex. Im Rückenmark und Cerebellum lässt sich eine SD nur unter gewissen nicht-physiologischen Bedingungen auslösen (Streit et al. 1995). Bedingt durch den großen Extrazellulärraum in den frühen Stadien der Entwicklung lässt sich in fötalem und neonatalem Gewebe eine SD nicht oder nur sehr schwer auslösen (Lehmenkühler et al. 1993). Im Kortex bleibt die SD in der Regel auf eine Hemisphäre beschränkt (Leão 1944).

Bei der Auslösung einer SD kommt es zu einem enormen Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration. Gleichzeitig verringern sich Na^+ , Ca^{2+} und Cl^- . Diese Tatsache lässt den Verdacht aufkommen, dass K^+ gegen Na^+ und Ca^{2+} ausgetauscht wird, wobei Cl^- passiv dem Natriumionenfluss folgt (Müller 2005). Aufgrund der gestörten Ionenverteilung während der SD kommt es zu einer Schwellung der Neuronen und der Gliazellen. Dies hat zur Folge, dass der Intrazellulärraum weiter verkleinert und somit das Ungleichgewicht der Ionenverteilung noch verstärkt wird (Hansen und Olsen 1980). Während einer SD lässt sich eine charakteristische Veränderung der Lichtstreuung an der Oberfläche von Hirnschnitten feststellen.

Zwischen einer Spreading Depression und einer hypoxieinduzierten Spreading Depression (HSD) bestehen einige Unterschiede. Die durch die zelluläre Respiration bereitgestellte Energie wird zur Regeneration und zur Wiederherstellung des Ionengleichgewichts benötigt. Aus diesem Grund ist die Zeitdauer einer HSD direkt von der Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung abhängig. SD und HSD unterscheiden sich ebenfalls im Zeitverlauf der Störung der synaptischen Funktion. Bei einer SD verlieren die Synapsen ihre Funktion erst mit dem Eintritt der massiven Depolarisation der Zellmembran. Bei der HSD hingegen verlieren die Synapsen ihre Funktion schon einige Minuten vor der Depolarisation (Somjen et al. 1993). Eine SD lässt sich durch N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten (NMDA) blockieren, wohingegen eine HSD nicht blockiert werden kann (Somjen 2001).

Es lassen sich aber auch Gemeinsamkeiten zwischen einer SD und HSD herausstellen. Diese Gemeinsamkeiten treten bei einer rechtzeitig wiederhergestellten Sauerstoffversorgung auf. Hierbei zeigen sich Übereinstimmungen im Verlauf der Membranpotentialänderung, der Verkleinerung des Extrazellulärspaces, der intrinsischen optischen Signale und deren Ausbreitungsgeschwindigkeit.

Das Auftreten von SD und HSD ist mit den Krankheitsbildern von Epilepsie, Migräne, Hirnödemen und Hirnverletzungen sowie der Apoplexia cerebri (Schlaganfall) in Zusammenhang gebracht worden (Somjen 2001).

1.8 Zielsetzung

In dieser Arbeit wird untersucht, ob eine HSD im Hirnstamm der Ratte auslösbar ist und wie sie sich ausbreitet.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Gewebe

Alle Versuche wurden an akuten Hirnstammschnitten durchgeführt. Das Hirngewebe für die Experimente wurde von Ratten entnommen. Diese Tiere wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universität Göttingen gehalten und gezüchtet.

2.2 Präparation der Hirnschnitte

Männliche neonatale (5-13 Tage postnatal), juvenile (19-21 Tage postnatal) und adulte Ratten (4-6 Wochen postnatal) wurden mit Ether betäubt und dekapitiert. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut dorsomedial zerteilt und vom Schädeldach gelöst. Danach wurde die Schädeldecke mittig bis zur Frontalplatte aufgeschnitten und vorsichtig entfernt, ohne das Gehirn zu verletzen. Die Parietal- und Okzipitalplatte wurde ebenfalls mittig eingeschnitten. Durch eine kaudale Schädelöffnung und mithilfe einer scharfen Knochenzange konnte durch laterale Einschnitte die Schädelkalotte gelockert und, ohne kortikale Strukturen zu verletzen, abgelöst werden. Um Ischämieschäden zu minimieren, wurde das Gehirn mithilfe eines Spatels zügig entnommen und für 2-3 min in eiskalter, begaster artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) abgekühlt. Der Hirnstamm, der aus Medulla oblongata, Pons und Mesencephalon besteht, wurde dann vom Cerebrum und Cerebellum mit einem glatten Schnitt einer Skalpellklinge auf Höhe des Pons abgetrennt. Der verbliebene Hirnstamm wurde vertikal auf einen vorgekühlten Agaroseblock geklebt und mit einem *tissue slicer* (752M Vibroslice, Campden Instruments, Loughborough, UK) in 400 µm dicke Schnitte geschnitten.

Aus jedem Hirnstamm konnten so etwa 3-4 für die spätere Messung geeignete Hirnschnitte gewonnen werden, die mit einem Haarpinsel und einem kleinen, leicht gebogenen Spatel in eine Interfaceversuchskammer vom Oslo-Typ (Croning und Haddad 1998) überführt wurden. Um eine Erholung vom Präparationstrauma zu ermöglichen, wurden sie für 90 Minuten ungestört gelassen.

2.3 Messaufbau



Abbildung 3 *Eigenphotographie des Messaufbaus (Mikroskop + Messkammer)*

Die Interface-Messkammer (Abbildung 3) bestand aus Plexiglas und war auf der Metallarbeitsplatte eines erschütterungsgedämpften Tisches angebracht. Die Hirnschnitte lagen in dieser Versuchskammer auf einem Netz an der Grenzfläche zwischen artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) und der Gasphase. Die beiden Perfusionskammern der Interface-Messkammer dienten sowohl als Mess- als auch als Aufbewahrungskammer. In jeder der beiden von einander getrennten Kammern fanden 3–4 Gehirnschnittpräparate Platz. Die Hirnschnitte ruhten in der Mitte der Kammern auf Linsenreinigungspapier. Auf 36°C erwärmte, oxygenierte

ACSF wurde mit einer Rollenpumpe in Polyethylenschläuchen durch eine feine Öffnung in den hinteren Teil der Kammer gepumpt. Die ACSF durchtränkte das Linsenreinigungspapier und verteilte sich gleichmäßig in der Kammer, bis es im vorderen Bereich der Messkammer passiv abfließen konnte. Die Hirnschnitte erhielten ihre nahezu komplette Sauerstoffversorgung aus der Luft und nicht aus der begasten Lösung. Daher ermöglichte dieser Versuchsaufbau, ohne große Zeitverzögerung zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu wechseln. Da die Messungen unter Interface-Bedingungen stattfanden, wurde der hierfür erforderliche hohe Sauerstoffpartialdruck durch Besprudeln des im unteren, beheizten Teil des Kammergehäuses eingefüllten, destillierten Wassers mit Carbogen aus 95% O₂ und 5% CO₂ gewährleistet, welches mit einer Flussrate von ca. ~400 ml/min begast wurde. Das erwärmte, wasserdampfgesättigte Gas wurde dann über Schlitze in die Perfusionskammer (300-400 ml/min) über die Oberfläche der Gehirnschnitte geleitet. Die Temperatur in der Perfusionskammer wurde bei 34°C – 35°C gehalten. Es wurde mittels Thermostat sicher gestellt, dass sowohl das eingeleitete Gasgemisch als auch die ACSF die gewünschte Temperatur besaßen. Die Interfacekammer bestand aus zwei komplett voneinander getrennten Kammern mit ACSF-Zufluss und eigener Gasversorgung. Dadurch konnten die Hirnschnitte in einer Kammer untersucht werden. In der zweiten Kammer konnten die Hirnschnitte unter Carbogenbegasung für die nachfolgenden Versuche aufbewahrt werden. Der gesamte Aufbau war von einem Faraday-Käfig umgeben, um elektronisches Rauschen zu reduzieren. In der so konstruierten Kammer konnten die Stoffwechselforgänge der Gehirnschnittpräparate aufrechterhalten werden, wobei die Schnitte circa 6 – 8 Stunden vital blieben. Bei den Versuchen wurde durch das Umschalten der Gasversorgung der Kammer auf 95% N₂/ 5% CO₂ eine Hypoxie induziert.

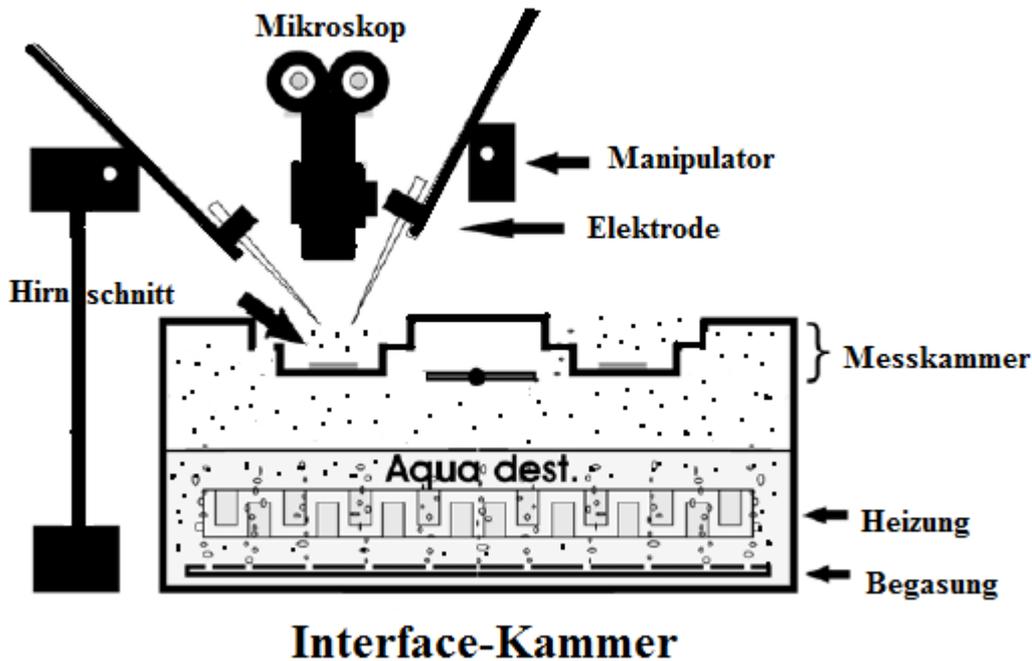


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Interface-Messkammer. Das Kammergehäuse ist etwa bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser (aqua dest.) gefüllt. Im unteren Teil befinden sich eine Heizspirale und ein Begasungssteine, durch dessen Öffnungen Carbogen bzw N_2/CO_2 ausfließen kann. Im oberen Bereich der Kammer liegen die Messkammern, in denen die Hirnschnittpräparate gelagert sind. Über dem Hirnschnitt ist ein binokulares Mikroskop, mit dessen Hilfe die in den Manipulatoren eingespannten Elektroden platziert werden können.

2.4 Allgemeines zur Arbeit mit der „Interface“-Messkammer

Die Temperatur, Ernährung, Luftzusammensetzung und Luftfeuchtigkeit sind für die Vitalität der Hirnschnittpräparate von enormer Bedeutung und müssen daher auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Des Weiteren ist aufgrund der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf eine exakte Dokumentation und Einhaltung dieser Faktoren zu achten. Es ist von besonderer Wichtigkeit, dass das Niveau des destillierten Wassers im unteren Teil der Perfusionskammer, das Flüssigkeitsniveau der ACSF in der Messkammer und vor allem die Temperatur konstant sind. Durch die Fließgeschwindigkeit der ACSF wird das Flüssigkeitsniveau in der Messkammer bestimmt. Durch feine Schläuche wird

die ACSF über eine Rollenpumpe aus den Vorratsbehältern in die Messkammer gepumpt. Die Fließgeschwindigkeit der ACSF wird über die Rollenpumpe gesteuert. Für die Gewährleistung einer konstanten Pumpleistung wurde die pro Zeiteinheit beförderte Flüssigkeitsmenge von Zeit zu Zeit überprüft. Um den Sauerstoffpartialdruck, die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur in der direkten Umgebung der Hirnschnitte auf einem gleichbleibenden Niveau zu halten, wurden die Messkammern bestmöglich abgedeckt und gleichmäßig begast. Die Temperatur wurde immer an derselben Stelle in der Kammer gemessen und an dieser Stelle auch regelmäßig überprüft, da die Temperatur auch innerhalb der Messkammer unterschiedlich ist. Nach jedem Versuchstag wurde die Versuchskammer gründlich mit Aqua dest. gereinigt.

2.5 Artificielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)

Die Zusammensetzung der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF), die ihrer chemischen Eigenschaft weitestgehend dem Liquor entspricht, ist in Tabelle 1 dargestellt. In allen Versuchen wurde der Hirnstamm mit ACSF umspült. Um die Vitalität des Gewebes beizubehalten, wurde das Gehirn nach der Entnahme sofort in einem begasten ACSF-Behälter abgekühlt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Gebrauchslösung

Substanz	NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	CaCl ₂	MgSO ₄	Dextrose
Konzentration mM	115	3,5	1,25	24	1,2	1,2	10

Diese Gebrauchslösung wurde aus 10facher ACSF und destilliertem H₂O erstellt. Es wurden insgesamt 2 Behälter mit jeweils 2 Liter Gebrauchslösung verwendet. Bei einem Behälter wurde das KCl auf 8 mM hochgesetzt.

2.6 ph-Wert-Einstellung

Um eine Hypoxie zu induzieren und einen stabilen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten, wurde die ACSF mit 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen) begast.

2.7 Chemische Substanzen

2.7.1 Strychnin

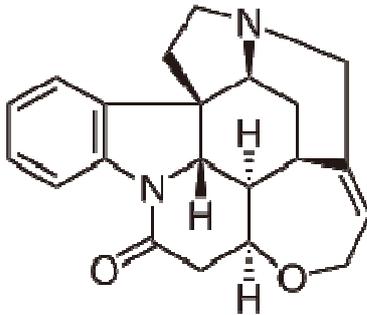


Abbildung 5: Strukturformel von Strychnin

Strychnin ist ein giftiges basisches Alkaloid, welches als Toxin in den Samen des in Indien vorkommenden Baumes *Strychnin nuxvomica* vorkommt. Schon geringe Dosen bewirken eine Muskelstarre. Es wurde früher auch in Rattengift verwendet. Ungeachtet seiner hohen Toxizität wurde Strychnin in der Heilkunde als Analeptikum eingesetzt und zählt heute noch zu den beliebtesten homöopathischen Arzneimitteln. Strychnin ist ein geruchsloses, aber stark bitter schmeckendes, weißes, kristallines Pulver.

Im zentralen Nervensystem gibt es zwei wesentliche inhibitorische Neurotransmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) und Glycin. Strychnin wirkt im Rückenmark als kompetitiver Antagonist des inhibitorischen Neurotransmitters Glycin an seinem Rezeptor, einem inhibitorischen Chloridkanal. Hierdurch unterdrückt es die Aktivität

von inhibitorischen Neuronen und führt zu tonischen Kontraktionen und Spasmen der Skelettmuskulatur.

Bei einer Intoxikation mit Strychnin treten zuerst eine Steifheit der Gesichts- und Nackenmuskulatur sowie Hyperreflexie auf. Geringe sensorische Reize können zu starken Muskelspasmen führen. Durch die tonische Kontraktion wird bei der Muskelschädigung vermehrt Myoglobin freigesetzt. Durch die konsekutive Myoglobinurie kann ein akutes Nierenversagen entstehen. Der Tod tritt meistens im Rahmen einer spasmusbedingten Atemlähmung oder durch die auftretende Hyperthermie ein. Zur Behandlung einer Strychnin-Vergiftung werden in der Regel Benzodiazepine oder Barbiturate eingesetzt (Forth et al. 2006 a).

In den Versuchen wurde eine 5 μM Strychnin-Stammlösung in einer 0,9%ige NaCl Lösung angesetzt und bei -20°C gelagert.

2.7.2 Bicucullin

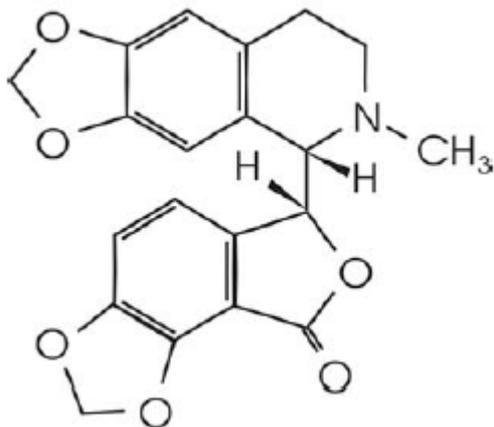


Abbildung 6: Strukturformel von Bicucullin

Das Alkaloid und Krampfgift Bicucullin ist ein kompetitiver Antagonist von GABA am GABA_A -Rezeptor. Im Tiermodell ruft Bicucullin Krämpfe hervor. Auf die Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA_A -Rezeptors wirken inverse Benzodiazepin-Agonisten, die die GABA-bedingte Öffnungsfrequenz des Cl^- -Kanals nicht steigern, sondern vermindern und so die Erregbarkeit erhöhen (Forth et al. 2006 b). Als GABA_A -Rezeptor-Antagonist hat Bicucullin die Fähigkeit, Ca^{2+} -gesteuerte Kaliumkanäle zu blockieren (Khawaled et al. 1999). Bicucullin unterdrückt die im Hintergrund ablaufende tonische GABA_A -vermittelte Inhibition.

In den Versuchen wurde eine 20 μM Bicucullin-Stammlösung in eine 0,9%igen NaCl-Lösung angesetzt. Daraufhin wurde der pH-Wert auf 3,0 mit HCl eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.8 Elektrophysiologische Feldpotentialmessung

Die Hirnschnittpräparate wurden nach der Präparation in eine Interface-Messkammer überführt. Während der Äquilibrationsphase wurden die Hirnschnitte für 90 Minuten unberührt gelassen. Nach der Äquilibrationsphase wurden unter mikroskopischer Sichtkontrolle (Axiotech - Carl Zeiss, Jena, BRD) die Ableitelektroden ca. 20-50 μm tief in die Hirnstammschnitte positioniert. In den Versuchen wurden dabei die Ableitelektroden mit Hilfe des Mikromanipulators in die VRG (ventrale respiratorische Gruppe), den Nucleus hypoglossus, den Nucleus trigeminus und in den NTS (Nucleus tractus solitarii) positioniert. Um von einer konstanten Zellanzahl, die die aufgezeichneten Signale bewirken, ausgehen zu können, verblieb jede Elektrode an ihrem ursprünglichen Ort und ihre Position wurde im Laufe der Messung nicht verändert.

Die extrazelluläre Messung ermöglichte es elektrische Summenpotentialänderungen zu messen, die aufgrund transmembranaler Ionenströme entstehen. Diese Potentialänderung wurde auf die ACS-Lösung im Inneren der Messelektrode und über den chlorierten Silberdraht auf einen Vorverstärker (Eigenbau, Elektronikwerkstatt, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen) übertragen.

2.9 Aufbau der Messapparatur

In dieser Arbeit wurden sowohl elektrophysiologische als auch optische Messungen durchgeführt. Mit extrazellulären Feldpotentialmessungen ist es meist nicht möglich, transmembranale Ströme einer einzelnen aktivierten Zelle aufzuzeichnen. Jedoch kommt es durch die Aktivierung einer Vielzahl von Zellen zu einer Summation der Einzelzellantworten. Dieses Summenpotential ist stark genug, um registriert zu werden.

Die Messelektroden zur Messung extrazellulärer DC-Potentiale wurden aus dünnwandigem Borosilicate-Glass (GC150TF-10, Harvard Apparatus, Edenbridge,

UK) an einem horizontalen Elektrodenziehgerät (Horizontal-Puller, P-97, Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Co., Novato, USA) ausgezogen. Die Spitze der Kapillare wurde auf einen Durchmesser von ca. 30-50 μm zurückgebrochen. Nachdem die Kapillaren bis zur Hälfte mit ACSF gefüllt waren, wurden die Messelektroden an einem Mikromanipulator befestigt und in die Kapillarlumina ein chlorierter Silberdraht eingetaucht.

Das Imaging-System zur Messung der IOS bestand aus einer monochromatischen Lichtquelle (Polychrome II), PCO Kamera (Sensi-CamQE), Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, BRD) und Auswertungssoftware (Tillvision). Die DC-Potentiale wurden mit einem DC-Extrazellulärverstärker (Eigenbau, Elektronikwerkstatt, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen) gemessen, digitalisiert und mit dem Softwarepaket PClamp 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gesteuert.

Die ACS-Lösung wurde in einem wassergefüllten Wärmebad (DC10, Haake) auf 40,2°C erwärmt, anschließend über eine Walzenpumpe (Watson Marlow 205U) mit 34 RPM (revolutions per minute) in die Messkammer gepumpt.

2.9.1 Auslösen der Hypoxie-induzierten Spreading Depression

Nach der Präparation wurden die Hirnschnitte für ca. 90 Minuten in der Interface-Kammer aufbewahrt. Die Ableitelektroden wurden, wie bereits oben beschrieben platziert und die Begasung der Versuchskammer wurde von Carbogen auf 95% N_2 und 5% CO_2 umgestellt. Dies ermöglichte die Auslösung einer schweren Hypoxie. Die Carbogenbegasung der Versuchslösungen wurde weiterhin fortgeführt. Aus diesem Grund wird hier durchgängig der Begriff Hypoxie gebraucht, obwohl im Gewebe faktisch anoxische Bedingungen vorherrschten. Durch den Sauerstoffmangel kam es in den Slices in der Regel nach 2-4 Minuten zu einer Hypoxie-induzierten Spreading Depression (HSD). Das Erscheinen einer HSD wurde durch eine abrupte Negativierung des extrazellulären DC-Potentials angezeigt. Um die schadensfreie Erholung der Gewebeschnitte zu gewährleisten, wurde die Begasung 20 Sekunden nach Beginn der HSD wieder auf Carbogen umgestellt. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Potentialänderung ihre maximale Amplitude erreicht. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten mehrere HSD-Episoden nacheinander ausgelöst

werden. Wenn zwischen den HSD-Episoden eine ausreichende Erholzeit von ca. 30 Minuten eingehalten wird, kommt es bei den ersten drei HSD zu keinen signifikanten Abweichungen in den gemessenen Parametern (Müller und Somjen 1998).

Des Weiteren wurden die Slices mit den Chemikalien Strychnin und Bicucullin und mit einer Fluoracetat-Lösung behandelt. Diese wurden über die Perfusionslösung zugegeben. Die Hirnschnitte wurden erst ca. 25 Minuten behandelt, bevor eine HSD ausgelöst wurde. Dadurch konnte eine ausreichende Diffusion der Pharmaka in das Gewebe gewährleistet werden. Mit den Werten einer zuvor induzierten Kontroll-HSD wurden am selben Slice die gemessenen Ergebnisse einer HSD unter Inhibitoreinfluss verglichen.

2.9.2 Statistik

Für die Versuche wurden bis zu drei neonatale oder bis zu fünf adulte Slices aus jedem Hirnstamm verwertet. Um die Unabhängigkeit der Beobachtungen zu gewährleisten, wurden für jede experimentelle Serie mindestens drei verschiedene Ratten verwendet. Die Berechnung der Signifikanz der beobachteten Veränderungen fand anhand eines zweiseitigen t-Tests für unverbundene Stichproben statt. Das Signifikanzniveau wurde als $P < 0,05$ definiert. In den Diagrammen wurden die Signifikanzveränderungen durch Asterisks markiert (* $P < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Experimente

In den Experimenten wurde untersucht, wie sich eine verminderte Sauerstoffzufuhr auf das neuronale Netzwerk auswirkt und ob eine SD durch schwere Hypoxie in akuten medullären Gewebeschnitten (400 μm) des Hirnstamms ausgelöst werden kann. Um die Altersabhängigkeit der SD zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte neonataler (P5-P13), juveniler (P19-P21) und adulter (4-6 Wochen) Ratten verwendet. Die Versuche wurden an akuten Gewebeschnitten *in vitro* durchgeführt. Dies ermöglichte, multiparametrische Aufnahmen und nichtinvasive optische Analysen (IOS) durchzuführen. Durch die IOS konnte die raumzeitliche Analyse der Entstehung, Ausbreitung und Gewebeinvasion der HSD realisiert werden. Alle Versuche wurden in einer Interface-Versuchskammer bei einer Temperatur von 34 – 35° C durchgeführt. Durch die Umschaltung der Gaszufuhr von Carbogen auf 95% N_2 und 5% CO_2 konnte eine schwere Hypoxie induziert werden.

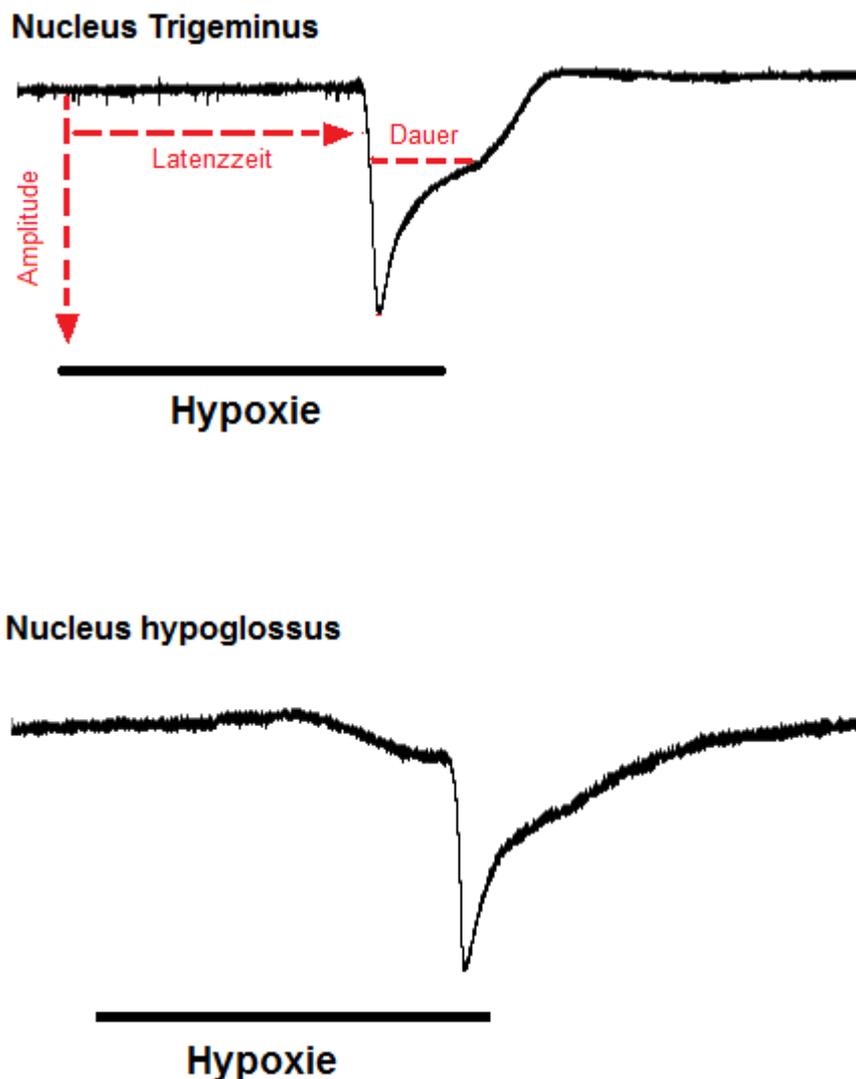
An neonatalen Ratten wurde das Phänomen Spreading Depression unter hypoxischen Voraussetzungen in den Kerngebieten Hypoglossus, Trigeminus und in der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) untersucht. Um die Änderungen der SD zu analysieren, wurden die Gewebeschnitte mit den Chemikalien Strychnin und Bicucullin behandelt.

An juvenilen Ratten wurden ebenfalls die Kerngruppen Hypoglossus, Trigeminus und die ventrale respiratorische Gruppe (VRG) untersucht. Auch hier wurden die Hirnschnitte in einer separaten Versuchsreihe mit den Chemikalien Strychnin und Bicucullin inkubiert.

An adulten Ratten wurde zusätzlich zu den zuvor genannten Kerngruppen der Nucleus tractus solitarii (NTS) untersucht. Auch diese Gewebeschnitte wurden mit Strychnin und Bicucullin inkubiert. Hier wurden die Slices zusätzlich noch mit einer 5 mM Fluoracetat-Lösung behandelt und hypoxischen Bedingungen ausgesetzt.

3.2 Ausbreitungsmuster der Spreading Depression

In dieser Versuchsgruppe wurden die elektrophysiologischen Parameter Amplitude einer SD (in mV), die Latenzzeit (in s) bis zur Auslösung SD-Welle und die Dauer einer SD (in s) erfasst. Die Digitalisierung auf einem Labor-PC gestattete die Identifizierung einer SD anhand der typischen Form (siehe Abbildung 7).



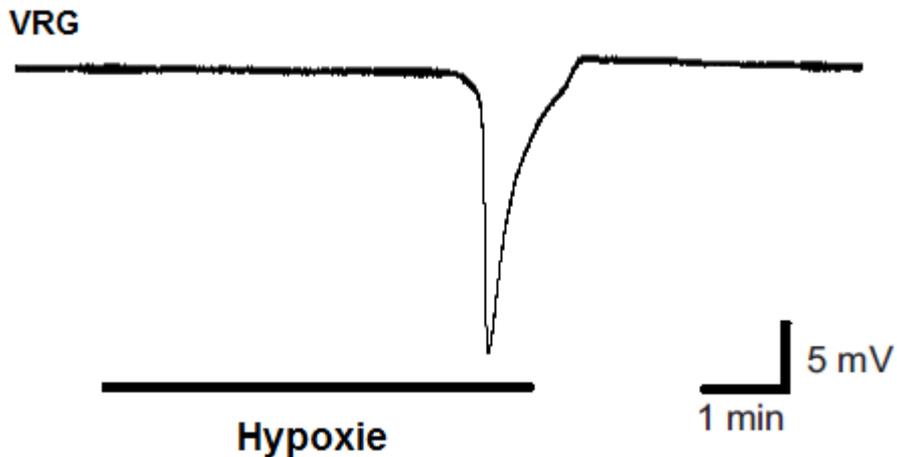


Abbildung 7 In dieser Abbildung wird der abrupte Beginn der Negativierung des DC-Potentials 2-4 Minuten nach dem Sauerstoffentzug im Nucleus trigeminus, Nucleus hypoglossus und in der ventralen respiratorischen Gruppe dargestellt. Die große negative Amplitude zwischen durchschnittlich -15 und -25 mV und die Rückkehr der SD-assoziierten Negativierung des DC-Potentials zur Ausgangslinie innerhalb von 1-2 Minuten lassen sich ebenfalls durch die Abbildung verdeutlichen. Die Skalierung gilt für alle drei Spuren.

3.3 Die anatomische Struktur der Gewebeschnitte

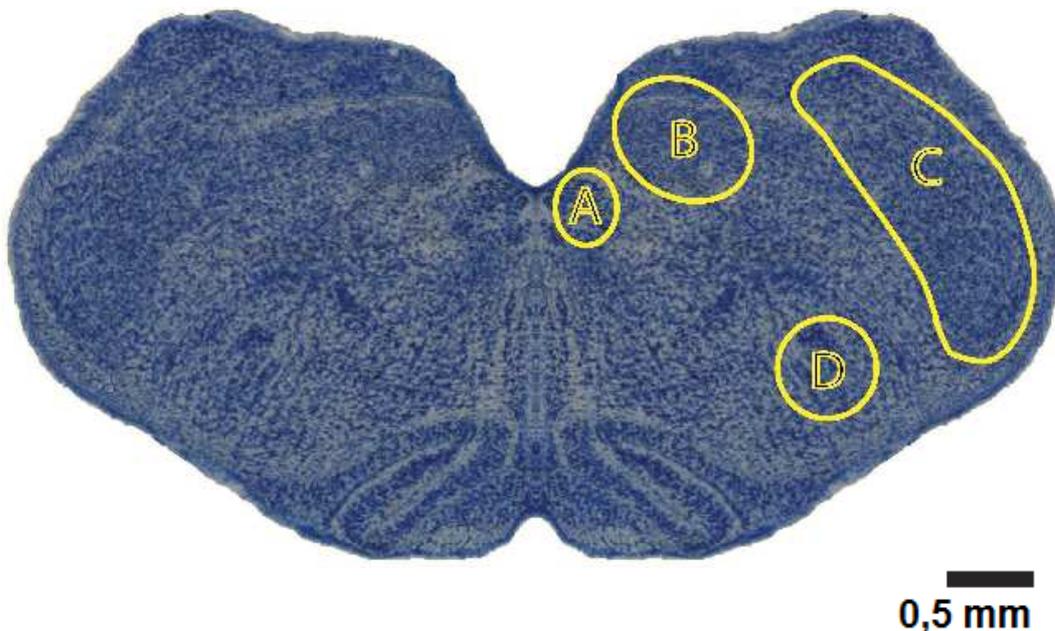


Abbildung 8: Transversaler Gewebeschnitt nach Nissl-Färbung

A: Nucleus hypoglossus, B: NTS, C: Nucleus trigeminus, D: VRG

3.4 HSD in verschiedenen Hirnstammregionen

3.4.1 HSD in neonatalen Ratten

	Ventrale respiratorische Gruppe	Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus
ΔV (mV)	-18,2 ± 9,2 (n = 12)	-17,3 ± 9,0 (n = 8)	-15,9 ± 4,0 (n = 19)
Δt (s)	412,0 ± 345,7	387,2 ± 425,6	291,1 ± 332,9
$t^{1/2}$ (s)	27,5 ± 19,3	26,8 ± 13,6	52,8 ± 32,9

Tabelle 2 Zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der DC-Potentialänderungen (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t^{1/2}$ in s) während der HSD-Ausbreitung in der ventralen respiratorischen Gruppe, im Nucleus hypoglossus und im Nucleus trigeminus neonataler Gewebeschnitte. ± Standardabweichung; n = Anzahl der Slices

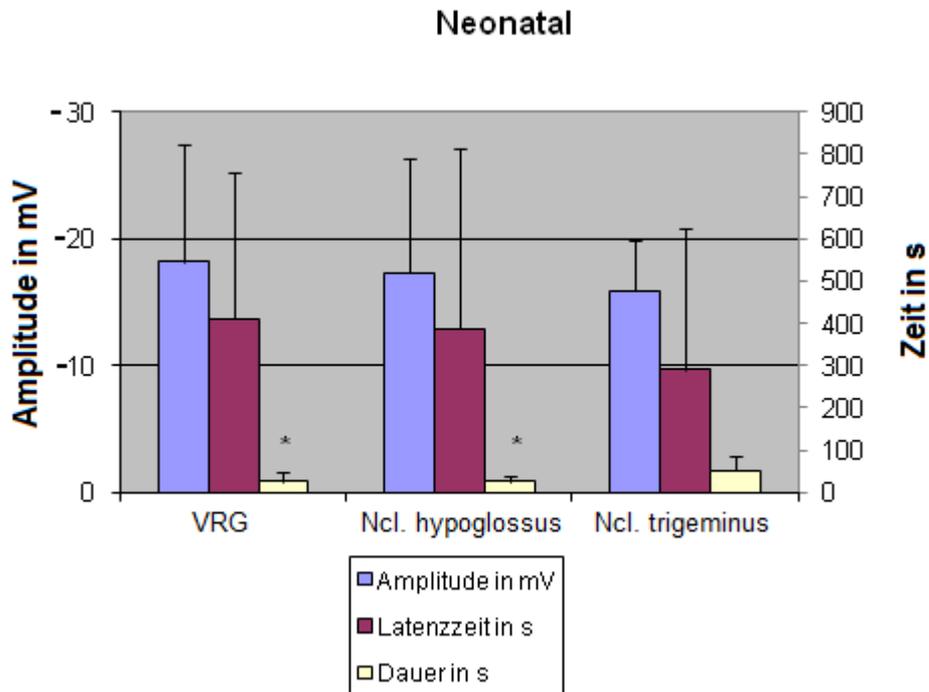


Abbildung 9 Die statistische Auswertung zeigt, dass die in verschiedenen Hirnstammkernen (VRG, Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus) aufgenommenen Parameter des DC Potentials (Amplitude in mV, Latenzzeit in s, Dauer in s) keine signifikanten Unterschiede in der Amplitude (mV) und Latenzzeit (s) aufweisen. Lediglich die Dauer (s) des DC Potentials ist im Nucleus hypoglossus und in der ventralen respiratorischen Gruppe signifikant niedriger als im Nucleus trigeminus (* $P < 0,05$).

Die Slices, die aus den neonatalen Ratten im Alter zwischen 5-13 d gewonnen wurden, wurde der Sauerstoff entzogen und im Nucleus trigeminus, Nucleus hypoglossus und in der ventralen respiratorischen Gruppe des Hirnstamms wurden die SD gemessen. In der Abbildung 9 werden die Relationen der 3 Parameter Amplitude in (mV), Latenzzeit in (s) und die Dauer in (s) zueinander und zu den drei Kerngebieten (Trigeminus, Hypoglossus, ventraler respiratorischer Gruppe) anschaulich dargestellt. Gut ausgeprägte DC-Potentialänderungen fanden sich im Nucleus trigeminus in 44,2 % der Gewebeschnitten (19/43), Nucleus hypoglossus zu 22,9 % (8/35) und in der ventralen respiratorischen Gruppe zu 42,9 % (12/28).

Am zuverlässigsten ließen sich DC-Potential-Änderungen im Nucleus trigeminus beobachten. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich wird, führte die schwere Hypoxie innerhalb von $291,1 \pm 332,9$ s (Latenzzeit) zu DC-Potentialverschiebungen innerhalb des trigeminalen Kernes. Die durchschnittliche Amplitude betrug $-15,9 \pm 4,0$ mV und

die HSD dauerte $52,8 \pm 32,9$ s. Nach der Reoxygenierung, die 20 s nach der HSD-Entstehung eingeleitet wurde, erholte sich die DC-Potentialverschiebung innerhalb einer Minute. Aus der Abbildung 9 lässt sich entnehmen, dass die Dauer (s) der HSD im Nucleus trigeminus signifikant am längsten war (*P < 0,05). Die restlichen HSD-Parameter Amplitude (mV) und Latenzzeit (s) unterschieden sich nicht signifikant in den verschiedenen Hirnstammkernen.

3.4.2 Wiederholte Induktion der HSD im Hirnstamm

Von den 19 erfolgreich durchgeführten HSD im Nucleus trigeminus ließen sich 14 SD-Wellen zum zweiten Mal und 10 weitere HSD zum dritten Mal auslösen. Die HSDs wurden in Abständen von 20 min ausgelöst, um jeweils eine Erholung sicherstellen. Bei den drei hervorgerufenen HSD-Episoden gab es keinen nennenswerten Unterschied in den DC-Potentialen (Abbildung 10). Lediglich die Dauer (s) der HSD fiel nicht signifikant auf $47,1$ s (zweite HSD, $n = 14$) und auf $45,2$ s (dritte HSD, $n = 10$).

Nucleus trigeminus	1. HSD	2. HSD	3. HSD
ΔV (mV)	$-15,9 \pm 4,0$ (n = 19)	$-14,6 \pm 4,6$ (n = 14)	$-15,5 \pm 5,0$ (n = 10)
Δt (s)	$291,1 \pm 332,9$	$245,3 \pm 326,7$	$261,2 \pm 248,3$
$t_{1/2}$ (s)	$52,8 \pm 32,9$	$47,1 \pm 31,1$	$45,2 \pm 9,1$

Tabelle 3 Zusammenfassung der Mittelwerte der DC-Potentialänderungen (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t_{1/2}$ in s) der wiederholten hypoxie-induzierten SD im Nucleus trigeminus neonataler Gewebeschnitte. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices

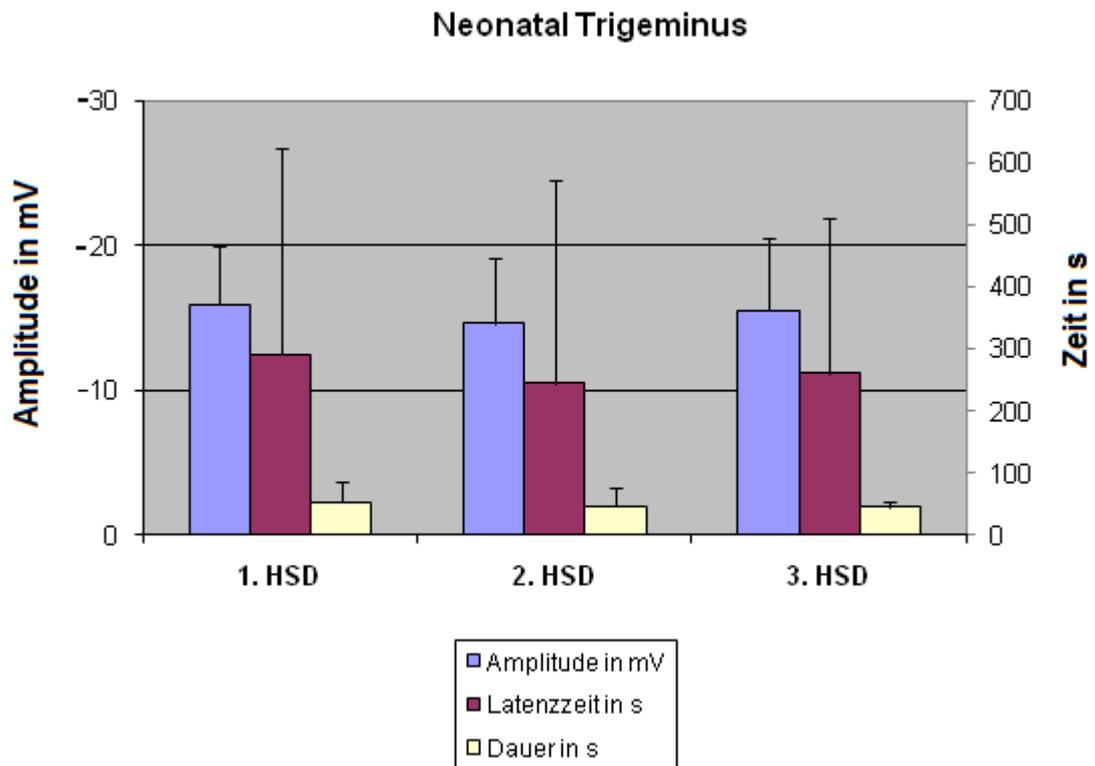


Abbildung 10 Graphische Darstellung der wiederholt induzierten HSD im Nucleus trigeminus neonataler Gewebeschnitte. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Parametern (Amplitude in mV, Latenzzeit in s, Dauer in s).

3.4.3 HSD in juvenilen Ratten

	Ventrale respiratorische Gruppe	Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus
ΔV (mV)	$-11,6 \pm 5,3$ (n = 5)	Keine HSD	$-12,1 \pm 8,8$ (n = 5)
Δt (s)	$67,3 \pm 11,3$	Keine HSD	$60,2 \pm 11,0$
$t_{1/2}$ (s)	$47,4 \pm 25,9$	Keine HSD	$41,7 \pm 5,0$

Tabelle 4 Darstellung der gemessenen Mittelwerte der DC-Potentiale (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t_{1/2}$ in s) während der HSD in der ventralen respiratorischen Gruppe, im Nucleus hypoglossus und im Nucleus trigeminus juveniler Gewebeschnitte. Im Nucleus hypoglossus konnte keine HSD ausgelöst werden. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices

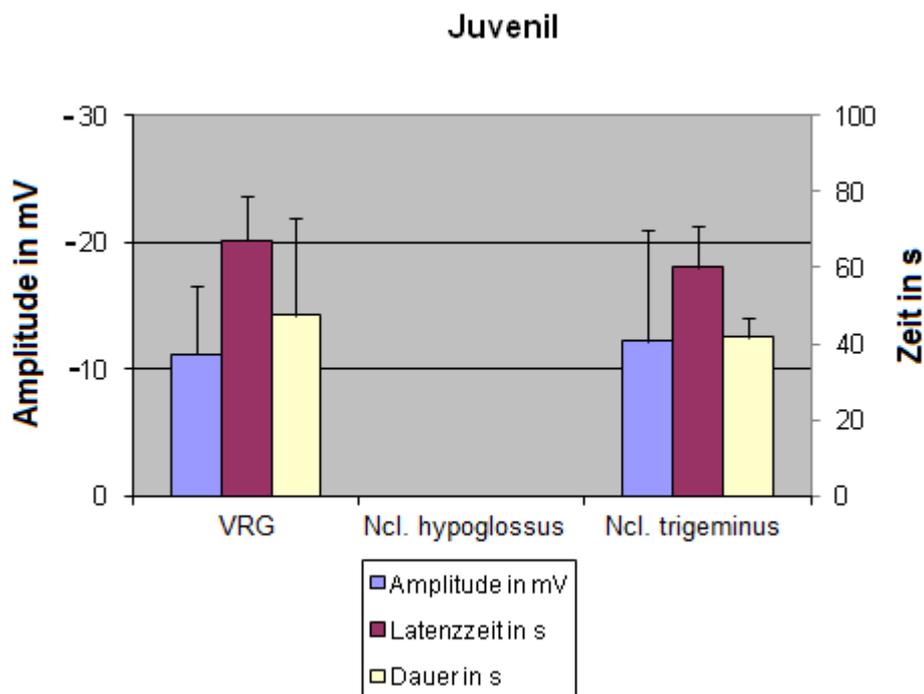


Abbildung 11 Graphische Gegenüberstellung der hypoxieinduzierten SD im Nucleus trigeminus und VRG juveniler Gewebeschnitte. Im Nucleus hypoglossus ließ sich keine HSD auslösen.

K⁺-induzierte SD kann im *in vivo* Hirnstamm nur bis zum Alter von ungefähr zwei Wochen ausgelöst werden (Richter et al. 2003). Es sei denn, die Gewebeschnitte wurden vor der HSD-Auslösung mit chemischen Substanzen behandelt (Richter et al. 2008). Um zu klären ob diese Tatsache auch auf HSD *in vitro* zutrifft, wurden Gewebeschnitte juveniler Ratten (P19-P21) einer schweren Hypoxie (mit 8 mM K⁺) ausgesetzt. Es ließen sich im Nucleus trigeminus und im VRG ausgeprägte HSD-Wellen auslösen. Im Nucleus hypoglossus konnte keine HSD ausgelöst werden (Abbildung 11 und Tabelle 4). Im Nucleus trigeminus ($-12,1 \pm 8,8$ mV, $n = 5$) und im VRG ($-11,6 \pm 5,3$ mV, $n = 5$) waren die DC-Potentialänderungen im Vergleich zu neonatalen Slices aufgrund des erhöhtem K⁺ geringer ausgeprägt. Die Latenzzeit (s) bis zum Auftreten einer HSD war sowohl im Nucleus trigeminus ($60,2 \pm 11,0$ s) als auch im VRG ($67,3 \pm 11,3$ s) ebenfalls aufgrund des erhöhtem K⁺ kürzer als in neonatalen Slices.

3.4.4 HSD in adulten Ratten

	Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus	NTS
ΔV (mV)	-5,1 (n = 4)	-9,5 (n = 4)	-17,1 (n = 4)
Δt (s)	60,7	37,4	33,2
$t_{1/2}$ (s)	k.A.	28,1	51,2

Tabelle 5 Zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der DC-Potentialänderungen (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t_{1/2}$ in s) während der HSD-Ausbreitung im Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus und NTS adulter Gewebeschnitte. Es ließ sich von den jeweils 4 Slices nur jeweils eine HSD in den drei Kerngebieten auslösen. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices; k.A. = keine Angabe

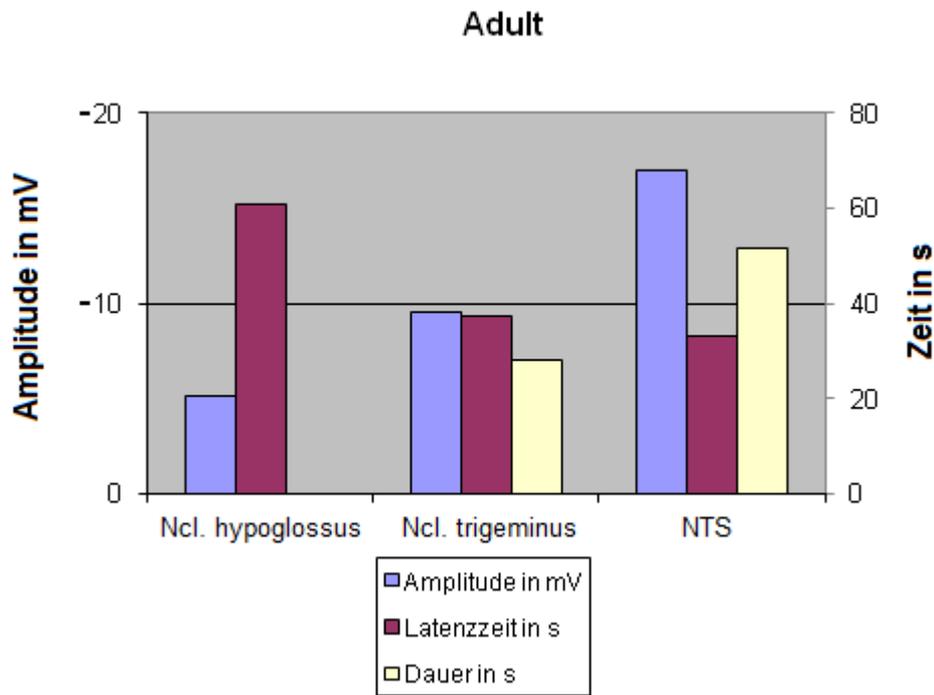


Abbildung 12 Die graphische Darstellung zeigt, dass sich jeweils nur eine HSD im Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus und NTS adulter Gewebeschnitte auslösen ließ.

In adulten (4-6 Wochen) Gewebeschnitten wurden nach 8 mM K⁺-Behandlung neun Versuche durchgeführt. Dabei ließ sich jeweils eine HSD im NTS, Nucleus hypoglossus und im Nucleus trigeminus auslösen (Tabelle 5 und Abbildung 12). Die Amplitude (mV) der HSD betrug im NTS -17,1 mV und erholte sich nach der Reoxygenierung. Trotz lang anhaltender Hypoxie (≤ 20 min) konnte keine charakteristische HSD im Nucleus hypoglossus und Nucleus trigeminus ausgelöst werden.

3.5 Modulation der Hirnstammschnitte mit 0,5 μ M Strychnin und 20 μ M Bicucullin

In früheren Experimenten mit Mäusen wurde belegt, dass die GABA_A-Rezeptor-vermittelten Potentiale in der ersten postnatalen Woche von einer Depolarisation zu einer Hyperpolarisation umkehren. Nach dem vierten Tag hat GABA_A im Hirnstamm nur noch eine inhibitorische Wirkung und regelt die Frequenzmodulation für die Atmungsregulation (Ritter und Zhang 2000). Falls die GABA_A-Rezeptoren bei der Entstehung von SD eine bedeutende Rolle spielen, könnte diese Tatsache dazu führen, dass sich beim adulten Hirnstamm SD schwieriger auslösen lassen als im neonatalen Hirnstamm. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Gewebeschnitte im neonatalen, juvenilen und adulten Alter zunächst mit einer ACS-Lösung behandelt. Im zweiten Versuchsdurchgang wurden die gleichen Slices mit dem GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin (20 μ M) und dem Glycinantagonisten Strychnin (0,5 μ M) 20 Minuten behandelt.

3.5.1 HSD in neonatalen Ratten mit Strychnin und Bicucullin

	Ventrale respiratorische Gruppe	Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus	
ACSF	ΔV (mV)	$-17,3 \pm 13,1$ (n = 4)	$-16,2 \pm 3,9$ (n = 4)	$-17,2 \pm 5,2$ (n = 19)
	Δt (s)	$142,4 \pm 135,4$	$243,0 \pm 185,7$	$164,8 \pm 148,4$
	$t \frac{1}{2}$ (s)	$47,2 \pm 24,8$	$24,3 \pm 19,3$	$50,8 \pm 26,6$
Strychnin+Bicucullin	ΔV (mV)	$-15,2 \pm 13,2$ (n = 4)	$-13,0 \pm 6,4$ (n = 2)	$-14,3 \pm 6,0$ (n = 13)
	Δt (s)	$145,9 \pm 101,7$	$205,5 \pm 71,0$	$115,7 \pm 91,0$
	$t \frac{1}{2}$ (s)	$47,2 \pm 28,8$	$33,4 \pm 17,3$	$52,6 \pm 32,2$

Tabelle 6 Statistische Zusammenfassung der Mittelwerte der DC-Potentialänderungen (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t \frac{1}{2}$ in s) während der HSD-Ausbreitung in der ventralen respiratorischen Gruppe, im Nucleus hypoglossus und im Nucleus trigeminus neonataler Gewebeschnitte mit ACSF und nach Behandlung mit Strychnin und Bicucullin. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices

Neonatal Strychnin/Bicucullin

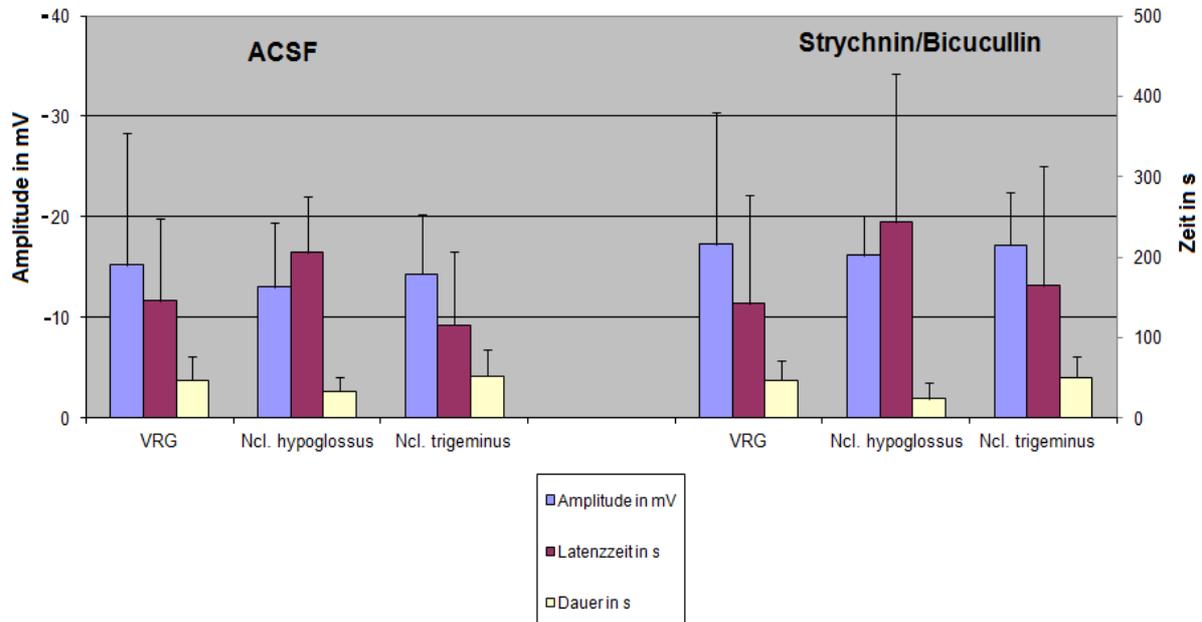


Abbildung 13 Graphische Darstellung der HSD-Parameter (Amplitude in mV, Latenzzeit in s, Dauer in s) in den Kerngebieten (VRG, Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus) neonataler Gewebeschnitte mit ACSF und nach Behandlung mit Strychnin und Bicucullin.

Zusätzlich zu den vorher durchgeführten Versuchen wurden die Gewebeschnitte der neonatalen Ratten mit 0,5 μ M Strychnin und 20 μ M Bicucullin inkubiert. Von den insgesamt 25 durchgeführten Versuchen (siehe Tabelle 6 und Abbildung 13) wurden zuerst die Gewebeschnitte lediglich mit einer ACS-Lösung behandelt. Hierbei ließen sich im Trigemuskerngebiet, Nucleus hypoglossus und in der ventralen respiratorischen Gruppe HSD-Wellen auslösen. Jedoch gab es zwischen den drei Kerngebieten keine nennenswerten Amplitudenveränderungen (ΔV). Auch die Latenzzeit bis zum Eintreten der HSD-Wellen (Δt) und die Dauer der HSD-Wellen ($t_{1/2}$) waren nach Durchführung eines t-Tests nicht signifikant verschieden. Die Behandlung der Slices mit Strychnin und Bicucullin (Tabelle 6 und Abbildung 13) zeigten eine im Vergleich zu den davor mit einer ACS-Lösung durchgeführten Versuchen keine signifikanten Veränderungen in den drei Parametern (Amplitude, Latenzzeit, Dauer).

3.5.2 HSD in juvenilen Ratten mit Strychnin und Bicucullin

		Ventrale respiratorische Gruppe	Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus
ACSF	ΔV (mV)	$-9,4 \pm 3,3$ (n = 4)	$-9,5 \pm 3,0$ (n = 2)	$-5,2 \pm 1,9$ (n = 5)
	Δt (s)	$72,1 \pm 15,8$	$74,2 \pm 20,4$	$49,4 \pm 9,4$
	$t_{1/2}$ (s)	$54,7 \pm 5,8$	k.A.	$75,7 \pm 25,6$
Strychnin+Bicucullin	ΔV (mV)	$-8,5 \pm 3,1$ (n = 4)	$-8,9 \pm 2,8$ (n = 2)	$-4,3 \pm 1,9$ (n = 5)
	Δt (s)	$81,7 \pm 14,8$	$80,7 \pm 34,2$	$55,0 \pm 14,5$
	$t_{1/2}$ (s)	$52,2 \pm 1,8$	k.A.	$56,7 \pm 4,5$

Tabelle 7 Zusammenfassung der Mittelwerte der DC-Potentiale (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t_{1/2}$ in s) während der HSD-Ausbreitung in den Kerngebieten (ventrale respiratorische Gruppe, Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus) neonataler Gewebeschnitte mit ACSF und nach Behandlung mit Strychnin und Bicucullin. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices; k.A.= keine Angabe.

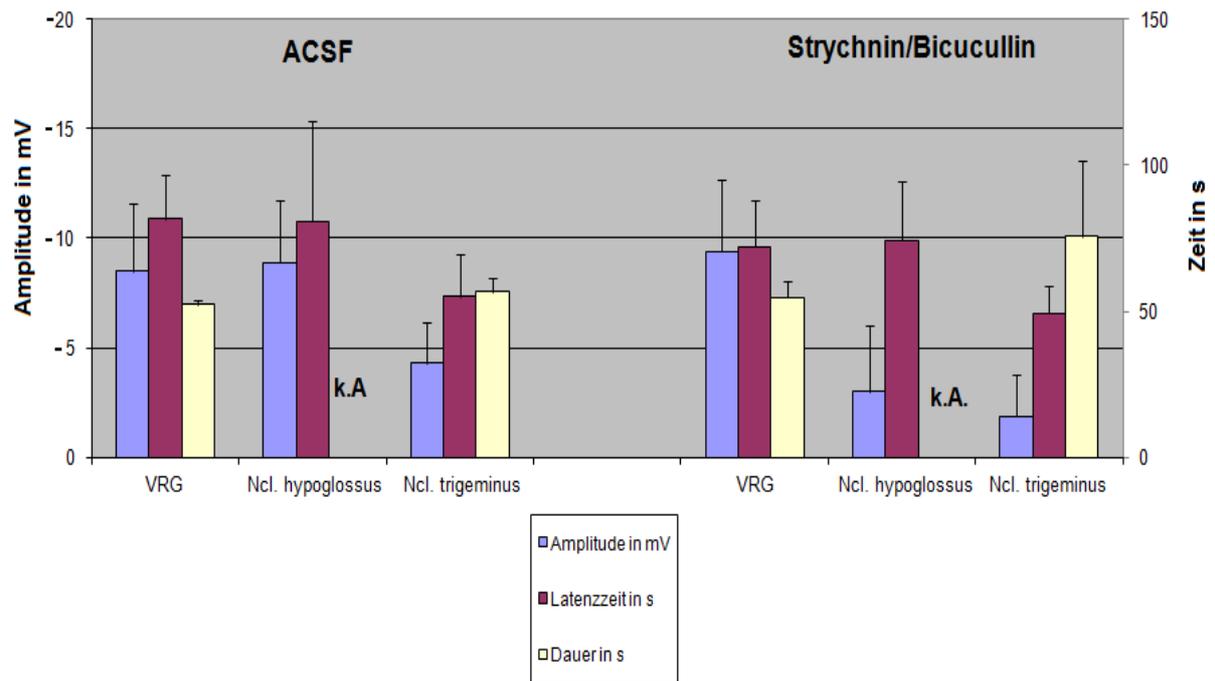


Abbildung 14 Graphische Darstellung der HSD-Parameter (Amplitude in mV, Latenzzeit in s, Dauer in s) in den Kerngebieten (VRG, Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus) juveniler Gewebeschnitte mit ACSF und nach Behandlung mit Strychnin und Bicucullin.

In juvenilen Gewebeschnitten konnten von sechs durchgeführten Versuchen in Anwesenheit von Strychnin und Bicucullin fünf HSD-Wellen im Nucleus trigeminus ausgelöst werden (Tabelle 7 und Abbildung 14). Nach Durchführung eines t-Tests stellte sich heraus, dass die drei Parameter (Amplitude, Latenzzeit, Dauer) keine nennenswerten Unterschiede aufwiesen (Tabelle 7 und Abbildung 14).

3.5.3 HSD in adulten Ratten mit Strychnin und Bicucullin

		Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus	NTS
ACSF	ΔV (mV)	$-4,5 \pm 4,4$ (n = 2)	$-6,6$ (n = 1)	$-17,5 \pm 12,9$ (n = 2)
	Δt (s)	$52,9 \pm 3,8$	15,4	$39,4 \pm 5,8$
	$t_{1/2}$ (s)	k.A.	113,2	$62,9 \pm 18,6$
Strychnin+Bicucullin	ΔV (mV)	$-3,9 \pm 2,8$ (n = 2)	$-6,0$ (n = 1)	$-16,6 \pm 11,4$ (n = 2)
	Δt (s)	$81,9 \pm 1,7$	20,5	$53,8 \pm 6,3$
	$t_{1/2}$ (s)	k.A.	118,3	$87,1 \pm 5,6$

Tabelle 8 Statistische Zusammenfassung der Mittelwerte der DC-Potentiale (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t_{1/2}$ in s) während der HSD-Ausbreitung in den Kerngebieten (Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus, NTS) adulter Gewebeschnitte mit ACSF und mit Strychnin und Bicucullin. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices; k.A.= keine Angabe.

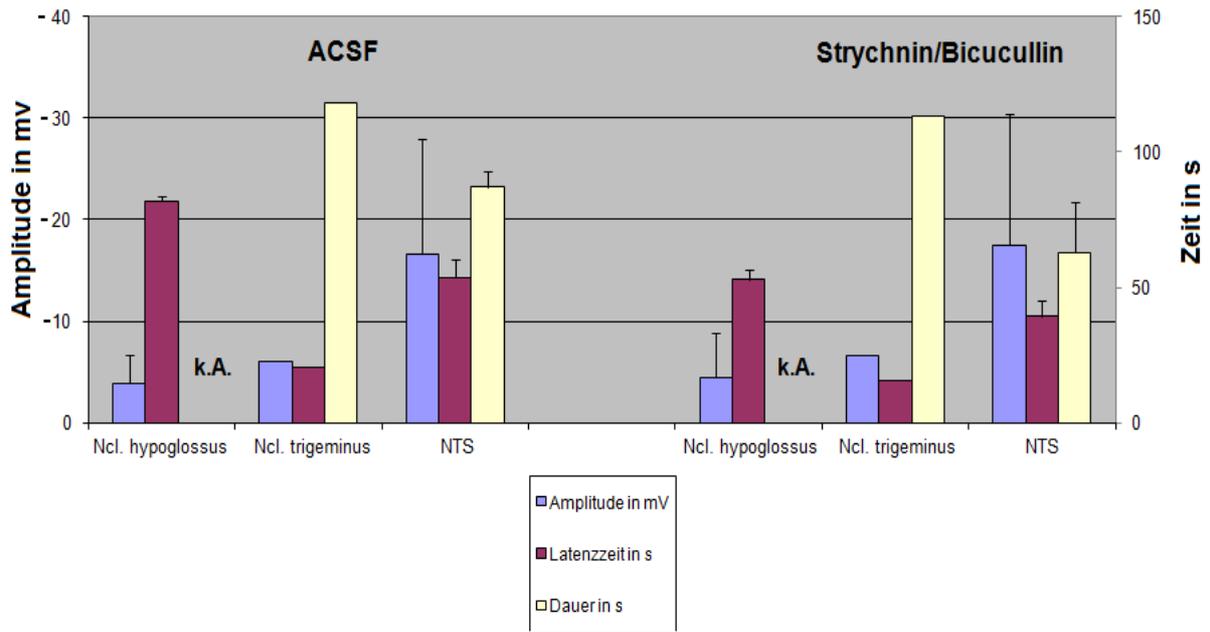


Abbildung 15 Graphische Darstellung der HSD-Parameter (Amplitude in mV, Latenzzeit in s, Dauer in s) in den Kerngebieten (Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus, NTS) juveniler Gewebeschnitte mit ACSF und nach Behandlung mit Strychnin und Bicucullin.

In adulten Ratten wurde zusätzlich zum Trigemini- und Hypoglossuskerngebiet der NTS untersucht. Wie bereits bei den vorherigen Versuchen wurden zunächst die Gewebeschnitte, die mit einer ACS-Lösung behandelt worden waren, einer Hypoxie ausgesetzt (Tabelle 8 und Abbildung 15). Im Anschluss an diese Versuche wurden die Gewebeschnitte mit einer 0,5 μ M Strychnin- und 20 μ M Bicucullinlösung inkubiert und die Lösung für 20 Minuten einwirken lassen. Die SD-Wellen, die mit einer Strychnin- und Bicucullinlösung inkubiert wurden, zeigten in der Regel ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu den davor durchgeführten Versuchen mit ACS-Lösung (Tabelle 8 und Abbildung 15).

3.6 HSD in Slices adulter Ratten nach Behandlung mit 5 mM Fluoracetat

		Nucleus hypoglossus	Nucleus trigeminus	NTS
ACSF	ΔV (mV)	-4,5 \pm 4,4 (n = 2)	-6,6 (n = 1)	-17,5 \pm 12,9 (n = 2)
	Δt (s)	52,9 \pm 3,8	15,4	39,4 \pm 5,8
	$t_{1/2}$ (s)	k.A.	113,2	62,9 \pm 18,6
Fluoracetat	ΔV (mV)	-5,9 (n = 1)	-3,1 \pm 1,6 (n = 5)	-5,7 \pm 1,6 (n = 6)
	Δt (s)	35,0	46,8 \pm 8,9	48,6 \pm 18,5
	$t_{1/2}$ (s)	k.A.	k.A.	k.A.

Tabelle 9 Statistische Zusammenfassung der Mittelwerte der DC-Potentiale (Amplitude in mV, Latenzzeit Δt in s, Dauer $t_{1/2}$ in s) während der HSD-Ausbreitung in den Kerngebieten (Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus, NTS) adulter Gewebeschnitte mit ACSF und Fluoracetat. \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Slices; k.A = keine Angabe

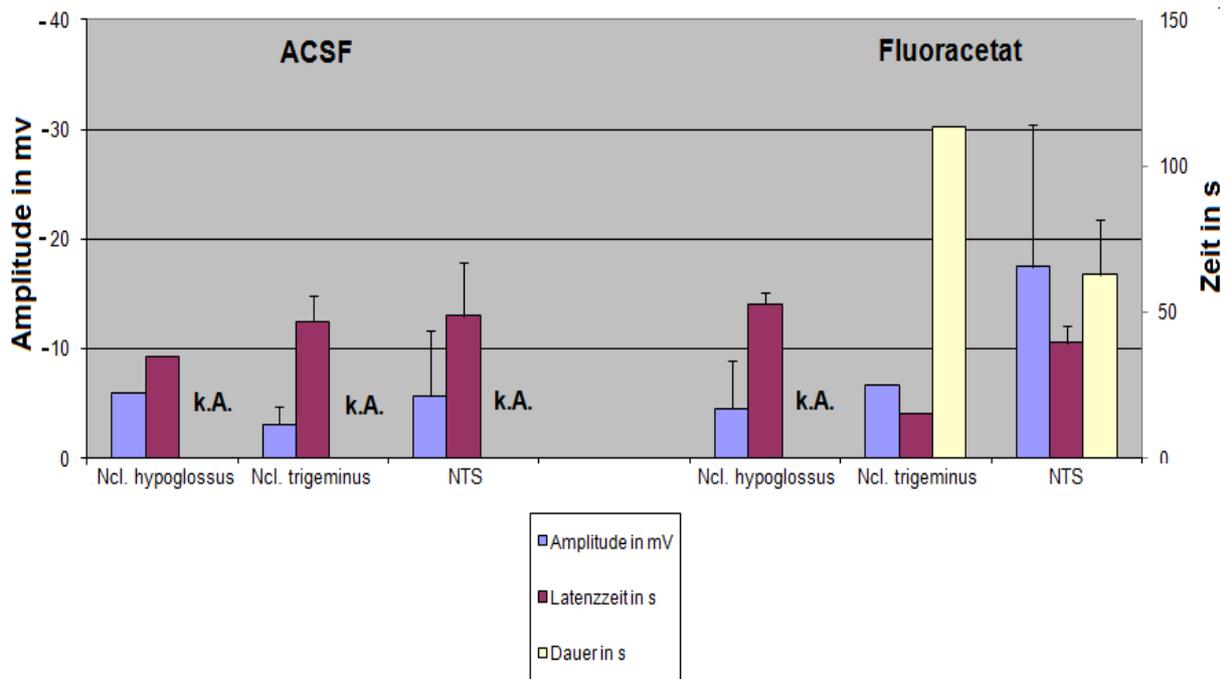


Abbildung 16 Graphische Darstellung der HSD-Parameter (Amplitude in mV, Latenzzeit in s, Dauer in s) in den Kerngebieten (VRG, Nucleus hypoglossus, Nucleus trigeminus, NTS) adulter Gewebeschnitte mit ACSF und nach Behandlung mit 5 mM Fluoracetat.

In den folgenden Versuchen wurde versucht zu ergründen, welche Faktoren die HSD-Entstehung im adulten Hirnstamm unterbinden könnten. Um herauszufinden, ob die Reifung der Gliazellen im adulten Hirnstamm einen Einfluss auf die HSD-Anfälligkeit hat, wurden die Gliazellen mit Fluoracetat vergiftet (FAC, 5 mM, 3 – 5 h). Die Vergiftung mit Fluoracetat führt dazu, dass das Ruhemembranpotential sukzessiv abnimmt (Largo et al. 1997 a). Als Kontrollgruppe wurden die HSD zunächst nur in ACSF induziert (Tabelle 9). Daraufhin wurden diese Hirnschnitte mit einer 5 mM Fluoracetat-Lösung behandelt (Tabelle 9). Von den insgesamt neun durchgeführten Versuchen konnten im NTS ($n = 6$, $-5,7 \pm 1,6$ mV) und im Nucleus trigeminus ($n = 5$, $-3,1 \pm 1,6$ mV) lediglich langsame HSD-ähnliche Wellen ausgelöst werden (Abbildung 16). Im Nucleus hypoglossus konnte nur eine HSD ausgelöst werden. Die Latenzzeit bis zur Auslösung einer HSD mit der Fluoracetat-Lösung unterschied sich kaum von der der Kontrollgruppe.

3.7 Intrinsische optische Signale (IOS)

Die intrinsischen optischen Signale ermöglichen die Visualisierung der SD-Ausbreitung im Gewebe. Durch die Auslösung einer SD oder HSD im Gewebeschnitt steigt begleitend zum Auftreten der SD die Lichtbrechung im betroffenen Gewebe. Dem Absinken des extrazellulären DC-Potentials folgen die intrinsischen optischen Signale (IOS). Das Aufnehmen der IOS hat den Nutzen, dass es sich um eine nichtinvasive Methode handelt, die zudem die simultane Analyse des gesamten Schnittpräparates ermöglicht. So können der Ursprungsort der SD außerhalb der Elektrodenreichweite detektiert und ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit nachvollzogen werden. Hinzu kommt, dass das betroffene Areal visualisiert werden kann. Bei der Messung intrinsischer optischer Signale kann auf den Einsatz von Farbstoffen oder anderen Substanzen verzichtet werden. Mit einem 5fach 0,13-NA Objektiv (Epiplan, Zeiss) wurden Bilder in 2-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet. Durch offline Bildsubtraktion konnten die Hypoxie- und Chemikalien-induzierten Effekte visualisiert werden (Müller und Somjen 1999). Kurz vor dem Wechsel der Begasung von Carbogen auf Stickstoff wurde ein Referenzbild aufgenommen.

Eine hypertone Lösung kann zu einer Steigerung der intrinsischen optischen Signale führen. Ein Abfall der extrazellulären K^+ -Konzentration und eine hypotonische Lösung hingegen bewirken den gegenteiligen Effekt. Durch die durch Zufuhr von Stickstoff eingeleitete Gewebehypoxie kam es zu erhöhten intrinsischen optischen Signalen. Bei der Reoxygenierung kehrte das intrinsische optische Signal wieder auf die Ausgangswerte zurück.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hypoxische IOS-Antwort möglicherweise als ein Ergebnis der Mitochondrienschwellung interpretiert werden kann (Aitken et al. 1999). Die intrinsischen optischen Signale waren in der Region des Nucleus trigeminus am größten und hielten auch länger an (siehe Abbildung 17). In dieser Abbildung sind die intrinsischen optischen Signale des Nucleus hypoglossus, des NTS und der ventralen respiratorischen Gruppe aufgetragen. Aus der Abbildung lässt sich entnehmen, dass die intrinsischen optischen Signale im Nucleus trigeminus am größten waren.

3.8 Intrinsische optische Signale in verschiedenen Hirnstammkernen

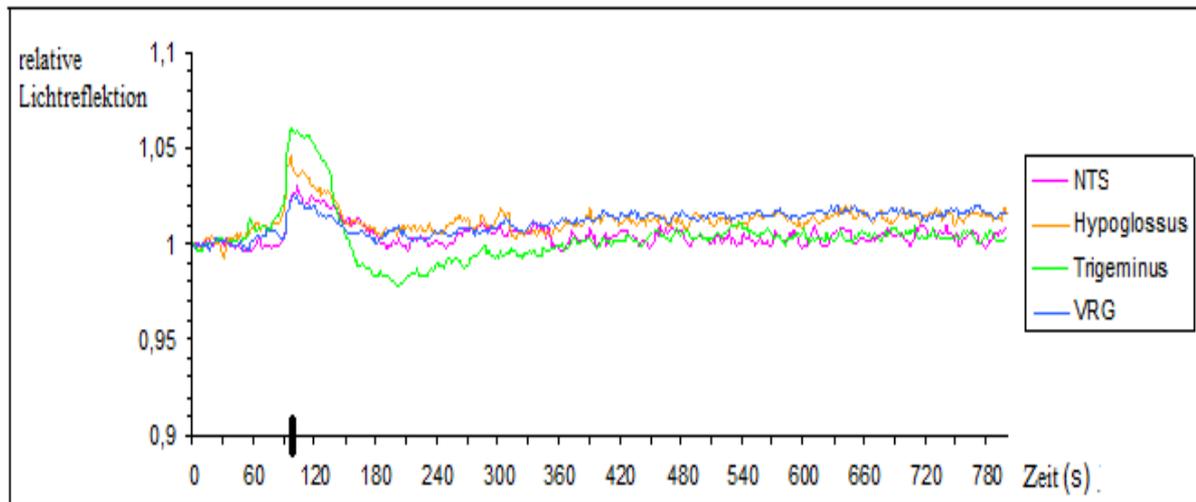


Abbildung 17 Diese Grafik zeigt die Darstellung der intrinsischen optischen Signale (IOS) im Nucleus trigeminus, Nucleus hypoglossus, NTS und in der ventralen respiratorischen Gruppe der neonatalen Ratte. Die Markierung auf der X-Achse setzt die Auslösezeit der Hypoxie fest. Aus der Grafik lässt sich entnehmen, dass im Nucleus trigeminus die relative Lichtreflektion am größten und die Dauer des IOS am längsten war.

3.9 Bildsequenz der Entstehung und Ausbreitung einer HSD im neonatalen Hirnstammschnitt

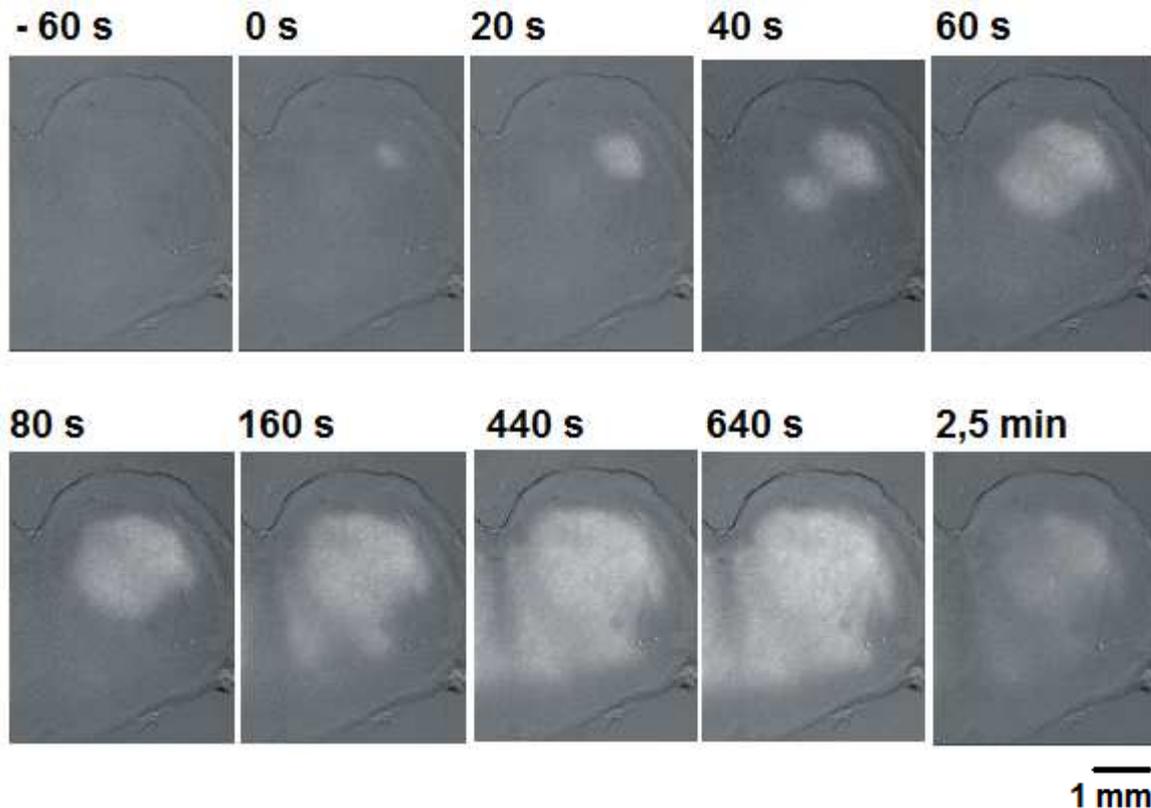


Abbildung 18 Die intrinsischen optischen Signale (IOS) ermöglichen die Visualisierung der HSD-Ausbreitung im Gewebe. Durch die Auslösung einer HSD im Gewebeschnitt steigt begleitend zum Auftreten der HSD die Lichtbrechung im betroffenen Gewebe. Diese Bildsequenz zeigt die ausführliche raumzeitliche Darstellung der HSD im Hirnstamm der neonatalen Ratte. Ungefähr 20 Minuten vor der Hypoxie-Induktion wurde das K^+ im Gewebeschnitt auf 8 mM erhöht. Nach 182 s wurde die Begasung von Carbogen auf Stickstoff umgestellt. Das erste Bild zeigt das Hirnstammgewebe nach Stickstoffgabe und 60 s vor der Auslösung der HSD. Ab dem zweiten Bild wird die Entstehung der HSD im Nucleus trigeminus und die Ausbreitung in Richtung Mittellinie verdeutlicht. Dabei dringt die HSD im Verlauf in den Nucleus hypoglossus und in die ventrale respiratorische Gruppe ein und geht über die Mittellinie in die kontralaterale Hemisphäre über. 640 s nach Stickstoffgabe wurde die Reoxygenierung eingeleitet. Das letzte Bild zeigt den Gewebeschnitt 2,5 min nach der Reoxygenierung.

4 Diskussion

Die aktuelle Studie konzentriert sich auf die Fragestellung, ob eine HSD im Hirnstamm der Ratte auslösbar ist und wie sie sich ausbreitet. Es ist die erste Studie, die das Auftreten der hypoxieinduzierten Spreading Depression (HSD) von Hirnstammschnitten *in vitro* beschreibt und eine detaillierte und multiparametrische Auswertung der SD-Wellen ermöglicht. Im lebenswichtigen Hirnstamm auftretende SD werden mit Komplikationen in der Atmungs- sowie Herz- und Kreislaufregulation in Zusammenhang gebracht.

4.1 HSD-Auslösung im Hirnstamm

Da im Gegensatz zu chemischen Verbindungen hypoxieinduzierte SD schneller auszulösen sind und durch Sauerstoffgabe wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeführt werden können, wurden in den einzelnen Hirnstammarealen durch Sauerstoffentzug SD-Wellen ausgelöst. Hinzu kommt, dass durch transiente Hypoxie keine mechanische und chemikalische Verletzung des Gewebes stattfindet. Dies ist wichtig, wenn man wiederholt SD-Episoden auslösen oder pharmakologische Effekte untersuchen will. Das Hirnstammgewebe weist eine geringe Anfälligkeit für die Entstehung von SD auf. Es wird angenommen, dass dies auf das große interstitielle Volumen und auf die hohe Gliazellichte im Hirnstamm zurückzuführen ist, welches einer SD- und HSD-Entstehung entgegenwirkt (Bures et al. 1974). In früheren Versuchen wurden die Hypoxieeffekte und andere metabolische Veränderungen im Hirnstammnetzwerk (Ballanyi et al. 1992, Cowan and Martin 1992, Jiang et al. 1992, Xia et al. 1992) in Perfusionskammern mit niedrigen Temperaturen und erhöhtem Glukosespiegel (30 mM) analysiert. Sowohl die niedrigen Temperaturen als auch der erhöhte Glukosespiegel wirken sich ungünstig auf die Entstehung einer HSD aus (Gerich et al. 2006, Schurr et al. 1987, Takaoka et al. 1996). Durch Richter et al. wurde erstmals belegt, dass SD in anästhesierten infantilen Ratten durch KCl-Applikation hervorgerufen werden kann (Richter et al. 2003), vorausgesetzt die vorherige Zufuhr einer Lösung mit Natriumacetat setzt die Cl⁻ vermittelte Inhibition herab. KCl und Natriumacetat werden ebenfalls benötigt, um SD im Kleinhirn

auszulösen (Nicholson 1984) und in der Retina die SD-Ausbreitung zu erleichtern (Martins-Ferreira et al. 1974).

In dieser Untersuchung wurde das K^+ in den Gewebeschnitten ungefähr 20 Minuten vor der Hypoxie-Induktion auf 8 mM erhöht. Eine K^+ -Erhöhung in den Gewebeschnitten wird oft vorgenommen, um die neuronale Erregbarkeit zu erhöhen (Funke et al. 2007, Smith et al. 1991). Dadurch wird das neuronale Membranpotential näher zur Reizschwelle verschoben, wodurch eine SD schneller ausgelöst werden kann. Außerdem verstärkt eine K^+ -Erhöhung einen persistierenden Na^+ -Strom (Somjen und Müller 2000), welcher wiederum die neuronale Erregbarkeit erhöht. In der Tat konnte durch die K^+ -Erhöhung die HSD-Ausbreitung erleichtert werden und die HSD traten viel zuverlässiger auf. Die einzelnen HSD-Episoden unterschieden sich kaum in ihren Parametern.

Wie bereits belegt, lassen sich HSD bei normalem K^+ -Niveau (3,5 mM) in neonatalen Gewebeschnitten auslösen. Im Gegensatz dazu reicht bei anästhesierten Ratten Hypoxie alleine nicht aus, um eine SD auszulösen. Nur in Kombination mit einer KCl-Zufuhr lässt sich eine SD-Welle auslösen. Dies lässt vermuten, dass HSD in akuten Hirnstammschnitten eine niedrigere Schwelle zur Auslösung einer SD haben, als unter *in-vivo*-Bedingungen. Ein möglicher Grund könnte die Betäubung während der *in-vivo*-Aufnahmen sein. Die durch das Fehlen der Durchblutung bedingte Unterbindung der Sauerstoffzufuhr und die weniger wirksame K^+ -Clearance aus dem Extrazellulärraum könnten ebenfalls Faktoren für die erhöhte Anfälligkeit für HSD in *in-vitro*-Gewebeschnitten sein. Trotzdem liegt ein großer Vorteil der Slicepräparation darin, dass dadurch multiparametrische Aufnahmen und eine nichtinvasive optische Analyse ermöglicht werden. Die aufgezeichneten DC-Potentialverschiebungen von neonatalen Hirnstammschnitten zeigten einen typischen Verlauf, welcher auch von anderen Hirnregionen bekannt ist. Deren Amplituden von bis zu -26 mV beweisen, dass ungeachtet ihrer heterogenen zellulären Hirnstammstruktur ein ausreichend hoher Grad an neuronalen Depolarisationen beobachtet werden kann. Anhaltende negative DC-Potentialverschiebungen wie bei KCl induzierten SDs (Richter et al. 2003) konnten nicht beobachtet werden. Nach Reoxygenierung konnten sich alle Slices komplett erholen.

4.2 Die raumzeitliche Analyse durch intrinsische optische Signale (IOS)

Die Aufzeichnung der intrinsischen optischen Signale (IOS) ermöglichte die ausführliche raumzeitliche Analyse der HSD im Hirnstamm. Durch die alleinige Verwendung der Mikroelektroden in den Versuchen wären viele HSD-Episoden unentdeckt geblieben. Speziell in adulten Hirnstamm, wo HSD auf den NTS begrenzt waren, hätten sonst die SDs nicht registriert werden können. Durch die IOS-Analyse wurde der Nucleus trigeminus im neonatalen Hirnstamm als bevorzugter Entstehungsort der HSD identifiziert. Die IOS-Analyse lieferte ebenfalls den Beweis für die Ausbreitung der HSD in den NTS, VRG, Nucleus hypoglossus und gelegentlich in die kontralaterale Hemisphäre. Das bevorzugte Auftreten der HSD im Nucleus trigeminus deckt sich mit den *in-vivo*-Experimenten von Richter und Kollegen (Richter et al. 2003). Außerdem wurden Veränderungen in der Herzfrequenz, beim arteriellen Blutdruck sowie eine gestörte Atmung beobachtet (Richter et al. 2008). Dadurch lässt sich feststellen, dass SD-Wellen *in vivo* eine Auswirkung auf das kardiorespiratorischen Zentrum im Hirnstamm haben. Eine raumzeitliche Analyse konnte von Richter und Kollegen aufgrund ihrer Elektrodenanordnung nicht durchgeführt werden. Eine Ausbreitung der SD-Welle in die kontralaterale Hemisphäre wurde ausgeschlossen (Richter et al. 2003). Dennoch sollte beachtet werden, dass die genaue Ausbreitung der HSD-Episoden *in vivo* aufgrund der komplexen Gewebeschaffenheit und der effizienteren Sauerstoffversorgung von *in vitro* abweichen kann.

4.3 HSD-Auslösung im Hirnstamm adulter Ratten

Im Gegensatz zu anderen Hirnregionen muss der Hirnstamm als Atmungs- und Kreislaufzentrum bereits bei der Geburt funktionsfähig sein. Dies könnte erklären warum im neonatalen Hirnstamm HSD zuverlässig ausgelöst werden können. Jedoch entwickelt der Hirnstamm mit seiner Reifung eine relative Resistenz gegen SD-Wellen. Die Anfälligkeit des neokortikalen und hippokampalen Gewebes für HSD ist ebenfalls altersabhängig. Der kompetitive GABA_A-Rezeptor-Antagonist Picrotoxin, 4-Amonopyridin und niedrige Mg²⁺-Lösungen lösen SD am stärksten in juvenilen

(P13-P16) neokortalen Slices aus (Wong und Yamada 2001) und 4-Aminopyridin löst SD im Hypokampus im Alter von P11-P20 aus (Psarropoulou und Avoli 1993). In beiden Studien nahm die SD-Wahrscheinlichkeit mit zunehmendem Alter ab. In früheren Versuchen wurde von Richter und Kollegen dargelegt, dass am Hirnstamm durch die Applikation von KCl SD ausgelöst werden können. Laut der Studie sei es nur bei juvenilen Ratten bis zum postnatalen Tag 13 (Richter et al. 2003) möglich.

In dieser Versuchsreihe wurde eine SD durch die Zufuhr einer Lösung, bestehend aus Acetat anstatt von Chloridionen, ausgelöst. Die Hypoxie durch 2 Minuten Atmung mit 6% O₂ in N₂ hatte denselben Effekt. In den Versuchen stellte sich heraus, dass es nicht möglich ist, zuverlässig SD in adulten Tieren auszulösen. Im Gegensatz zu den Versuchen von Richter und Kollegen, die den gesamten Hirnstamm mit einer KCl-Lösung behandelt haben, wurde bei den Versuchen zu dieser Arbeit bei Gewebeschnitten in verschiedenen Kerngebieten die Sauerstoffzufuhr unterbunden. Desweiteren bot sich die Möglichkeit, sowohl elektrische als auch optische Messungen an den Gewebeschnitten durchzuführen. In den Experimenten an adulten Gewebeschnitten konnten durch Hypoxie mit 8 mM K⁺-Lösung nur langsame DC-Potentialveränderungen registriert werden.

Lediglich im Nucleus tractus solitarii (NTS) kam es zu typischen DC-Potentialveränderungen. Dies legt nahe, dass nur im NTS durch einen ausreichenden Grad an neuronalen Depolarisationen HSD ausgelöst werden können.

4.4 Fluoracetatvergiftung der Gliazellen im Hirnstamm

Fluoracetat und sein toxischer Metabolit Fluorcitrat verursachen eine Inhibition der Aconitase (Fonnum et al. 1997). Aconitase katalysiert die Umwandlung von Citrat in Aconitat und umgekehrt und es ist ein lebensnotwendiges Enzym des Citratzyklus (Horn et al. 2005). Beide Substanzen werden im Hirngewebe von den Gliazellen aufgenommen und führen zur Inhibition des glialen Citratzyklus. Es wurden bereits diverse Versuche mit Fluoracetat durchgeführt. Im Neokortex durchgeführte Versuche hatten gezeigt, dass es durch das gliaspezifische Gift Fluoracetat zum Absinken der glialen Funktion kommt. Durch die Energieknappheit in den Gliazellen wird das neuronale Gewebe anfällig für eine SD und somit erhöht sich das Risiko eines neuronalen Schadens (Largo et al. 1997 a). In einem weiteren Versuch wurde

der Effekt des Fluoracetats auf das hippokampale Gewebe untersucht. Durch den Einsatz von Fluoracetat kam es zu keiner Änderung in der SD-Entstehung. Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass normal funktionierende Gliazellen nicht bedeutsam für das Auftreten und die Ausbreitung einer SD sind (Largo et al. 1997 b). Um die Anfälligkeit der Hirnstammneurone auf Fluoracetat zu testen, wurden die Gliazellen der adulten Tiere mit Fluoracetat vergiftet. Es wurde angenommen, dass die erhöhte Anzahl der Gliazellen bei adulten Tieren eventuell protektiv gegen die Auslösung einer SD-Welle wirken und sich somit eine SD schwieriger auslösen lässt als bei neonatalen Tieren. Zunächst wurden die Versuche mit einer ACS-Lösung durchgeführt. In weiteren Versuchen wurden die Gewebeschnitte mit einer 5 mM Fluoracetatlösung behandelt. Die Fluoracetat-Intoxikation der Gliazellen rief jedoch keinen wesentlichen Unterschied in der Auslösung der SD hervorgerufen. Daraus lässt sich schließen, dass bei adulten Tieren die erhöhte Anzahl der Gliazellen keinen protektiven Effekt darstellten und somit keinen Einfluss auf die Auslösung und Ausbreitung einer SD hatten. Die bereits schwer eingeschränkte Ausbreitung der HSD im adulten Hirnstamm schien durch die Vergiftung noch weiter eingeschränkt zu sein. Dies lässt annehmen, dass Fluoracetat auch funktionell die Hirnstammneurone beeinträchtigt.

4.5 Die Beteiligung GABA- und glycinergere Rezeptoren

Als wesentlichste Vertreter inhibitorischer Transmitter des zentralen Nervensystems seien Glycin und Gammaaminobuttersäure (GABA) erwähnt. Die betreffenden Rezeptorkanäle sind Glycinrezeptoren, die vorwiegend im Hirnstamm und Rückenmark exprimiert sind und GABA_A-Rezeptoren, die hauptsächlich im Kortex und Cerebellum vorkommen. Glycin- und GABA_A-Rezeptoren zählen zu den transmittergesteuerten Chloridkanälen, da sie eine hohe Selektivität für negativ geladene Chloridionen besitzen. Die intrazelluläre Chloridkonzentration ist ausschlaggebend dafür, wie die Wirkung von Glycin- und GABA_A-Rezeptoren auf das Membranpotential ausfällt. Ist die intrazelluläre Chloridkonzentration niedrig, führt die Öffnung dieser ligandengesteuerten Kanäle zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und somit zu einer Stabilisierung des Ruhezustands. Wenn jedoch die intrazelluläre Chloridkonzentration erhöht ist, wie es z.B. bei

pathologischen Zuständen und während der Embryonalentwicklung der Fall ist, dann hat die Aktivierung ligandengesteuerter Chloridkanäle entweder eine geringer ausgeprägte Inhibition zur Folge oder kann sogar zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran führen (Schmidt et al. 2004). Die GABA_A vermittelten postsynaptischen Potentiale wirken in vielen Hirnbereichen während der Embryonalentwicklung und in der frühen postnatalen Phase exzitatorisch. Wie bereits erwähnt, wirken bei neonatalen Tieren die GABA- und glycinergen Synapsen aufgrund des Ungleichgewichts des Chlorid-Ionenverhältnisses zunächst exzitatorisch und erst bei fortschreitender Entwicklung inhibitorisch. Nach dem vierten postnatalen Tag dreht sich das Chlorid-Gleichgewichtspotential um und wirkt fortan nur noch inhibitorisch (Ritter und Zhang 2000).

Um herauszufinden, ob die GABA_A- und Glycin-Rezeptoren im Zusammenhang mit der Entstehung einer SD-Welle stehen, wurde die exzitatorische und inhibitorische Wirkung der neonatalen GABA_A- und Glycinrezeptoren durch die Antagonisten Bicucullin und Strychnin aufgehoben. Bicucullin ist ein GABA_A-Antagonist und Strychnin ist ein Glycinantagonist. Bei den durchgeführten Versuchen hat sich weder eine Veränderung in der Zeit bis zur Auslösung einer SD (Δt) noch eine Amplitudenveränderung (ΔmV) gezeigt. Bei adulten Tieren wirken die GABA_A-Rezeptoren und die Glycinrezeptoren inhibitorisch. Falls die GABA_A- beziehungsweise Glycinrezeptoren einen ausschlaggebenden Effekt auf die Auslösung einer SD-Welle haben sollten, müsste durch die Aufhebung der inhibitorischen Wirkung bei adulten Tieren durch die Antagonisten Bicucullin und Glycin eine SD-Welle früher auftreten als bei Versuchen, die lediglich in einer ACS-Lösung durchgeführt worden sind. Die durchgeführten Versuche haben jedoch gezeigt, dass auch bei adulten Tieren durch die Blockade der GABA_A- und Glycinrezeptoren die SD-Wellen nicht früher auftraten.

Das Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die GABA_A- und Glycinrezeptoren weder bei neonatalen noch bei adulten Tieren eine ausschlaggebende Rolle bei der Auslösung einer SD-Welle spielen

4.6 Funktionelle Auswirkungen der HSD im Hirnstamm

4.6.1 Migräne und Basilarismigräne

Bei Migräne handelt es sich um eine erblich bedingte Funktionsstörung des Gehirns, die zu einer Fehlfunktion der Sinnesverarbeitung führt. Zu den typischen klinischen Symptomen zählen Kopfschmerzen, Photophobie und Übelkeit (Sprenger und Goadsby 2009). Zu dieser Sinnesbeeinträchtigung kommt es durch das Auftreten einer SD, die sich über den Kortex ausbreitet (Lauritzen 1994). Seit längerem werden auch SD-Wellen im Hirnstamm für die Entstehung von Migräne verantwortlich gemacht (Cutrer und Baloh 1992). Entgegen früherer Ansicht handelt es sich bei der Migräne um eine neurogene Funktionsstörung. Genetische Studien brachten hervor, dass einige Migräneformen durch Genmutation zum transmembranen Ionenungleichgewicht führen. Dieses Ungleichgewicht kann die Ursache für die Migräneattacken sein. Durch neurobildgebende Versuche konnte gezeigt werden, dass es während der Migräneattacken nicht nur im Kortex, sondern auch im Hirnstamm zu unregelmäßigen Aktivitäten kommen kann. Laut dieser Studie kann es bei einer Migräneattacke durch Trigeminiereizung zum trigemino-vaskulären Reflex und dadurch bedingter Dilatation der Meningealgefäße kommen. In den Wänden dieser Blutgefäße kommen Schmerz- und Dehnungsrezeptoren des Nervus trigeminus vor, die bei einem Migräneanfall aktiviert werden und zum Kopfschmerz führen können (Martins 2009). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls festgestellt werden, dass der Hirnstamm an der Pathophysiologie der Migräne maßgeblich beteiligt ist. Anhand der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wurde bei Menschen während eines Migräneanfalls die Blutflussänderung aufgezeichnet. Dem PET nach zu urteilen führte ein Migräneanfall zu erhöhtem Blutfluss im Hirnstamm (Weiller et al. 1995).

Die Basilarismigräne ist eine besondere und sehr seltene Migräneform. Man bezeichnet sie auch als basilare Migräne oder Bickerstaff Syndrom. Sie wird von fokalen neurologischen Symptomen begleitet, die aus dem Hirnstamm resultieren. Diese führen zu einer Dysfunktion der Regionen, die durch die Basilarisarterie und ihre Äste versorgt werden (Moreno et Diez-Tejedor 1997). Über die Häufigkeit der Basilarismigräne gibt es keine genauen Angaben. Von der Basilarismigräne sind meist junge Menschen, sprich Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene betroffen.

Der Ausbruch der Krankheit tritt in den meisten Fällen vor dem 25. Lebensjahr auf. Während der Aura, die einer Basilarismigräneattacke voraus geht, können reversible Symptome, wie z.B. Dysarthrie, Vertigo, Tinnitus, Doppelbilder, Sehstörungen auf beiden Augen, Ataxie sowie Bewusstseinsbeeinträchtigungen auftreten (Kozubski 2005). Die Basilarismigräne entsteht durch eine Durchblutungsstörung in bestimmten Hirnbereichen. In den von Kirchmann und Kollegen durchgeführten Versuchen trat die Basilarismigräne bei 10 % der Migräne-Patienten mit Aura auf. Die Basilarismigräne hatte eine durchschnittliche Dauer von 60 Minuten und beinhaltete in 61 % Schwindel, 53 % Dysarthrie, 45 % Tinnitus, 45 % Diplopie, 40 % bilaterale visuelle Symptome, 24 % bilaterale Parästhesien, 21 % herabgesetzte Schwelle zu Bewusstlosigkeit, Hypakusie und 5 % Ataxie. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Basilarismigräne offensichtlich bei jedem Migräne-Patienten mit typischer Aura auftreten kann. Es gibt somit keinen Beweis, dass die Basilarismigräne eine unabhängige Krankheit von Migräne ist (Kirchmann et al. 2006).

Die Tatsache, dass SD-Wellen im Hirnstamm für die Entstehung der Migräne bzw. der Basilarismigräne verantwortlich gemacht werden, waren der Anlass, für diese Arbeit die verschiedenen Nervenkerne des Hirnstamms in Hinblick auf Hypoxie zu untersuchen. Durch die hierzu durchgeführten Versuche konnte festgestellt werden, dass in adulten Tieren im NTS-Bereich SD-Wellen ausgelöst werden können. Dieser Bereich könnte daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Migräne bzw. Basilarismigräne spielen und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.6.2 Der plötzliche Kindstod

Der plötzliche Kindstod ist ein unerklärlicher Tod eines Säuglings im ersten Lebensjahr. Der Begriff ist auch unter der englischen Abkürzung SIDS (Sudden Infant Death Syndrome) bekannt (Huang und Cheng 2006). Er gilt in den Industriestaaten als häufigste Todesursache von Kleinkindern. Trotz des Rückgangs der Prävalenz in den letzten zwei Jahrzehnten ist der plötzliche Kindstod in den Industriestaaten eine der führenden Todesursachen bei Kindern zwischen einem Monat und einem Jahr. Der plötzliche Kindstod ist durch einen spontanen Atemstillstand gekennzeichnet und wird auf die genetische Disposition zurückgeführt. Ferner hat sich in epidemiologischen Untersuchungen gezeigt, dass die seitliche und

geneigte Position der Kleinkinder im Schlaf, ein weiches Bett und das Überheizen Gründe für einen plötzlichen Kindstod sein können. Der Grund dafür ist zwar nicht bekannt, dennoch sind das unreife kardiorespiratorische Kontrollsystem und der Verlust der Schlafempfindlichkeit wichtige Faktoren (Moon et al. 2007). Die tatsächliche Ursache für den plötzlichen Kindstod bleibt jedoch unbekannt.

In postmortalen Hirnstammstudien wurden Veränderungen in den Serotonin-neuronen solcher Kinder nachgewiesen. Mechanismen, durch die die Serotonin-homöostase den plötzlichen Kindstod verursachen könnte, sind nicht bekannt. Durch Versuche an Mäusen wurde bewiesen, dass es durch die Änderung der autoinhibitorischen Kapazität von serotonergen Neuronen und einer Überexpression von Serotonin 1A Autorezeptoren zu einer Hypothermie und Bradykardie in gewissen Entwicklungsstadien kam, die schlussendlich zum Tod führten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die übermäßige Serotoninautoinhibition ein Risikofaktor für autonome Dysregulation ist, und liefern einen möglichen Mechanismus für die Rolle von veränderter Serotoninhomöostase beim plötzlichen Kindstod. Es sind jedoch detaillierte Untersuchungen erforderlich, um die Ursachen aufzudecken (Audero et al. 2008). In einer weiteren Untersuchung wurde entdeckt, dass Jungen für den plötzlichen Kindstod anfälliger sind als Mädchen (Paterson et al. 2006). Überraschenderweise schwächt die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors die SD im kortikalen Gewebe ab (Krüger et al. 1999). Dies lässt vermuten, dass die intakte Serotoninsignalübertragung die Anfälligkeit des neuronalen Gewebes für SD herabsetzt. Außerdem führt Hyperthermie zur erhöhten SD-Anfälligkeit und kann so spontane SD-Wellen auslösen (Wu und Fisher 2000).

In den durchgeführten Versuchen hat sich gezeigt, dass der neonatale Hirnstamm eine mögliche Rolle bei der Entstehung des plötzlichen Kindstod spielen könnte. Durch die Aufnahme des intrinsischen optischen Signales hat sich herausgestellt, dass der Nucleus trigeminus einen bevorzugten Ursprung der hypoxieinduzierten SD im neonatalen Hirnstamm darstellt. Diese Erkenntnis könnte für die weitere Forschung nach der Ursache des plötzlichen Kindstods eine bedeutende Rolle spielen.

5 Zusammenfassung

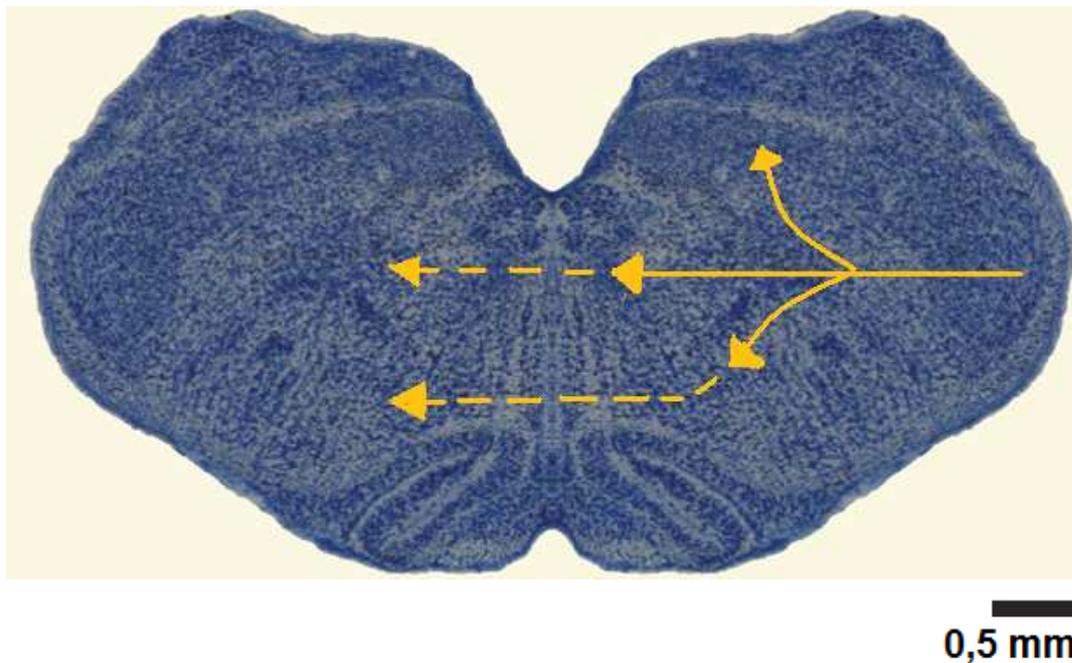


Abbildung 19 Der schematische Verlauf einer typischen HSD-Welle am Transversalschnitt eines Gewebeschnittes nach Nissl-Färbung. Die HSD wird innerhalb des Trigemuskerns ausgelöst und breitet sich medial und ventral in den VRG und Nucleus hypoglossus aus. Gelegentlich überschreitet die HSD die sagittale Mittellinie und dringt in die kontralaterale Hemisphäre ein.

Die SD ist eine sich langsam von einem Punkt aus wellenartig durch das neuronale Gewebe ausbreitende massive Depolarisation von Neuronen und Gliazellen. Das Auftreten der SD wird mit den Krankheitsbildern der Epilepsie, der Migräne, des plötzlichen Kindstods und Hirnverletzungen sowie der Apoplexia Cerebri (Schlaganfall) in Zusammenhang gebracht. Das Phänomen der Spreading Depression wurde bereits ausgiebig im Kortex und Hippokampus untersucht. Über die Anfälligkeit des Hirnstammes für SD-Wellen ist bis jetzt jedoch relativ wenig bekannt.

Um die Anfälligkeit des Hirnstammes zu untersuchen, wurden transversale Gewebeschnitte (400 µm) neonataler, juveniler und adulter Ratten in einer Interface-Versuchskammer einer schwere Hypoxie ausgesetzt. In neonatalen Ratten

erschieden nach 4-6 Minuten schwerer Hypoxie HSD-Wellen, wohingegen in adulten Gewebeschnitten sich sogar nach 20 minütiger Hypoxie keine SD-Wellen mit vergleichbaren Amplituden auslösen ließen. In neonatalen Slices kam es zu starken DC-Potential-Auslenkungen, jedoch war die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Hypoxie-induzierten Spreading Depression (HSD) geringer als in anderen Hirnregionen. Die plötzliche extrazelluläre DC-Potential-Veränderung von ca. -20 mV zeigte das typische Profil, welches auch von anderen Hirnregionen bekannt ist und wurde von einem intrinsischen optischen Signal (IOS) begleitet. Sobald eine HSD auftrat, kam es zu einem intrinsischen optischen Signal, das von einem plötzlichen Anstieg der Lichtreflexion geprägt war. Es ließen sich für jeden einzelnen Slice bis zu jeweils drei HSD-Episoden auslösen. Die Elektroden wurden in verschiedene Hirnstammkerne positioniert. Um die räumlich-zeitliche Komponente zu analysieren, wurde das intrinsische optische Signal einer SD aufgenommen. Im Laufe der Versuche zeichnete sich ab, dass sich die HSD hauptsächlich innerhalb des Trigemuskerns auslösen ließen und sie sich danach medial und ventral ausbreiteten sowie in den Nucleus hypoglossus und in die ventrale respiratorische Gruppe eindrangen. Gelegentlich überschritten die HSD-Episoden die sagittale Mittellinie und drangen in die kontralaterale Hemisphäre ein (Abbildung 19). Im Vergleich dazu bleibt die SD im Kortex in der Regel auf eine Hemisphäre beschränkt (Leão 1944). Nach den optischen Signalen zu urteilen, breiteten sich die HSD-Wellen diskontinuierlich und oft von verschiedenen Orten aus aus. Dies könnte auf die unterschiedliche Struktur des Hirnstammes zurückzuführen sein. Nach der Re-Oxygenierung erholte sich der Hirnstammschnitt von der HSD rasch und es konnte in der elektrischen Messung eine Rückkehr auf die prähypoxische Ausgangslinie beobachtet werden.

Um herauszufinden, ob die GABA- und Glycin-Rezeptoren im Zusammenhang mit der Entstehung einer SD-Welle stehen, wurden sowohl die exzitatorische und inhibitorische Wirkung der neonatalen als auch die inhibitorische Wirkung der adulten GABA- und Glycinrezeptoren durch die Antagonisten Bicucullin und Strychnin aufgehoben. Es zeigte sich, dass GABA- und Glycin-Rezeptoren einer Entstehung der SD nicht entgegenwirken.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass durch die Gliazellintoxikation mit Fluoracetat keine Veränderung in der Entstehung einer SD zu beobachten ist und dass Gliazellen im Hirnstamm nicht der einzige protektive Faktor gegen SD sind.

Bei adulten Tieren beschränkte sich die SD auf den Nucleus tractus solitarii (NTS) und breitete sich nie ins Atemzentrum aus, wohingegen sich die SD bei neonatalen Tieren bis ins Atemzentrum ausbreitete. Es konnte gezeigt werden, dass sich im neonatalen Hirnstammgewebe zuverlässig HSD-Wellen erzeugen lassen. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass sich im Nucleus tractus solitarii (NTS) der adulten Tiere HSD-Wellen auslösen lassen. Diese Erkenntnis könnte von großer Wichtigkeit für die pathologischen Zustände wie Basilaris-Migräne, Hirnstamminfarkt und den plötzlichen Kindstod sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACSF: Artificielle cerebrospinale Flüssigkeit

ATP: Adenosintriphosphat

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide

ECoG: Elektrokortikogramm

EEG: Elektroenzephalogramm

GABA: Gamma-Aminobuttersäure

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

HSD: *hypoxic spreading depression* (Hypoxie-induzierte spreading depression)

IOS: intrinsische optische Signale

NCL: Nucleus

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

NTS: Nucleus tractus solitarii

PET: Positronen-Emissions-Tomographie

SD: Spreading Depression

VRG: Ventrale respiratorische Gruppe

7 Literaturverzeichnis

Aitken PG, Fayuk D, Somjen GG, Turner DA (1999): Use of intrinsic optical signals to Monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 18: 91-103

Audero E, Coppi E, Mlinar B, Rossetti T, Caprioli A, Banchaabouchi MA, Corradetti R, Gross C (2008): Sporadic autonomic dysregulation and death associated with excessive serotonin autoinhibition. *Science* 321: 130-133

Ballanyi K, Kuwana S, Volker A, Morawietz G, Richter DW (1992): Developmental changes in the hypoxia tolerance of the in vitro respiratory network of rats. *Neurosci Lett* 148: 141–144

Bures J, Bureslova O, Krivanek J: The mechanism and application of Leão's spreading depression of electroencephalographic activity. *Academia: Prague* 1974

Bures J, Buresová O, Krivánek J (1984): The meaning and significance of Leão's spreading depression. *An Acad Bras Cienc* 56: 386-400

Chance B, Willams GR (1955): A method for the localization of sites from oxidative phosphorylation. *Nature* 176: 250-254

Collewijn H, Harreveld AV (1966): Membrane potential of cerebral cortical cells during spreading depression and asphyxia. *Exp Neurol* 15: 425-436

Cowan AI, Martin RL (1992): Ionic basis of membrane potential changes induced by anoxia in rat dorsal vagal motoneurons. *J Physiol* 455: 89–109

Croning MD, Haddad GG (1998): Comparison of brain slice chamber designs for investigations of oxygen deprivation in vitro. *J Neurosci Methods* 81: 103-111

Csiba L, Paschen W, Mies G (1985): Regional changes in tissue pH and glucose content during cortical spreading depression in rat brain. *Brain Res* 336: 167-170

Cutrer FM, Baloh RW (1992): Migraine-associated dizziness. *Headache* 32: 300–304

Czéh G., Somjen GG (1990): Hypoxic failure of synaptic transmission in the isolated spinal cord, and the effects of divalent cations. *Brain Res* 527: 224-233

Fonnum F, Johnsen A, Hassel B (1997): Use of fluorocitrate and fluoracetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21: 106-113

Forth W, Henschler D, Rummel W: *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie* 9. Auflage, Urban & Fischer Verlag. München 2006a, 1075

Forth W, Henschler D, Rummel W: *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie* 9. Auflage, Urban & Fischer Verlag. München 2006b, 293

Funke F, Dutschmann M, Müller M (2007): Imaging of respiratory-related population activity with single-cell resolution. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C508–C516

Gault LM, Lin CW, LaManna JC, Lust WD (1994): Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression. *Brain Res* 641: 176-180

Gerich FJ, Hepp S, Probst I, Müller M (2006): Mitochondrial inhibition prior to oxygen-withdrawal facilitates the occurrence of hypoxia-induced spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 96: 492–504

Gjedde A, Hansen AJ, Quistorff B (1981): Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem* 37: 807-812

Goadsby PJ, Kaube H, Hoskin KL (1992): Nitric oxide couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res* 595: 167-170

Grafstein B (1956): Mechanism of cortical spreading depression. *J Neurophysiol* 19: 154-171

Grinvald A, Frostig RD, Lieke E, Hildesheim R (1988): Optical imaging of neuronal activity. *Physiol Rev* 68: 1285-1366

Hansen AJ, Olsen CE (1980): Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand* 108: 355-365

Harreveld A. Van (1978): Two mechanisms of spreading depression in chicken retina. *J Neurobiol* 9: 419-431

Higashida H, Mitarai G, Watanabe S (1974): A comparative study of membrane potential changes in neurons and neuroglial cells during spreading depression in rabbit. *Brain Res* 65: 411-425

Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B: *Biochemie des Menschen*. 3. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2005, S. 202

Hossmann KA (2003): Glutamate hypothesis of stroke. *Fortschr Neurol Psychiatr* 71 Suppl 1, S10-15

Huang CY, Cheng SF (2006): Reducing the risk of sudden infant death syndrome through safe sleep practices. *Hu Li Za Zhi*. 53(4):11-16

Jiang C, Agulian S, Haddad GG (1992): Cl^- and Na^+ homeostasis during anoxia in rat hypoglossal neurons: intracellular and extracellular in vitro studies. *J Physiol* 448: 697–708

Jöbsis FF (1977): Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198: 1264-1267

Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman JP, Maylie J (1999): Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch* 438: 314-321

Kirchmann M, Thomsen LL, Olesen J (2006): Basilar-type migraine: clinical, epidemiologic, and genetic features. *Neurology* 66: 880-886

Klinke R, Pape HC, Silbernagl S: *Physiologie*. 5. Auflage, Thieme-Verlag Stuttgart 2005

Kozubski W (2005): Basilar-type migraine: pathophysiology, symptoms and signs, and treatment. *Neurol Neurochir Pol.* 39(4 Suppl 1):S65-67

Krüger H, Heinemann U, Luhmann HJ (1999): Effects of ionotropic glutamate receptor blockade and 5-HT_{1A} receptor activation on spreading depression in rat neocortical slices. *Neuroreport* 10: 2651–2656

LaManna JC, Sick TJ, Pikarsky SM, Rosenthal M (1987): Detection of an oxidizable fraction of cytochrome oxidase in intact rat brain. *Am J Physiol* 253: C477-483

Largo C, Ibarz JM, Herreras O (1997 a): Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J Neurophysiol* 78: 295-307

Largo C, Tombaugh GC, Aitken PG, Herreras O, Somjen GG (1997 b): Heptanol but not fluoroacetate prevents the propagation of spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 77: 9-16

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

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

Leão AAP (1944): Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7: 359-396

Leão AAP, Morrison RS (1945): Propagation of spreading cortical depression. J Neurophysiol 8: 33-45

Lehmenkühler A, Sykova E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C (1993): Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. Neuroscience 55: 339-351

Martins IP (2009): Migraine. Acta Med Port 22(5):589-598

Martins-Ferreira H, De Oliveira Castro G, Struchiner CJ, Rodrigues PS (1974): Circling spreading depression in isolated chick retina. J Neurophysiol 37: 773–784

Mayevsky A, Weiss HR (1991): Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. J Cereb Blood Flow Metab 11: 829-836

McLachlan RS, Girvin JP (1994): Spreading depression of Leão in rodent and human cortex. Brain Res 666: 133-136

Moon RY, Horne RS, Hauck FR (2007): Sudden infant death syndrome. Lancet 370: 1578-1587

Moreno MS, Díez-Tejedor E (1997): basilar artery migraine, Neurologia. 12 Suppl 5:1-6

Müller M: Responses of central neurons to hypoxia and the role of mitochondria as metabolic sensors. In: Recent Research Developments in Physiology Vol 3, Research Signpost, Kerala, India 2005, 59-90

Müller M, Somjen G (1998): Inhibition of major cationic inward currents prevents spreading depression-like hypoxic depolarization in rat hippocampal tissue slices. Brain Res 812: 1-13

Müller M, Somjen GG (1999): Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82: 1818-1831

Nedergaard M, Astrup J (1986): Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [¹⁴C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 607-615

Nicholson C (1984): Comparative neurophysiology of spreading depression in the cerebellum. *An Acad Bras Cienc* 56: 481–494

Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC (2006): Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296: 2124-2132

Psarropoulou C, Avoli M (1993): 4-Aminopyridine-induced spreading depression episodes in immature hippocampus: developmental and pharmacological characteristics. *Neuroscience* 55: 57–68

Reid KH, Marrannes R, Wauquier A (1988): Spreading depression and central nervous system pharmacology. *J Pharmacol Methods* 19: 1-21

Richter F, Rupprecht S, Lehmenkühler A, Schaible HG (2003): Spreading depression can be elicited in brain stem of immature but not adult rats. *J Neurophysiol* 90: 2163-2170

Richter F, Bauer R, Lehmkuhler A, Schaible HG (2008): Spreading depression in the brainstem of the adult rat: electrophysiological parameters and influences on regional brainstem blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 984-994

Ritter B, Zhang W (2000): Early postnatal maturation of GABA_A-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse. *Eur J Neurosci* 12: 2975-2984

Roitbak AI, Bobrov AV (1975): Spreading depression resulting from cortical punctures. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 35: 761-768

Rosenthal M, Somjen G (1973): Spreading depression, sustained potential shifts, and metabolic activity of cerebral cortex of cats. *J Neurophysiol* 36: 739-749

Rossi D. J, Oshima T, Attwell D (2000): Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321

Salzberg BM, Obaid AL, Bezanilla F (1993): Microsecond response of a voltage-sensitive merocyanine dye: Fast voltage-clamp measurements on squid giant axon. *Jap J Physiol* 43: S37-41

Schmidt RF, Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 29. Auflage, Springer-Verlag. Berlin 2004, 77

Schurr A, West CA, Reid KH, Tseng MT, Reiss SJ, Rigor BM (1987): Increased glucose improves recovery of neuronal function after cerebral hypoxia in vitro. *Brain Res* 421: 135–139

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991): Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254: 726–729

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

Somjen GG, Müller M (2000): Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. *Brain Res* 885: 102–110

Somjen GG, Aitken PG, Czéh GL, Herreras O, Jing J, Young JN (1992): Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl S248-254

Somjen GG, Aitken PG, Czéh G, Jing J, Young JN (1993): Cellular physiology of hypoxia of the mammalian central nervous system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 71: 51-65

Sprenger T, Goadsby PJ (2009): Migraine pathogenesis and state of pharmacological treatment options. *BMC Med* 16;7:71

Stepnoski RA, Laporta A, Raccaia-Behling F, Slusher GE, Kleinfeld D (1991): Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88: 9382-9386

Streit DS, Ferreira Filho CR, Martins-Ferreira H (1995): Spreading depression in isolated spinal cord. *J Neurophysiol* 74: 888-890

Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M (2002): Spreading and synchronous depressions of cortical activity in actually injured human brain. *Stroke* 33: 2738-2743

Sugaya E, Tokato M, Noda Y (1975): Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 38: 822-841

Takaoka S, Pearlstein RD, Warner DS (1996): Hypothermia reduces the propensity of cortical tissue to propagate direct current depolarizations in the rat. *Neurosci Lett* 218: 25–28

Ueki M, Linn F, Hossmann KA (1988): Functional activation of cerebral blood flow and metabolism before and after global ischemia of rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 486-494

Villringer A, Chance B (1997): Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends Neurosci* 20: 435-442

Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC (1995): Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1(7):658-660

Wong M, Yamada KA (2001): Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: a comparison of four in vitro seizure models. *Brain Res Dev Brain Res* 128: 113–120

Wu J, Fisher RS (2000): Hyperthermic spreading depressions in the immature rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 84: 1355–1360

Xia Y, Jiang C, Haddad GG (1992): Oxidative and glycolytic pathways in rat (newborn and adult) and turtle brain: role during anoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 262: R595–R603

