

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

**Spektrale Eigenschaften des intrinsischen optischen Signals
während hypoxieinduzierter Spreading Depression im
Hippokampus der Ratte**

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

vorgelegt von

Maria Mané

aus

Ilmenau

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. Jakobs

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

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2011

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Spreading Depression.....	1
1.1.1	Grundlegende Bemerkungen.....	1
1.1.2	Ionenumverteilung bei einer HSD und die Rolle der Mitochondrien.....	2
1.1.3	Rolle der Gliazellen.....	5
1.2	Intrinsische optische Signale.....	5
1.3	Zielsetzung.....	8
1.4	Pharmakologische Modulation der HSD und der IOS.....	9
1.4.1	Ionale Veränderungen der Lösungszusammensetzung.....	10
1.4.2	Änderung der Lösungsosmolarität.....	10
1.4.3	Gliazellintoxikation.....	11
1.4.4	Mitochondriale Intoxikation.....	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Versuchsaufbau.....	13
2.2	Präparation der Ratte.....	15
2.3	Herstellen der Hirnschnitte.....	16
2.4	Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	17
2.5	Verwendete Gasgemische.....	19
2.6	Vorgehensweise bei den Messungen.....	19
2.6.1	Vorbereitung der Messungen.....	19
2.6.2	Durchführung der Messungen.....	21
2.7	Vorgehensweise bei der Auswertung.....	22
2.7.1	Auswertung der elektrischen Messungen.....	22
2.7.2	Auswertung der optischen Messungen.....	24
3	Darstellung der eigenen Untersuchungen.....	26
3.1	Veränderungen im Reflexionsverhalten des Hippokampusgewebes während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung.....	26
3.2	HSDs bei ionaler Veränderung der Lösungszusammensetzung.....	34
3.3	HSDs bei veränderter Lösungsosmolarität.....	39
3.4	HSDs bei ausgeschalteter Gliazellfunktion.....	43

3.5	HSDs bei mitochondrialer Intoxikation.....	45
3.6	Vergleich der Messreihen untereinander zu den vier definierten Messzeitpunkten.....	52
3.6.1	Messzeitpunkt 1 (30s vor der HSD).....	52
3.6.2	Messzeitpunkt 2 (IOS _{min} bzw. IOS _{min1}).....	53
3.6.3	Messzeitpunkt 3 (IOS _{max} bzw. IOS _{min2}).....	53
3.6.4	Messzeitpunkt 4 (3 Minuten nach Reoxygenierung bzw. nach der HSD).....	55
4	Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Angaben in der Literatur.....	57
4.1	IOS-Verlauf und DC-Potenzialänderungen während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung.....	57
4.2	HSDs bei ionaler Veränderung der Lösungszusammensetzung.....	66
4.3	HSDs bei veränderter Lösungsmolarität.....	71
4.4	HSDs bei ausgeschalteter Gliazellfunktion.....	74
4.5	HSDs bei mitochondrialer Intoxikation.....	75
4.6	Methodenkritik.....	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Literaturangaben.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: DC-Potenzialänderung während einer HSD in Standard-ACSF. Ergänzend ist die Anzahl der Belichtungsreihen für die Registrierung der Lichtreflexion im Gewebe dargestellt.	2
Abb. 2: Zeitliche Verzögerung zwischen SD-Beginn und Zunahme der IOS. Die im Text beschriebenen Phasen der IOS-Entwicklung sind im zeitlichen Zusammenhang mit den DC-Potenzialveränderungen dargestellt. Die Abweichung in der Lichtreflexion wird in % bezüglich des anfangs ermittelten Referenzwertes angegeben.	6
Abb. 3: Entstehung und Ausbreitung der IOS während einer HSD im Hippokampus (so <i>stratum oriens</i> , <i>sp stratum pyramidale</i> , <i>sr stratum radiatum</i> , <i>DG Gyrus dentatus</i>). Die Lichtreflexion wird in % des eingangs bestimmten Referenzwertes in Form verschiedener Graustufen dargestellt. Vor allem die CA1-Region zeigt eine Reflexionszunahme.	8
Abb. 4: Interface-Kammer (Oslo style)	13
Abb. 5: Durchflussregler	14
Abb. 6: Windkessel	14
Abb. 7: Wasserbad (rechts) und Mehrkanal-Rollenpumpe (links)	14
Abb. 8: Präparationsbesteck	16
Abb. 9: Hemisphäre des Gehirns einer adulten Ratte	17
Abb. 10: Vibroslicer beim Herstellen der Hirnschnitte	17
Abb. 11: Hirnschnitt mit plazierter Elektrode und festgelegter AOI (Area of Interest) für die optischen Aufzeichnungen	20
Abb. 12: Auswertung der DC-Potenzialableitung (nach Hepp und Müller 2008, S.906).....	23
Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des DC-Potenzials während einer HSD in Standard-ACSF-Lösung	27
Abb. 14: Oberflächendiagramme des Reflexionsverhaltens von neuronalem Gewebe während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung	30

Abb. 15: Reflexionsquotienten R/R_0 zu den vier definierten Messzeitpunkten während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung (Mittelwerte \pm Standardabweichung) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)	33
Abb. 16: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion während einer HSD in kalziumfreier ACSF-Lösung. Eine ausgeprägte Steigerung der Gewebereflexion um den Zeitpunkt der HSD sowie eine sekundäre Reflexionszunahme nach Reoxygenierung unterscheiden diese Versuchsreihe etwas von den korrespondierenden Kontrollmessungen. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung) (* $p < 0,05$).	35
Abb. 17: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion am Hippokampusgewebe während einer HSD in chloridarmer ACSF-Lösung. Das Ausbleiben der Reflexionssteigerung im Zuge der HSD ist das führende Charakteristikum. Das Reflexionsprofil erscheint verglichen mit den Kontrollmessungen spiegelbildlich. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)	38
Abb. 18: (A) Oberflächendiagramm der Gewebereflexion während einer HSD in hypotoner Lösung. Es kommt zu einem ausgeprägten Anstieg der Reflexion während der HSD. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Zeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Auffällig ist der massive Reflexionsanstieg im Wellenlängenbereich $\lambda > 340\text{nm}$ mit einem Einbruch bei $\lambda = 440\text{nm}$. Schon 30s vor der HSD ist die Reflexion bei $\lambda > 380\text{nm}$ signifikant höher als bei den Kontrollen. Die Rückbildung der Reflexionszunahme ist zum Zeitpunkt 4 unvollständig. Dennoch gibt es nach Reoxygenierung keine signifikanten Unterschiede im Reflexionsverhalten verglichen mit den Kontrollmessungen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	40
Abb. 19: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion während einer HSD in hypertoner Lösung. Es ist nur ein schwacher Anstieg in der Gewebereflexion bei der HSD zu erkennen, welcher sich kaum von den ermittelten Reflexionsquotienten im restlichen Aufzeichnungszeitraum abhebt. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Obwohl nur geringe Intensitätsschwankungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten zu erkennen sind, bleibt das Grundmuster in der Reflexion mit größeren Reflexionsquotienten bei $\lambda = 400\text{nm}$ und kleinen Reflexionsquotienten im Bereich $\lambda = 440\text{nm}$ wie bei den ersten HSDs in Standard-ACSF erhalten (* $p < 0,05$).	42
Abb. 20: (A) Oberflächendiagramm der Gewebereflexion während einer HSD in FAC-haltiger ACSF-Lösung. Es kommt zu einer deutlichen Zunahme der Reflexion während der HSD bei den Wellenlängen $\lambda > 380\text{nm}$. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Intensitätssteigerung der Lichtreflexion zum Zeitpunkt IOS_{max} ist bei $\lambda > 400\text{nm}$ signifikant größer als unter Standard-Bedingungen. Auch nach Reoxygenierung bleiben die Reflexionsquotienten sichtbar über dem Referenzwert $R/R_0 = 1$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	44

Abb. 21: (A) Oberflächendiagramm der Gewebereflexion während einer HSD unter Einfluss von FCCP (5mM). Die Reflexion nimmt weniger zu als bei den Kontrollen. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die initiale Reflexionsminderung vor der HSD ist hier nur leicht angedeutet. Während der HSD steigert sich die Lichtreflexion im Bereich $\lambda > 500\text{nm}$ weniger als in Standard-ACSF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	46
Abb. 22: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion während der zweiten HSD in $10\mu\text{M}$ Cyanidlösung. Die Reflexion nimmt weniger zu als bei den Kontrollen. Der initiale Reflexionsverlust bleibt wie bei den Kontrollen erhalten. Im Zuge der HSD steigt die Reflexion generell an, um nach Reoxygenierung wieder abzufallen. Im Anschluss werden die Reflexionsquotienten wieder größer und erreichen ein Plateau. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Reflexionssteigerung bei $\lambda < 400\text{nm}$ während der HSD ist auffällig (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	48
Abb. 23: (A) Gewebereflexion während einer HSD ausgelöst durch 1mM Cyanidlösung. Es kommt v. a. in den Wellenlängen $\lambda = 360\text{--}460\text{nm}$ zu einer Reflexionszunahme, welche sich im Zeitverlauf nur sehr langsam zurückbildet. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Reflexion ändert sich nach der HSD nur sehr langsam (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	51
Abb. 24: Mittlere Reflexionsquotienten für die definierten Messzeitpunkte: (A) Messzeitpunkt 1, (B) Messzeitpunkt 2, (C) Messzeitpunkt 3, (D) Messzeitpunkt 4.	54
Abb. 25: Vergleich der charakteristischen DC-Potenzial-Parameter Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$ mit den aufgeführten Literaturquellen	57
Abb. 26: Quotienten der Parameter Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$ in den verschiedenen Lösungen in Bezug auf die korrespondierenden Kontrollmessungen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)	58
Abb. 27: Komplexe I-IV der mitochondrialen Atmungskette; I NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, II Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, III Ubihydrochinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase, IV Cytochrom c-Oxidase (nach Karlson et al. 2005, S. 191).....	60
Abb. 28: Absorptionsspektrum aus den Differenzen von Messungen unter Normoxie und Hypoxie an hippokampalen Hirnschnitten. Die Absorptionsspitzen werden Strukturen der mitochondrialen Atmungskette, nämlich verschiedenen Cytochromen, zugeschrieben (nach Sick und Perez-Pinzon 1999, S. 106).	62
Abb. 29: Entwicklung der IOS im Zeitverlauf während repetitiver HSDs (nach Müller und Somjen 1999, S. 1822).....	63
Abb. 30: Zeitliche Entwicklung der IOS-Intensität während einer HSD. Die vermutlich für die Entstehung der IOS verantwortlichen Strukturen sind zeitlich in das Reflexionsprofil eingeordnet.....	84

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen18

Tab. 2: Zusammenfassung über die charakteristischen DC-Potenzialparameter
Zeitspanne Δt , Amplitude ΔV und Halbwertsbreite $\Delta t_{1/2}$ für die durchgeführten
Versuchsreihen28

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
ACSF	-	artificial cerebrospinal fluid
AOI	-	Area of Interest
ATP	-	Adenosintriphosphat
bzw.	-	beziehungsweise
ca.	-	circa
d. h.	-	das heißt
et al.	-	et alii
FAC	-	Fluoracetat
FCCP	-	Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon
ggf.	-	gegebenenfalls
HSD	-	hypoxieinduzierte Spreading Depression
IOS	-	intrinsische optische Signale
Kap.	-	Kapitel
min.	-	Minuten
o. g.	-	oben genannt
S.	-	Seite
SD	-	Spreading Depression
Tab.	-	Tabelle
u.	-	und
u. a.	-	unter anderem
v. a.	-	vor allem
z. B.	-	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Spreading Depression

1.1.1 Grundlegende Bemerkungen

Unter dem von Aristides Leão im Jahr 1944 erstmals beschriebenen elektrophysiologischen Ereignis einer Spreading Depression (SD) versteht man die nahezu vollständige und schnelle Depolarisation von Neuronen und Gliazellen im Hirngewebe einhergehend mit einem Verlust der neuronalen Aktivität (Müller und Somjen 2000a, Somjen 2001). Man unterscheidet die klassische normoxische SD, welche durch erhöhte Kaliumkonzentration, Glutamat, mechanische Reizung, Hypotonie, alkalische pH-Werte und Hyperthermie ausgelöst werden kann, von der hypoxieinduzierten SD (Somjen 2001). Letztere wird durch Sauerstoffentzug oder durch Cyanid in Form einer chemischen Anoxie erzeugt (Somjen 2001, Gerich et al. 2006). Dabei kommt es zu einer massiven Umverteilung der Ionen zwischen Zytosol und Interstitium. Andere in der Literatur synonym verwendete Begriffe sind „terminale Depolarisation“, „anoxische Depolarisation“ und „schnelle Depolarisation“ (Somjen 2001, S. 1066).

In der extrazellulären Ableitung des DC (direct current)–Potenzials können während einer SD Spannungsveränderungen in der Größenordnung von -15 bis -30mV registriert werden, die die massive Depolarisation von Neuronen und Gliazellen widerspiegeln. In Neuronen tritt nach der anfänglichen Depolarisation kurzzeitig eine Repolarisation ein, welcher eine massive terminale Depolarisation folgt (Somjen 2001). Neurone und Gliazellen sind in unterschiedlicher Weise an diesen Vorgängen beteiligt (Müller und Somjen 2000a).

Für die Wertung einer Messung als authentische SD gilt eine rasche DC-Potenzialnegativierung von mehr als -10mV als Bedingung, sofern die Messung in

Standard-ACSF-Lösung (ACSF-artificial cerebrospinal fluid) erfolgt (Müller und Somjen 2000a).

Bisher wurde von der Spreading Depression (SD) gesprochen und nähere Bezeichnungen wie „hypoxisch“ oder „normoxisch“ wurden hinzugefügt, um dieser Unterscheidung durch manche Autoren gerecht zu werden. In der weiteren Arbeit verwende ich für die SD überwiegend das Kürzel „HSD“ (hypoxieinduzierte Spreading Depression), weil durch die angewendeten Methoden entweder eine Hypoxie durch Sauerstoffentzug oder eine chemisch induzierte Anoxie, z. B. mit Cyanid, durch Blockierung mitochondrialer Strukturen zum Eintritt der Spreading Depression führt.

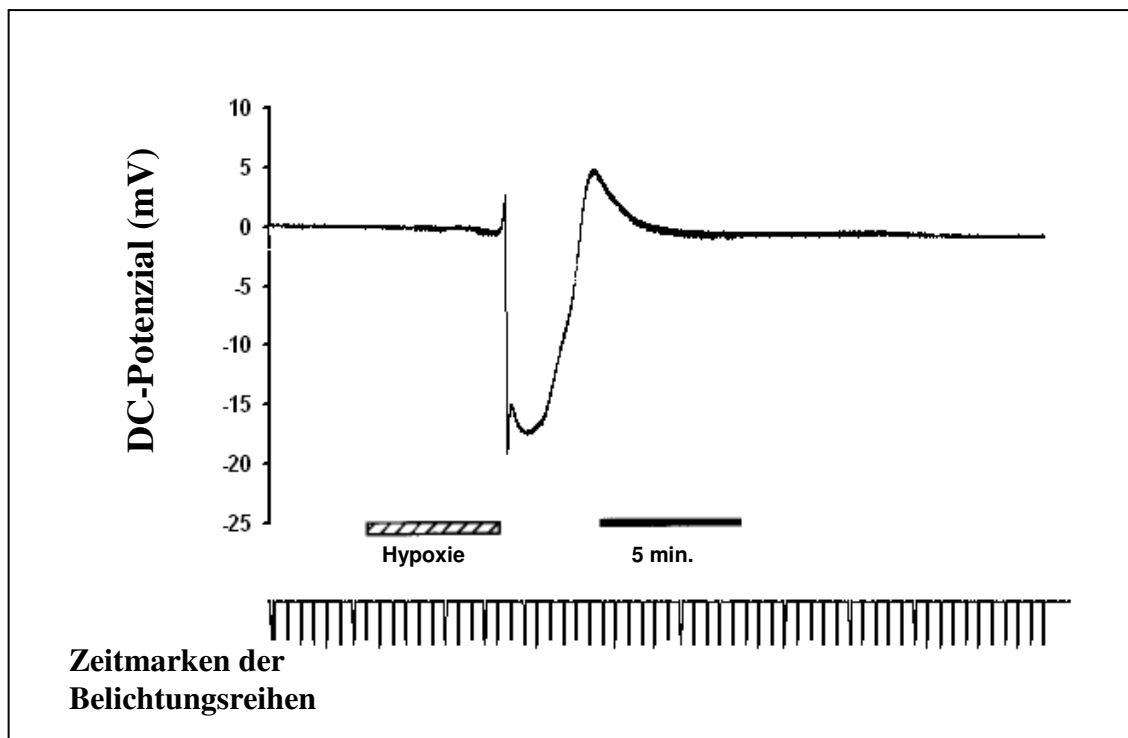


Abb. 1: DC-Potenzialänderung während einer HSD in Standard-ACSF. Ergänzend ist die Anzahl der Belichtungsreihen für die Registrierung der Lichtreflexion im Gewebe dargestellt.

1.1.2 Ionenumverteilung bei einer HSD und die Rolle der Mitochondrien

Zunächst möchte ich auf die einer HSD zugrunde liegenden ionalen Veränderungen an den Neuronen eingehen. Sauerstoffentzug führt wie auch eine Minderdurchblutung zu

einem Rückgang der ATP-Synthese (Adenosintriphosphat-Synthese). Somit kann die Na^+/K^+ -ATPase ihrer stabilisierenden Funktion auf das Membranpotenzial nicht mehr im ausreichenden Maße nachkommen. Die Neurone öffnen zum Eigenschutz K^+ -Kanäle, bevor ATP depletiert ist (Müller 2005). Das führt zu einem Kaliumausstrom ins Interstitium über K_{ATP} - und / oder K_{ca} -Kanäle (Müller und Somjen 2000b). Die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle kann dabei unabhängig vom Vorhandensein von ATP erfolgen (Müller 2005). Es kommt zu einer allmählichen extrazellulären Akkumulation von Kaliumionen auf eine Konzentration von etwa 15mM vor der HSD und über 50mM am Gipfel der HSD, was mehr als dem Vierzehnfachen der normalen Kaliumkonzentration von 3,5mM im Ruhezustand entspricht (Müller und Somjen 2000a, Müller 2005). Diese bedingt eine höhere Erregbarkeit der Neurone und führt zu deren Depolarisation (Müller und Somjen 2000b).

Der Kaliumverlust aus den Neuronen setzt einen selbst regenerativen Prozess in Gang. Die Kaliumionen im Interstitium führen zur weiteren neuronalen und glialen Depolarisation, welche wiederum einen Kaliumausstrom zur Folge hat. Zudem kommt es zu einem Na^+ -Einstrom in die Neurone. Letztlich geht dadurch die neuronale Erregbarkeit komplett verloren (Somjen 2001). Der Kaliumausstrom beginnt bereits vor Eintritt der HSD. Die Natriumkonzentrationen im Zellinneren und im Interstitium bleiben zu diesem Zeitpunkt noch unverändert. Während der HSD fällt die interstitielle Natriumkonzentration von einem Ausgangswert, der etwa 155mM beträgt, auf durchschnittlich ca. 65mM ab und nähert sich im zeitlichen Verlauf nach ein bis zwei Minuten mittleren Werten von ungefähr 90mM an. Dieser Natriumeinstrom ist ebenso wie eine initial ausreichend hohe Konzentration von Natriumionen im interzellulären Raum nötig, um eine HSD auszulösen. Der Natriumeinstrom erfolgt u. a. über TTX-sensitive Na^+ -Kanäle und Glutamatrezeptoren (Müller und Somjen 2000a,b).

In den hippokampalen Pyramidenzellen der CA1-Region kommt es durch die Depolarisation auch zum Kalziumeinstrom in die Neurone, welcher eine irreversible Zellschädigung hervorrufen kann (Somjen 2001, Müller 2005). Das geschieht zum einen über die positive Rückkopplung auf die Depolarisation und zum anderen durch die Aktivierung proteolytischer Enzyme (Müller und Somjen 2000b, Müller 2005). Die

Entstehung und Ausbreitung einer HSD ist aber nicht an das Vorhandensein von Kalziumionen im Interstitium gebunden. Auch in kalziumfreier Lösung können HSDs erzeugt werden. Die extrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} -Ionen sinkt während der HSD von einem Ausgangswert von 1,2-1,5mM auf $<0,3\text{mM}$ ab. Die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wie z. B. den Mitochondrien, während einer HSD trägt ebenfalls zum Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} bei (Somjen 2001).

Des Weiteren steigt die extrazelluläre Konzentration der Magnesiumionen im Hippokampusgewebe während einer HSD an. Das ist durch das Ablösen von ATP-gebundenen Magnesiumionen und durch die Freisetzung von Mg^{2+} aus Zytoplasma, Mitochondrien und Zellkern ins Interstitium zu erklären. Chlorid- und Hydrogencarbonationen strömen in die Neurone ein und führen zu einer deutlichen Zellschwellung (Müller und Somjen 2000a). Der Neurotransmitter Glutamat wird von den Neuronen freigesetzt (Somjen 2001). Er ist dazu in der Lage, eine HSD zu induzieren, und scheint wesentlich zum Neuronenverlust beim Schlaganfall beizutragen (Glutamat Excitotoxizität). Die Aktivierung von Glutamatrezeptoren hat einen positiven Rückkopplungseffekt auf den K^+ -Ausstrom und den Na^+ -Einstrom zur Folge (Müller und Somjen 2000b).

Die beschriebene Ionenumverteilung ist nicht stöchiometrisch (Somjen 2001). Sie ist bei rechtzeitiger Reoxygenierung, d. h. Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung innerhalb von einigen Minuten, reversibel (Müller 2005). Nach Reoxygenierung kommt es auch zu einer Normalisierung der Summenaktionspotenziale, d. h. die Synapsen sind wieder funktionell. Dies geschieht in etwa drei bis fünf Minuten, wobei die interstitielle Na^+ -Konzentration ihren Ausgangswert erreicht und die K^+ -Konzentration zunächst 1,7mM darunter liegt (Ausgangswert $[\text{K}^+]=3,5\text{mM}$) (Müller und Somjen 2000a). Es ist möglich, am gleichen Hippokampusgewebe mehrere HSDs auszulösen (Müller und Somjen 1998).

Zellmorphologisch gesehen beginnen die elektrophysiologischen Veränderungen einer HSD im Dendritenbaum der Neurone und breiten sich von dort in Richtung Zellsoma

aus (Somjen 2001). Die Mitochondriendichte ist in den Dendriten und in deren Verzweigungen besonders hoch. Mitochondrien spielen wahrscheinlich bei der Reaktion auf die Hypoxie eine entscheidende Rolle (Müller und Somjen 2000a).

1.1.3 Rolle der Gliazellen

Auch Gliazellen beeinflussen die Entstehung und Ausbreitung einer Spreading Depression. Sie spielen aber keine aktive Rolle. Sie nehmen Kaliumionen aus dem Interstitium auf und mildern somit den massiven Konzentrationsanstieg dieses Kations ab. Das hat vermutlich einen protektiven Effekt auf die Neurone und verzögert das Auftreten der SD bzw. HSD. Dennoch ist die Pufferkapazität der Gliazellen auf ein gewisses Maß begrenzt. Die SD wird verzögert, aber nicht verhindert (Müller und Somjen 2000a).

Gliazellen nehmen außerdem Chloridionen auf, was ähnlich wie bei den Neuronen zur Zellschwellung führt. Auch Gliazellen depolarisieren deutlich, wenn die extrazelluläre Kaliumkonzentration ansteigt. Die Amplitude dieser glialen Depolarisation ist im Hippokampusgewebe kleiner als die der neuronalen Depolarisation. Das Ruhemembranpotenzial der Gliazellen ist negativer und stabiler als das der Neurone (Somjen 2001). Es liegt mit -85mV unter dem der Neurone ($-66,3$ bis $-62,6\text{mV}$) und es werden auch am Gipfel der hypoxischen Depolarisation Potenziale von $-25,0\text{mM}$ nicht überschritten (Müller und Somjen 2000a). Die Gruppe der Gliazellen reagiert während der HSD einheitlich mit einer Depolarisation, aber es depolarisieren nicht alle Neurone. Anzumerken ist, dass die Gliazellen eher eine passive Rolle während einer HSD spielen und ihre Depolarisation durch die strikte Kaliumabhängigkeit ihres Membranpotenzials bestimmt wird (Somjen 2001).

1.2 Intrinsische optische Signale

Das elektrophysiologische Ereignis einer HSD wird von gleichzeitig auftretenden intrinsischen optischen Signalen (IOS) begleitet (Müller und Somjen 1998, Müller und Somjen 1999). Diese Signale entsprechen dem vom Nervengewebe reflektierten Anteil

des eingestrahlichten Lichtes. Die IOS sind sowohl als verminderte Transmission als auch als gesteigerte Lichtreflexion des Gewebes messbar (Müller und Somjen 1999). Bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurde ausschließlich die Lichtreflexion des Gewebes gemessen, wobei sich für Reflexion und Transmission ein gegensätzliches Verhalten ergibt (Müller und Somjen 1999). Für die Messung von IOS sind somit eine zusätzliche Lichtquelle sowie die entsprechende Optik (Mikroskop und CCD-Kamera) zur Registrierung der Signale nötig. Während einer Spreading Depression werden „milchig weiße“ Gewebeaufhellungen beobachtet, die sich langsam über den Hirnschnitt ausbreiten und die von der SD bzw. HSD betroffenen Areale identifizieren (Somjen 2001, S. 1071). Für diese Beobachtungen sind keine Fluoreszenzfarbstoffe oder ähnliche Substanzen nötig. Daher rührt die Bezeichnung intrinsische optische Signale.

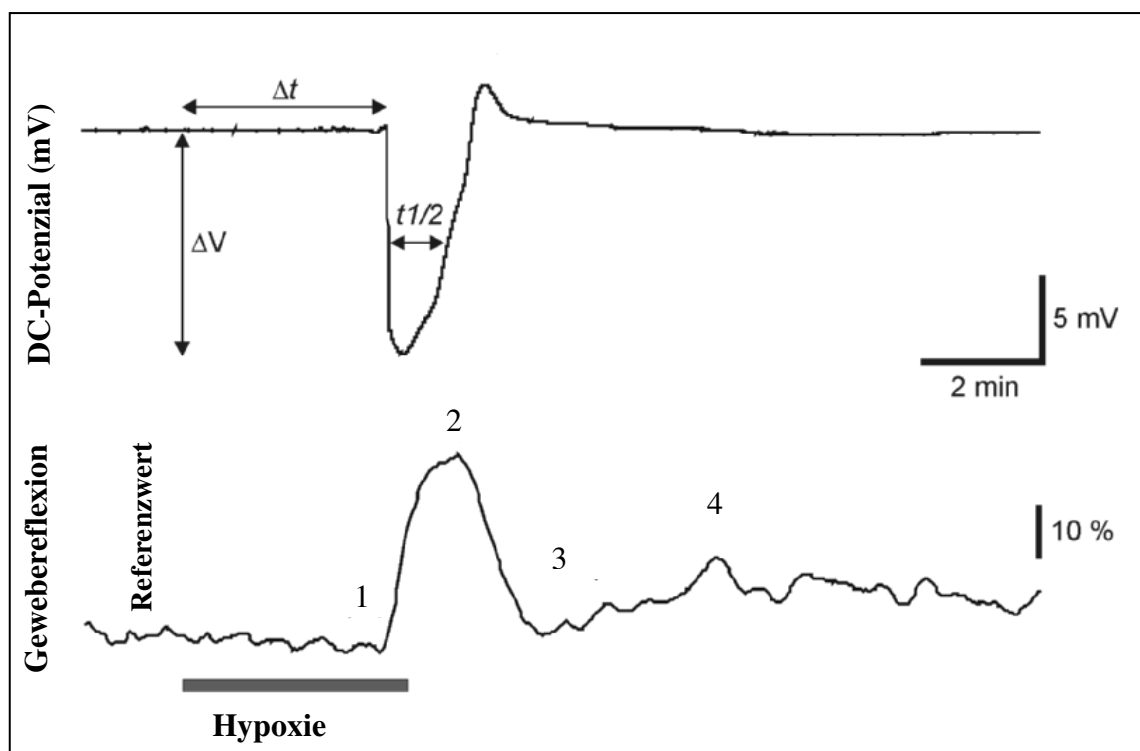


Abb. 2: Zeitliche Verzögerung zwischen SD-Beginn und Zunahme der IOS. Die im Text beschriebenen Phasen der IOS-Entwicklung sind im zeitlichen Zusammenhang mit den DC-Potenzialveränderungen dargestellt. Die Abweichung in der Lichtreflexion wird in % bezüglich des anfangs ermittelten Referenzwertes angegeben.

IOS eröffnen die Möglichkeit, eine HSD auf nicht invasivem Weg zuverlässig zu messen. Zudem kann man eindeutig die Gewebeareale bestimmen, die von der HSD erfasst werden. Die Ausbreitung einer HSD kann im räumlichen und zeitlichen Verlauf nichtinvasiv analysiert werden (Müller und Somjen 1998). Somit ist die detaillierte Beobachtung einer HSD in ihrer zeitlichen und räumlichen Entwicklung nicht von der Anzahl der verwendeten Elektroden abhängig (Somjen 2001).

Im Detail zeigen die IOS einen mehrphasigen Verlauf. Es ist zu beobachten, dass es kurz vor der HSD zunächst zu einem Rückgang der Reflexion kommt (Phase 1) (Abb. 2). Dieser Phase 1 schließt sich ein schlagartiger Anstieg der Reflexion während der HSD an (Phase 2) (Müller und Somjen 1998). Die Reflexionszunahme beginnt mit einer geringen zeitlichen Verzögerung von etwa 10 Sekunden nach dem DC-Potenzialsprung bei HSD-Beginn und erreicht das Maximum etwas nach dem DC-Peak (Müller und Somjen 1999). Nachdem die Sauerstoffzufuhr wieder hergestellt wurde, bildet sich der Reflexionsanstieg allmählich wieder zurück (Phase 3). Er liegt aber immer noch etwas über dem vor der HSD ermittelten Ausgangswert (Hepp und Müller 2008). Die Veränderungen der IOS bleiben somit viel länger erhalten als die registrierten DC-Potenzialveränderungen (Phase 4) (Müller und Somjen 1998). Die Erholung in der Phase 4 erfolgt langsamer als die Erholung des DC-Potenzials.

Nun stellt sich die Frage, wie die IOS mechanistisch entstehen. Diese Frage lässt sich bis jetzt nicht eindeutig beantworten. Veränderungen im Zytoskelett und in den Zellorganellen, wie z. B. den Mitochondrien, werden vermutet (Hepp und Müller 2008). Außerdem ist die Zunahme der IOS während einer HSD strikt vom Vorhandensein von Chloridionen abhängig. Die ursprüngliche Annahme, dass die Zellschwellung während einer HSD für die IOS verantwortlich ist, gilt mittlerweile als widerlegt (Müller und Somjen 1999). Wenn man sich nämlich eine Zelle als einfache Kugel vorstellt, deren Durchmesser zunimmt, dann würde diese das eingestrahlte Licht weniger reflektieren, weil ihre Oberfläche dann eine geringere Krümmung aufweist. Zudem wird bei der Zellschwellung der Zellinhalt verdünnt. Somit würden die Zellen ebenfalls lichtdurchlässiger und die Reflexion vermindert.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit soll es sein, die zur Beobachtung einer HSD genutzten IOS mechanistisch genauer zu verstehen. Ihre genaue Entstehung ist derzeit noch weitestgehend ungeklärt. Dennoch werden Registrierungen der IOS nahezu standardmäßig eingesetzt.

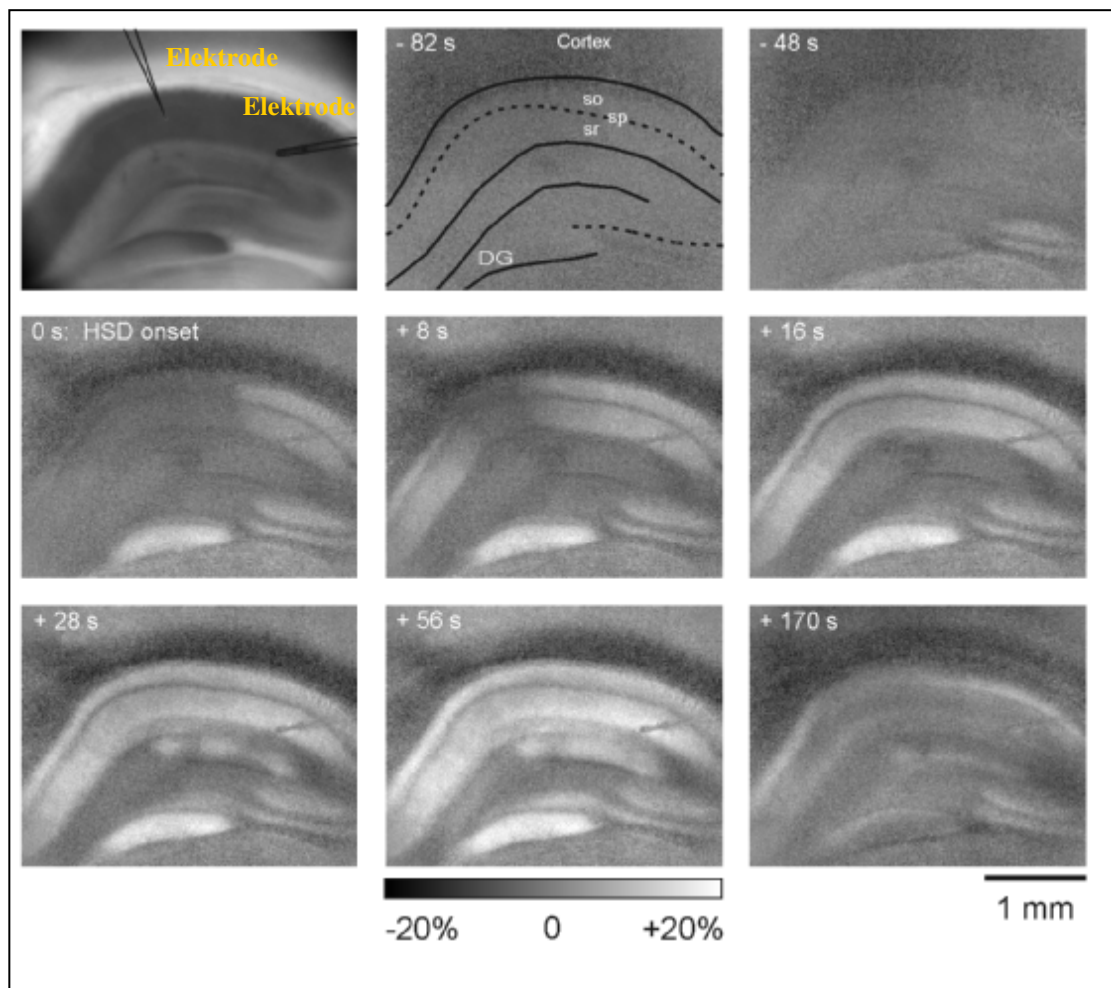


Abb. 3: Entstehung und Ausbreitung der IOS während einer HSD im Hippokampus (so *stratum oriens*, sp *stratum pyramidale*, sr *stratum radiatum*, DG *Gyrus dentatus*). Die Lichtreflexion wird in % des eingangs bestimmten Referenzwertes in Form verschiedener Graustufen dargestellt. Vor allem die CA1-Region zeigt eine Reflexionszunahme.

Ein genaueres Verständnis der IOS könnte so weitere wichtige Hinweise auf den Mechanismus und die Ausbreitung der HSD liefern. Dies wiederum ist von Interesse für

die Erforschung von Ereignissen wie cerebraler Ischämie, Schlaganfall, Migräne und Epilepsie (Somjen 2001). Die Reaktion von Nervengewebe auf Hypoxie könnte ebenfalls besser verstanden werden.

Bisher wurde das zu untersuchende Gewebe in der Regel mit weißem Licht bestrahlt und die IOS registriert. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals eine spektral definierte Beleuchtung über das gesamte sichtbare Spektrum und angrenzende Wellenlängenbereiche von $\lambda=320-680\text{nm}$ durchgeführt. Mit der Belichtung in definierten Wellenlängen soll untersucht werden, ob die IOS in einem oder in mehreren Wellenlängenbereichen besonders stark oder schwach ausgeprägt sind. So kann man möglicherweise durch die genaue Analyse die IOS bestimmten Molekülen, Zellorganellen oder zellulären Ereignissen zuordnen.

1.4 Pharmakologische Modulation der HSD und der IOS

Die Auswahl der verwendeten Chemikalien berücksichtigt die verschiedenen Stimuli, durch die eine HSD ausgelöst werden kann. Hier gibt es zum einen die Möglichkeit über eine Reduktion der Sauerstoffzufuhr eine HSD zu erzeugen. Eine HSD kann aber auch auf chemischem Weg hervorgerufen werden, indem die Mitochondrien als Energielieferanten der Zelle direkt in ihrer Funktion behindert werden, so dass sie O_2 nicht mehr verwenden können. Zudem tragen die Mitochondrien als Zellorganellen möglicherweise zur Entstehung der IOS bei (siehe Kapitel 1.2, Abschnitt 4).

Es sollen sowohl die HSDs als auch die IOS durch gezielte ionale Manipulation der Lösungszusammensetzung unter Verwendung von kalziumfreier und chloridarmer Lösung in ihrer Ausprägung moduliert werden. Auch Effekte, die sich aus unterschiedlichen Lösungsmolaritäten ergeben, sollen beobachtet werden. Vor allem ist der Aspekt der Zellschwellung zu nennen, der erwartungsgemäß zu verminderten IOS führen würde. Ebenso soll der Beitrag der Gliazellen zu den IOS durch deren chemische Vergiftung und somit funktionelle Ausschaltung betrachtet werden. Die Rolle der Mitochondrien bei der IOS-Entwicklung soll durch deren Blockade mit Cyanid und die Entkopplung der Atmungskette mit FCCP

(Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon) beleuchtet werden (Karlson et al. 2005).

1.4.1 Ionale Veränderungen der Lösungszusammensetzung

In der Einleitung ist u. a. die schädigende Wirkung von Ca^{2+} -Ionen auf die Nervenzellen beschrieben. Der massive Kalziumeinstrom bei der SD soll nun durch die Verwendung von kalziumfreier ACSF-Lösung unterbunden werden. Somit hat nur noch das Kalzium aus intrazellulären Speichern Einfluss auf den Verlauf einer SD und die etwaige Zellschädigung. Das Auftreten einer HSD kann aber durch den Kalziumentzug nicht verhindert werden (Müller und Somjen 2000b, Somjen 2001).

Während einer HSD kommt es zu einer Zunahme der IOS, welche den durch die Zellschwellung verursachten initialen Reflexionsrückgang wieder aufhebt. Die starke Zunahme der IOS ist strikt chloridabhängig (Müller und Somjen 1999). Durch die Verminderung der Chloridkonzentration in der ACSF-Lösung wird erwartet, dass die Zunahme der IOS ausbleibt und der parallel stattfindende Reflexionsrückgang durch Zellschwellung deutlich in Erscheinung tritt. Chloridionen sollen für das Anschwellen von Mitochondrien während einer HSD verantwortlich sein, was zu einer Reflexionsänderung des hippocampalen Gewebes führt (Müller und Somjen 1999). Mit der Verwendung von chloridarmer Lösung sollen die Aspekte Zellschwellung und Mitochondrienschwellung näher betrachtet werden.

1.4.2 Änderung der Lösungsmolarität

In hypertoner ACSF-Lösung kommt es zum Schrumpfen von Neuronen und Gliazellen. Das Volumen des interzellulären Raumes vergrößert sich, so dass die gleiche Stoffmenge an Ionen wie z. B. K^+ eine geringere Stoffmengenkonzentration hat. Das Interstitium hat daher eine größere Pufferkapazität für ionale Veränderungen. In hypertoner Lösung kann sogar das Auftreten von HSDs verhindert werden und die Regenerationsfähigkeit der Zellen nach stattgefundenener HSD ist verbessert (Müller und Somjen 2000b).

In hypotoner Lösung hingegen schwellen die darin befindlichen Zellen an. Das Interstitium und sein Puffervermögen für Ionenverschiebungen werden verkleinert. Zudem werden vermutlich durch die entstehenden Scherkräfte mechanisch sensitive Ionenkanäle aktiviert, die zum Na^+ -Einstrom und zum K^+ -Ausstrom beitragen. Allerdings sind diese bisher nur in Gliazellen und nicht in Neuronen nachgewiesen (Somjen 2001). Mit der Veränderung der Osmolarität in der Badlösung soll dieser Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der SDs sowie der daraus resultierende Effekt auf die IOS betrachtet werden.

1.4.3 Gliazellintoxikation

Auch der Beitrag der Gliazellen zu den IOS soll näher untersucht werden. Fluoracetat (FAC) ist ein Pharmakon, das in erster Linie zunächst auf Gliazellen wirkt (Müller und Somjen 2000a). Durch seine hemmende Wirkung auf den Zitronensäurezyklus (Blockade der Aconitase) werden die glialen Stoffwechselforgänge gehemmt. Neurone bleiben davon anfangs unberührt (Hepp und Müller 2008). Mit Hilfe von FAC sollen die Gliazellen in ihrer Funktion als K^+ - und Cl^- -Puffer ausgeschaltet und somit ihr Beitrag zu den IOS näher beleuchtet werden.

1.4.4 Mitochondriale Intoxikation

Der mitochondriale Entkoppler FCCP und Cyanidionen bewirken eine chemisch induzierte Anoxie, da sie das mitochondriale Membranpotenzial bzw. die physiologischen Abläufe in der mitochondrialen Atmungskette beeinträchtigen. Beide Substanzen führen zu einer HSD, obwohl die Zellen eine ausreichende Sauerstoffversorgung erhalten (Gerich et al. 2006). Der Protonengradient, der durch die Komplexe I–IV der Atmungskette zwischen der Matrix und dem Intermembranraum der Mitochondrien aufgebaut wurde, wird durch FCCP gestört. Die Protonen werden am Komplex V (ATP–Synthase) vorbeigeleitet. Demzufolge sinkt die ATP–Produktion der Zellen. FCCP führt zudem zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration

(Foster et al. 2006). In einigen Neuronen führt die Applikation von FCCP ähnlich wie die Anoxie zur Aktivierung von K^+ -Kanälen (Müller 2005).

Cyanidionen inhibieren den Komplex IV der Atmungskette. Es kommt zu einem Verlust von K^+ -Ionen aus den Mitochondrien und den Neuronen sowie zu einer erhöhten Kalziumkonzentration im Zytoplasma. Das beruht auf der Freisetzung von Kalziumionen aus den Mitochondrien selbst, einem verminderten Abtransport von Kalzium aus dem Zytoplasma und einer erhöhten Erregbarkeit der Zellen durch den Kalziumeinstrom (Foster et al. 2006).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Herzstück des Versuchsaufbaus war die Interface-Kammer (Oslo style) (Abb. 4). Sie wurde von der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie, Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Georg-August-Universität Göttingen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. M. Müller) selbst konstruiert. Sie war in zwei kleinere vollständig voneinander getrennte Kammern aufgeteilt. In der einen wurden die Messungen durchgeführt, die andere diente der Aufbewahrung zusätzlicher Hirnschnitte. Unter beiden Kammern befand sich eine Heizspirale, die über einen außerhalb gelegenen Regler gesteuert werden konnte und konstante Temperaturen gewährleistete. An den Seiten der Kammern strömte das jeweilige Gasgemisch durch kleine Bohrungen ein.

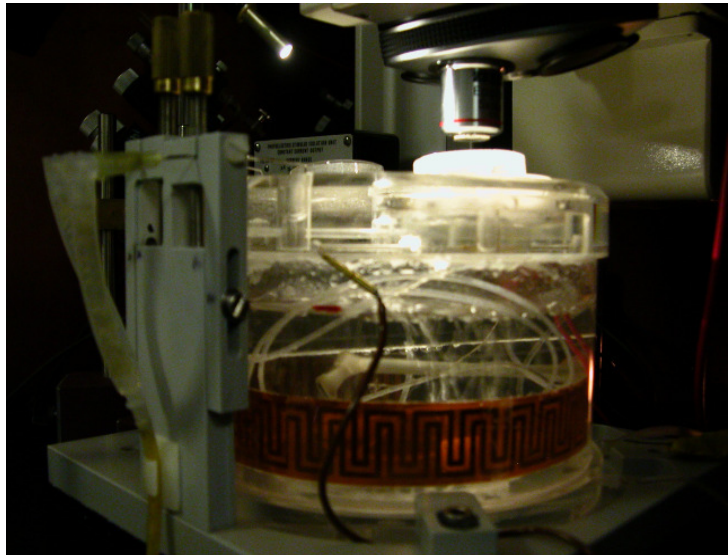


Abb. 4: Interface-Kammer (Oslo style)

In der Aufbewahrungskammer handelte es sich hierbei stets um Carbogen (95% O₂, 5% CO₂), in der Messkammer wurde das Gasgemisch während der Messungen variiert. Die Menge der Begasung betrug ca. 400ml pro Minute und wurde über einen Durchflussregler (HOSCO LPM AIR, MI 48150, USA), der zwischen Gasflasche und den Kammern eingebaut war, reguliert (Abb. 5). Die Hirnschnitte lagen in beiden Kammern auf einem Netz aus Nylon, welches von der Unterseite ständig mit frischer, vorgewärmter ACSF-Lösung umspült wurde. Der ACSF-Fluss betrug je Kammer 3–4 ml pro Minute und wurde mit einer Mehrkanal-Rollenpumpe (Typ: 205 S, Watson Marlow GmbH, Rommerskirchen) eingestellt.

Den Kammern und der Pumpe war jeweils ein Windkessel zwischengeschaltet, der zu starke Schwankungen des Flüssigkeitspegels in den Kammern und einen ruckartigen Flüssigkeitseinstrom sowie Druckschwankungen vor allem während der Messungen verhindern sollte (Abb. 6). Die Windkessel wurden von der institutseigenen Werkstatt der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Göttingen angefertigt. Der Abfluss des verbrauchten ACSF erfolgte über eine Unterdruckpumpe (WiSA Modell 300), die die Lösung in eine große Glasflasche absaugte. Der Flüssigkeitspegel in den Kammern konnte über zwei Kanülen an den Abflussöffnungen der Kammern exakt eingestellt werden. Diese waren über ein Schlauchsystem mit der o. g. Glasflasche verbunden. Die ACSF-Lösungen wurden mit Hilfe eines Wasserbades (HAAKE DC 10-V26, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) vorgewärmt und schon dort mit Carbogen begast (Abb. 7). Das diente der pH-Werteinstellung der Lösung auf einen Wert von pH=7,4.



Abb. 5: Durchflussregler



Abb. 6: Windkessel



Abb. 7: Wasserbad (rechts) und Mehrkanal-Rollenpumpe (links)

Die Sauerstoffversorgung der Hirnschnitte wurde vor allem durch die Gasphase in der Interface-Kammer gewährleistet. Der im ACSF gelöste Sauerstoff spielte hier nur eine untergeordnete Rolle.

Über der Messkammer befand sich ein Mikroskop (AxioTech mit 5 x Objektiv, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen) mit integrierter Kamera (IMAGO-QE, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing). Die Kamera zeichnete während der Messung zusammen mit der Steuerungssoftware Veränderungen der Intensität des vom Gewebe reflektierten Lichtes in einer festgelegten Area of Interest (AOI) auf. Zum Versuchsaufbau gehörten des Weiteren eine Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Schott AG, Mainz) und eine weitere Lichtquelle zum Generieren von Licht in verschiedenen Spektralbereichen (Polychrome V, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing). Für die elektrischen Ableitungen des DC-Potenzials wurden eine Glas-Mikro-Elektrode mit Messkopf und ein Verstärker genutzt. Die Aufzeichnung der DC-Potenziale erfolgte über einen AD-Wandler (Digidata 1322A) mit Hilfe der PClamp 9.2-Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Sowohl die Lichtquelle für die verschiedenen Spektralbereiche (Polychrome V, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing), als auch die Kamera und die Geräte zur Messung des elektrischen Signals waren mit einem Computer verbunden. Dies diente zum einen der Aufzeichnung der gewonnenen Daten, zum anderen der Einstellung der Belichtung (Wellenlänge, Belichtungszeit, Dauer der Messung, Anzahl der erzeugten Belichtungsreihen).

2.2 Präparation der Ratte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Untersuchungen an isoliertem Hirngewebe durchgeführt. Dieses wurde aus männlichen Sprague-Dawley-Ratten im Alter von fünf bis zehn Wochen (Körpergewicht: 180–300g, n=77) gewonnen. Die Tiere wurden nach einer tiefen Ether-Betäubung dekapitiert (Diethylether, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München). Haut und Fell am Kopf wurden mit einer Schere entfernt. Ebenso wurden Reste des Halses abgeschnitten. Anschließend wurden ausgehend vom *Foramen magnum* am *Os occipitale* drei Entlastungsschnitte gesetzt, damit man diesen Teil des knöchernen Schädels im nächsten Arbeitsschritt mit

einem Rangeur gut abnehmen konnte. Mit einer kleinen Schere habe ich nun der *Sutura sagittalis* entlang geschnitten und beide *Ossa temporalia* sowie Teile der *Ossa frontalia* ebenfalls mit dem Rangeur abgehoben. Als das Gehirn weitestgehend offen lag, wurde es mit gekühlter Standard-ACSF-Lösung übergossen. So konnte das Hirngewebe bereits gekühlt und Blut abgespült werden. Dann hob ich das Gehirn mit einem Spatel aus den Schädelgruben und kühlte es für einige Minuten mit auf Eis stehender und mit Carbogen begaster Standard-ACSF-Lösung herunter.

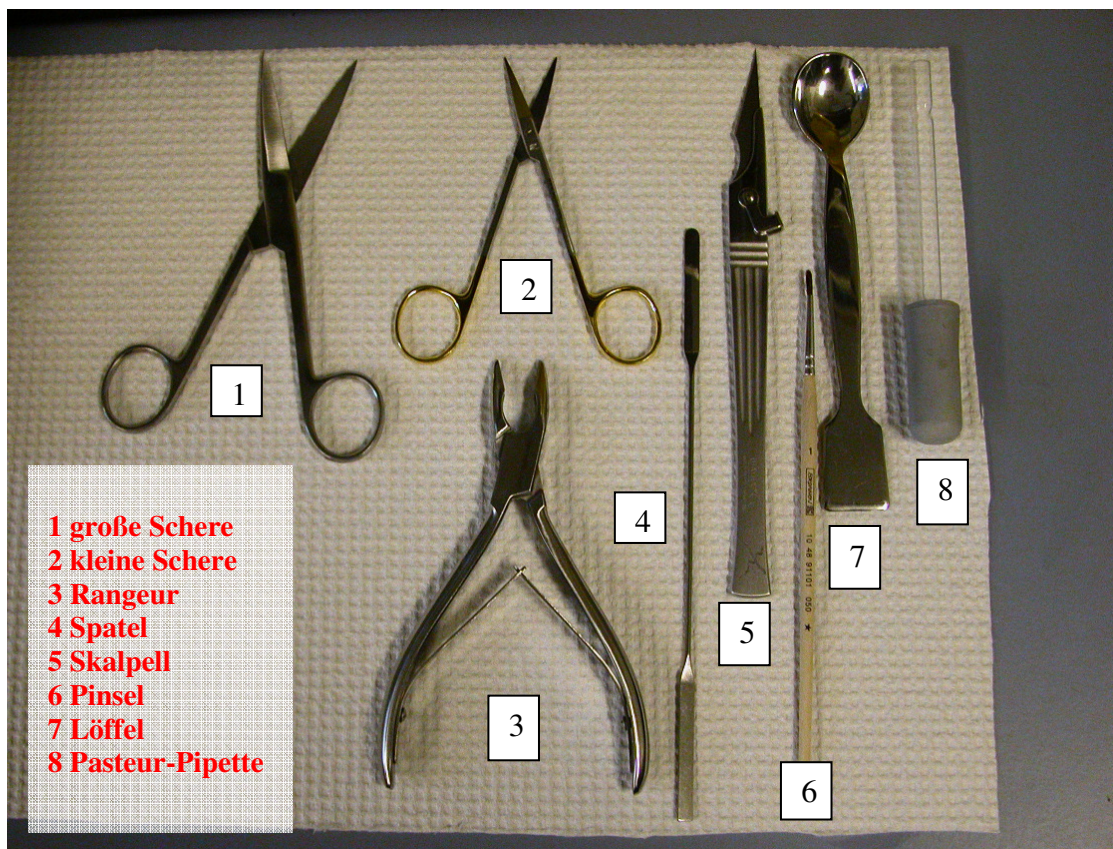


Abb. 8: Präparationsbesteck

2.3 Herstellen der Hirnschnitte

Es wurden akute Hirngewebschnitte mittels Vibroslicer hergestellt. Dazu wurden bei dem in ACSF gekühlten Gehirn die Hemisphären voneinander getrennt (Abb. 9). Von der Hemisphäre habe ich dann Kleinhirn, Hirnstamm und das vordere Drittel des Großhirns entfernt. Das verbliebene Gewebe klebte ich mit Sekundenkleber auf einen

Kunststoffblock, wobei die kaudale Seite als Klebefläche diente. Der Kunststoffblock wurde in ein Plastikgefäß eingespannt und mit gekühltem Standard-ACSF übergossen, so dass das Gewebe vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war.

Anschließend konnten mit einem Vibroslicer (NVSLM 1, Motorized Advance Vibroslice, Campden Instruments, Loughborough, UK) vier bis sechs 400µm starke Schnitte vom Hippokampus gewonnen werden (Abb. 10). Dabei wurde in der Regel nur eine Hemisphäre geschnitten, da sie bereits ausreichend Material für die Messungen eines Tages lieferte.

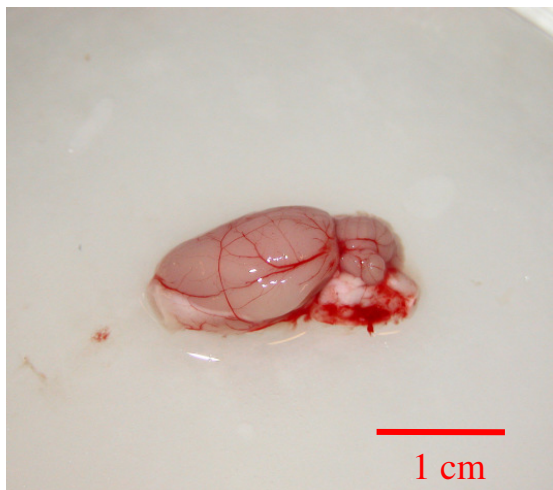


Abb. 9: Hemisphäre des Gehirns einer adulten Ratte

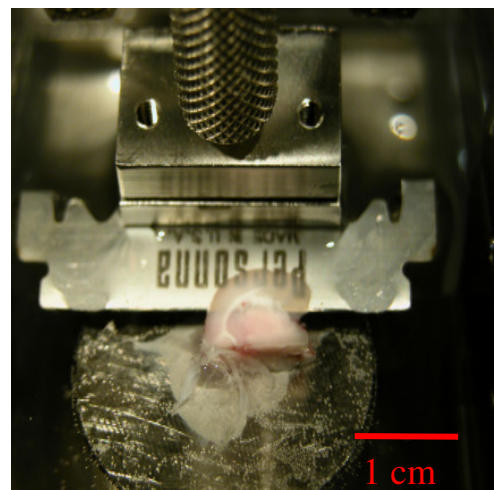


Abb. 10: Vibroslicer beim Herstellen der Hirnschnitte

2.4 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Für die Messungen habe ich die in der Tabelle 1 aufgeführten Lösungen in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Standard- ACSF	Nominell Kalziumfreier ACSF	Chloridarmer ACSF	Hypotoner ACSF (-30mM NaCl)
130mM NaCl	130mM NaCl	130mM Natrium- methylsulfat	100mM NaCl
3,5mM KCl	3,5mM KCl	3,5mM KCl	3,5mM KCl
1,25mM NaH ₂ PO ₄	1,25mM NaH ₂ PO ₄	1,25mM NaH ₂ PO ₄	1,25mM NaH ₂ PO ₄
24mM NaHCO ₃	24mM NaHCO ₃	24mM NaHCO ₃	24mM NaHCO ₃
1,2mM MgSO ₄	1,2mM MgSO ₄	1,2mM MgSO ₄	1,2mM MgSO ₄
10mM Dextrose	10mM Dextrose	10mM Dextrose	10mM Dextrose
1,2mM CaCl ₂	-----	1,2mM CaCl ₂	1,2mM CaCl ₂

Bei den nun folgenden Lösungen wurden die verwendeten Pharmaka zusätzlich in Standard-ACSF gelöst, so dass man 10µM FCCP-, 5mM FAC- und 1mM oder 10µM Natriumcyanidlösung erhielt. Für die hypertone ACSF-Lösung wurde der Standard-Lösung 60mM Mannitol zugegeben. Die Lösungen wurden aus demineralisiertem Wasser und den angegebenen Chemikalien zubereitet, welche von den nun aufgeführten Herstellern bezogen wurden:

1. Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
2. Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt
3. Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
4. Natriumbicarbonat, Sigma-Aldrich, Steinheim
5. D (+)-Glucose (wasserfrei) Merck, Darmstadt
6. Calciumchlorid, Sigma-Aldrich, Seelze
7. Magnesiumsulfat, Merck, Darmstadt
8. Natriummethylsulfat, TCI Europe nv, Zwijndrecht (Belgien)

9. Natriumcyanid, Sigma–Aldrich, Steinheim
10. D–Mannitol, Sigma–Aldrich, Steinheim
11. Natriumfluoracetat, Sigma–Aldrich, Steinheim
12. FCCP (Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon), TOCRIS bioscience, Bristol (UK).

2.5 Verwendete Gasgemische

Um in der Messkammer eine sauerstoffhaltige Atmosphäre zu schaffen, wurde Carbogen genutzt (5% CO₂ in O₂, AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf). Für die Simulation des Sauerstoffentzuges kam ein Gasgemisch von 5% CO₂ in N₂ zum Einsatz (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Krefeld).

2.6 Vorgehensweise bei den Messungen

2.6.1 Vorbereitung der Messungen

Die Hirnschnitte legte ich mit Hilfe eines Pinsels auf Filterpapierstückchen, die sich auf den Netzen in Aufbewahrungs- und Messkammer befanden. Dabei kamen vier Hirnschnitte in die Aufbewahrungskammer und ein bis zwei Hirnschnitte in die Messkammer. Danach mussten die Hirnschnitte etwa 90 Minuten ruhen, um sich vom Präparationstrauma zu erholen und um sich an das Mikroklima in den Kammern zu gewöhnen (Temperatur, Begasung, ACSF–Fluss). Für beide Kammern wurde dann eine Temperatur zwischen 35,3°C und 35,6°C eingestellt, die auch während des Versuchstages durch häufige Kontrollen in diesem Bereich gehalten wurde.

Als nächstes habe ich eine mit Standard–ACSF gefüllte Elektrode (Borsilikat Glaskapillaren GC150F-10, Harvard Apparatus LTD, Edenbridge Kent, UK) zum Ableiten des elektrischen Signals im *Stratum radiatum* (CA1) des Hippokampus positioniert und mit Hilfe der Kamera (5 x Objektiv) und des EDV–Programms TillVision® (TILLvisION real time software, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) eine Übersichtsaufnahme angefertigt.

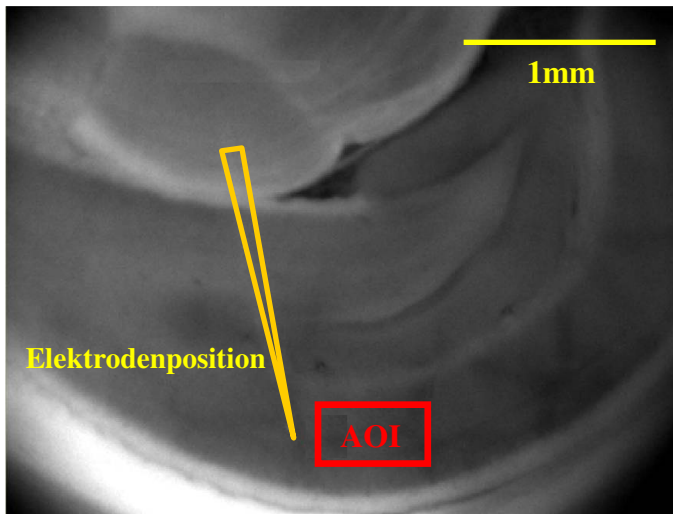


Abb. 11: Hirnschnitt mit plazierter Elektrode und festgelegter AOI (Area of Interest) für die optischen Aufzeichnungen

In unmittelbarer Nähe der Einstichstelle der Elektrode wurde eine Area of Interest (AOI) bestimmt, in der die Intensität des vom Hirnschnitt reflektierten Lichtes während der optischen Aufzeichnungen gemessen werden sollte. Anschließend bereitete ich am Rechner die Aufzeichnung der elektrischen und optischen Messungen vor. Mit dem EDV-Programm PClamp 9.2® konnte das elektrische Signal der Elektrode sowohl aufgezeichnet als auch während des Versuches ständig beobachtet werden. Für die Generierung der Belichtungsreihen, mit denen die Gewebeschnitte alle 15 Sekunden über 15 Minuten im Wellenlängenbereich von 320nm bis 680nm in einem Winkel von $\alpha=45^\circ$ bestrahlt wurden, konnte über das Steuerprogramm des Imaging-Systems TillVision® die Belichtungszeit von 20ms sowie die Anzahl der Spektren (Belichtungsreihen) eingestellt werden. Die erzeugten Lichtsignale hatten ein Inkrement von 20nm, so dass sich die Schritte 320nm, 340nm, ..., 680nm ergaben. 60 derartige Spektren und eine eingangs generierte Belichtungsreihe, die mit einer Leerwertmessung vergleichbar ist, wurden erzeugt. Lichtquelle, Kamera, Mikroskop und das Steuerprogramm sind als eine funktionelle Einheit zu betrachten. Die Aufzeichnungen der optischen und elektrischen Ableitungen wurden zu Versuchsbeginn gleichzeitig gestartet.

2.6.2 Durchführung der Messungen

Bei den durchgeführten Messreihen liegt mit Ausnahme der Messung in FAC-Lösung das Prinzip zu Grunde, dass immer erst eine erfolgreiche Test-HSD in Standard-ACSF-Lösung ausgelöst wurde, bevor nachfolgend die Effekte der jeweiligen experimentellen Behandlung untersucht wurden. Bei der Test-HSD wurde das Carbogen in der Messkammer nach einer Vorlaufzeit von zwei Minuten durch das stickstoffreiche Gasgemisch ersetzt und somit für die Hirnschnitte schwere Hypoxie simuliert. Der Zeitpunkt der Stickstoffgabe ist in der elektrischen Aufzeichnung für die spätere Auswertung mit einem so genannten „Time-Tag“ gekennzeichnet (Programm PClamp 9.2®).

Wenn durch den Sauerstoffentzug eine HSD eingetreten war, reoxygenierte ich die Messkammer 30 Sekunden nach dem Gipfel der HSD durch die Begasungsumstellung auf Carbogen, um eine vollständige Erholung der Hirnschnitte zu gewährleisten. Die gewählte Zeitspanne basiert auf Erfahrungen aus vorherigen Messungen (Hepp und Müller 2008). Auch hier wurde ein „Time-Tag“ gesetzt. Die elektrischen und optischen Signale wurden unabhängig vom Eintrittszeitpunkt der HSD für insgesamt 15 Minuten aufgezeichnet.

Zur Beurteilung und als Referenz für Drogeneffekte wurden auch unter Kontrollbedingungen mehrfach HSDs ausgelöst. Das Vorgehen entsprach dem der eben beschriebenen Test-HSD. Zudem wird hier die erste HSD der Test-HSD in den anderen Versuchsreihen gleichgesetzt. Zwischen erster und zweiter bzw. zwischen zweiter und dritter HSD wurde dem Gewebe in Anlehnung an die Messungen von Hepp und Müller jeweils 20 Minuten Zeit zur Erholung von dieser Stresssituation (Hypoxie) gegeben (Hepp und Müller 2008). Alternativ wurden nach der Kontroll-HSD Lösungen mit veränderter Zusammensetzung (kalziumfrei, chloridarm, hypoton, hypertone) eingewaschen.

Zur Vergiftung der Gliazellen wurden sowohl Mess- als auch Aufbewahrungskammer mit FAC-haltiger Lösung versorgt. Auf diese Weise erfolgte eine Vorinkubation des

Gewebes mit dem Gliazellgift über ca. drei Stunden. Diese Zeitspanne orientiert sich im mittleren Bereich der von Müller und Somjen angewendeten Inkubationszeiten zwischen 1,5–6 Stunden (Müller und Somjen 1999). Aufgrund dieses langen Zeitraumes verzichtete ich bei diesen Versuchen auf die Test-HSD in Standard-ACSF-Lösung. Pro Hirnschnitt habe ich durch das Einstellen hypoxischer Bedingungen zwei Minuten nach Versuchsbeginn je eine HSD ausgelöst. Nur diese HSD geht in die Auswertung ein.

Eine Blockade der Mitochondrienfunktion erfolgte durch FCCP bzw. Cyanidionen. Für die HSDs in 10 μ M FCCP-haltiger Lösung wurden die Hirnschnitte 15 Minuten in dieser inkubiert. Danach führte die zusätzliche Stickstoffgabe zur zweiten HSD. Bei der niedrig konzentrierten Cyanidlösung (10 μ M) begannen die Messungen nach einer Einwaschzeit von 20 Minuten. Um eine zweite HSD in dieser Lösung zu erzeugen, war die zusätzliche Gabe von Stickstoff zwei Minuten nach Versuchsbeginn notwendig.

Nach erfolgreicher Test-HSD in Standard-ACSF-Lösung konnte man eine zweite HSD direkt durch das Einwaschen der höher konzentrierten cyanidhaltigen Lösung (1mM) hervorrufen. Die Carbogenbegasung der Messkammer blieb bestehen. Der Zeitpunkt des Einwaschens entspricht hier dem Versuchsbeginn und dem Start der elektrischen und optischen Messungen. Für die Ableitung des elektrischen Signals der Messreihen wurde in der 1mM Cyanidlösung zusätzlich eine Agarbrücke an der Erdungselektrode der Messkammer angeschlossen, um eine zu starke Potenzialdrift in den elektrischen Aufzeichnungen zu vermeiden. Dabei befand sich ein chlorierter Silberdraht in 3%igem Agar und 3M KCl.

2.7 Vorgehensweise bei der Auswertung

2.7.1 Auswertung der elektrischen Messungen

Die Daten aus den elektrischen Ableitungen wertete ich mit den Programmen PClamp 9.2® und Microsoft-Excel® aus. Die gesetzten „Time-Tags“ ermöglichten es, dass die Zeitspanne Δt vom Beginn der Hypoxie bis zu Eintritt der HSD ausgemessen werden

konnte. Δt stellt ein Maß für die Empfindlichkeit des Gewebes dar. Je kleiner Δt ist, desto größer ist die Vulnerabilität des Nervengewebes unter Sauerstoffentzug bzw. unter den anderen chemischen Einflüssen und umso früher geht die neuronale Funktion verloren.

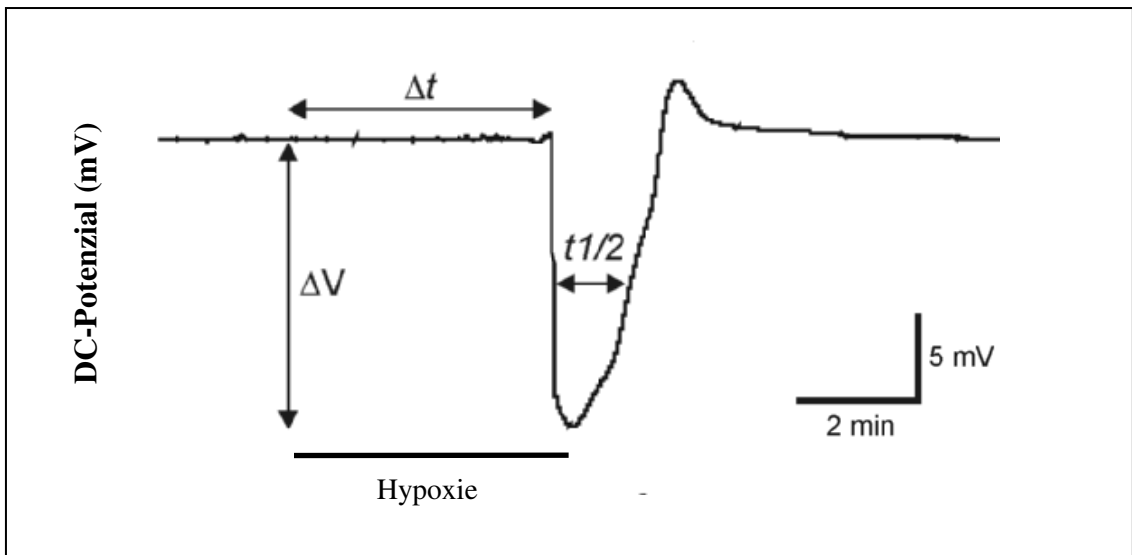


Abb. 12: Auswertung der DC-Potenzialableitung (nach Hepp und Müller 2008, S.906)

Als nächstes habe ich die Amplitude ΔV der HSD-assoziierten DC-Potenzialveränderung vermessen. Dazu wurde die DC-Potenzialdifferenz vom Zeitpunkt des Sauerstoffentzuges (prähypoxische Baseline) bis zum negativen Peak des DC-Potenzials bestimmt. Von diesem Parameter kann man Rückschlüsse auf den Grad der Synchronisation der beteiligten Neurone und Gliazellen ziehen. Je größer ΔV ist, desto mehr dieser Zellen depolarisieren gleichzeitig. Des Weiteren wurde die Halbwertsbreite $\Delta t_{1/2}$ der HSDs bestimmt. Für $\Delta t_{1/2}$ habe ich beim halbierten Wert von ΔV den Zeitabstand zwischen auf- und absteigendem Schenkel der DC-Potenzialänderung gemessen. $\Delta t_{1/2}$ macht eine Aussage für die Zeit, die das Gewebe zur Erholung von der induzierten Stresssituation (Hypoxie) benötigt (Abb. 12). Die weitere Bearbeitung der ausgemessenen Werte führte ich mit Microsoft-Excel® durch.

2.7.2 Auswertung der optischen Messungen

Mit Hilfe des Programms TILLVision® konnte ich nun für jede generierte Belichtungsreihe und jeden darin vorkommenden Wellenlängenbereich die Intensitäten der Reflexion innerhalb der definierten AOI einsehen. Diese Daten kopierte ich in das Programm Microsoft-Excel® und normierte sie auf die Intensitäten der eingangs ermittelten Leerwertmessungen. Das Ergebnis daraus wird in dieser Arbeit als Reflexionsquotient (R/R_0) bezeichnet und soll eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Messreihen untereinander ermöglichen, weil alle Werte auf den normoxischen Ausgangswert im jeweiligen Hirnschnitt normiert sind und somit individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Hirnschnitten nicht ins Gewicht fallen.

Da für die Spektren (Belichtungsreihen) eine feste Zeiteinstellung erfolgte, konnten jetzt die HSD-Ereignisse aus den elektrischen Ableitungen mit den optischen Signalen zu den entsprechenden Zeitpunkten in Beziehung gesetzt werden. Alle 15 Sekunden wurde ein Spektrum generiert. Die zu Beginn durchgeführte Referenzmessung geht hier mit zwei Spektren ein. Vor der Stickstoffgabe bzw. dem Einwaschen von 1mM Cyanidlösung wurde jeweils das Reflexionsverhalten des Hirnschnittes unter den Ausgangsbedingungen registriert.

Die Reflexionsquotienten wurden zu vier definierten Zeitpunkten bestimmt. Messzeitpunkt 1, 30 s vor der HSD, entspricht dabei nahezu dem Ausgangsniveau der Reflexion. Anschließend war eine leichte Abschwächung der Lichtreflexion zwischen diesem Messzeitpunkt und der elektrisch registrierten HSD zu beobachten. Die minimalen Reflexionsquotienten wurden hier abgelesen und gehen als Messzeitpunkt 2, IOS_{\min} , in die Auswertung ein. Mit geringer zeitlicher Verzögerung zur HSD zeichnete sich eine mitunter massive Steigerung der Reflexion ab. Die Reflexionsquotienten zu diesem dritten Messzeitpunkt, IOS_{\max} , wurden ebenfalls ermittelt. Nach Reoxygenierung nähern sich die Reflexionsquotienten dem Ausgangsniveau wieder an. Drei Minuten nach Reoxygenierung bzw. nach der HSD in 1mM Cyanidlösung, dem vierten Messzeitpunkt, wurden sie nochmals bestimmt.

Bei den Messungen in chloridarmer ACSF-Lösung ergeben sich aufgrund des abweichenden Reflexionsverhaltens im Oberflächendiagramm einige charakteristische Besonderheiten (siehe Kap. 3.2, Abb. 17A). Da es kurz nach der HSD nicht zu einer Zunahme der IOS kommt, sondern sich nur ein deutlicher Rückgang der optischen Signale abzeichnet, wird hier als Messzeitpunkt 3 das zweite Reflexionsminimum $IOS_{\min 2}$ angenommen. Ein Messzeitpunkt IOS_{\max} entfällt für diese Versuchsreihe. Der Zeitpunkt 2 wird in chloridarmer Lösung als $IOS_{\min 1}$ bezeichnet und ist analog zu den in den anderen Lösungen als IOS_{\min} angegebenen Werten.

Es wurden die Reflexionsquotienten zu den vier genannten Zeiten über den gesamten Wellenlängenbereich von 320–680nm bestimmt. Die statistische Auswertung dieser Daten habe ich mit Microsoft-Excel® durchgeführt. Dabei kam u. a. ein zweiseitiger gepaarter bzw. ungepaarter t-Test nach Student zur Anwendung.

3 Darstellung der eigenen Untersuchungen

3.1 Veränderungen im Reflexionsverhalten des Hippokampusgewebes während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung

Die IOS wurden grundsätzlich zusammen mit den DC-Potenzialen gemessen, um beide Parameter miteinander abgleichen zu können. So können Veränderungen des DC-Potenzials zu bestimmten Veränderungen der IOS in Beziehung gesetzt werden. Am Beispiel von Abb. 13 soll der charakteristische Verlauf des DC-Potenzials während einer HSD aufgezeigt werden. Wie bereits im Kapitel 1.1 „Spreading Depression“ beschrieben, ist eine leichte anfängliche Positivierung im DC-Potenzial gefolgt von einer raschen und deutlichen Negativierung zu erkennen. Im Anschluss kommt es zu einer langsameren Normalisierung des DC-Potenzials, welche zunächst den Ausgangswert überschießt, um sich dann allmählich diesem anzunähern. Für die Kontroll-HSDs (1. HSD) ergibt sich eine durchschnittliche Latenzzeit zwischen Stickstoffgabe und dem Beginn der HSD von $\Delta t=128s$. Es wird im Mittel eine Amplitude von $\Delta V=-14,8mV$ erreicht. Die Halbwertsbreite beträgt $\Delta t_{1/2}=65s$. Eine vollständige Datenübersicht über die DC-Potenzialparameter aller Versuchsreihen enthält die Tabelle 2. Die zweiten HSDs in Standard-Lösung treten nach einer Zeitspanne von $\Delta t=151s$ auf. Die DC-Potenzialveränderung beträgt durchschnittlich $-14,4mV$. $\Delta t_{1/2}$ misst 62s. Die dritte HSD am gleichen Nervengewebe kann nach einer mittleren Latenzzeit von 154s nach Stickstoffgabe beobachtet werden. Es ergeben sich für Amplitude und Halbwertsbreite Mittelwerte von $\Delta V=-12,0mV$ und $\Delta t_{1/2}=56s$.

Im gleichen Zeitfenster von 15 Minuten wurde das Reflexionsverhalten des Gewebes in der AOI aufgezeichnet. Um zu untersuchen, ob wiederholter hypoxischer Stress Einfluss auf die Reflexionseigenschaften des Hippokampusgewebes während der HSD hat, wurden am gleichen Hirnschnitt bis zu drei HSDs induziert. Das Gewebe hatte zwischen den einzelnen Messungen 20 Minuten Zeit, um sich von den durch die Hypoxie bedingten Veränderungen zu erholen. Exemplarisch sei dies in der Abb. 14 (S. 30) für drei nacheinander provozierte HSDs am selben Hirnschnitt dargestellt.

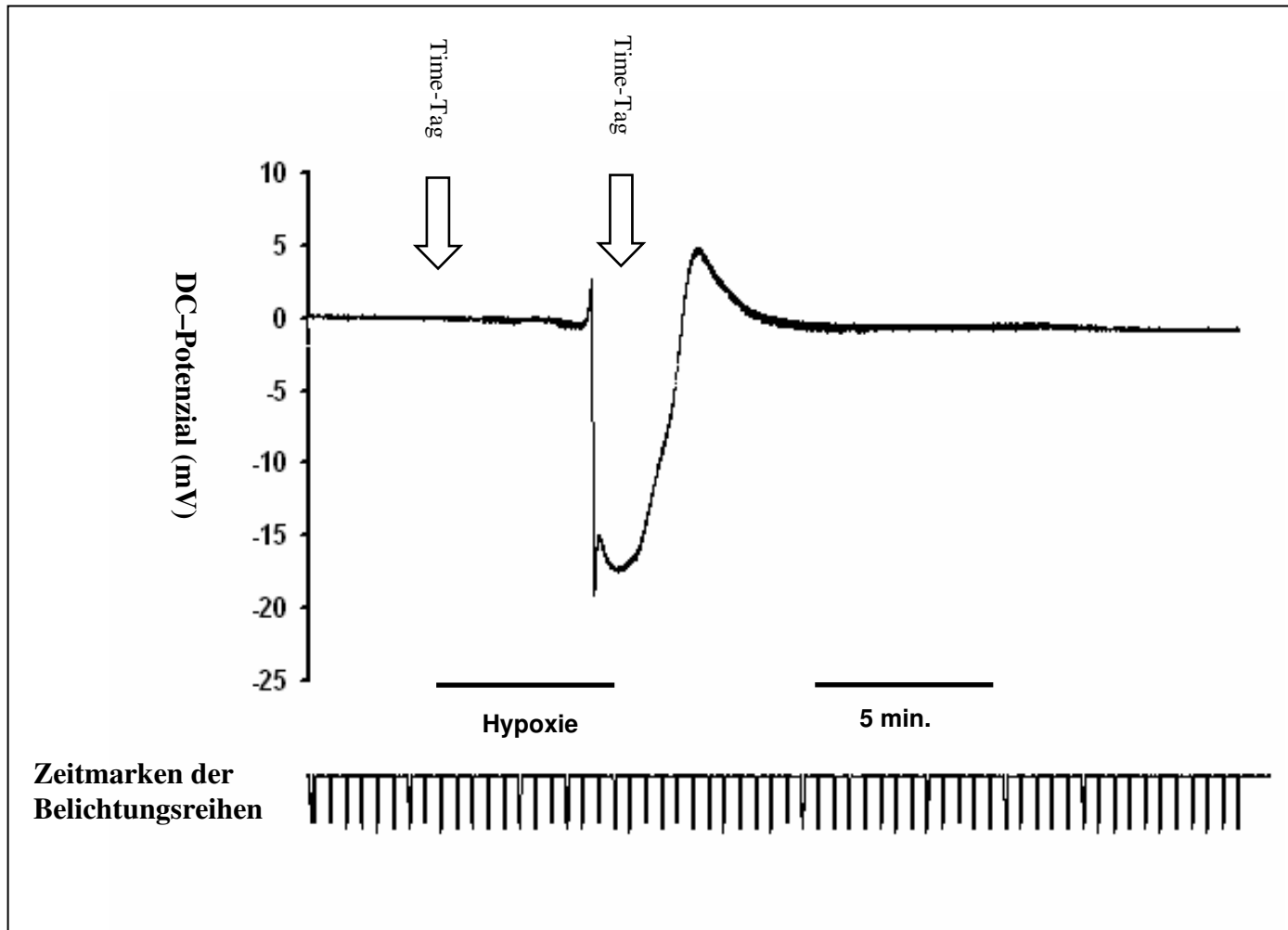


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des DC-Potenzials während einer HSD in Standard-ACSF-Lösung

Tab. 2: Zusammenfassung über die charakteristischen DC-Potenzialparameter Zeitspanne Δt , Amplitude ΔV und Halbwertsbreite $\Delta t_{1/2}$ für die durchgeführten Versuchsreihen

Verwendete Lösung	Δt (s)	ΔV (mV)	$\Delta t_{1/2}$ (s)	Stichprobenumfang
	Mittelwert \pm Standardabweichung			
Standard - ACSF (1. HSD)	128 \pm 30	- 14,8 \pm 2,3	65 \pm 17	n = 52
Standard - ACSF (2. HSD)	151 \pm 44	- 14,4 \pm 3,3	62 \pm 13	n = 7
Standard - ACSF (3. HSD)	154 \pm 44	- 12,0 \pm 3,1	56 \pm 7	n = 6
Kalziumfreier ACSF (2. HSD)	108 \pm 16	- 14,1 \pm 4,0	35 \pm 29	n = 6
Chloridarmer ACSF (2. HSD)	194 \pm 51	- 15,0 \pm 3,0*	67 \pm 33	n = 6
Hypotoner ACSF (-30mM) (2. HSD)	178 \pm 71	- 16,9 \pm 4,7	66 \pm 29*	n = 7
Hypertoner ACSF (+60mM) (2. HSD)	162 \pm 58*	- 12,0 \pm 6,0*	36 \pm 30	n = 6
FAC (5mM) + N ₂ (1. HSD)	159 \pm 29	- 18,6 \pm 3,6	18 \pm 19	n = 5
FCCP (10 μ M) + N ₂ (2. HSD)	45 \pm 12**	- 10,2 \pm 3,1	28 \pm 26	n = 7
CN ⁻ (10 μ M) + N ₂ (2. HSD)	182 \pm 44*	- 16,1 \pm 2,1	78 \pm 14*	n = 8
CN ⁻ (1mM) (2. HSD)	284 \pm 97*	- 13,2 \pm 3,1*	110 \pm 55	n = 5

* Signifikanzschranke $p = 0,05$

** Signifikanzschranke $p = 0,01$

In den Oberflächendiagrammen der IOS ist ein Rückgang der Reflexion in der Zeit zwischen Stickstoffgabe und dem Beginn der HSD zu erkennen. Dieser ist im Wellenlängenbereich um $\lambda=440\text{nm}$ besonders deutlich ausgeprägt. Etwas zeitverzögert zur HSD kommt es zu einer generellen Steigerung der Lichtreflexion. Davon sind vor allem die Wellenlängen von $\lambda=360\text{-}460\text{nm}$ betroffen. Der Bereich $\lambda=440\text{nm}$ ist von der Intensitätssteigerung nahezu ausgeschlossen. Nach Reoxygenierung wird die Reflexion wieder schwächer. Gefolgt wird diese Reflexionsabnahme erneut von einem leichten Reflexionsanstieg, der ein Plateau erreicht. Auf diesem bleibt die Gewebereflexion bis zum Ende des Aufzeichnungszeitraums stabil. Sie hält sich über dem zu Beginn der Aufzeichnungen erkennbaren Ausgangsniveau.

Zum Zeitpunkt der zweiten HSD zeigt sich eine ähnliche Entwicklung in der Lichtreflexion. Es treten, wie schon bei der ersten HSD, der initiale Reflexionsverlust, der bei $\lambda=440\text{nm}$ quantitativ am stärksten ist, und die IOS-Zunahme während der HSD in Erscheinung. Die Intensitätssteigerung während der HSD ist bei dieser exemplarischen Messung vor allem im Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{-}480\text{nm}$ zu erkennen. Dabei ist der deutliche Einschnitt im Reflexionsprofil bei $\lambda=440\text{nm}$ erneut vorhanden. Nach Reoxygenierung fallen die Reflexionsquotienten ab und zeigen Werte etwas oberhalb der Referenzmessung zu Aufzeichnungsbeginn.

Auch das Reflexionsprofil der dritten HSD ähnelt denen der vorangegangenen HSDs am gleichen Hirnschnitt (Abb. 14). Es gibt keine wesentlichen Abweichungen zu den vorher beobachteten Reflexionsveränderungen.

Im Vergleich der optischen und elektrischen Signale der HSD fällt auf, dass der Anstieg in der Lichtreflexion mit einer zeitlichen Verzögerung nach dem elektrisch registrierten DC-Potenzialsprung auftritt. Für die Kontroll-HSDs ergibt sich für das elektrische Signal ein Vorlauf von 32s. Die maximalen Reflexionszunahmen während der zweiten und dritten HSDs in Standard-Lösung treten im Mittel 9s bzw. 20s später als die elektrischen Veränderungen auf.

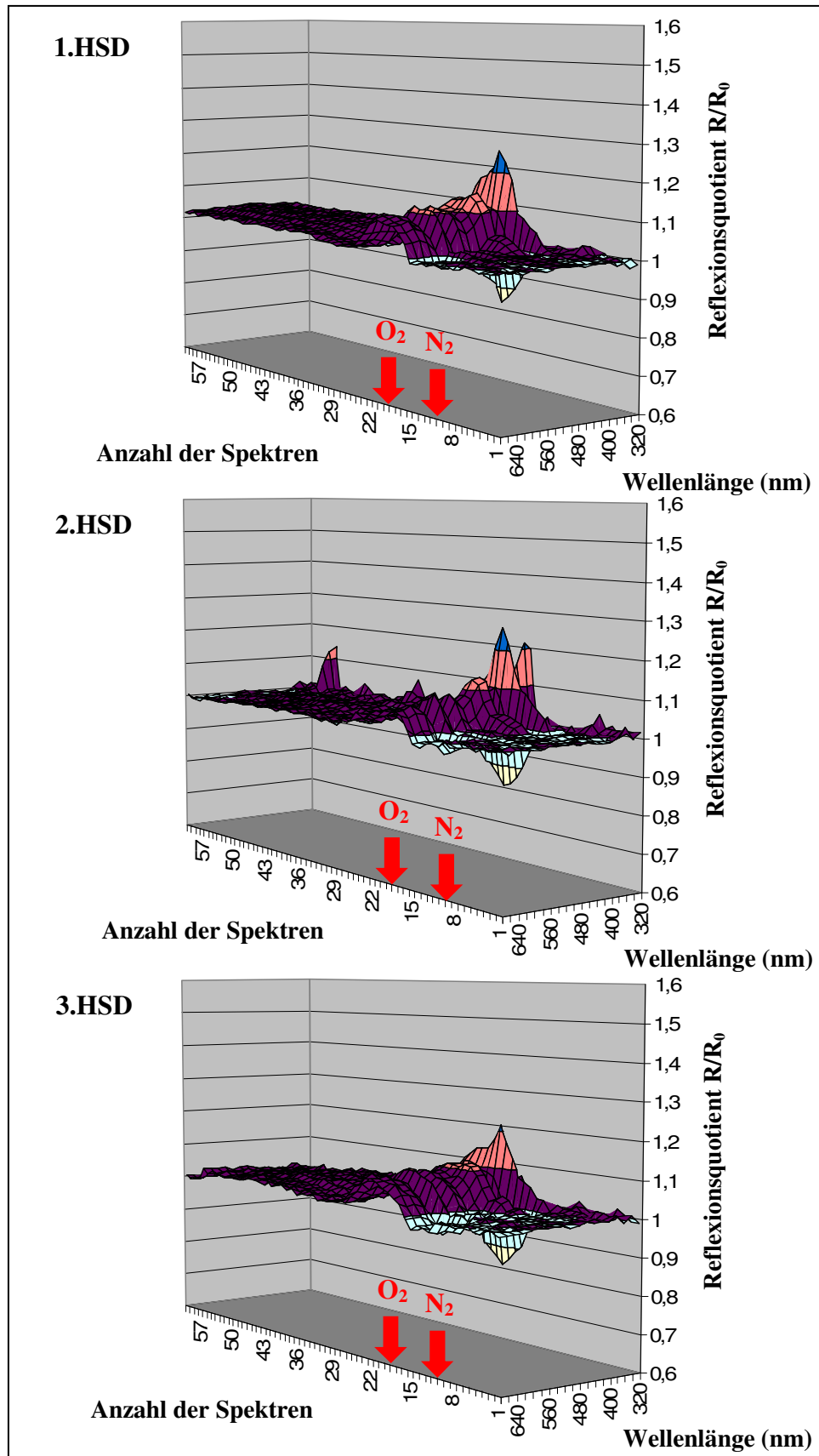


Abb. 14: Oberflächendiagramme des Reflexionsverhaltens von neuronalem Gewebe während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung

Anhand dieser charakteristischen und unter Standardbedingungen reproduzierbaren IOS-Verläufe und in Anlehnung an frühere Beobachtungen von Müller und Somjen wurden die unter Kapitel 2.7.2 „Auswertung der optischen Messungen“ festgelegten Messzeitpunkte 1 bis 4 bestimmt (Müller und Somjen 1999). Messzeitpunkt 1 ist zeitlich 30s vor der HSD einzuordnen. Der Zeitpunkt 2, IOS_{min} , erfasst den initialen Reflexionsrückgang kurz vor der HSD-assoziierten DC-Potenzialveränderung. IOS_{max} , der dritte Messzeitpunkt, wird kurz nach dem Peak der DC-Potenzialnegativierung abgelesen. Der Messzeitpunkt 4 wird im Zeitraster 3 Minuten nach der Reoxygenierung der Messkammer bzw. 3 Minuten nach der HSD in 1mM Cyanidlösung bestimmt. Für die Messungen in chloridarmer Lösung gelten, wie bereits erläutert, teilweise abweichende Messzeitpunkte.

In der Abb. 15 sind die Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten für die jeweils ersten HSDs in Standard-ACSF-Lösung dargestellt. Sie errechnen sich aus den Intensitäten des vom Gewebe reflektierten Lichtes in Bezug auf die eingangs ermittelte Reflexion des untersuchten Hirnschnittes unter normoxischen Bedingungen (R/R_0). Die aufgetragenen Mittelwerte ergeben sich aus den Test-HSDs aller Versuchsreihen ($n=52$). Bereits 30s vor der elektrisch registrierten HSD (Messzeitpunkt 1) zeigt sich ein Profil, das in seiner Form bis nach der Reoxygenierung erhalten bleibt. Als markante Punkte fallen die gesteigerte Lichtreflexion bei $\lambda=400nm$ und die abgeschwächte Reflexion bei $\lambda=440nm$ auf. Durchschnittlich 21s vor der HSD wird die initiale Reflexionsabschwächung, IOS_{min} , beobachtet. Es kommt zu einer Reflexionsverminderung in den betrachteten Wellenlängenbereichen von $\lambda=320-680nm$ mit Ausnahme von $\lambda=340nm$ und $\lambda=400nm$. Diese beträgt maximal 14,3% ($\lambda=440nm$) verglichen mit dem unter normoxischen Bedingungen ermittelten Ausgangswert $R/R_0=1$. Während der HSD kommt es zu einer Zunahme der Gewebereflexion bis zum Messzeitpunkt 3, IOS_{max} . Der stärkste Reflexionszuwachs wird mit +22,0% bei $\lambda=400nm$ erzielt. Die übrigen Wellenlängenbereiche zeigen zwar auch eine Reflexionssteigerung, diese ist aber weniger stark ausgeprägt. Eine halbe Minute nach der elektrisch registrierten HSD wurde die Gasversorgung in der Messkammer wieder auf Carbogen umgestellt. Drei Minuten nach dieser Reoxygenierung wurden erneut die Reflexionsquotienten R/R_0 bestimmt. Zu diesem vierten Messzeitpunkt ist der

Reflexionsanstieg bereits weitestgehend zurückgebildet. Das Reflexionsmaximum liegt unverändert bei $\lambda=400\text{nm}$ ($R/R_0=1,071$). Die Reflexionsquotienten haben sich zum vierten Messzeitpunkt zwar wieder an das Ausgangsniveau $R/R_0=1$ angenähert, halten sich aber noch stabil darüber.

Während der zweiten HSD in Standard-Lösung zeigt sich in Grundzügen eine ähnliche Dynamik im Reflexionsverhalten (Abb. 15). Das bei der ersten HSD beschriebene Profil der optischen Veränderungen bleibt bis auf geringe Intensitätsänderungen erhalten. 30s vor der zweiten HSD wird Licht mit der Wellenlänge $\lambda=400\text{nm}$ am stärksten vom Gewebe reflektiert ($R/R_0=1,053$). Bei $\lambda=440\text{nm}$ ist die Reflexion wieder abgeschwächt. Der Reflexionsquotient liegt 15,7% unter dem Ausgangswert $R/R_0=1$ ($R/R_0=0,843$). Die Reflexion nimmt bis zum Messzeitpunkt 2, IOS_{\min} , tendenziell weiter ab. Maximum und Minimum liegen wiederum bei $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=440\text{nm}$. IOS_{\min} wird im Mittel 24s vor der HSD abgelesen. Um den Zeitpunkt der HSD kommt es zu einem generellen Reflexionsanstieg, welcher je nach Wellenlängenbereich unterschiedlich stark ausfällt.

Vor allem bei $\lambda=400\text{nm}$ wird die Lichtreflexion intensiver. Sie ist um 22,2% stärker als zu Beginn der Aufzeichnungen. Der Bereich $\lambda=380\text{--}400\text{nm}$ und die Wellenlänge $\lambda=460\text{nm}$ verzeichnen einen Intensitätsgewinn von mehr als 10%. Am schwächsten wird das eingestrahlte Licht bei $\lambda=440\text{nm}$ zurückgeworfen ($R/R_0=0,930$). Nach dem zum Teil kräftigen Anstieg der Reflexion während der HSD ist dieser zum Zeitpunkt 4 fast vollständig zurückgebildet. Am stärksten nimmt die Gewebereflexion bei $\lambda=400\text{nm}$ ab (-21,7%). Mit Ausnahme des Reflexionsquotienten bei $\lambda=400\text{nm}$ ist R/R_0 nun stets kleiner als der eingangs ermittelte Referenzwert $R/R_0=1$. Auch bei der dritten HSD am selben Gewebe ändert sich das Reflexionsverhalten über den Beobachtungszeitraum kaum im Vergleich zu den vorangegangenen HSDs. Es zeichnet sich eine Verminderung der Lichtreflexion vor der HSD ab. 30s vor Beginn der dritten HSD ist die Reflexion außer in den Bereichen $\lambda=320\text{--}360\text{nm}$ und $\lambda=400\text{nm}$ geringer als der Ausgangswert $R/R_0=1$. Bei $\lambda=400\text{nm}$ ist die Reflexion am stärksten ($R/R_0=1,046$). Am schwächsten ist sie bei $\lambda=440\text{nm}$ ($R/R_0=0,840$). Bis zum zweiten Messzeitpunkt kommt es zur weiteren Abnahme der Reflexion. Am meisten geht diese bei $\lambda=440\text{nm}$ zurück (-17,6%).

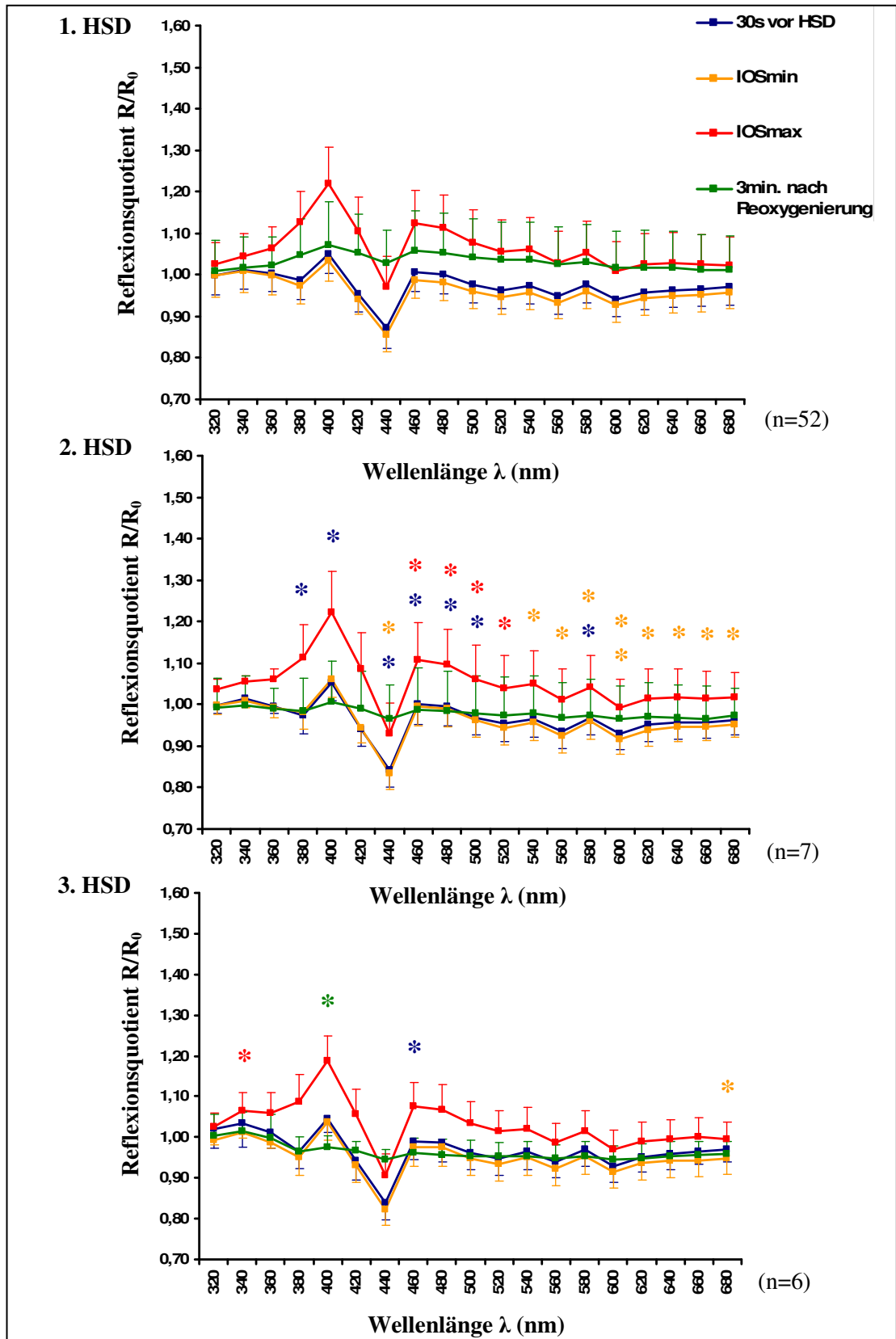


Abb. 15: Reflexionsquotienten R/R_0 zu den vier definierten Messzeitpunkten während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung (Mittelwerte \pm Standardabweichung) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Während der HSD gewinnen die IOS im gesamten Wellenlängenbereich von $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ an Stärke (Abb. 15). Besonders hervorzuheben sei an dieser Stelle die Wellenlänge $\lambda=400\text{nm}$ mit einem Zuwachs von $+18,8\%$. Es handelt sich zugleich um das Reflexionsmaximum. Die Reflexion ist bei $\lambda=440\text{nm}$ wiederum am geringsten. Hier ist auch 3 Minuten nach Reoxygenierung das Reflexionsminimum angesiedelt, obwohl in diesem Wellenlängenbereich ein Reflexionsanstieg bezüglich des Messzeitpunktes 3 stattgefunden hat. Am intensivsten wird zum Messzeitpunkt 4 Licht mit der Wellenlänge $\lambda=340\text{nm}$ reflektiert. Bei $\lambda=400\text{nm}$, wo zu den ersten drei Messzeitpunkten das Reflexionsmaximum lokalisiert war, geht die Reflexion entsprechend stark zurück.

3.2 HSDs bei ionaler Veränderung der Lösungszusammensetzung

Um den Mechanismus der IOS-Entstehung genau zu untersuchen, wurden gezielt Veränderungen in der ionalen Lösungszusammensetzung vorgenommen (siehe Kap. 2.4 „Verwendete Lösungen und Chemikalien“ Tab. 1). Es wurden zum einen Kalzium entzogen, zum anderen große Mengen des gelösten Chlorids durch das nicht membrangängige Anion Methylsulfat ersetzt. Vor ionaler Manipulation wurde eine Referenz-HSD in Standard-ACSF generiert. Im Anschluss erfolgte die Messung in der veränderten ACSF-Lösung.

Die HSD in kalziumfreier ACSF-Lösung stellt sich mit $\Delta t=108\text{s}$ etwas früher ein als die repetitiven HSDs in Standard-ACSF. Ihre Amplitude erreicht einen Mittelwert von $\Delta V=-14,1\text{mV}$. Die Halbwertsbreite misst durchschnittlich 35s . Die Parameter der DC-Potenzialableitung unterscheiden sich nicht signifikant von den Test-HSDs in Standard-Lösung.

Die Abb. 16A zeigt die zeitliche Entwicklung des Reflexionsverhaltens um den Zeitpunkt der HSD in kalziumfreier Lösung. Der initiale Reflexionsrückgang sowie der sich anschließende Intensitätszuwachs der Lichtreflexion sind deutlich zu erkennen. Die anfänglichen Reflexionseinbußen betreffen, wie schon bei den Kontrollen, v. a. die Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$.

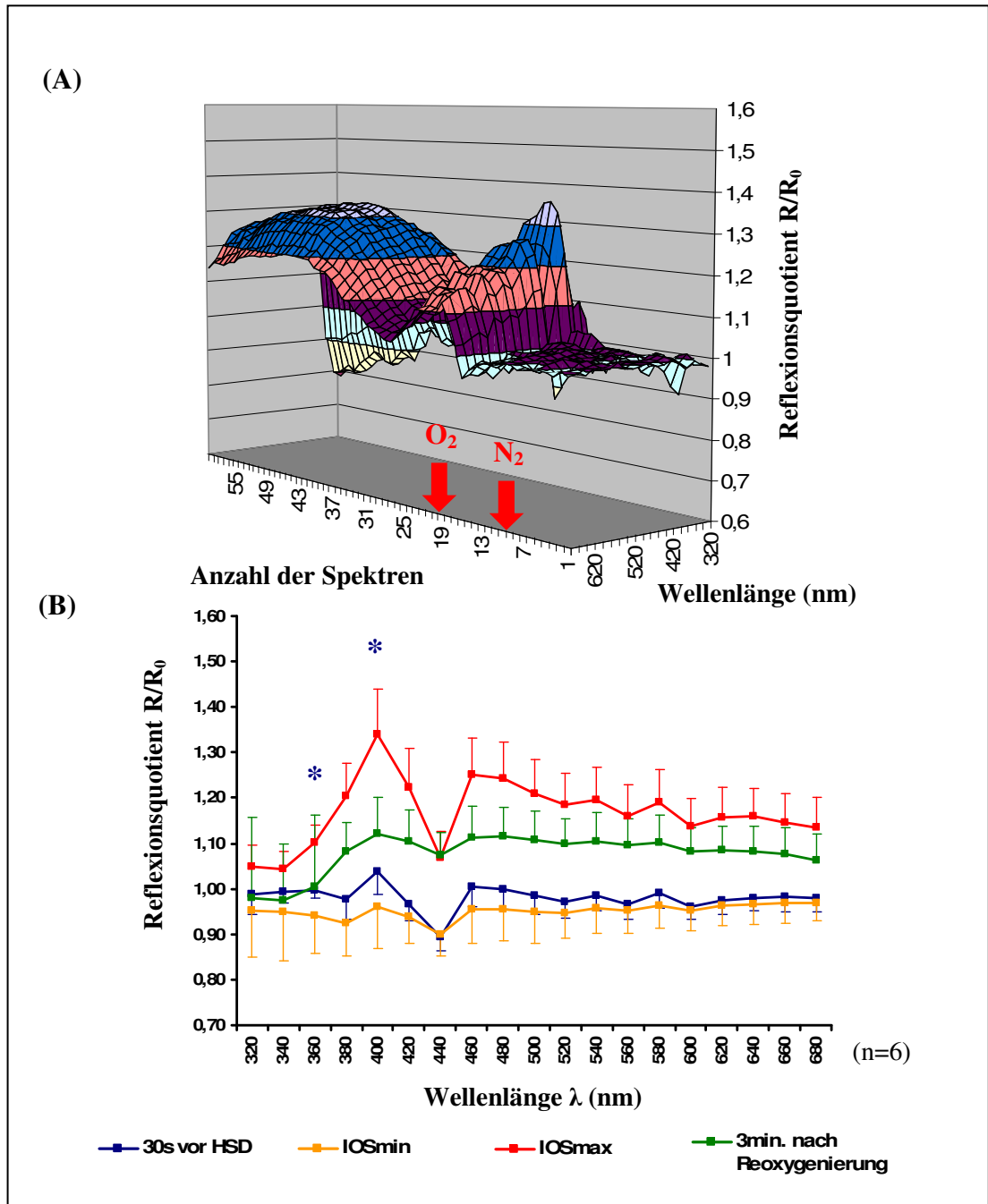


Abb. 16: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion während einer HSD in kalziumfreier ACSF-Lösung. Eine ausgeprägte Steigerung der Gewebereflexion um den Zeitpunkt der HSD sowie eine sekundäre Reflexionszunahme nach Reoxygenierung unterscheiden diese Versuchsreihe etwas von den korrespondierenden Kontrollmessungen. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung) (* $p < 0,05$).

Die Reflexionssteigerung während der HSD ist hier etwas intensiver als in Standard-ACSF. Nachdem die HSD abgelaufen ist und das Gewebe reoxygeniert wurde, halten sich die Reflexionsquotienten über dem Ausgangswert $R/R_0=1$. Nach anfänglicher Erholung kommt es im ganzen betrachteten Wellenlängenbereich von $\lambda=320\text{nm}$ bis $\lambda=680\text{nm}$, aber besonders im Bereich $\lambda>460\text{nm}$, zu einem sekundären Anstieg der Reflexion, welcher im Aufzeichnungszeitraum nicht mehr reversibel ist. Ein tiefer Einschnitt im Reflexionsprofil bei $\lambda=440\text{nm}$, wie er während der HSD auftritt, findet sich hier nicht.

Die beschriebenen Veränderungen zeigen sich auch in den gemittelten Reflexionsquotienten zu den 4 Messzeitpunkten. In der kalziumfreien ACSF-Lösung wird 30s vor der zweiten HSD das Licht mit der Wellenlänge $\lambda=400\text{nm}$ besonders stark reflektiert (Abb. 16B). Auch zu den drei folgenden Messzeitpunkten sind die Maxima bei $\lambda=400\text{nm}$ lokalisiert. Das Minimum findet sich 30s vor der HSD unverändert bei $\lambda=440\text{nm}$. Bis zum Messzeitpunkt 2, welcher im zeitlichen Rahmen durchschnittlich 58s vor der HSD einzuordnen ist, werden die IOS über alle Wellenlängen bis auf $\lambda=440\text{nm}$ schwächer. Dennoch ist bei $\lambda=440\text{nm}$ die Reflexion am geringsten ($R/R_0=0,901$).

Nach diesem initialen Reflexionsrückgang kommt es durchschnittlich 43s nach Registrierung des elektrischen Signals für die HSD zu einer generellen und starken Steigerung der Lichtreflexion. Am stärksten ist diese bei $\lambda=400\text{nm}$ mit einem Zuwachs von +34,1% in Bezug auf das normoxische Ausgangsniveau. Am schwächsten wird das eingestrahlte Licht bei $\lambda=340\text{nm}$ zurückgeworfen ($R/R_0=1,043$). Drei Minuten nach Reoxygenierung hat die Reflexion außer bei $\lambda=440\text{nm}$ wieder abgenommen. Die Werte liegen im Bereich $\lambda=360\text{--}680\text{nm}$ aber immer noch über dem Ausgangswert $R/R_0=1$. Die größten Reflexionsquotienten werden wieder bei $\lambda=400\text{nm}$ aufgezeichnet ($R/R_0=1,120$). Am schwächsten wird Licht der Wellenlänge $\lambda=340\text{nm}$ reflektiert ($R/R_0=0,974$).

Die Substitution von Chloridionen in der ACSF-Lösung durch Natriummethylsulfat ist in der Lage, das Reflexionsverhalten des Gewebes während der HSD umzukehren (Müller und Somjen 1999, Bahar et al. 2000).

Für die elektrischen Ableitungen des DC-Potenzials ergeben sich unter diesen ionalen Bedingungen die folgenden Werte: Im Vergleich zu den Test-HSDs tritt die HSD in chloridarmer Lösung mit geringer Verzögerung, nämlich erst nach 194s, ein. Für ihre Amplitude und Halbwertsbreite wurden Mittelwerte von $\Delta V = -15,0\text{mV}$ und $\Delta t_{1/2} = 67\text{s}$ bestimmt.

Das Oberflächendiagramm (Abb. 17A) zeigt die zeitliche Entwicklung der Lichtreflexion während einer HSD in chloridarmer ACSF-Lösung. Besonders auffällig sind die zwei Reflexionseinbrüche $\text{IOS}_{\text{min}1}$ und $\text{IOS}_{\text{min}2}$, sowie die kurzzeitige Normalisierung der Reflexion zwischen beiden Ereignissen. Zu beiden Zeitpunkten sind die Wellenlängenbereiche $\lambda > 360\text{nm}$ deutlich davon betroffen. Am stärksten ist die Reflexionsabnahme bei $\lambda = 440\text{nm}$ ausgeprägt. Da in chloridarmer Lösung erwartungsgemäß keine Intensitätssteigerung der IOS während der HSD zu beobachten war, wird der sonst als IOS_{max} bezeichnete Messzeitpunkt 3 hier als $\text{IOS}_{\text{min}2}$ angegeben.

30s vor der HSD in chloridarmer ACSF-Lösung ist die Reflexion bei $\lambda = 320\text{nm}$ am stärksten (Abb. 17B). Bei $\lambda = 440\text{nm}$ wird der Ausgangswert $R/R_0 = 1$ zu diesem Messzeitpunkt am deutlichsten, d. h. um 12,0%, unterschritten. Bis zum Messzeitpunkt 2, $\text{IOS}_{\text{min}1}$, nimmt die Intensität der IOS im gesamten beobachteten Wellenlängenbereich ab. Am stärksten ist $\lambda = 440\text{nm}$ mit einem Intensitätsrückgang um 18,9% betroffen. Bei dieser Wellenlänge ist zugleich der kleinste Reflexionsquotient zum Zeitpunkt 2 zu beobachten ($R/R_0 = 0,812$). Der Messzeitpunkt 2 liegt durchschnittlich 10s vor Eintritt der HSD.

Zum Zeitpunkt 3, $\text{IOS}_{\text{min}2}$, liegen die Reflexionsquotienten etwas über den zum Zeitpunkt $\text{IOS}_{\text{min}1}$ ermittelten Durchschnittswerten. Lediglich bei $\lambda = 320\text{-}340\text{nm}$ und $\lambda = 620\text{nm}$ ist die Reflexion geringfügig schwächer geworden. Das Reflexionsverhalten unterscheidet sich für die Messzeitpunkte $\text{IOS}_{\text{min}1}$ und $\text{IOS}_{\text{min}2}$ in den Wellenlängen $\lambda > 360\text{nm}$ deutlich von den Kontrollmessungen in Standard-Lösung.

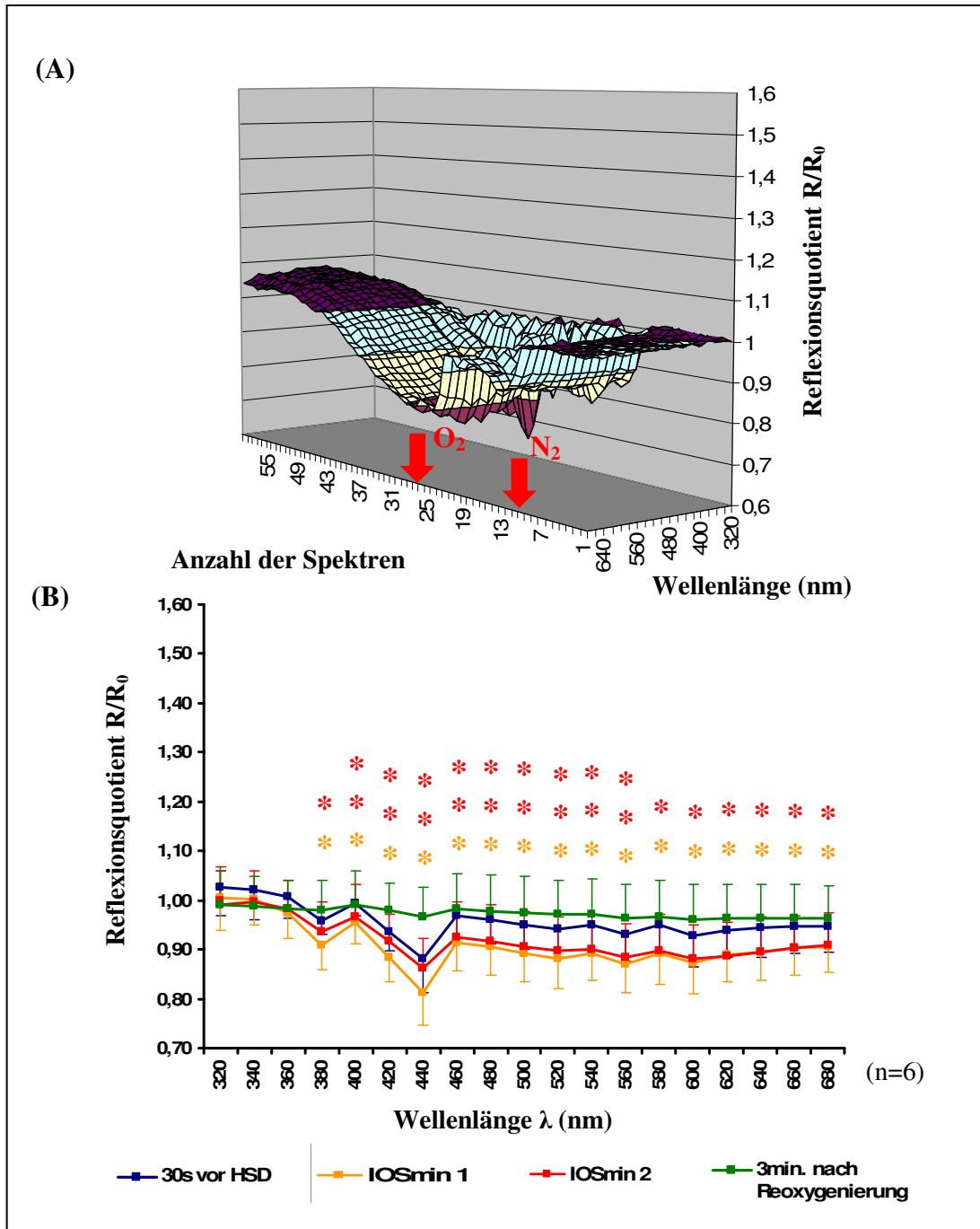


Abb. 17: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion am Hippocampusgewebe während einer HSD in chloridarmer ACSF-Lösung. Das Ausbleiben der Reflexionssteigerung im Zuge der HSD ist das führende Charakteristikum. Das Reflexionsprofil erscheint verglichen mit den Kontrollmessungen spiegelbildlich. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Drei Minuten nach Reoxygenierung, dem vierten Messzeitpunkt, normalisiert sich die Reflexion im Bereich $\lambda=360\text{--}680\text{nm}$ wieder. Am Messzeitpunkt 4 liegen die Reflexionsquotienten generell noch unter dem Ausgangsniveau. Sie nähern sich diesem aber an, so dass nur noch ein maximaler Unterschied von 3,8% bei $\lambda=600\text{nm}$ besteht.

3.3 HSDs bei veränderter Lösungsosmolarität

Ebenso wie ionale Veränderungen können auch osmotische Veränderungen die IOS und die HSD deutlich modulieren. Daher wurden auch diese Effekte hier untersucht. Bei hypotoner Lösungsosmolarität (-30mM NaCl) ist die Zeitspanne Δt etwas größer als in Standard-ACSF. Es vergehen 178s bis Neurone und Gliazellen mit einer schnellen synchronen Depolarisation auf den Sauerstoffentzug reagieren. Die Halbwertsbreite und die Amplitude betragen $\Delta t_{1/2}=66\text{s}$ bzw. -16,9mV. Dabei unterscheidet sich nur der Parameter $\Delta t_{1/2}$ signifikant von den korrespondierenden Test-HSDs in Standard-Lösung.

Die Abb. 18A stellt die Intensitätsentwicklung der Gewebereflexion während einer HSD in hypotoner ACSF-Lösung dar. Der starke Intensitätszuwachs während der HSD ist besonders gut zu erkennen. Er bezieht sich vornehmlich auf den Bereich $\lambda=360\text{--}620\text{nm}$. Die Veränderungen sind etwa doppelt so stark ausgeprägt wie in Standard-ACSF. Bereits zwischen Stickstoffgabe und HSD ist ein leichter und kontinuierlicher Reflexionsanstieg zu erkennen. Zudem werden die geringen Intensitätsänderungen zwischen den ersten zwei Messzeitpunkten offensichtlich. Nach der HSD wird das normoxische Ausgangsniveau nicht wieder erreicht. Nach anfänglicher Rückbildung der IOS steigt die Reflexion wieder an und bleibt im Beobachtungszeitraum auf diesem erreichten Niveau.

Bereits 30s vor der HSD in hypotoner ACSF-Lösung liegen die Reflexionsquotienten bis zu 8,1% über dem Referenzwert $R/R_0=1$ ($\lambda=400\text{nm}$). Im Gegensatz dazu ist die Reflexion bei $\lambda=440\text{nm}$ 9,9% geringer als zu Aufzeichnungsbeginn (Abb. 18B). Auch zum Messzeitpunkt 2 bleiben Maximum und Minimum bei diesen Wellenlängen bestehen. Der Zeitpunkt IOS_{min} wurde durchschnittlich 19s vor der HSD bestimmt.

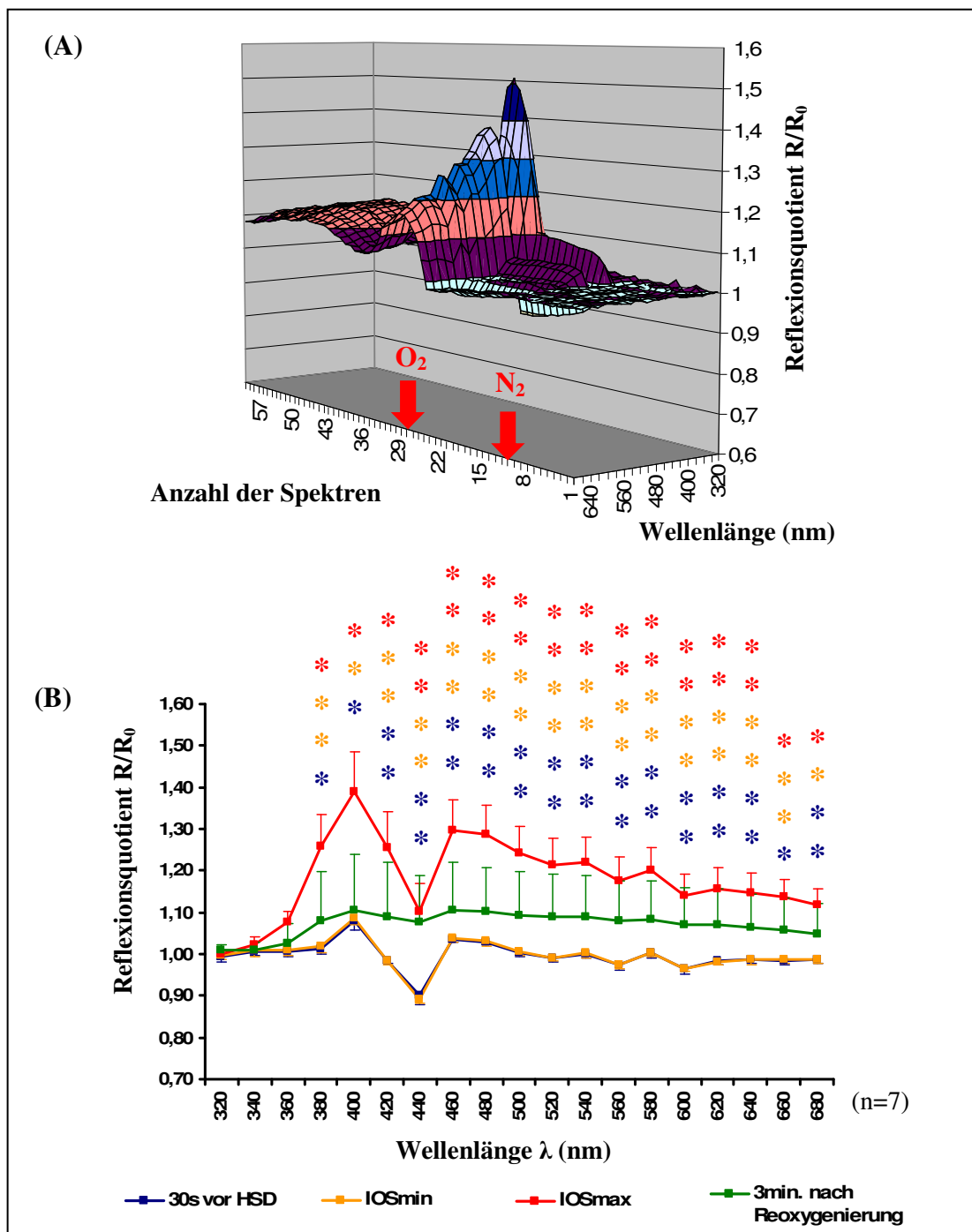


Abb. 18: (A) Oberflächendiagramm der Gewebereflexion während einer HSD in hypotoner Lösung. Es kommt zu einem ausgeprägten Anstieg der Reflexion während der HSD. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Zeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Auffällig ist der massive Reflexionsanstieg im Wellenlängenbereich $\lambda > 340$ nm mit einem Einbruch bei $\lambda = 440$ nm. Schon 30s vor der HSD ist die Reflexion bei $\lambda > 380$ nm signifikant höher als bei den Kontrollen. Die Rückbildung der Reflexionszunahme ist zum Zeitpunkt 4 unvollständig. Dennoch gibt es nach Reoxygenierung keine signifikanten Unterschiede im Reflexionsverhalten verglichen mit den Kontrollmessungen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

54s nach der HSD wird die stärkste Gewebereflexion gemessen. Es kommt zu einem kräftigen Intensitätsanstieg. Bei $\lambda=400\text{nm}$ ist die Reflexion mit $R/R_0=1,391$ am größten. Das bedeutet zugleich einen Intensitätszuwachs von $+39,1\%$ in Bezug auf den Ausgangswert unter normoxischen Bedingungen. Drei Minuten nach Reoxygenierung kam es zur Erholung der Lichtreflexion. Besonders stark ist diese bei $\lambda=400\text{nm}$ ausgeprägt, der Wellenlänge, die zuvor eine große Intensitätssteigerung erfahren hat. Die IOS werden hier merklich abgeschwächt. Trotz Reflexionsrückgang liegen die Reflexionsquotienten im gesamten Spektralbereich von $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ über dem Wert $R/R_0=1$. Im Bereich $\lambda=460\text{nm}$ ist die Reflexion immer noch $10,6\%$ größer als der Ausgangswert.

Hypertone ACSF-Lösung ($+60\text{mM}$ Mannitol) hat einen gegenteiligen Effekt auf die Gewebereflexion. In der DC-Potenzialableitung treten durchschnittlich 162s nach Sauerstoffentzug die HSDs in hypertoner Lösung ein. Sie haben eine mittlere Amplitude von $\Delta V=-12,0\text{mV}$. Ihre Halbwertsbreite ergibt einen Wert von $\Delta t_{1/2}=36\text{s}$.

Im Oberflächendiagramm wird vor allem der geringe Intensitätsanstieg in der Lichtreflexion während der HSD sichtbar (Abb. 19A). Gut zu erkennen sind auch die nur geringen Veränderungen in der Intensität der IOS über den gesamten Beobachtungszeitraum. Des Weiteren ist der initiale Reflexionsrückgang vor der HSD kaum noch vorhanden. Eine Reflexionsminderung in den Wellenlängen $\lambda=380\text{nm}$ und $\lambda=440\text{nm}$ zieht sich durch weite Teile des Beobachtungszeitraums. Der Einschnitt bei $\lambda=440\text{nm}$ ist nach Reoxygenierung wieder aufgehoben.

In hypertoner ACSF-Lösung liegen die Reflexionsquotienten 30s vor der HSD außer bei $\lambda=320\text{--}360\text{nm}$ und $\lambda=400\text{nm}$ unter dem Ausgangswert (Abb. 19B). Das Maximum liegt bei $\lambda=400\text{nm}$ ($R/R_0=1,046$). Am schwächsten wird Licht der Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$ reflektiert ($R/R_0=0,874$). Diese Konstellation von Maximum und Minimum hält sich bis einschließlich des Messzeitpunktes 3 stabil. Bis zum Messzeitpunkt 2, welcher im Mittel 5s vor der HSD abgelesen wird, kommt es zur weiteren Intensitätsminderung der Gewebereflexion. Durchschnittlich 33s nach dem HSD-Beginn wird der dritte Messzeitpunkt, IOS_{max} , erreicht. Es kommt zu einem generellen Anstieg der Reflexion.

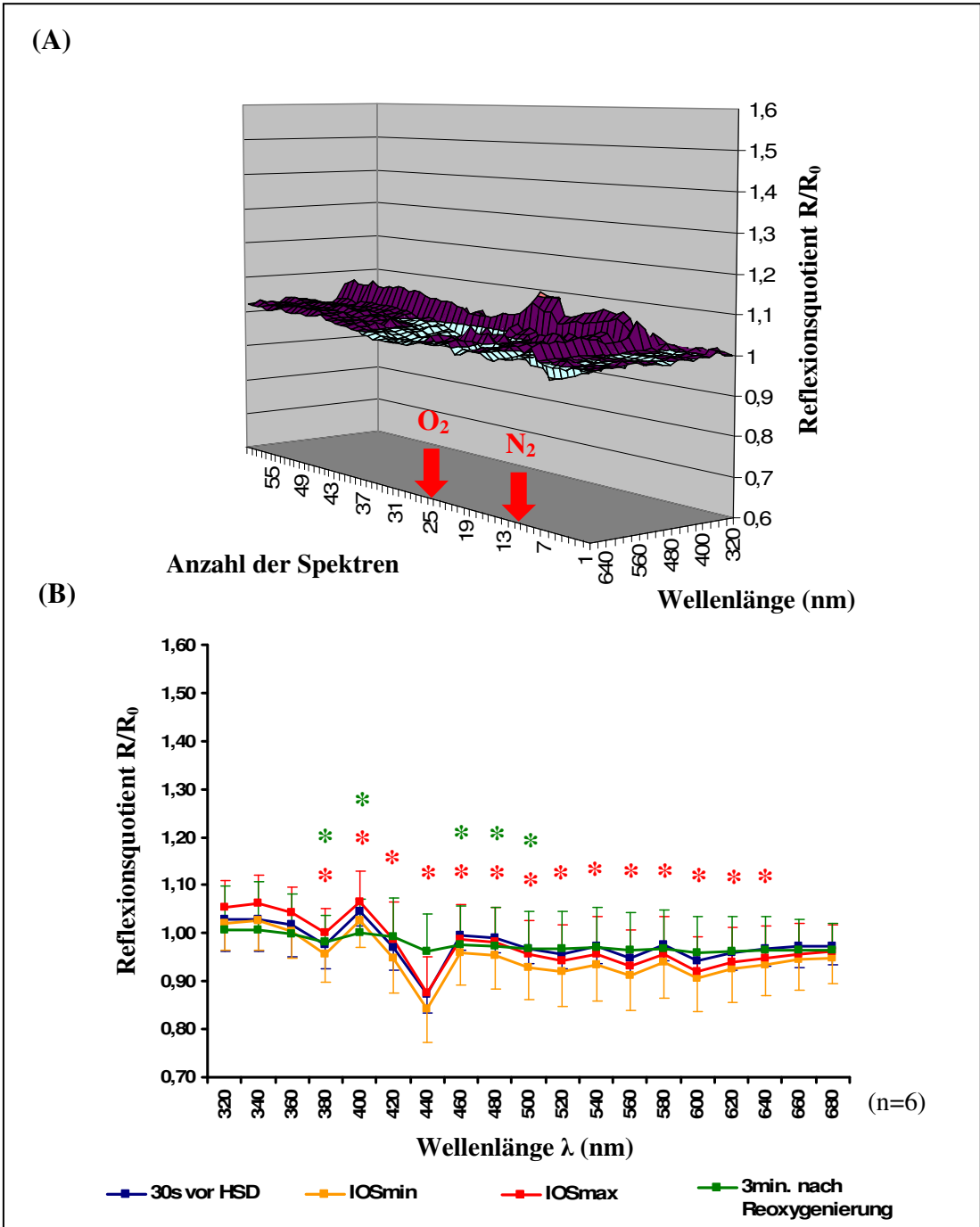


Abb. 19: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion während einer HSD in hypertoner Lösung. Es ist nur ein schwacher Anstieg in der Gewebereflection bei der HSD zu erkennen, welcher sich kaum von den ermittelten Reflexionsquotienten im restlichen Aufzeichnungszeitraum abhebt. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Obwohl nur geringe Intensitätsschwankungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten zu erkennen sind, bleibt das Grundmuster in der Reflexion mit größeren Reflexionsquotienten bei $\lambda=400\text{nm}$ und kleinen Reflexionsquotienten im Bereich $\lambda=440\text{nm}$ wie bei den ersten HSDs in Standard-ACSF erhalten (* $p < 0,05$).

Die Wellenlänge $\lambda=400\text{nm}$ hat mit einem Zuwachs von 6,4% bezüglich des normoxischen Ausgangsniveaus die größte Intensitätssteigerung zu verzeichnen. Diese ist aber deutlich geringer als unter Kontrollbedingungen. Nach Reoxygenierung gleichen sich die Reflexionsquotienten zügig dem Ausgangswert $R/R_0=1$ an. Dieser wird zu großen Teilen, nämlich in den Bereichen $\lambda=360\text{--}380\text{nm}$ und $\lambda=420\text{--}680\text{nm}$, unterschritten. Der Einschnitt in den Kurven bei $\lambda=440\text{nm}$ ist nach Umstellung der Gasversorgung auf Carbogen nahezu aufgehoben.

3.4 HSDs bei ausgeschalteter Gliazellfunktion

Um den Beitrag der Gliazellen zur Entstehung der IOS zu analysieren, wurden diese mit 5mM FAC-Lösung vergiftet. Unter Verwendung von FAC ist die DC-Potenzialnegativierung zu HSD-Beginn mit $\Delta V=-18,6\text{mV}$ am stärksten ausgeprägt. Die HSDs treten 159s nach Hypoxieinduktion auf und haben eine Halbwertsbreite von 18s.

Im Oberflächendiagramm ist die Gewebereflexion um den Zeitpunkt der HSD nach FAC-Behandlung dargestellt (Abb. 20A). Gut zu erkennen ist vor allem der Intensitätsanstieg der Lichtreflexion um den Zeitpunkt der HSD, sowie dessen nur unvollständige Rückbildung nach Reoxygenierung. Die Reflexionssteigerung erfasst einen größeren Wellenlängenbereich als bei den Kontrollen in Standard-Lösung und sie ist zudem auch stärker ausgeprägt. Die Rückbildung der Reflexionsveränderungen scheint langsamer zu erfolgen, was dem Reflexionsprofil einen massiven Charakter verleiht.

Nachdem das Gewebe für mindestens drei Stunden dem Gliazellgift FAC ausgesetzt war, befindet sich der maximale Reflexionsquotient 30s vor der 1. HSD bei $\lambda=400\text{nm}$ ($R/R_0=1,037$) und bleibt unter hypoxischen Bedingungen dort angesiedelt. Das Minimum liegt bei $\lambda=440\text{nm}$ ($R/R_0=0,880$) (Abb. 20B).

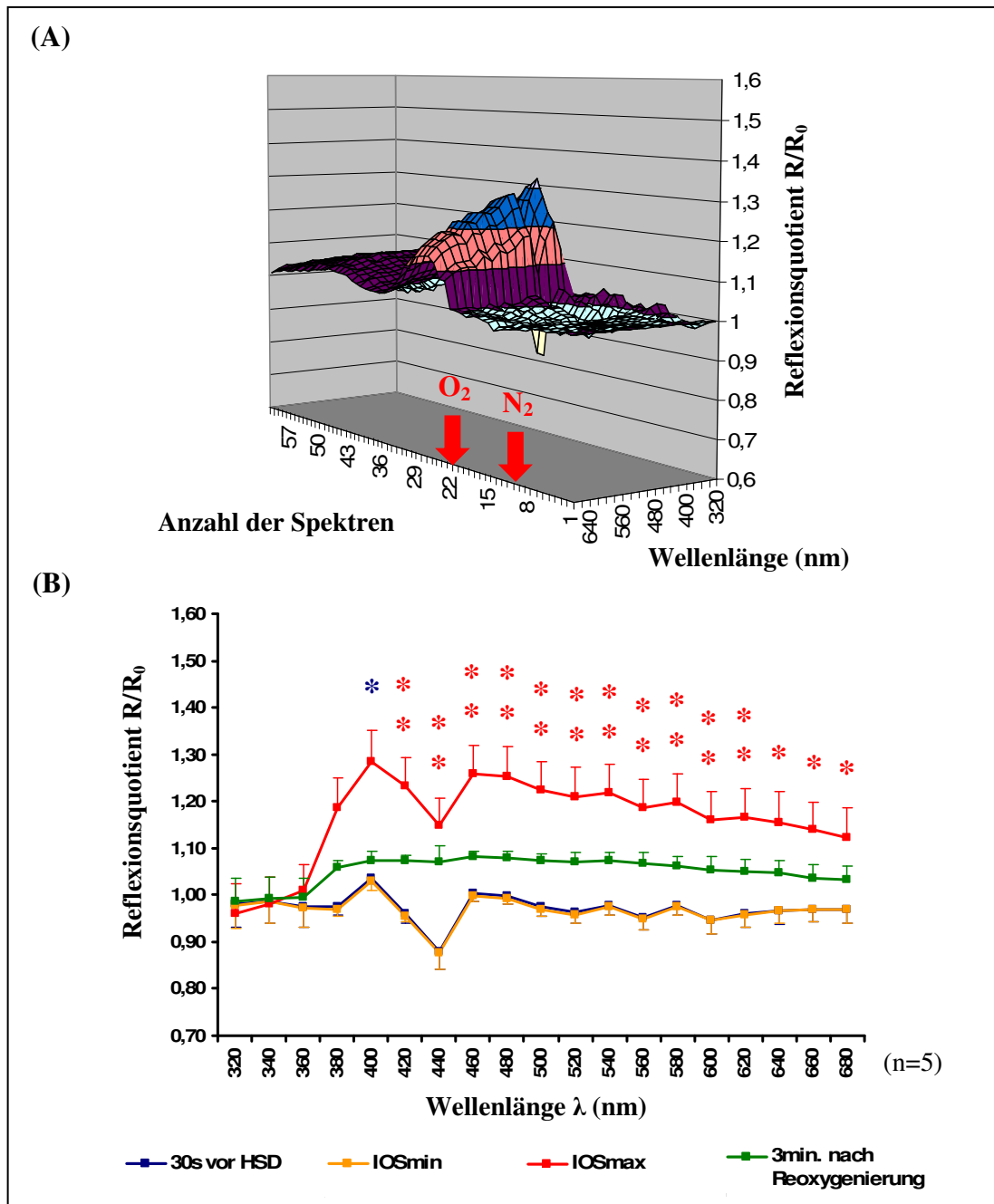


Abb. 20: (A) Oberflächendiagramm der Gewebereflexion während einer HSD in FAC-haltiger ACSF-Lösung. Es kommt zu einer deutlichen Zunahme der Reflexion während der HSD bei den Wellenlängen $\lambda > 380\text{nm}$. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Intensitätssteigerung der Lichtreflexion zum Zeitpunkt IOS_{max} ist bei $\lambda > 400\text{nm}$ signifikant größer als unter Standard-Bedingungen. Auch nach Reoxygenierung bleiben die Reflexionsquotienten sichtbar über dem Referenzwert $R/R_0=1$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Bis zum Zeitpunkt 2, IOS_{\min} , welcher durchschnittlich 39s vor der DC-Potenzialnegativierung zu HSD-Beginn liegt, wird die Lichtreflexion tendenziell schwächer. Im Durchschnitt 42s nach elektrisch registriertem HSD-Beginn wird der Messzeitpunkt 3, IOS_{\max} , erreicht. Im Wellenlängenbereich $\lambda=380\text{--}680\text{nm}$ nimmt die Reflexion um durchschnittlich 18,6% zu. Am stärksten wird das eingestrahlte Licht bei $\lambda=400\text{nm}$ reflektiert ($R/R_0=1,285$). Bei der Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$ ist zwar wie in den Kontrollmessungen ein Einschnitt in der Kurve zu erkennen, dieser ist aber deutlich kleiner als in Standard-ACSF. Nach Reoxygenierung wird die Reflexion im Wellenlängenbereich $\lambda>340\text{nm}$ wieder schwächer. Im Bereich $\lambda=380\text{--}680\text{nm}$ liegen die Reflexionsquotienten drei Minuten nach Reoxygenierung aber dennoch über dem Ausgangswert $R/R_0=1$.

3.5 HSDs bei mitochondrialer Intoxikation

Vorherige Untersuchungen suggerieren eine mögliche Rolle der Mitochondrien bei der IOS-Generierung (Hepp und Müller 2008). Um diese zu untersuchen, wurde gezielt die Mitochondrienfunktion durch Pharmaka manipuliert. Das geschah zum einen durch verschieden stark konzentrierte Cyanid-Lösung. Cyanid ist ein Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette (Komplex IV). Zum anderen wurde FCCP, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, eingesetzt.

Für die Messungen in $10\mu\text{M}$ FCCP-Lösung ergeben sich für die elektrischen Ableitungen die folgenden Mittelwerte: Es vergeht nur eine kurze Zeitspanne zwischen Stickstoffgabe und Beginn der HSD ($\Delta t=45\text{s}$). Die durchschnittliche DC-Potenzialamplitude ist mit $\Delta V=-10,2\text{mV}$ kleiner als bei allen anderen Versuchsreihen und die Halbwertsdauer $\Delta t_{1/2}$ liegt bei 28s. Nur die Latenzzeit Δt weicht dabei signifikant von den Kontrollen ab.

Im Diagramm (Abb. 21A) ist die Intensität der Lichtreflexion in Anwesenheit von FCCP im Beobachtungszeitraum von 15 Minuten über die Wellenlängen $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ dargestellt. Es sind der initiale Reflexionsrückgang vor der HSD und der Intensitätszuwachs der Reflexion um den Zeitpunkt der HSD zu erkennen.

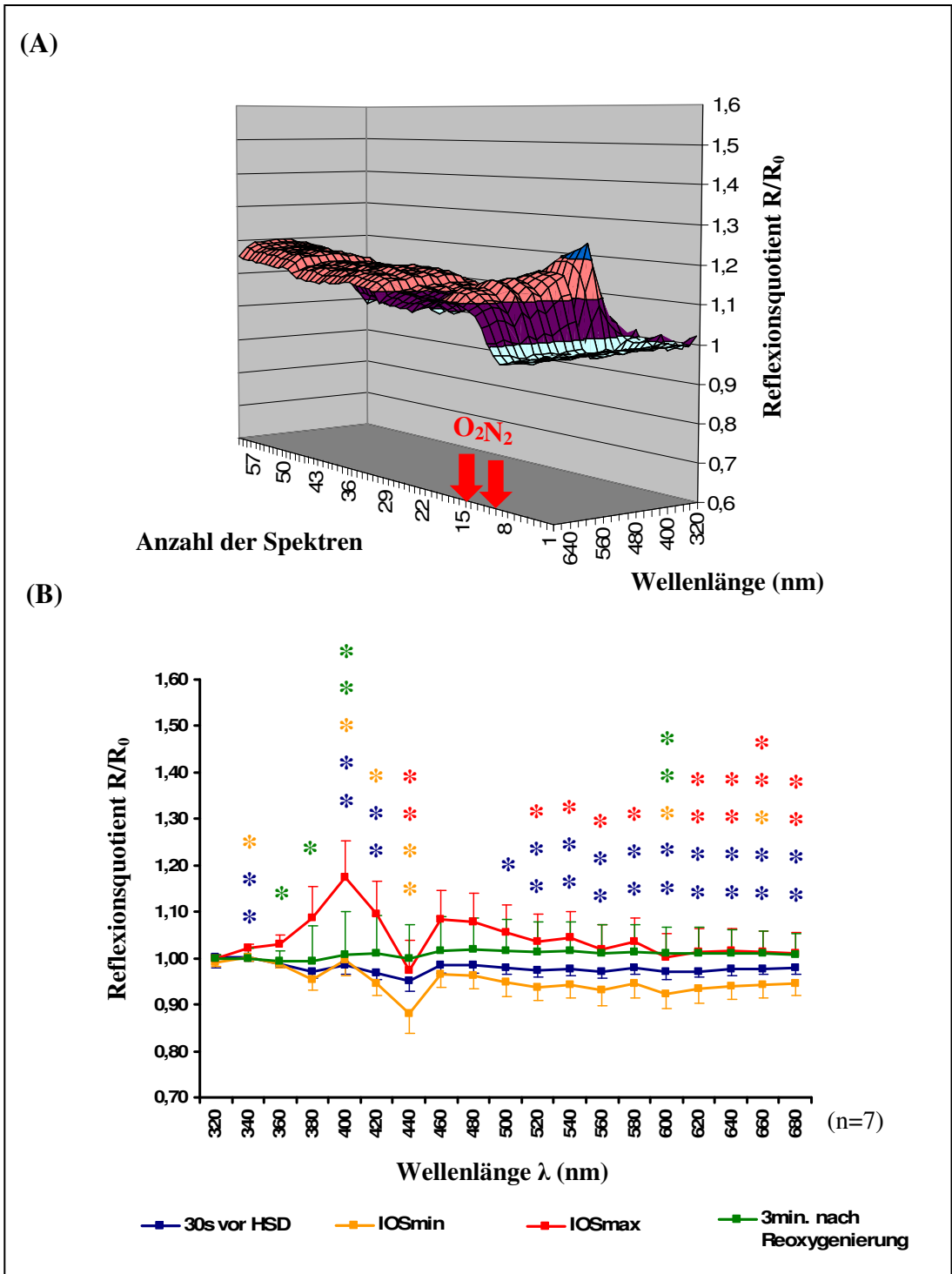


Abb. 21: (A) Oberflächendiagramm der Gewebereflexion während einer HSD unter Einfluss von FCCP (5mM). Die Reflexion nimmt weniger zu als bei den Kontrollen. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die initiale Reflexionsminderung vor der HSD ist hier nur leicht angedeutet. Während der HSD steigert sich die Lichtreflexion im Bereich $\lambda > 500\text{nm}$ weniger als in Standard-ACSF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Unter Sauerstoffentzug zeigt das Reflexionsprofil einen tiefen Einschnitt bei der Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$. Auch nach Reoxygenierung und Erholung von der HSD halten sich die Reflexionsquotienten über dem Niveau $R/R_0=1$.

Nach einer Einwaschzeit von 15 Minuten zeigen die Reflexionsquotienten 30s vor der HSD in FCCP-haltiger ACSF-Lösung ein Maximum bei $\lambda=340\text{nm}$ ($R/R_0=1,002$). Bei $\lambda=440\text{nm}$ ist die Reflexion in Bezug auf den Aufzeichnungsbeginn am meisten, genau um 5,0%, zurückgegangen. Bis zum Messzeitpunkt IOS_{\min} geht dort die Reflexion noch weiter zurück ($R/R_0=0,882$) (Abb. 21B). Das Reflexionsminimum befindet sich für die gesamte Hypoxiedauer bei $\lambda=440\text{nm}$. Man sieht über den gesamten Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ eine Reflexionsminderung zum Zeitpunkt IOS_{\min} . Der Messzeitpunkt 2, IOS_{\min} , liegt im Mittel 9s vor der HSD. Zum Messzeitpunkt 3, IOS_{\max} , hat die Reflexion in allen erfassten Wellenlängenbereichen zugenommen. Dieser Intensitätszuwachs der Lichtreflexion ist bei $\lambda=400\text{nm}$ mit einem Anstieg von +17,3% verglichen mit dem Ausgangswert $R/R_0=1$ am stärksten ausgeprägt. Hier sind zugleich die maximalen Reflexionsquotienten zu finden. Der Messzeitpunkt IOS_{\max} ist im Zeitraster 30s nach dem elektrisch registrierten DC-Potenzialsprung bei der HSD einzuordnen. Drei Minuten nach Reoxygenierung nimmt die Stärke der IOS in den Wellenlängen $\lambda=340\text{--}420\text{nm}$ und $\lambda=460\text{--}680\text{nm}$ ab. Am meisten büßen die Reflexionsquotienten bei $\lambda=400\text{nm}$ an Stärke ein. Bei $\lambda=440\text{nm}$ nimmt die Reflexion leicht zu. Die Wellenlängenbereiche $\lambda=400\text{--}420\text{nm}$ und $\lambda=460\text{--}680\text{nm}$ zeigen auch drei Minuten nach Reoxygenierung noch eine Reflexion, die über dem Ausgangswert $R/R_0=1$ liegt.

Cyanid führt ebenso wie Sauerstoffentzug zu einer Blockade der Atmungskette. Es blockiert den Komplex IV. Es wurden die Effekte von niedrig konzentrierter Cyanidlösung ($10\mu\text{M}$) in Kombination mit N_2 und von höher konzentrierter Cyanidlösung (1mM) unter sonst normoxischen Bedingungen auf die HSD und die IOS-Entwicklung untersucht. In $10\mu\text{M}$ Cyanidlösung tritt die DC-Potenzialnegativierung früher auf als bei den Kontrollmessungen in Standard-ACSF ($\Delta t=182$). Die Amplitude bewegt sich im Mittel bei $-16,1\text{mV}$. Die Halbwertsbreite ist mit $\Delta t_{1/2}=78\text{s}$ ebenfalls größer als bei den Kontrollen.

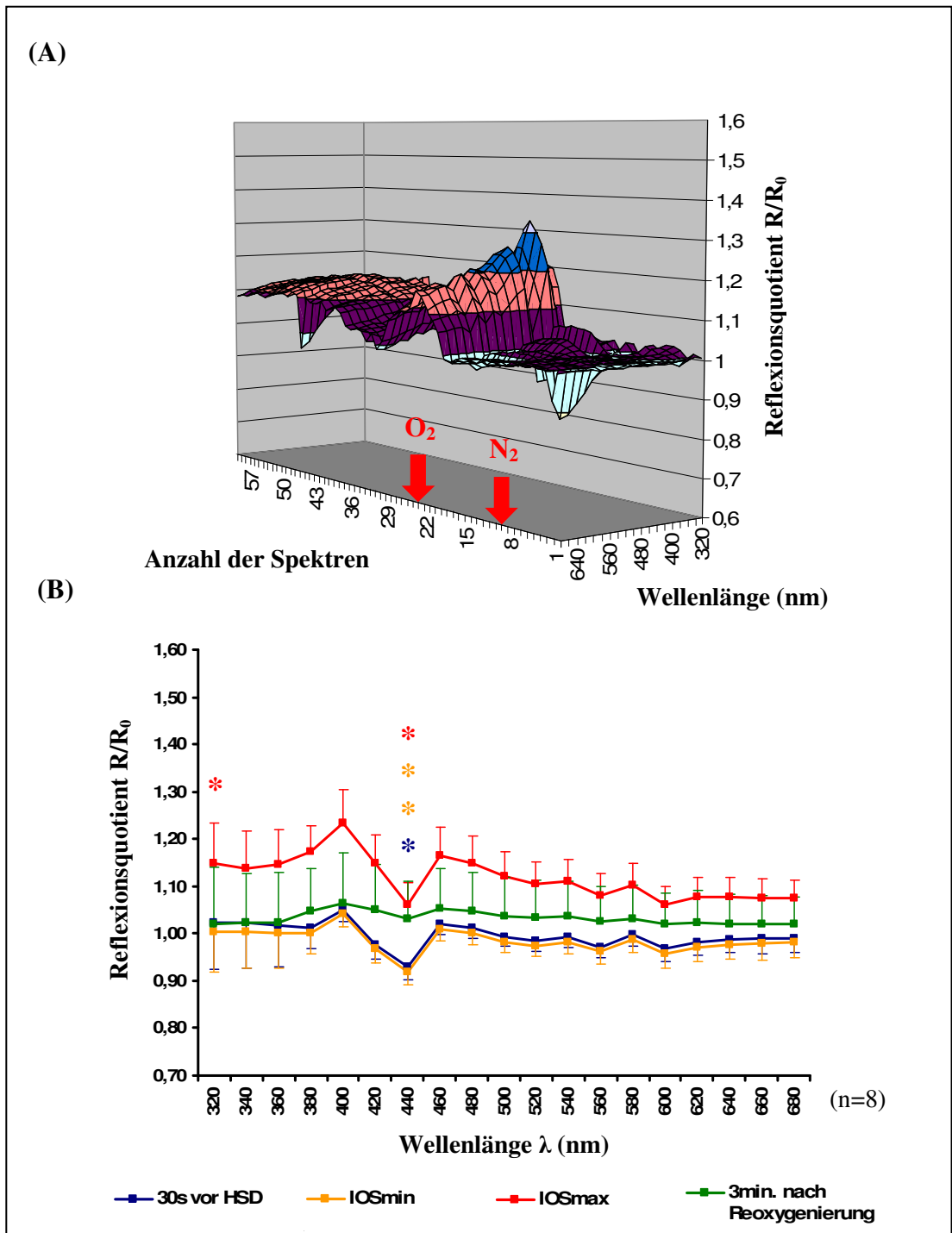


Abb. 22: (A) Oberflächendiagramm der Lichtreflexion während der HSD in 10 μ M Cyanidlösung. Die Reflexion nimmt weniger zu als bei den Kontrollen. Der initiale Reflexionsverlust bleibt wie bei den Kontrollen erhalten. Im Zuge der HSD steigt die Reflexion generell an, um nach Reoxygenierung wieder abzufallen. Im Anschluss werden die Reflexionsquotienten wieder größer und erreichen ein Plateau. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Reflexionssteigerung bei $\lambda < 400$ nm während der HSD ist auffällig (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Das Oberflächendiagramm in Abb. 22A stellt exemplarisch die Intensitätsentwicklung der Gewebereflexion für die Versuchsreihe mit 10 μ M Cyanidlösung dar. Der initiale Reflexionsrückgang ist wie bei den Messungen in Standard-ACSF bei $\lambda=440\text{nm}$ besonders ausgeprägt. Während der HSD steigt die Reflexion im ganzen Beobachtungsspektrum von $\lambda=320\text{-}680\text{nm}$ an. Dabei scheint $\lambda=440\text{nm}$ außen vor gelassen. Nach Reoxygenierung kommt es zu einer Rückbildung dieses Reflexionsanstieges auf Werte nahe dem normoxischen Ausgangsniveau. Dann folgt allerdings erneut ein leichter Anstieg der Reflexion, welcher ein Plateau erreicht, das bis zum Ende des Aufzeichnungszeitraums stabil bleibt. Hier ist kein so deutlicher Einschnitt im Profil bei $\lambda=440\text{nm}$ mehr zu beobachten.

Das Reflexionsmaximum liegt 30s vor der HSD in 10 μ M Cyanidlösung bei $\lambda=400\text{nm}$ ($R/R_0=1,051$). Das Minimum ist bei $\lambda=440\text{nm}$ mit $R/R_0=0,929$ zu finden (Abb. 22B). Zum Zeitpunkt 2, IOS_{min} , welcher durchschnittlich 11s vor der HSD liegt, werden die Reflexionsquotienten zwischen $\lambda=320\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$ schwächer. Die größten Reflexionsquotienten werden für alle 4 Zeitpunkte bei $\lambda=400\text{nm}$ bestimmt. Unter hypoxischen Bedingungen, d. h. zu den Messzeitpunkten 1 bis 3, sind die geringsten Reflexionsquotienten bei $\lambda=440\text{nm}$ zu finden. Bis zum dritten Messzeitpunkt, IOS_{max} , nimmt die Intensität der Gewebereflexion zwischen $\lambda=320\text{nm}$ und $\lambda=540\text{nm}$ um mehr als 10% zu. Nur bei $\lambda=440\text{nm}$ ist ein Einschnitt im Reflexionsprofil zu beobachten. Besonders stark ist der Intensitätszuwachs bei $\lambda=400\text{nm}$ mit einer Steigerung von +23,3% bezüglich des Aufzeichnungsbeginns. Drei Minuten nach Reoxygenierung nimmt die Lichtreflexion in ihrer Intensität im gesamten Wellenlängenbereich von $\lambda=320\text{-}680\text{nm}$ ab. Dennoch sind zum vierten Messzeitpunkt alle Mittelwerte der Reflexionsquotienten größer als der Ausgangswert $R/R_0=1$. Das Reflexionsmaximum liegt bei $\lambda=400\text{nm}$ ($R/R_0=1,064$). Bei $\lambda=320\text{nm}$ ist die Reflexion am geringsten ($R/R_0=1,019$).

Für die Versuchsreihe mit der 1mM Cyanidlösung wurde die HSD abweichend zu den anderen Messreihen allein durch das Einwaschen der Cyanidlösung hervorgerufen. Die Sauerstoffversorgung der Messkammer blieb erhalten. Höher konzentrierte Cyanidlösungen sind in der Lage auch in Anwesenheit von O_2 eine HSD zu induzieren

(Gerich et al. 2006). Unter diesen Bedingungen zeigt sich im DC-Potenzial nach einer Latenzzeit Δt von durchschnittlich 284s eine HSD. Die DC-Potenzialänderung erreicht Werte von $-13,2\text{mV}$. Die Halbwertsbreite misst 110s, wobei man das von den anderen Versuchsreihen abweichende methodische Vorgehen berücksichtigen muss. Ein schnelles Auswaschen der Cyanidionen ist nicht möglich.

Die Abb. 23A stellt den zeitlichen Verlauf der Gewebereflexion in 1mM Cyanidlösung exemplarisch dar. Der frühe Intensitätsanstieg der Reflexion zum Messzeitpunkt 1 zwischen $\lambda=380\text{nm}$ und $\lambda=420\text{nm}$ und der initiale Reflexionsverlust vor der HSD sind erkennbar. Als markanter und bis zum Ende des Aufzeichnungszeitraumes fortbestehender Wellenberg tritt die durch die HSD bedingte Reflexionssteigerung vor allem im Bereich $\lambda=360\text{--}460\text{nm}$ in Erscheinung. Der initiale Reflexionsrückgang ist durchschnittlich 132s vor der im DC-Potenzial gemessenen HSD am deutlichsten ausgeprägt. Dieser Zeitpunkt, IOS_{min} , liegt somit vor dem Zeitpunkt 1, 30s vor der HSD.

Die Reflexion zum Messzeitpunkt IOS_{min} hat in den Wellenlängenbereichen $\lambda>340\text{nm}$ merklich abgenommen (Abb. 23B). Es fehlt aber der deutliche Reflexionsverlust bei $\lambda=440\text{nm}$ im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Dieser war dort klar von den benachbarten Wellenlängen abgrenzbar.

Bereits 30s vor der HSD, ausgelöst durch 1mM Cyanidlösung, liegen die Reflexionsquotienten im Bereich $\lambda=380\text{--}420\text{nm}$ mehr als 10% über dem Ausgangswert $R/R_0=1$. Das Maximum befindet sich bei $\lambda=400\text{nm}$ mit $R/R_0=1,188$. Die Wellenlängen $\lambda=320\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$ haben eine leichte Reflexionsminderung bezüglich des Ausgangswertes erfahren. Durchschnittlich 39s nach der HSD ist die maximale Intensitätssteigerung der Lichtreflexion zu verzeichnen, welche zwischen $\lambda=380\text{nm}$ und $\lambda=580\text{nm}$ wiederum größer als 10% bezüglich des Aufzeichnungsbeginns ist. Das Reflexionsmaximum liegt bei $\lambda=400\text{nm}$ ($R/R_0=1,197$). In allen betrachteten Wellenlängenbereichen mit Ausnahme von $\lambda=680\text{nm}$ liegen die Reflexionsquotienten über dem Ausgangsniveau. Bis zum Messzeitpunkt 4, drei Minuten nach der HSD, nimmt die Gewebereflexion leicht ab, mit Ausnahme der Wellenlänge $\lambda=340\text{nm}$.

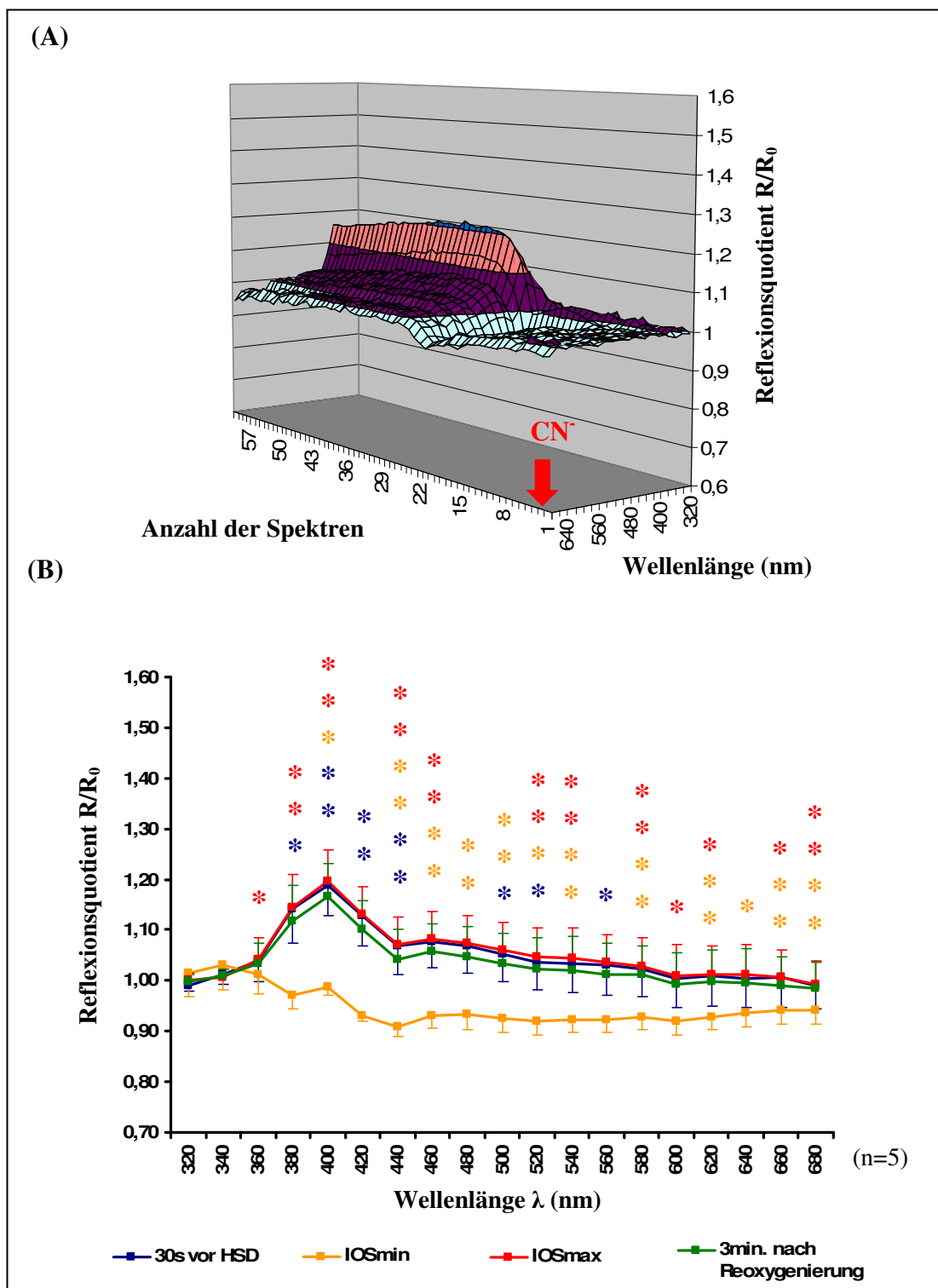


Abb. 23: (A) Gewebereflexion während einer HSD ausgelöst durch 1mM Cyanidlösung. Es kommt v. a. in den Wellenlängen $\lambda=360\text{--}460\text{nm}$ zu einer Reflexionszunahme, welche sich im Zeitverlauf nur sehr langsam zurückbildet. (B) Mittlere Reflexionsquotienten zu den vier definierten Messzeitpunkten (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Reflexion ändert sich nach der HSD nur sehr langsam (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

3.6 Vergleich der Messreihen untereinander zu den vier definierten Messzeitpunkten

3.6.1 Messzeitpunkt 1 (30s vor der HSD)

In der Abb. 24A sind die für die verschiedenen Lösungen ermittelten Reflexionsquotienten zum Messzeitpunkt 1 in einem Wellenlängenbereich von $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ dargestellt. Die Reflexionsmaxima liegen mit Ausnahme der Messungen in chloridarmer und FCCP-haltiger ACSF-Lösung bei $\lambda=400\text{nm}$. Im Vergleich zu den übrigen Messreihen ist die Reflexion 30s vor den durch 1mM Cyanidlösung provozierten HSDs am stärksten ($R/R_0=1,188$).

30s vor den durch Sauerstoffentzug eingeleiteten HSDs hat die Gewebereflexion bei $\lambda=440\text{nm}$ die geringste Intensität. Vor der dritten HSD in Standard-ACSF sind die Reflexionsquotienten über alle Messreihen gesehen am kleinsten ($R/R_0=0,840$). Vor allem heben sich die Reflexionsquotienten für die Messungen mit 1mM Cyanidlösung von den Kontrollmessungen in Standard-ACSF ab. Bei $\lambda=440\text{nm}$ ist dieser Unterschied mit +22,8% am stärksten ausgeprägt. Auch bei den anderen Messreihen ist die Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$ als markanter Punkt im Diagramm anzusehen, da sich hier in den meisten Fällen das Reflexionsminimum befindet.

Die Reflexion unterscheidet sich in den durchgeführten Messreihen in den Mittelwerten nur gering von den Kontrollen. Es gibt einzelne Ausnahmen, nämlich die Messungen einiger Reflexionsquotienten in 1mM Cyanidlösung und in FCCP-haltiger ACSF-Lösung. Die größten Unterschiede sind in der 1mM Cyanidlösung zu erkennen. Dort sind die Reflexionsquotienten im Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ um durchschnittlich 8,0% über den Kontrollmessungen angesiedelt. In 1mM Cyanidlösung ist der sonst so tiefe Einschnitt in der Kurve bei $\lambda=440\text{nm}$ nur leicht angedeutet.

3.6.2 Messzeitpunkt 2 (IOS_{\min} bzw. $IOS_{\min 1}$)

Zum zweiten Messzeitpunkt, IOS_{\min} , weichen die Reflexionsquotienten in den Messreihen der repetitiven HSDs, der HSDs in hypertoner, FAC-haltiger, FCCP-haltiger und in der $10\mu\text{M}$ Cyanidlösung kaum von den Vergleichsmessungen, den ersten HSDs in Standard-Lösung, ab (Abb. 24B).

In der chloridarmen Lösung zeigen sich deutliche Unterschiede ($IOS_{\min 1}$). Dort werden die Werte der Kontrollmessungen um bis zu 7,7% bei $\lambda=480\text{nm}$ unterschritten. Im Mittel ist die Reflexion für diese Messreihe im Wellenlängenbereich $\lambda=340\text{--}680\text{nm}$ um 6,0% kleiner. Bei den Messungen in hypotoner Lösung ist die Reflexion besonders in den Bereichen $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=460\text{--}480\text{nm}$ größer als in den Vergleichsmessungen. Dasselbe gilt für die Versuchsreihe in 1mM Cyanidlösung für die Wellenlängen $\lambda=440\text{--}480\text{nm}$.

Alle Versuchsreihen haben ein gemeinsames Reflexionsminimum bei $\lambda=440\text{nm}$, welches im Diagramm als tiefer Einschnitt in allen Reflexionsprofilen imponiert (Abb. 24B). Der absolut kleinste Reflexionsquotient für diesen Messzeitpunkt wird bei $\lambda=440\text{nm}$ in chloridarmer Lösung gemessen ($R/R_0=0,812$). Die Reflexionsmaxima sind über mehrere Wellenlängen verteilt. Im Vergleich über alle Versuchsreihen ist die Lichtreflexion bei $\lambda=400\text{nm}$ in hypotoner Lösung am stärksten.

3.6.3 Messzeitpunkt 3 (IOS_{\max} bzw. $IOS_{\min 2}$)

Zum dritten Messzeitpunkt, dem Reflexionsmaximum unmittelbar nach dem elektrisch registrierten HSD-Beginn, zeigen sich die höchsten Reflexionsquotienten mit Ausnahme der chloridarmen Lösung immer bei $\lambda=400\text{nm}$. Davon ist der Mittelwert über die Messungen in hypotoner Lösung mit $R/R_0=1,391$ am größten. In hypertoner Lösung ist die Lichtreflexion verglichen mit den anderen Reflexionsmaxima bei $\lambda=400\text{nm}$ am geringsten ausgeprägt ($R/R_0=1,064$) (Abb. 24C).

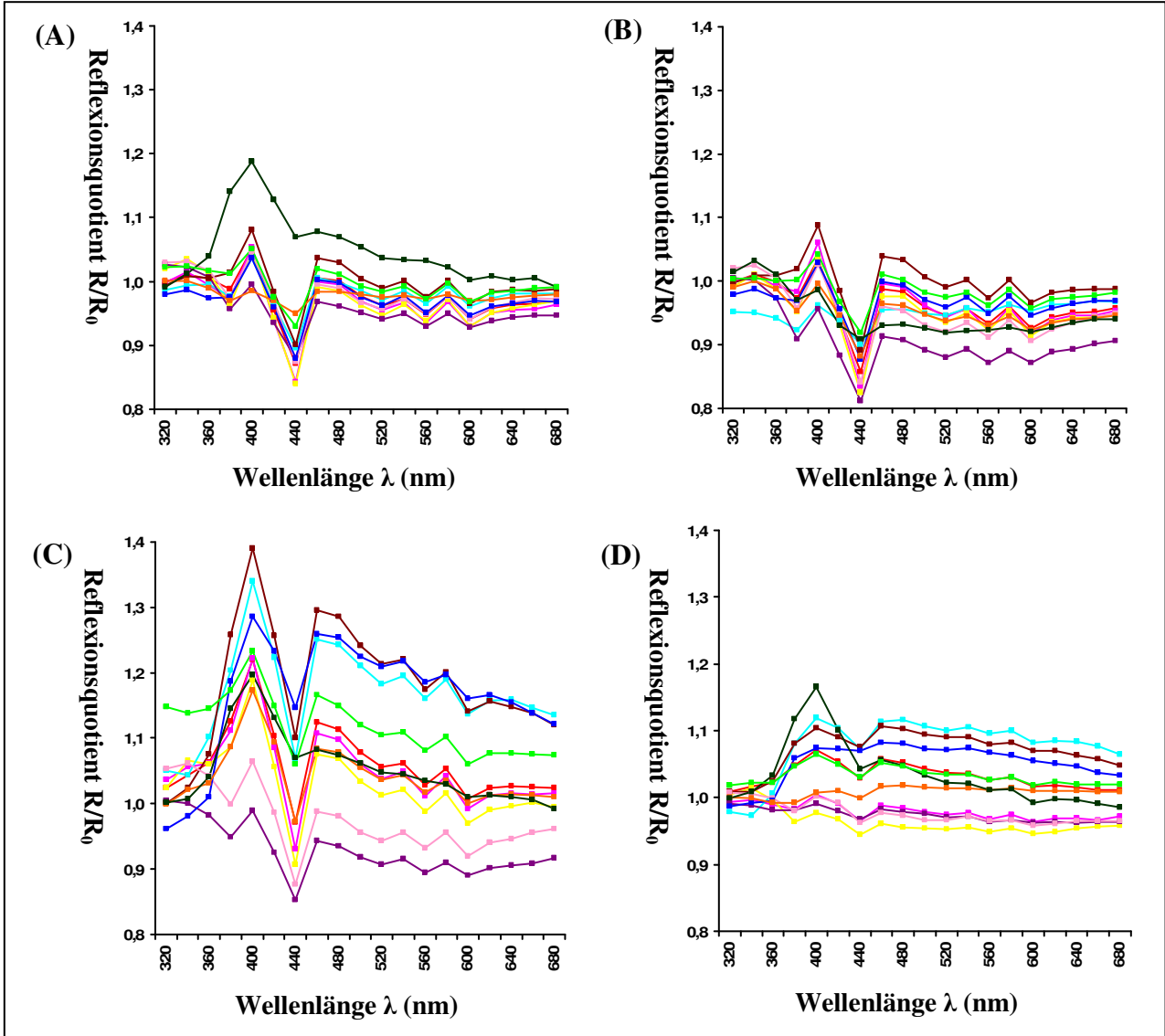


Abb. 24: Mittlere Reflexionsquotienten für die definierten Messzeitpunkte: (A) Messzeitpunkt 1, (B) Messzeitpunkt 2, (C) Messzeitpunkt 3, (D) Messzeitpunkt 4.

Ein nicht ganz so einheitliches Bild bezüglich der Wellenlängenzuordnung zeigen die Reflexionsminima. Diese sind über den gesamten Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ verteilt. Das absolute Reflexionsminimum lässt sich für die Mittelwerte der Messungen in chloridarmer Lösung bei $\lambda=440\text{nm}$ mit $R/R_0=0,862$ bestimmen. Den wohl deutlichsten Reflexionsunterschied findet man bei der chloridarmen Lösung im Bereich $\lambda=400\text{nm}$. Hier liegen die Reflexionsquotienten durchschnittlich 13,4% unter denen der Vergleichsmessungen. Im Wellenlängenbereich $\lambda=440\text{nm}$ zeigen sich in FAC-haltiger ACSF-Lösung ähnliche Abweichungen. Bei $\lambda=440\text{nm}$ ist dort der Reflexionsquotient durchschnittlich 18,2% größer als bei den Kontrollen. Dennoch liegt das absolute Reflexionsmaximum für den Zeitpunkt 3 bei $\lambda=400\text{nm}$ in der Messreihe mit der hypotonen ACSF-Lösung. Beim Betrachten der Kurven in der Abb. 24C fällt der tiefe Einschnitt bei $\lambda=440\text{nm}$ auf. Er ist bei den Versuchen mit 1mM Cyanidlösung schwächer ausgeprägt.

Für die HSDs in chloridarmer Lösung wird zum Zeitpunkt 3 der zweite Einbruch im Reflexionsprofil beobachtet. Deshalb wird hier, mit etwas zeitlicher Verzögerung zur HSD, ein zweites Reflexionsminimum abgelesen ($IOS_{\min 2}$). In chloridarmer Lösung wird zu diesem Zeitpunkt Licht der Wellenlänge $\lambda=340\text{nm}$ am meisten reflektiert ($R/R_0=0,997$).

3.6.4 Messzeitpunkt 4 (3 Minuten nach Reoxygenierung bzw. nach der HSD)

Drei Minuten nach Reoxygenierung bzw. nach der HSD liegen die Maxima der Reflexion bei den ersten und zweiten HSDs in Standard-ACSF, in kalziumfreier und chloridarmer sowie in den beiden Cyanidlösungen bei $\lambda=400\text{nm}$. Die absolut stärkste Lichtreflexion wird in 1mM Cyanidlösung mit $R/R_0=1,166$ bei $\lambda=400\text{nm}$ aufgezeichnet (Abb. 24D).

Die Reflexionsminima liegen je nach verwendeter Lösung über den gesamten Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ verteilt. Für die dritte HSD in Standard-ACSF wird bei $\lambda=440\text{nm}$ der kleinste Reflexionsquotient zu diesem Zeitpunkt gemessen ($R/R_0=0,944$).

Im Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{--}360\text{nm}$ zeigen alle Versuchsreihen mit ihren Reflexionsquotienten nur geringe Abweichungen von den Kontrollmessungen. Gleiches gilt für die gesamten Versuchsreihen mit $10\mu\text{M}$ Cyanidlösung und FAC-haltigem ACSF. Die größte Abweichung von den Kontrollen liegt bei $\lambda=460\text{nm}$ während der Messungen für die dritte HSD in Standard-Lösung mit einem Reflexionsverlust von $-9,1\%$ vor. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Reflexion in hypotoner Lösung bei $\lambda=320\text{nm}$ nicht von den Vergleichsmessungen. Der zum Messzeitpunkt 3 deutlich ausgeprägte Einschnitt bei $\lambda=440\text{nm}$ ist drei Minuten nach Reoxygenierung bzw. nach der HSD nur noch dezent angedeutet.

4 Besprechung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Angaben in der Literatur

4.1 IOS-Verlauf und DC-Potenzialänderungen während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung

Wie bereits aus dem Kapitel 3.1 „Veränderungen im Reflexionsverhalten des Hippokampusgewebes während repetitiver HSDs in Standard-ACSF-Lösung“ hervorgeht, beträgt die Latenzzeit zwischen Stickstoffgabe und der ersten HSD in Standard-ACSF 128s. Die DC-Potenzialnegativierung ergibt eine mittlere Amplitude von $-14,8\text{mV}$. Die Halbwertsbreite $\Delta t_{1/2}$ der HSD wurde durchschnittlich mit 65s bestimmt. Müller und Somjen sowie Gerich et al. und Hepp und Müller führten elektrische HSD-Messungen unter Anwendung einer ähnlichen Methodik durch. In den drei Arbeiten wurden ebenfalls die charakteristischen Parameter Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$ ermittelt (Müller und Somjen 1998, Gerich et al. 2006, Hepp und Müller 2008). Die Abb. 25 stellt vergleichend die Mittelwerte dieser Messgrößen der jeweils ersten HSDs dar.

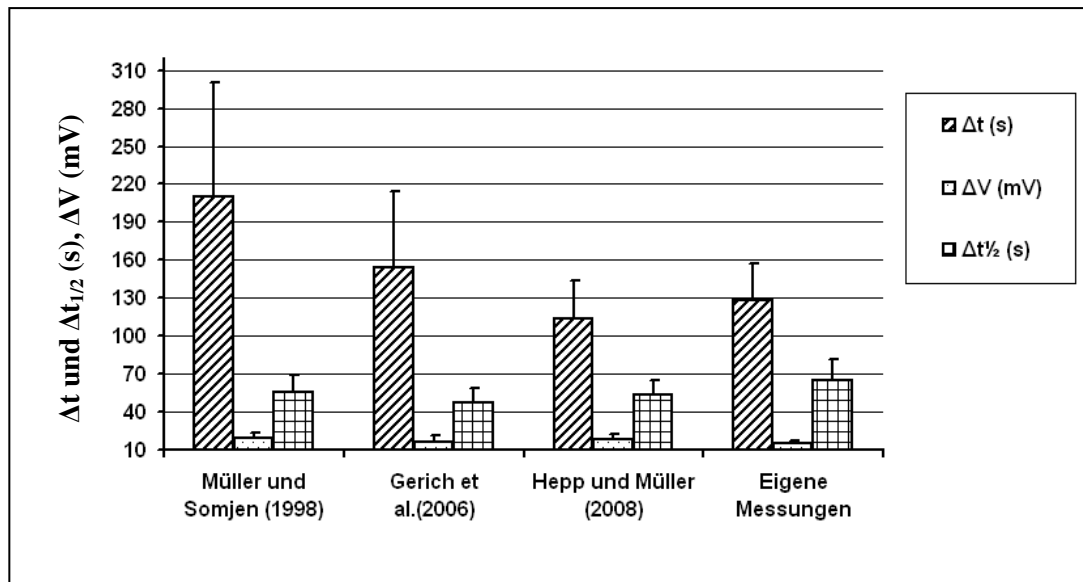


Abb. 25: Vergleich der charakteristischen DC-Potenzial-Parameter Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$ mit den aufgeführten Literaturquellen

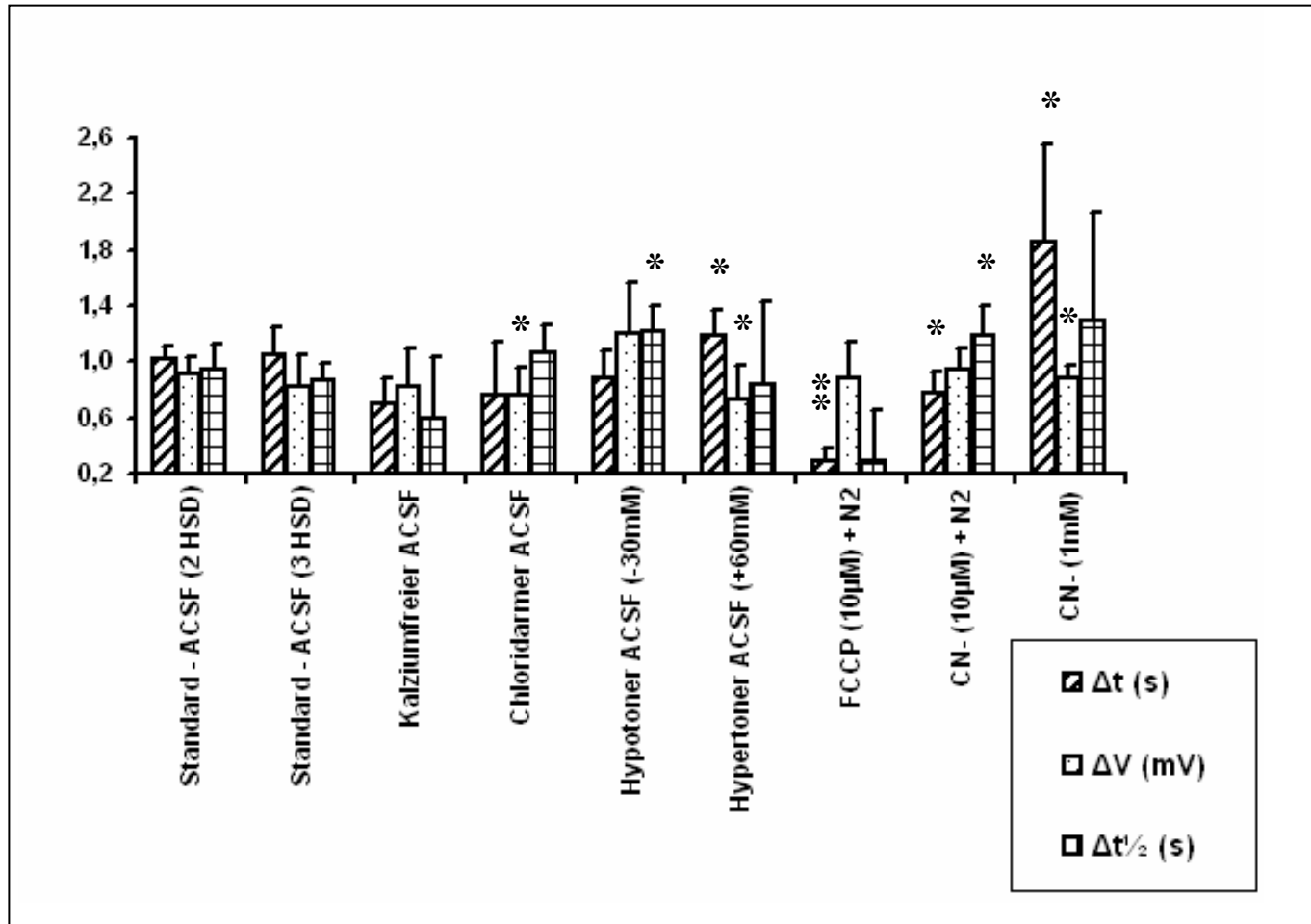


Abb. 26: Quotienten der Parameter Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$ in den verschiedenen Lösungen in Bezug auf die korrespondierenden Kontrollmessungen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Die Latenzzeit zwischen Hypoxiebeginn und HSD ist bei den Versuchen von Müller und Somjen mit $\Delta t=210\text{s}$ am längsten. Im Vergleich zu den eigenen Messungen ist sie um 64,0% größer. Hepp und Müller ermittelten mit $\Delta t=114\text{s}$ eine etwas kürzere Zeitspanne, welche 11,0% unter der in dieser Arbeit bestimmten Latenz lag. Für die Amplitude liegen die Vergleichswerte in der Literatur durchgehend über den Werten der eigenen Messungen. Am stärksten werden diese durch die von Müller und Somjen bestimmten DC-Potenzialsprünge ΔV übertroffen (+27%). Die Halbwertsbreite ist in den drei für die Vergleiche zu Grunde liegenden Versuchsreihen stets geringer ausgeprägt als in den hier durchgeführten Messungen (1. HSD). In den Messungen von Gerich et al. ist $\Delta t_{1/2}$ um 28% kleiner (Müller und Somjen 1998, Gerich et al. 2006, Hepp und Müller 2008). Ursachen dafür könnten auch moderate Unterschiede der verwendeten Messapparaturen und Versuchsbedingungen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals IOS im Detail spektral definiert gemessen. Bisherige Arbeiten verwandten fast immer nur weißes Licht, so dass Vergleichswerte nicht vorliegen. Für die IOS-Entwicklung ergeben sich folgende Charakteristika. Bereits nach Hypoxiebeginn, 30s vor der HSD, ist ein massiver Einbruch der spektral aufgelösten IOS-Intensität bei $\lambda=440\text{nm}$ zu beobachten. Für die ersten HSDs beträgt dieser durchschnittlich -12,9%. Zugleich nehmen die IOS bei $\lambda=400\text{nm}$ an Stärke zu. Dieser Intensitätszuwachs ist vor der ersten HSD mit +5,1% bezüglich des normoxischen Ausgangswertes zu beziffern. Vor der ersten HSD kommt es im ganzen beobachteten Wellenlängenbereich von $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ zu einer Reflexionsabnahme, welche quantitativ eher gering ausfällt, wenn man sie mit dem sich anschließenden Reflexionsanstieg während der HSD vergleichen möchte. Die Reflexion nimmt lediglich um maximal 0,2% ab ($\lambda=480\text{nm}$). IOS_{\min} wird im Mittel 21s vor der HSD bestimmt. Der Reflexionsrückgang kurz vor der HSD lässt sich mit der eine Depolarisation begleitenden Zellschwellung erklären, die in der Frühphase der HSD v. a. in den Gliazellen auftreten dürfte (Somjen 2001).

Gefolgt wird die Reflexionsabnahme von einer generellen Reflexionszunahme bei der HSD. Diese tritt mit einer zeitlichen Verzögerung von 32s nach der HSD auf. Dabei

sind die Wellenlängen $\lambda=380\text{--}420\text{nm}$ sowie $\lambda=460\text{--}480\text{nm}$ während der ersten HSD mit Intensitätssteigerungen von mehr als 10% besonders hervorzuheben.

Die stärksten IOS werden zu den ersten drei Messzeitpunkten bei $\lambda=400\text{nm}$ ermittelt. Bei $\lambda=400\text{nm}$ sind die Reflexionsquotienten zudem verglichen mit dem Zeitpunkt IOS_{min} am deutlichsten angestiegen. Aus diesem Reflexionsmuster ist zu schlussfolgern, dass es Strukturen oder Moleküle gibt, die unter hypoxischen Bedingungen bzw. während der HSD ihr Reflexionsverhalten derart ändern, dass in Summe bedeutend mehr Licht im Bereich $\lambda=400\text{nm}$ reflektiert wird als unter normoxischen Bedingungen. Ähnliches gilt für die Minima bei $\lambda=440\text{nm}$. Hier müssen Zellorganellen oder Moleküle dazu beitragen, dass unter den eben genannten Voraussetzungen die Reflexion abnimmt und das eingestrahelte Licht offenbar absorbiert wird.

Potenzielle Kandidaten dazu wären die Cytochrome a, a₃, und c der mitochondrialen Atmungskette. Diese zeigen abhängig von ihrem oxidativen Status charakteristische Absorptionsbanden. Unter reduzierenden Bedingungen kommt es zu einem Anstieg der Absorption (Foster et al. 2006). Die Absorptionsänderung von Cytochrom c kann als Marker für die O₂-Verfügbarkeit angesehen werden (Foster et al. 2006).

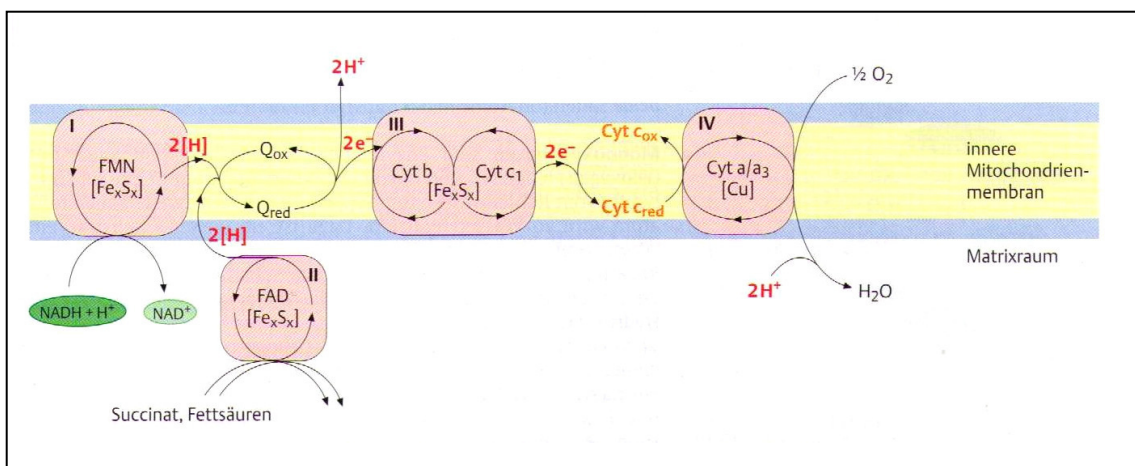


Abb. 27: Komplexe I-IV der mitochondrialen Atmungskette; *I* NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, *II* Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, *III* Ubihydrochinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase, *IV* Cytochrom c-Oxidase (nach Karlson et al. 2005, S. 191)

Um den Spektralbereich um $\lambda=400\text{nm}$ sind die so genannten Soret-Banden lokalisiert. Diese beschreiben ein sich veränderndes Absorptionsverhalten von Porphyrinen, wie sie auch in den Cytochromen der Mitochondrien vorkommen (Shkirman et al. 1999). Unter hypoxischen Bedingungen steigt v. a. die Absorption der Cytochrome a und a_3 etwa bei der Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$ an. Im Bereich von ungefähr $\lambda=420\text{nm}$ erfährt Cytochrom c eine Absorptionssteigerung (Sick und Perez-Pinzon 1999). Das erklärt den tiefen Einschnitt in den Reflexionsprofilen bei $\lambda=440\text{nm}$ unter Sauerstoffentzug.

Die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette ist an das Vorhandensein von Sauerstoff gebunden. Demnach sind hier sehr früh nach Hypoxiebeginn Veränderungen zu erwarten. Man sollte sich dabei vor Augen führen, dass bereits nach siebenminütigem Sauerstoff- und Glucoseentzug der ATP-Gehalt in hippokampalen Nervenzellen um ca. 70% abnimmt (Foster et al. 2006). Sowohl bei den Kontrollmessungen als auch bei den anderen Versuchsreihen, mit Ausnahme der Messungen in 1mM Cyanidlösung, steigt die Gewebereflection bei der Wellenlänge $\lambda=400\text{nm}$ unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den angrenzenden Wellenlängenbereichen stärker an. Somit liegt dieser Effekt am ehesten in der Reaktion auf den Sauerstoffentzug begründet. Durch die Hypoxie werden die normalen Abläufe in der Atmungskette gestört. So reichert sich u. a. das Ausgangssubstrat NADH an, welches Licht im Bereich von $\lambda=400\text{--}460\text{nm}$ emittiert, wenn es mit UV-Licht ($\lambda=340\text{--}360\text{nm}$) angeregt wurde (Foster et al. 2006). Sick und Perez-Pinzon zeigen sogar für den Wellenlängenbereich $\lambda=380\text{--}580\text{nm}$ eine Steigerung der Autofluoreszenz unter Hypoxie auf. Zudem weisen sie auf eine Rückbildung der Fluoreszenz nach Reoxygenierung hin (Sick und Perez-Pinzon 1999). Karlson et al. beschreiben die Absorptionssteigerung von NADH in reduzierter Form für den Wellenlängenbereich von etwa 300-380nm (Karlson et al. 2005).

Diese Autofluoreszenz des NADHs kann eine mögliche Begründung für die starke Reflexionssteigerung unter hypoxischen Bedingungen sein. Die NADH-Autofluoreszenz steigt innerhalb weniger Minuten unter hypoxischen Bedingungen um etwa 25% an (Foster et al. 2006). Eine gesteigerte NADH-Menge gilt als Indikator für einen anaeroben Energiestoffwechsel (Foster et al. 2006). Die Anreicherung von NADH

unter Sauerstoffentzug und die damit einhergehende Störung der mitochondrialen Atmungskette kann das Entstehen der IOS in den kurzen Wellenlängenbereichen erklären. Der tiefe Einschnitt bei $\lambda=440\text{nm}$ wird vermutlich durch die gesteigerte Absorption der Cytochrome a und a_3 verursacht, welche den durch NADH bedingten Reflexionsanstieg überdecken. Auch bei $\lambda=420\text{nm}$ kommt es vermutlich zu einer Überlagerung des NADH-Signals mit der Absorption des Cytochrom c.

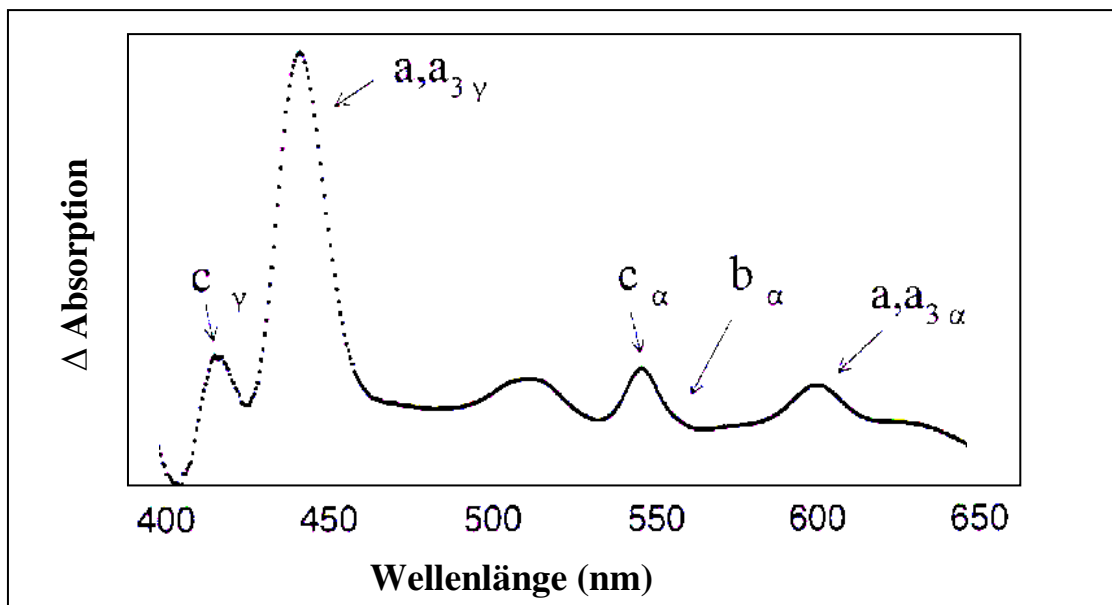


Abb. 28: Absorptionsspektrum aus den Differenzen von Messungen unter Normoxie und Hypoxie an hippokampalen Hirnschnitten. Die Absorptionsspitzen werden Strukturen der mitochondrialen Atmungskette, nämlich verschiedenen Cytochromen, zugeschrieben (nach Sick und Perez-Pinzon 1999, S. 106).

Drei Minuten nach Reoxygenierung kommt es nach der ersten HSD in den meisten Wellenlängen zu einem Rückgang der IOS. Lediglich bei $\lambda=440\text{nm}$ und $\lambda=600\text{nm}$ steigt die Reflexion an. Bei $\lambda=440\text{nm}$ beträgt dieser Anstieg sogar +5,9%. Zum Messzeitpunkt 4 gibt es zudem weniger große Abweichungen der Reflexionsquotienten untereinander. Die Kurve wirkt geglättet. Die vermutlich durch Hypoxie und die HSD verursachten Veränderungen scheinen rückläufig zu sein, nachdem die Reoxygenierung erfolgte. Auch das deutet darauf hin, dass die dargelegten Veränderungen im Reflexionsmuster an Hypoxie und HSD gebunden sind. Die schnelle Rückbildung der durch den Sauerstoffentzug verursachten Veränderungen lässt sich ebenfalls mit dem Molekül NADH begründen. Sobald die Atmungskette nicht mehr in ihrer Funktion

gehemmt ist, wird NADH wieder verbraucht. Der Rückgang der Autofluoreszenz des NADHs erfolgt genau wie ihr Anstieg innerhalb weniger Minuten (Foster et al. 2006). Dieser Rückgang ist ähnlich schnell wie der Intensitätsrückgang der IOS nach Reoxygenierung.

Nach der ersten HSD nähern sich die Reflexionsquotienten dem Ausgangswert $R/R_0=1$ an, erreichen ihn aber nicht ganz. Deshalb kann man hier nicht von einer vollständigen Erholung im Beobachtungszeitraum sprechen. Anhand der Abb. 14 und Abb. 15 (S. 30 u. S. 33) ergibt sich ein typischer IOS-Verlauf über die Zeit. Dieser besteht aus dem initialen Reflexionsrückgang gefolgt von der raschen Reflexionszunahme bei der HSD. Kurz danach werden die IOS schwächer, zeigen nochmals einen geringen Anstieg und gleichen sich dann langsam dem Wert $R/R_0=1$ an (Abb. 29) (Müller und Somjen 1999).

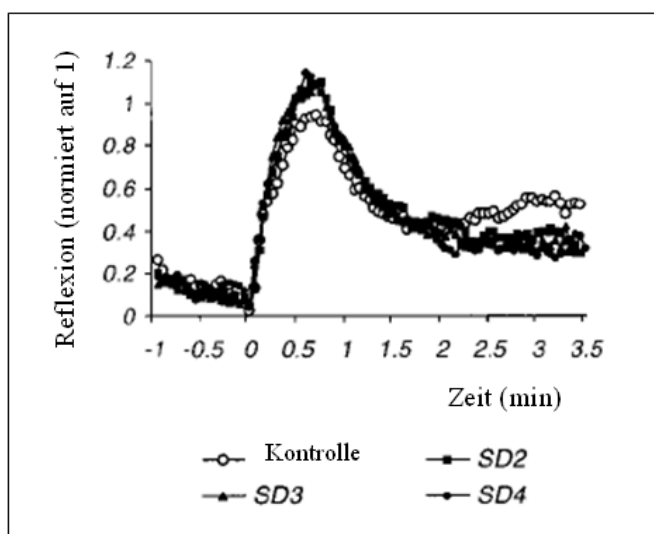


Abb. 29: Entwicklung der IOS im Zeitverlauf während repetitiver HSDs (nach Müller und Somjen 1999, S.1822)

Die nicht vollständige Erholung des Nervengewebes von der HSD bzw. der nochmalige Intensitätsanstieg der IOS im Anschluss an die HSD weisen auf eine mögliche irreversible Schädigung der Strukturen hin, die für die Entstehung der IOS nötig sind. Da die HSDs ihren räumlichen Ursprung im Dendritenbaum nehmen, im Bereich der Dendriten auch die IOS am deutlichsten ausgeprägt sind und die Mitochondrien dort in hoher Dichte vorkommen, sind diese morphologischen Strukturen vermutlich einer Schädigung durch die Hypoxie und die HSD ausgesetzt (Müller und Somjen 2000a,

Somjen 2001). Eine Dendritenschädigung unter Ischämie wird von Andrew und Kollegen beschrieben. Sie zeigt sich mit strukturellen Veränderungen am Dendritenbaum („dendritic beading“) (Andrew et al. 1999, S.193). Es resultiert ein gesteigertes und nicht reversibles Reflexionsverhalten (Andrew et al. 1999). Eine derartige Schädigung der Dendriten ist nicht vollständig reversibel (Somjen 2001).

Bei repetitiven HSDs in Standard-Lösung zeichnet sich von der ersten bis zur dritten HSD ein immer wiederkehrendes Muster in der Entwicklung der IOS ab. Bereits nach Hypoxiebeginn, 30s vor der HSD, ist ein massiver Einbruch der IOS-Intensität bei $\lambda=440\text{nm}$ zu beobachten. Für die ersten HSDs beträgt dieser durchschnittlich $-12,9\%$. Für die jeweils zweiten und dritten HSDs sind Intensitätsverluste von $-15,7\%$ und $-16,0\%$ zu erkennen. Zugleich nehmen die IOS bei $\lambda=400\text{nm}$ an Stärke zu. Dieser Intensitätszuwachs ist vor der ersten HSD mit $+5,1\%$ bezüglich des Ausgangswertes zu beziffern. 30s vor der zweiten HSD beträgt er $+5,3\%$ und vor der dritten HSD $+4,6\%$.

Wie schon bei den ersten HSDs in Standard-ACSF zeichnet sich auch vor den zweiten HSDs in Standard-Lösung tendenziell ein leichter Reflexionsrückgang zum Zeitpunkt 2 ab. Auch vor der dritten HSD ist wieder ein genereller Reflexionsrückgang zu verzeichnen, der bei $\lambda=320\text{nm}$ am deutlichsten ausgeprägt ist ($-2,7\%$). IOS_{\min} wird im Mittel 24s bzw. 18s vor den zweiten und dritten HSDs bestimmt. Der initiale Reflexionsverlust, welcher sowohl bei den Kontrollmessungen als auch bei den Messreihen in veränderter ACSF-Lösung zu beobachten war, wird von Müller und Somjen auf die Zellschwellung während der neuronalen Erregung zurückgeführt (Müller und Somjen 1999). Zudem tragen die Gliazellen ebenfalls dazu bei (Somjen 2001).

Eine Reflexionsabnahme bedingt durch Zellschwellung bei neuronaler Erregung ist mit den im Kapitel 1.2 „Intrinsische optische Signale“ getroffenen Vorüberlegungen vereinbar. Zudem unterscheiden sich die Reflexionsrückgänge zum Zeitpunkt IOS_{\min} in ihrem Ausmaß nicht so stark bei den verschiedenen Lösungen wie die darauf folgenden Reflexionsanstiege bei den HSDs. Das deutet darauf hin, dass der initiale Reflexionsrückgang fester mit der neuronalen Erregung verknüpft ist, als dass die

Lösungszusammensetzung einen großen Einfluss auf die Stärke der Reflexionsminderung hat.

Gefolgt wird die initiale Reflexionsabnahme von einer generellen Reflexionszunahme bei allen drei HSDs. Diese tritt mit einer zeitlichen Verzögerung von 32s, 9s und 20s nach der HSD auf. Dabei sind die Wellenlängen $\lambda=380\text{--}480\text{nm}$ während der ersten HSD mit Intensitätssteigerungen von mehr als 10% besonders hervorzuheben. Bei der zweiten HSD ist ein ähnlich starker Intensitätszuwachs zwischen $\lambda=380\text{--}520\text{nm}$ und bei der dritten HSD zwischen $\lambda=380\text{--}460\text{nm}$ angesiedelt. $\lambda=440\text{nm}$ ist grundsätzlich davon ausgenommen. Hieran ist der enge zeitliche Bezug zwischen den elektrisch registrierten HSDs und der Entstehung der IOS zu erkennen. Eine leichte Zeitverzögerung zwischen HSD-Beginn und Reflexionssteigerung geht bereits aus den Beobachtungen von Müller und Somjen hervor (Müller und Somjen 1999).

Die intensivsten IOS werden bei den drei Versuchsdurchgängen zu den ersten drei Zeitpunkten bei $\lambda=400\text{nm}$ gemessen. Bei $\lambda=400\text{nm}$ sind die Reflexionsquotienten zudem, verglichen mit dem hypoxischen Ausgangswerten, am deutlichsten angestiegen. Bei der ersten HSD misst dieser Anstieg +22,0%. Bei den nachfolgenden HSDs beträgt er +22,2% und +18,8%. Die Minima sind alle bei $\lambda=440\text{nm}$ zu finden.

Das entstehende Reflexionsprofil der ersten HSD in Standard-Lösung kehrt bei den wiederholten HSDs am gleichen Hippokampusgewebe in nahezu gleicher Form wieder. Es entstehen in enger zeitlicher Beziehung zur Hypoxie und der HSD zunächst eine Abschwächung der IOS vor der HSD sowie eine deutliche Steigerung der Reflexion während der HSD.

Nach Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung werden die IOS schwächer und nähern sich dem Ausgangswert an. Bei allen drei Messreihen wird die Reflexion im Bereich $\lambda=400\text{nm}$ besonders stark abgeschwächt, was sicherlich in dem zuvor beobachteten starken Reflexionsanstieg begründet liegt. Es erfolgt eine schwache, aber lang bestehende Reflexionssteigerung nach Reoxygenierung. Auf die reproduzierbaren Änderungen im Reflexionsverhalten wird durch Müller und Somjen hingewiesen

(Abb. 29, S. 63) (Müller und Somjen 1999). Nicht reversible Anteile der IOS treten offenbar kaum auf, weil Sauerstoff ca. 30s nach HSD-Auftreten bereits wieder zugeführt wurde.

Die dargestellte Dynamik in der IOS-Intensität lässt sich, wie bereits aufgeführt, zumindest teilweise mit dem Molekül NADH und den Cytochromen a, a₃ und c erklären. Der initiale Reflexionsrückgang ist durch Zellschwellung im Zuge der neuronalen Erregung zu begründen.

Die Parameter Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$ weisen bei den repetitiven HSDs in Standard-ACSF eher geringe Unterschiede bezüglich der ersten HSDs auf. Die Zeitspanne Δt ist bei der zweiten HSD um 3,3% (22,8s) größer. Es wird eine durchschnittlich 0,4mV (-7,5%) kleinere Amplitude gemessen. Die Halbwertsbreite ist um 5,3% vermindert. Im Vergleich dazu sind die Abweichungen bei der dritten HSD etwas größer. So ist Δt um 9,0% länger als bei der ersten HSD. Die Amplitude und die Halbwertsbreite sind um 17,1% bzw. 12,3% geringer als bei der ersten HSD in Standard-Lösung. Somit kann man sagen, dass bei den wiederholten HSDs am gleichen Nervengewebe die Latenzzeit Δt bis zum HSD-Beginn tendenziell etwas länger wird. Die Amplitude ΔV schwächt sich tendenziell mit der Anzahl der Wiederholungen ab. Gleiches gilt für die Halbwertsbreite. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen der ersten und den zwei folgenden HSDs bezüglich der Werte Δt , ΔV und $\Delta t_{1/2}$.

4.2 HSDs bei ionaler Veränderung der Lösungszusammensetzung

In kalziumfreier ACSF-Lösung sind alle Messgrößen der elektrischen Ableitungen im Vergleich zur Test-HSD im größeren Maß vermindert als bei den Kontrollmessungen in Standard-ACSF. Δt ist 24,9% kleiner, ΔV ist um 15,1% abgeschwächt. Diese Abweichungen sind zwar stärker ausgeprägt als bei den zweiten HSDs in Standard-ACSF, aber sie sind dennoch nicht signifikant (Abb. 26, S. 58). Das Gewebe scheint anfälliger gegenüber Hypoxie zu sein als in Standard-ACSF, es erholt sich aber auch etwas schneller. Ursache dafür dürfte die Steigerung der neuronalen Aktivität in kalziumfreier ACSF-Lösung sein.

Die Entwicklung der IOS bei den HSDs in kalziumfreier ACSF-Lösung weist viele Parallelen zu den Kontrollmessungen in Standard-Lösung auf. Besonders auffällig ist dabei die Verteilung der Reflexionsmaxima und -minima zu den ersten zwei Messzeitpunkten. Die Maxima befinden sich wie in Standard-ACSF bei $\lambda=400\text{nm}$. Die Minima liegen bei $\lambda=440\text{nm}$. Man kann also davon ausgehen, dass diesen frühen Intensitätsänderungen der IOS vermutlich die gleichen Mechanismen zu Grunde liegen, unabhängig davon, ob die verwendete Lösung Ca^{2+} -Ionen enthält oder nicht.

Eine weitere Gemeinsamkeit ist der initiale Reflexionsrückgang vor der HSD, welcher auch hier den gesamten beobachteten Wellenlängenbereich $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ erfasst. Dieser tritt in kalziumfreier Lösung früher und im größeren zeitlichen Abstand zu der sich anschließenden HSD auf. Die Zeitdifferenz zur HSD beträgt mit 58s mehr als das Doppelte im Vergleich zur ersten HSD der Kontrollmessungen (Quotient=2,73). Sie ist außerdem um das 2,4 fache und um das 3,3 fache größer als bei den zweiten oder dritten HSDs in Standard-Lösung. Somit scheint die Verfügbarkeit von Kalzium den initialen Reflexionsrückgang vor der HSD zu verzögern. Mit einer Latenz von 43s kommt es nach der HSD in kalziumfreiem ACSF zu einem generellen Intensitätsanstieg der IOS. Dieser tritt aber später auf als bei den Kontrollen (Quotienten der Latenzzeiten: 1. HSD 1,32, 2. HSD 4,96, 3. HSD 2,13). Daraus ergibt sich zum einen, dass Kalzium zum schnellen IOS-Anstieg nach der HSD beiträgt, und zum anderen, dass diese Beobachtung vermutlich wirklich auf die veränderten Ca^{2+} -Konzentrationen und nicht auf die Wiederholung der HSDs am gleichen Gewebe zurückzuführen ist.

Der mit der HSD einhergehende Reflexionsanstieg ist in kalziumfreier Lösung tendenziell stärker ausgeprägt als in Standard-ACSF. Er beträgt durchschnittlich +16,9%. In den Kontrollmessungen wurden über die Wellenlängen $\lambda=320\text{--}680\text{nm}$ Durchschnittswerte von +6,2% bei der ersten, +5,1% bei der zweiten und +2,9% bei der dritten HSD ermittelt. Demnach ist die Intensitätssteigerung der IOS in kalziumfreier Lösung mehr als doppelt so stark ausgeprägt. Als Konsequenz ergibt sich die Annahme, dass das Vorhandensein von Ca^{2+} -Ionen die neuronale Erregbarkeit und so auch die Intensitätssteigerung der IOS limitiert. Vermutlich werden Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle

aktiviert, was zu einer Einschränkung der neuronalen Erregbarkeit führt (Sah 1996). Kalziumionen können während einer Depolarisation zu einer nicht reversiblen Schädigung der Neurone führen (Somjen 2001, Müller 2005). Dabei stammen die Ca^{2+} -Ionen nicht nur aus dem Interstitium. Sie können auch aus intrazellulären Speichern, wie den Mitochondrien, freigesetzt werden (Somjen 2001). Kalzium trägt zur Aktivierung proteolytischer Enzyme bei, die die Neurone schädigen, wenn dauerhaft eine Kalziumlast besteht (Müller und Somjen 2000b, Müller 2005).

Unter der Voraussetzung, dass die ACSF-Lösung in dieser Versuchsreihe kalziumfrei war, sollte der schädigende Effekt des Kalziums eher abgeschwächt sein. Dennoch sind die Zellen von einer massiven Depolarisation betroffen. Die IOS während der HSD sind tendenziell deutlicher ausgeprägt, treten aber erst später als unter Standard-Bedingungen in ihrer Maximalform in Erscheinung. Das beweist, dass der Kalziumeinstrom in die Dendriten nicht Auslöser der IOS sein kann. Der initiale Reflexionsrückgang stellt sich früher ein als bei den Kontrollen. Das alles spricht für einen modulierenden Effekt des Kalziums auf die Entwicklung der HSD und der IOS. Kalzium stellt aber keine kausale Ursache für die HSD- oder die IOS-Entwicklung dar.

Drei Minuten nach Reoxygenierung ist es auch hier mit Ausnahme der Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$ (+0,4%) zu einer Abschwächung der Reflexion gekommen. Die Kurve wirkt ausgeglichener, die Maxima und Minima stechen nicht mehr so hervor, wie es vor allem zu den Zeitpunkten 2 und 3 der Fall ist. Im Bereich $\lambda=360\text{--}680\text{nm}$ sind die Reflexionsquotienten aber immer noch erkennbar größer als der Referenzwert $R/R_0=1$. Auch in den meisten Oberflächendiagrammen der Einzelmessungen ist eine erneute Reflexionszunahme zu erkennen, die Werte nahe den maximalen IOS erreicht. Diese bleibt zudem erhalten (Abb. 16A, S. 35). Das lässt vermuten, dass Kalzium bei der Rückbildung der durch Hypoxie und die HSD bedingten Veränderungen im Reflexionsverhalten eine wichtige Rolle spielt. Möglicherweise unterstützt eine verminderte Kalziumkonzentration, z. B. durch die erhöhte neuronale Erregbarkeit in den Zellen, die durch Hypoxie bedingte, partiell irreversible Dendritenschädigung, welche von den Arbeitsgruppen von Andrew und Somjen beschrieben wird (Andrew et al. 1999, Somjen 2001).

Eine starke Reduktion des Chloridgehaltes in der ACSF-Lösung führt wie die kalziumfreie Lösung zu einem Rückgang der HSD-Parameter Δt und ΔV . Δt ist 14,1% kleiner als bei den entsprechenden Test-HSDs. Die Amplitude ist um 22,2% abgeschwächt. Im Gegensatz zur kalziumfreien Lösung dauert die HSD bei geringer Chloridkonzentration 5,0% der Zeit länger an als unter Kontrollbedingungen. Das deutet auf eine Einschränkung des Regenerationsvermögens hin. Zudem kann von der Verkürzung von Δt auf eine erhöhte Anfälligkeit des Gewebes gegenüber Hypoxie geschlossen werden. Allerdings lässt eine verminderte Amplitude auch vermuten, dass die HSDs in chloridarmer Lösung nicht in vollem Umfang wie unter Kontrollbedingungen ablaufen. Die Abschwächung in der DC-Potenzialnegativierung ist im Vergleich zu den korrespondierenden Test-HSDs signifikant. Da die Abweichungen von der vorangegangenen Test-HSD teilweise größer sind als die bei den Kontrollmessungen, ist davon auszugehen, dass Cl^- -Ionen zumindest modulatorisch durch Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit auf die Entstehung und Entwicklung einer HSD wirken. Dieser Einfluss wurde bereits 2000 von Müller beschrieben (Müller 2000).

In chloridarmer ACSF-Lösung sind die Reflexionsminima zu den Zeitpunkten 1 bis 4 analog zu den Kontrollen bei $\lambda=440\text{nm}$ zu beobachten. Bei dieser Wellenlänge scheinen die gleichen Strukturen, wie schon für die Kontrollmessungen erwähnt, das eingestrahlte Licht zu absorbieren. Sie werden durch die Abwesenheit von Cl^- -Ionen offenbar wenig oder gar nicht beeinflusst.

Die Reflexionsmaxima liegen zu den Zeitpunkten 30s vor der HSD und $\text{IOS}_{\min 1}$ bei $\lambda=320\text{nm}$, sowie zum Zeitpunkt $\text{IOS}_{\min 2}$ bei $\lambda=340\text{nm}$. Im Gegensatz zu anderen Messreihen gibt es keine Maxima bei $\lambda=400\text{nm}$ unter hypoxischen Bedingungen. 10s vor der elektrisch registrierten HSD erfolgt wie bei den Test-HSDs in Standard-ACSF ein generalisierter initialer Reflexionsrückgang. Dieser befindet sich zeitlich näher an der HSD (Quotienten Δt : 1. HSD 0,47, 2. HSD 0,42, 3. HSD 0,57). Chloridionen scheinen somit zum frühen Reflexionsrückgang vor der HSD beizutragen. 33s nach der HSD in chloridarmer Lösung kommt es zu einem moderaten Reflexionsanstieg zwischen $\lambda=360\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$. Die Reflexionsquotienten sind aber auch dabei

kleiner als der Ausgangswert $R/R_0=1$. Der Anstieg der Reflexion ist nur von kurzer Dauer. Er wird von einem erneuten Reflexionsrückgang gefolgt, welcher alle Wellenlängenbereiche außer $\lambda=440\text{nm}$ erfasst ($\text{IOS}_{\text{min}2}$). Drei Minuten nach Reoxygenierung gewinnen die IOS erneut an Stärke, v. a. bei $\lambda=440\text{nm}$. Maximum und Minimum liegen bei $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=600\text{nm}$. Alle Reflexionsquotienten sind zu diesem Zeitpunkt kleiner als der Wert $R/R_0=1$. Es gibt signifikant geringere Veränderungen der IOS zum Zeitpunkt $\text{IOS}_{\text{min}1}$ verglichen mit den HSDs in Standard-Lösung. Die Kurven zu den einzelnen Messzeitpunkten zeigen eine ähnliche Verlaufsform und unterscheiden sich in ihren Messwerten nicht so stark voneinander wie die HSDs in Standard-ACSF. Drei Minuten nach Reoxygenierung wirkt die Kurve fast schon parallel zur x-Achse und weist keine markanten Punkte wie den in den Kontrollen beobachteten Einschnitt bei $\lambda=440\text{nm}$ unter hypoxischen Bedingungen auf. Dieser Einschnitt ist aber bei den vorangegangenen Messzeitpunkten sichtbar.

Ein mit der HSD einhergehender starker Anstieg der Intensität der IOS bleibt in chloridarmer ACSF-Lösung aus. Die Oberflächendiagramme geben oft ein nahezu spiegelbildlich wirkendes Bild verglichen mit den Kontrollmessungen ab (Abb. 17A, S. 38). Demnach ist der deutliche Reflexionsanstieg bei der HSD im hohen Maße chloridabhängig. Chloridionen tragen wesentlich zur Schwellung von Mitochondrien bei, die wiederum ein verändertes Reflexionsverhalten des hippokampalen Gewebes nach sich zieht (Müller und Somjen 1999). Die Mitochondrien machen ungefähr 17,3% des Volumens der Neurone bei der Ratte aus (Foster et al. 2006). Somit ist es vorstellbar, dass eine Veränderung im Volumen und in den optischen Eigenschaften dieser Zellorganellen auch einen Einfluss auf die registrierten IOS hat.

Lediglich der leichte Reflexionsrückgang vor der HSD und die starke Abschwächung der IOS während einer HSD in chloridarmer Lösung werden der Zellschwellung zugeschrieben, nicht aber die Entstehung der starken IOS während der HSD in chloridhaltiger ACSF-Lösung (Müller und Somjen 1999).

4.3 HSDs bei veränderter Lösungsosmolarität

Hypotone ACSF-Lösung bewirkt eine Verkürzung der Latenzzeit zwischen Stickstoffgabe und Beginn der HSD. Im Vergleich zu den Test-HSDs tritt die zweite HSD in hypotoner Lösung 8,0% der Zeitspanne Δt früher auf. Die HSDs haben nicht nur eine um mehr als ein Fünftel (22,9%) größere Amplitude als in Standard-Lösung, sie halten auch mehr als ein Fünftel der Zeit $\Delta t_{1/2}$ (21,6%) länger an. Für $\Delta t_{1/2}$ sind diese Abweichungen signifikant. Eine verminderte Osmolarität des ACSFs, die hier durch eine geringere Menge von NaCl in der Lösung bedingt ist, führt zu einer gesteigerten „synaptischen Übertragung“ und somit zu einer Modulation der HSD (Somjen 2001, S. 1081). Für stark hypotone Badlösungen wird sogar das Auftreten zahlreicher spontaner SDs beschrieben (Fayuk et al. 2002). SDs können bei verminderter Lösungsosmolarität auch unter normoxischen Bedingungen auftreten (Somjen 2001). Demnach wird das Gewebe durch niedrige Lösungsosmolarität für eine SD sensibilisiert, zumal auch das Interstitium kleiner und damit die ionale Homöostase noch anfälliger wird.

Bereits nach kurz andauernder Hypoxie haben sich 30s vor der zweiten HSD in hypotoner ACSF-Lösung das Reflexionsmaximum bei $\lambda=400\text{nm}$ und das Minimum bei $\lambda=440\text{nm}$ ausgebildet. Der Reflexionsanstieg unter hypoxischen Bedingungen unterscheidet sich für die Wellenlängen $\lambda=380\text{-}680\text{nm}$ signifikant von den Kontrollmessungen.

Der initiale Reflexionsverlust fällt mit maximal 1,0% ($\lambda=440\text{nm}$) eher gering aus und begrenzt sich auf die Wellenlängen $\lambda=440\text{nm}$, $\lambda=560\text{nm}$, $\lambda=620\text{-}640\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$. Der Messzeitpunkt IOS_{min} befindet sich 19s vor der HSD. Damit ist er etwas enger mit der HSD assoziiert als bei den Kontrollen (Quotienten Δt : 1. HSD 0,92, 2. HSD 0,82). 54s nach der HSD wird der Zeitpunkt IOS_{max} erreicht. Die stärksten IOS werden somit später erreicht als in Standard-Lösung (Quotienten der Latenzzeit: 1. HSD 1,66, 2. HSD 6,25, 3. HSD 2,68). Das bedeutet, dass eine verminderte Lösungsosmolarität (-30mM) sowohl den initialen Reflexionsrückgang verzögert und abschwächt als auch einen Anstieg der IOS-Intensität während der HSD später zulässt. Dennoch ist der

Reflexionsanstieg bei der HSD mit durchschnittlich +18,1% viel intensiver als unter Standard-Bedingungen. Dort werden für die erste und zweite HSD mittlere Anstiege von +6,2% und +5,1% erzielt. Wie bei den Kontrollen sind auch in hypotoner Lösung alle betrachteten Wellenlängen von $\lambda=320\text{nm}$ bis $\lambda=680\text{nm}$ an der Reflexionssteigerung beteiligt. Drei Minuten nach Reoxygenierung werden die IOS zwischen $\lambda=340\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$ zwar schwächer, aber kehren bei keiner Wellenlänge zum Ausgangswert $R/R_0=1$ zurück. Die Reflexionsminderung ist bei $\lambda=400\text{nm}$ bedingt durch den vorher starken Anstieg besonders ausgeprägt. Maximum und Minimum sind zu den Wellenlängen $\lambda=460\text{nm}$ und $\lambda=340\text{nm}$ verschoben. Die beschriebenen Veränderungen unterscheiden sich für die Wellenlängen $\lambda=380\text{nm}$ bis $\lambda=680\text{nm}$ signifikant von den korrespondierenden Test-HSDs (Abb. 18B, S. 40).

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Überlegung, dass Zellschwellung zu einer stärkeren Transmission und somit einer Abschwächung der Reflexion führt (Müller und Somjen 1999). Dem zufolge sind die IOS bei einer HSD auf andere Ursachen zurückzuführen als auf reine Veränderungen des Zellvolumens. Von Müller und Somjen wurde festgestellt, dass Zellschwellung und das Auftreten der IOS nicht zueinander in Beziehung stehen (Müller und Somjen 1999).

Bei Zellschwellung ist das Gewebe aber anfälliger gegenüber einer HSD, da das Interstitium verkleinert ist. Hypertone ACSF-Lösung hat den gegenteiligen Effekt. Die Verwendung von hypertoner Lösung bedingt eine längere Latenzzeit Δt (+25,3%). ΔV ist in Bezug auf die Test-HSD um 28,1% kleiner, $\Delta t_{1/2}$ ist um 6,9% größer. Für Δt und ΔV sind die Unterschiede signifikant. Eine größere Latenzzeit spricht für einen protektiven Effekt von erhöhter Lösungsmolarität gegenüber der Entstehung einer HSD. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Zellschrumpfung und die damit einhergehende Vergrößerung des interstitiellen Raums. Im Interstitium können nun beispielsweise mehr K^+ -Ionen aufgenommen werden, bevor sich deren Konzentration im gleichen Maß wie in isoosmolarer Lösung ändert. Die kleinere Amplitude und kürzere Dauer der HSD zeigen, dass weniger Zellen gleichzeitig depolarisieren und sich dann schneller vom hypoxischen Stress erholen. Die hohe Osmolarität schützt das Gewebe zum gewissen Grad vor einer HSD, was neben der Tatsache, dass eine

verminderte Lösungsosmolarität das Gewebe anfälliger für eine HSD macht, logisch erscheint.

In hypertoner Lösung bilden sich bereits nach kurzer Hypoxiedauer das Reflexionsmaximum und das Reflexionsminimum bei $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=440\text{nm}$ aus und bleiben bei diesen Wellenlängen auch bis zum Messzeitpunkt 3 unverändert bestehen. Es kommt kurz vor der HSD zu einer generellen Reflexionsabnahme zum zweiten Messzeitpunkt (IOS_{\min}) in den Wellenlängen $\lambda=380\text{nm}$ und $\lambda=420\text{-}680\text{nm}$. IOS_{\min} wurde 5s vor der HSD bestimmt. Das entspricht gerade etwas mehr als einem Fünftel der Zeit, die zwischen IOS_{\min} und der zweiten HSD in Standard-ACSF vergeht (Quotient=0,21). Dem schließt sich 33s nach der HSD ein Reflexionsanstieg bezüglich des normoxischen Ausgangswertes $R/R_0=1$ an, welcher auf die Spektralbereiche $\lambda=320\text{-}360\text{nm}$ und $\lambda=400\text{nm}$ begrenzt bleibt. Obwohl dieser nahezu zeitgleich zur Reflexionszunahme während der ersten HSD stattfindet, fällt er in hypertoner Lösung quantitativ deutlich geringer aus (1. HSD Kontrolle +6,2%). Zudem ist die Zeitspanne zwischen der HSD und IOS_{\max} hier fast vier Mal so lang wie bei der zweiten HSD in Standard-Lösung (Quotient der Latenzzeit=3,79). Zum Messzeitpunkt 3 wird nur bei $\lambda=320\text{-}360\text{nm}$ und bei $\lambda=400\text{nm}$ der Ausgangswert $R/R_0=1$ überschritten. Auch drei Minuten nach Reoxygenierung sind die Reflexionsquotienten in den Wellenlängenbereichen $\lambda>340\text{nm}$ kleiner als der normoxische Ausgangswert $R/R_0=1$, es erfolgt aber bei $\lambda=440\text{nm}$ und zwischen $\lambda=500\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$ ein Reflexionsanstieg, der als Annäherung an den Ausgangswert zu verstehen ist.

In hypertoner Lösung ist während der HSD in allen Wellenlängenbereichen eine Intensitätssteigerung der IOS zu verzeichnen, wenn man den Messzeitpunkt IOS_{\min} zum Vergleich nimmt. Diese ist aber deutlich schwächer als bei den repetitiven HSDs in Standard-Lösung oder in hypotoner Lösung. Diese Unterschiede sind zwischen $\lambda=380\text{nm}$ und $\lambda=640\text{nm}$ im Vergleich zu den Test-HSDs signifikant (Abb. 19, S. 42). Der sich fortsetzende Anstieg der IOS nach Reoxygenierung und die Annäherung an $R/R_0=1$ deuten auf eine langsame Erholung des Gewebes vom hypoxieinduzierten Stress hin. Der Einschnitt in der Kurve bei $\lambda=440\text{nm}$ ist nach Reoxygenierung aufgehoben.

4.4 HSDs bei ausgeschalteter Gliazellfunktion

Nachdem das Nervengewebe für mindestens drei Stunden einer Lösung des Gliazellgiftes FAC (5mM) ausgesetzt war, steigen sowohl die Latenzzeit als auch die Amplitude der ersten HSD um ca. ein Viertel im Vergleich zu den Kontrollmessungen in Standard-ACSF an ($\Delta t=+24,8\%$, $\Delta V=+25,7\%$). Die HSD dauert aber nur noch knapp ein Drittel der Zeit in Standard-Lösung (Quotient $\Delta t_{1/2}=0,27$).

Während der frühen Phase der Hypoxie, zu den Messzeitpunkten 1 und 2, liegt das Reflexionsmaximum bei $\lambda=400\text{nm}$. Auch das Minimum befindet sich wie bei den Kontrollmessungen in Standard-ACSF bei $\lambda=440\text{nm}$. 39s und damit fast doppelt so lange vor der HSD, verglichen mit den Test-HSDs, findet ein initialer Reflexionsrückgang statt (Quotient=1,85). Das bedeutet, intakt funktionierende Gliazellen verzögern den Beginn des initialen Reflexionsrückganges. Die IOS werden mit Ausnahme der Bereiche $\lambda=340\text{nm}$ und $\lambda=680\text{nm}$ schwächer. Dennoch ist dieser Reflexionsrückgang weniger stark ausgeprägt als bei den Kontrollen. Er beträgt hier maximal $-0,7\%$. Im Vergleich dazu wird in Standard-ACSF eine maximale Abschwächung von $-1,8\%$ erzielt ($\lambda=480\text{nm}$). Der initiale Reflexionsrückgang ist somit in FAC-haltiger ACSF-Lösung um bis zu $60,0\%$ schwächer als bei den ersten HSDs in Standard-Lösung. Daraus ergibt sich, dass die Gliazellen maßgeblich zum Reflexionsrückgang vor der HSD beitragen. Der Reflexionsrückgang ist auf das Anschwellen von Neuronen und Gliazellen während der neuronalen Erregung zurückzuführen.

42s nach dem DC-Potenzialsprung zu HSD-Beginn wird eine deutliche Zunahme der IOS um durchschnittlich $+16,3\%$, verglichen mit dem Ausgangswert, beobachtet. In Bezug auf die ersten HSDs in Standard-ACSF, welche einen mittleren Reflexionsanstieg von $+6,2\%$ erreichen, ist das ein etwa dreifach so starker Anstieg. Allerdings betrifft dieser in FAC-Lösung nur den Wellenlängenbereich $\lambda \geq 360\text{nm}$. Zudem werden auch die Wellenlängen $\lambda \geq 500\text{nm}$ deutlich sichtbar vom Reflexionsanstieg erfasst, welche bei den Kontrollen eher geringe Intensitätssteigerungen der IOS erkennen ließen. Bereits ab $\lambda \geq 420\text{nm}$ sind diese

Unterschiede signifikant (Abb. 20, S. 44). Der Reflexionsanstieg während der HSD tritt unter Ausschaltung der Gliazellen später auf und ist zudem auf die Wellenlängenbereiche $\lambda \geq 500\text{nm}$ ausgeweitet. Das deutet darauf hin, dass die Gliazellen zu einem schnelleren Anstieg der IOS nach der HSD führen. Das kann durch ihre passive Teilnahme an der Depolarisation und einer damit einhergehend größeren Zellzahl im beobachteten Gewebe begründet werden. Trotzdem ist das Auftreten von IOS nicht an das Vorhandensein funktionstüchtiger Gliazellen gekoppelt. Auch der schnellere HSD-Eintritt und die verstärkten IOS bei der Verwendung von FAC werden durch die Beobachtungen von Müller und Somjen gestützt (Müller und Somjen 1999). IOS treten auch bei glialer Intoxikation auf. Sie sind dann sogar stärker, was wiederum für eine regulatorische und protektive Funktion der Gliazellen spricht. Sie dämpfen die Intensitätsanstiege der IOS. Weiterhin scheinen sie die Reflexionssteigerungen im Bereich $\lambda \geq 500\text{nm}$ fast zu unterdrücken.

Drei Minuten nach Reoxygenierung nehmen die IOS bei $\lambda > 340\text{nm}$ ab. Das Minimum liegt bei $\lambda = 320\text{nm}$, das Maximum bei $\lambda = 460\text{nm}$. In den Wellenlängenbereichen $\lambda = 360\text{nm}$ bis $\lambda = 680\text{nm}$ bleibt die Reflexion um bis zu 8,2% bei $\lambda = 460\text{nm}$ über dem Ausgangswert $R/R_0 = 1$. Wie bei den Kontrollen wirkt die Kurve geglättet. Der bei Hypoxie sichtbare Einschnitt bei $\lambda = 440\text{nm}$ ist aufgehoben. Da in den Wellenlängenbereichen $\lambda = 400\text{nm}$ - 680nm die Reflexionsquotienten etwas über denen der Kontrollmessungen liegen, scheint die Erholung des Gewebes langsamer zu erfolgen. Somit ergibt sich, dass die Gliazellen wahrscheinlich einen Beitrag zur Rückbildung der durch die HSD hervorgerufenen Veränderungen im Reflexionsverhalten leisten.

4.5 HSDs bei mitochondrialer Intoxikation

Die Exposition der Zellen gegenüber $10\mu\text{M}$ FCCP-Lösung führt dazu, dass sich die Latenzzeit Δt auf 29,9% des Vergleichswertes in Standard-ACSF verkürzt. Ebenso zeigt sich ein Rückgang für den Parameter $\Delta t_{1/2}$, welcher um 46,3% vermindert ist. Geringere Verluste sind für die durchschnittliche Amplitude zu verzeichnen (-11,4%). Gerich et al. konnten bei Versuchen mit $10\mu\text{M}$ FCCP-Lösung einen um $31,0 \pm 11,6\%$ früheren Beginn der HSD aufzeigen. Die Amplituden dieser HSDs waren um $28,3 \pm 15,5\%$ gemindert.

Die Dauer der HSD ging um $28,0 \pm 25,0\%$ zurück (Gerich et al. 2006). Die Reduktion aller drei DC-Potenzialparameter deckt sich mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. FCCP, das die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt, besitzt somit die Fähigkeit, die Hypoxietoleranz des Hirngewebes signifikant einzuschränken (Gerich et al. 2006). Zudem ist eine sich gegenseitig potenzierende Wirkung der Noxen FCCP und Hypoxie zu vermuten, die zu einem so frühen HSD-Beginn verglichen mit den Kontrollmessungen führt. Die Verminderung der Amplitude im DC-Signal deutet auf eine geringere Anzahl synchron depolarisierender Neurone hin.

Unter Verwendung von FCCP, einem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, liegen das Reflexionsmaximum und das Reflexionsminimum anfänglich bei $\lambda=340\text{nm}$ bzw. $\lambda=440\text{nm}$. Im Mittel 9s vor der HSD stellt sich auch in FCCP-Lösung ein initialer Reflexionsverlust ein, der den gesamten Bereich von $\lambda=320\text{nm}$ bis $\lambda=680\text{nm}$ mit Ausnahme von $\lambda=400\text{nm}$ erfasst. Die Zeitspanne zwischen HSD und Reflexionsrückgang ist kürzer als bei den jeweils ersten und zweiten HSDs in Standard-Lösung (Quotienten Latenzzeit: 1. HSD 0,41, 2. HSD 0,37). Das spricht dafür, dass FCCP den anfänglichen Reflexionsrückgang hinauszögert und die Mitochondrien einen Beitrag zur frühen Phase des IOS-Verlaufs leisten. Laut Gerich und Kollegen existiert ein klarer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit des HSD-Beginns und der Depolarisation der Mitochondrien. Daher werden den Mitochondrien wichtige protektive Funktionen in der Frühphase der Hypoxie zugeschrieben (Gerich et al. 2006).

Durchschnittlich 30s nach der HSD kommt es zu einer generellen Zunahme der IOS im beobachteten Spektralbereich um $+4,1\%$. Die Wellenlänge $\lambda=400\text{nm}$ sticht mit einer Zunahme von $+17,8\%$ deutlich hervor. Der durchschnittliche Reflexionsanstieg ist mit dem unter Kontrollbedingungen vergleichbar. Bei den ersten HSDs betrug er dort $+6,2\%$ und bei den zweiten HSDs in Standard-Lösung $+5,1\%$. Die Latenz zwischen HSD und IOS_{max} ähnelt ebenfalls der der Kontrollmessungen. Sie ist nur um $7,2\%$ kleiner. Im Vergleich zu den zweiten HSDs in Standard-Lösung ergibt sich allerdings eine um den Faktor 3,5 längere Zeitspanne. Demnach hat FCCP wenig Einfluss auf die Entstehungsgeschwindigkeit und die Stärke der IOS im Anschluss an die HSD, wenn

man dafür den Vergleich mit den ersten HSDs zu Grunde legt. Man sollte aber beachten, dass die HSDs in FCCP-haltigem ACSF wesentlich früher beginnen.

Maximum und Minimum sind zum Zeitpunkt 3 bei $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=440\text{nm}$ anzutreffen, was eine weitere Gemeinsamkeit mit den Kontroll-HSDs darstellt. Drei Minuten nach Reoxygenierung sind die IOS im Bereich von $\lambda=320\text{nm}$ bis $\lambda=680\text{nm}$ wieder rückläufig. Vor allem bei $\lambda=400\text{nm}$ nehmen die IOS ab, was mit dem vorangegangenen starken Anstieg bei dieser Wellenlänge zu begründen ist (-14,2%). Das Reflexionsmaximum ist zu $\lambda=480\text{nm}$ verschoben. In den Wellenlängenbereichen $\lambda=400\text{--}420\text{nm}$ und $\lambda=460\text{--}680\text{nm}$ sind die Reflexionsquotienten immer noch größer als $R/R_0=1$, was auf eine noch nicht abgeschlossene Erholungsphase des Gewebes hindeutet. Es sollte aber bedacht werden, dass die Rückbildung der IOS im Bereich $\lambda=400\text{nm}$ im Gegensatz zu den Kontrollen nahezu vollständig erfolgt. Die Kurve verläuft fast parallel zur x-Achse.

In den Oberflächendiagrammen (Abb. 21, S. 46) ist erneut ein sich anschließender leichter Reflexionsanstieg zu erkennen. Der Einschnitt in den Kurven bei $\lambda=440\text{nm}$ wirkt zu allen 4 Messzeitpunkten nicht so deutlich wie in den Kontrollmessungen. Das deutet darauf hin, dass möglicherweise die Stoffwechselvorgänge der Mitochondrien zur starken Absorption bei dieser Wellenlänge beitragen. Die Entkopplung der Atmungskette führt dazu, dass der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran schnell abgebaut wird. Demzufolge wird die Erhaltung dieses Gradienten durch die Komplexe I–IV der Atmungskette angeregt und die Atmungskettenaktivität maximiert. Somit sind auch die Cytochrome, welche zu einer verstärkten Absorption v. a. in den Bereichen $\lambda=420\text{nm}$ und $\lambda=440\text{nm}$ führen, von einer Verschiebung ihres Redoxstatus hin zur Oxidation betroffen. Das schwächt möglicherweise den Einschnitt im Reflexionsprofil bei $\lambda=440\text{nm}$ ab, welcher bei den Messungen in Standard-ACSF, bei veränderter ionaler Lösungszusammensetzung und unterschiedlicher Lösungsmolarität unter hypoxischen Bedingungen deutlich zu erkennen ist.

Cyanidionen hemmen den Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette und greifen somit erheblich in den Stoffwechsel dieser Zellorganellen ein. Das Einwaschen von

niedrig konzentrierter Cyanidlösung in Verbindung mit Stickstoffgabe führt zu einem auf dem 5%-Niveau signifikant früheren HSD-Beginn (-18,2%) (Abb. 26, S. 58). Die Amplitude der DC-Potenzialnegativierung ist etwas schwächer (-3,6%) und das Gewebe braucht längere Zeit, um sich von der durch Cyanid und Sauerstoffentzug induzierten HSD zu erholen. $\Delta t_{1/2}$ ist 19,0% und damit signifikant länger als bei den Kontrollen. Ein früherer HSD-Beginn und eine langsamere Erholung nach der HSD deuten ähnlich wie bei den Messungen in FCCP-haltiger Lösung auf einen sich potenzierenden Effekt von CN^- -Ionen und O_2 -Mangel hin. Die mitochondriale Atmungskette wird gleich zweifach angegriffen.

In Kombination von 10 μM Cyanidlösung und Stickstoffgabe bleiben die Reflexionsmaxima und -minima zu den ersten 3 Messzeitpunkten, d. h. unter hypoxischen Bedingungen bei $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=440\text{nm}$. Bereits zu Beginn, 30s vor der HSD, steigt die Reflexion bei $\lambda=400\text{nm}$ um +5,1%. Bei $\lambda=440\text{nm}$ ist der Reflexionsrückgang mit -7,1% nicht ganz so stark wie bei den Kontrollen (-12,9%). Bis zum Messzeitpunkt 2, IOS_{min} , nehmen die Reflexionsquotienten in allen registrierten Wellenlängenbereichen leicht ab. Das ähnelt der Reflexionsabnahme in Standard-ACSF. Nur die Zeitspanne zwischen IOS_{min} und HSD ist in 10 μM Cyanidlösung mit 11s kürzer als bei den Kontrollen (Quotienten der Latenzzeit: 1. HSD 0,53, 2. HSD 0,48).

Somit beschleunigt auch die niedrig konzentrierte Cyanidlösung den initialen Reflexionsverlust in einer ähnlichen Größenordnung wie die FCCP-Lösung. Das erhärtet die Vermutung, dass diese frühe Phase der IOS-Entwicklung u. a. auf die Mitochondrien zurückzuführen ist. Die sich gegenseitig unterstützende Wirkung von Cyanid und Hypoxie wird hier ähnlich wie bei den elektrischen Messungen erkennbar.

Der Intensitätszuwachs der IOS während der HSD ist mit durchschnittlich +13,6% stärker ausgeprägt als bei den HSDs in Standard-Lösung (1. HSD +6,2%, 2. HSD +5,1%). Es wird ebenfalls der ganze Bereich von $\lambda=320\text{nm}$ bis $\lambda=680\text{nm}$ erfasst. Besonders stark ist der Anstieg bei $\lambda=400\text{nm}$ (+23,3%). Im Gegensatz zu den Test-HSDs liegt der durchschnittliche Reflexionsquotient auch bei $\lambda=440\text{nm}$ erkennbar

über dem Ausgangswert ($R/R_0=1,061$). In Standard-ACSF wird lediglich ein Reflexionsquotient von $R/R_0=0,971$ erreicht. Diese Unterschiede bei $\lambda=440\text{nm}$ sind zu den ersten drei Messzeitpunkten signifikant.

Wahrscheinlich tragen auch hier die Mitochondrien mit ihren Cytochromen zum Rückgang der IOS in normaler ACSF-Lösung bei. Weiterhin ist auffällig, dass die IOS auch in den Wellenlängenbereichen $\lambda < 400\text{nm}$ stärker ansteigen als bei den anderen verwendeten Lösungen. $\lambda=320\text{nm}$ unterscheidet sich sogar signifikant von den Test-HSDs. Demnach führt die Kombination von $10\mu\text{M}$ Cyanid und Sauerstoffentzug zu einer ausgeprägten Beeinträchtigung der Mitochondrien, die den Anstieg der IOS zwischen $\lambda=320\text{nm}$ und $\lambda=400\text{nm}$ noch verstärkt. Die Zeitverzögerung zwischen IOS_{max} und HSD beträgt mit 36s $10,3\%$ mehr als bei den ersten HSDs. Im Vergleich mit den zweiten HSDs unter Kontrollbedingungen ist die Zeitspanne mehr als vier Mal so lang (Quotient der Latenzzeit= $4,18$).

Drei Minuten nach Reoxygenierung bleibt das Maximum bei $\lambda=400\text{nm}$, das Minimum wandert zu $\lambda=320\text{nm}$. Die Reflexionsquotienten werden wie unter Kontrollbedingungen über alle Wellenlängen kleiner, v. a. bei $\lambda=400\text{nm}$ ($-13,7\%$). Dennoch bleiben sie über dem Ausgangswert $R/R_0=1$, was auf eine noch nicht abgeschlossene Erholung des Nervengewebes von der Hypoxie hindeutet. Maximum und Minimum haben sich wie bei den anderen Messungen aneinander angenähert.

Bei den Messungen, bei denen nur durch das Einwaschen von 1mM Cyanidlösung eine HSD generiert wurde, ist die Latenzzeit zwischen Cyanidgabe und HSD-Beginn fast doppelt so groß wie bei den Test-HSDs (Quotient $\Delta t=1,89$). Die Amplitude ist im Mittel $13,2\%$ kleiner. Sowohl für Δt als auch für ΔV weisen die Werte signifikante Unterschiede zu den Kontrollen auf ($p < 0,05$) (Abb. 26, S. 58). Die lange Latenz im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen liegt sicherlich v. a. in der geänderten Methodik begründet, die darin besteht unter normoxischen Bedingungen 1mM Cyanidlösung einzuwaschen. Die Cyanidionen müssen erst in das Gewebe diffundieren, was Zeit in Anspruch nimmt. Ebenso kann die kleinere Amplitude ΔV mit dem anderen Diffusionsverhalten von N_2 und CN^- ins Gewebe begründet werden. Gerich und

Kollegen lösten u. a. durch Einwaschen von 1 mM Cyanidlösung unter sonst normoxischen Bedingungen HSDs aus. Diese hatten mit $\Delta t=251\pm 34s$ eine ähnlich lange Latenzzeit wie die entsprechende Messreihe dieser Arbeit. Δt beträgt hier durchschnittlich 284s (siehe Kapitel 3.5 „HSDs bei mitochondrialer Intoxikation“ und Tab. 2). Die Amplitude von -13,2mV ist mit den von Gerich et al. publizierten ΔV -Werten von $-11\pm 1mV$ vergleichbar (Gerich et al. 2006).

In 1mM Cyanidlösung ist zu den Messzeitpunkten 1, 3 und 4 das Reflexionsmaximum bei $\lambda=400nm$ zu finden. Nur zum Zeitpunkt IOS_{min} kommt es zu einer Verlagerung zu $\lambda=340nm$ für das Maximum und $\lambda=440nm$ für das Minimum. Die Besonderheit bei dieser Messreihe ist, dass der sonst als Zeitpunkt 2 bezeichnete Messzeitpunkt IOS_{min} schon vor dem Messzeitpunkt 1, 30s vor der HSD, abgelesen wurde. IOS_{min} liegt im Mittel 132s vor der HSD. Das ist ein Mehrfaches der Zeitspanne, die unter Kontrollbedingungen bestimmt wurde (Quotienten der Latenzzeit: 1. HSD 6,27, 2. HSD 5,60). Dieser Zeitunterschied lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass hier die HSD nur durch das Einwaschen von 1mM Cyanidlösung unter sonst normoxischen Bedingungen ausgelöst wurde. Das Gewebe reagierte darauf langsamer als auf den Sauerstoffentzug, was auch in der verlängerten Zeitspanne Δt der elektrischen Messungen zu erkennen ist (siehe Abb. 26, S. 58).

Dennoch kommt es zum Zeitpunkt IOS_{min} zu einem deutlichen Rückgang der Reflexion um maximal 9,2% bei $\lambda=440nm$. Dieser weicht bei $\lambda=400nm$, $\lambda=440-540nm$, $\lambda=580nm$ und $\lambda=620-680nm$ signifikant von den Kontrollen ab. Das spricht wiederum für eine Beteiligung der Mitochondrien an der Frühphase der Hypoxie, wie bereits für die FCCP-haltige Lösung beschrieben wurde (Gerich et al. 2006).

30s vor der HSD befinden sich die IOS schon im Intensitätsanstieg. Dieser betrifft die Wellenlängen $\lambda=340-660nm$ und ist zwischen $\lambda=380-420nm$ größer als 10% in Bezug auf IOS_{min} . IOS_{max} wird 39s nach der HSD und damit gut ein Fünftel der Zeit später als bei den Kontrollen gemessen (Quotient der Latenzzeit: 1,21). Es kommt zu einem Reflexionsanstieg bei $\lambda>340nm$, welcher im Vergleich zum Messzeitpunkt IOS_{min} durchschnittlich +12,8% beträgt, sich aber nur um 0,5% zum Zeitpunkt 30s vor der

HSD unterscheidet. Auch im Hinblick auf den Zeitpunkt drei Minuten nach der HSD sind die Veränderungen mit einem maximalen Reflexionsrückgang bei $\lambda=420\text{nm}$ von $-2,7\%$ gering. Es scheint als würde das Gewebe auf die chemisch hervorgerufene Hypoxie durch Cyanid träger reagieren als auf den direkten Sauerstoffentzug. Man sollte aber gerade bei der Beurteilung des Messzeitpunktes 4 berücksichtigen, dass das Gewebe nicht reoxygeniert wurde, sondern weiterhin dem Cyanid ausgesetzt war. In den Oberflächendiagrammen bleiben die Reflexionsquotienten im Zeitverlauf hoch ohne vorher kleiner zu werden und erneut anzusteigen, wie es bei den Kontrollen und den anderen Messreihen der Fall ist (Abb. 23, S. 51).

Dieses Verhalten ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Mitochondrien vor allem in der frühen Phase der HSD zur Rückbildung der IOS-Intensität beitragen. In den Kurven ist zu keinem Zeitpunkt so ein markanter Einschnitt bei $\lambda=440\text{nm}$ zu erkennen wie bei den anderen Versuchsreihen. Eine suffiziente Intoxikation der Mitochondrien durch Cyanid scheint diesen aufzuheben. Somit tragen diese Zellorganellen zum Anstieg der Absorption bei $\lambda=440\text{nm}$ bei. Die Cytochrome, die vermutlich zu einer starken Absorption bei $\lambda=440\text{nm}$ und $\lambda=420\text{nm}$ führen, sind in der Atmungskette der Mitochondrien zu finden. So kann eine direkte Beeinträchtigung der Atmungskette durch die Hemmung des Komplex IV mit Cyanid offenbar dazu beitragen, dass die Menge der in reduzierter Form vorliegenden Cytochrome vermindert ist. Dann würde die Absorption bei der Wellenlänge $\lambda=440\text{nm}$ geringer sein. Das zeigt sich wiederum in einem fast nicht mehr erkennbaren Einschnitt im Reflexionsverhalten.

4.6 Methodenkritik

An dieser Stelle soll auf mögliche Schwankungen und die daraus eingeschränkte Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Messwerte eingegangen werden. Dies liegt u. a. an den individuellen Unterschieden der Tiere, von denen das Untersuchungsmaterial gewonnen wurde. Auch die Hippokampusformation war nicht in jedem Hirnschnitt identisch. Es wurde sowohl Gewebe untersucht, das den vorderen Teil des Hippokampus enthielt, als auch Gewebe, das eher kaudal gelegene Hippokampusstrukturen beinhaltete. Daraus ergibt sich weiterhin, dass die Position der

für die elektrischen Ableitungen eingestochenen Elektrode leicht variiert. Sie wurde zwar vor jeder Messung in die CA1-Region des *Stratum radiatum* eingestochen, aber traf sicherlich nicht jedes Mal exakt die gleichen Neuronengruppen.

Bei den eigentlichen Messungen habe ich einen Zeitraum von 15 Minuten pro Versuch in den elektrischen und optischen Aufzeichnungen festgehalten. Dieser stellte die Grundlage für die Auswertung der Daten dar. Mögliche Ereignisse elektrischer oder optischer Art, die außerhalb dieser Zeitspanne stattfanden, konnten nicht erfasst und bewertet werden. Bei der Auswertung der optischen Signale wurden diese im zeitlichen Zusammenhang mit den elektrischen betrachtet und der Reflexionsquotient bestimmt. Da die Intensitäten des reflektierten Lichtes aber nur alle 15 Sekunden gemessen wurden (daraus ergibt sich die Anzahl der Spektren), war auch das die Zeitauflösung, mit der man die Reflexionsquotienten ablesen konnte. Somit ist mitunter keine zeitlich hoch aufgelöste Aussage über die zum Zeitpunkt der HSD entstandenen IOS möglich. Da IOS aber langsame Signale sind, die sich im Bereich von Minuten ausbilden, sollte eine zeitliche Auflösung von 15s/Spektrum dennoch ausreichend sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Entstehungsmechanismen von intrinsischen optischen Signalen (IOS) während einer HSD im Hippokampusgewebe von Ratten genauer zu analysieren. IOS wurden dazu erstmals spektral definiert gemessen. Dabei wurde zum einen die ionale Lösungszusammensetzung des ACSF variiert und zum anderen wurden gezielt Zellorganellen, nämlich die Mitochondrien, in ihrer Funktion gehemmt. Des Weiteren wurden Gliazellen mit FAC intoxikiert.

IOS entstehen grundsätzlich im Zusammenhang mit einer HSD. Dabei sind sie im zeitlichen Rahmen einige Sekunden nach der HSD einzuordnen. Eine korrelative Beziehung zwischen der Stärke der abgeleiteten DC-Potenzialnegativierung für die HSD und der Intensität der IOS konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

In der Entwicklung der IOS sind mehrere markante Phasen zu unterscheiden. Bevor es im Anschluss an die HSD zu einer Intensitätssteigerung der IOS kommt, ist zunächst eine geringe Abschwächung der optischen Signale zu beobachten. Diese lässt sich auf die Schwellung von Neuronen und Gliazellen während der neuronalen Erregung zurückführen. Der HSD folgt unmittelbar eine deutliche Intensitätszunahme der IOS, die vor allem die Wellenlängenbereiche $\lambda=380-560\text{nm}$ erfasst (Abb. 30). Das kann teilweise mit dem Anstieg der Autofluoreszenz von NADH unter hypoxischen Bedingungen begründet werden. Betroffen sind vorrangig die Wellenlängen $\lambda=400-460\text{nm}$. Ein tiefer Einschnitt im Bereich um $\lambda=440\text{nm}$ im Reflexionsprofil ist auf die gesteigerte Absorption der mitochondrialen Cytochrome a, a_3 und c zurückzuführen.

Nach Reoxygenierung nimmt die IOS-Intensität wieder ab. Das Ausgangsniveau vor der Hypoxie wird aber nicht erreicht. Die IOS werden danach im gesamten beobachteten Wellenlängenbereich $\lambda=320-680\text{nm}$ erneut kräftiger. Dafür ist vermutlich die partiell irreversible Schädigung der Dendriten verantwortlich (dendritic beading). Dieser charakteristische Verlauf in der IOS-Entwicklung ist am gleichen Gewebe mehrfach reproduzierbar.

Ionensubstitutionsexperimente beweisen, dass Kalziumionen den Intensitätszuwachs der IOS limitieren. Zudem ist die Intensitätszunahme der IOS strikt chloridabhängig. In chloridarmer Lösung kommt es an dieser Stelle zu einem Reflexionsrückgang. Hypotone ACSF-Lösung intensiviert die IOS. Im Gegensatz dazu werden die optischen Signale in hypertoner Lösung abgeschwächt.

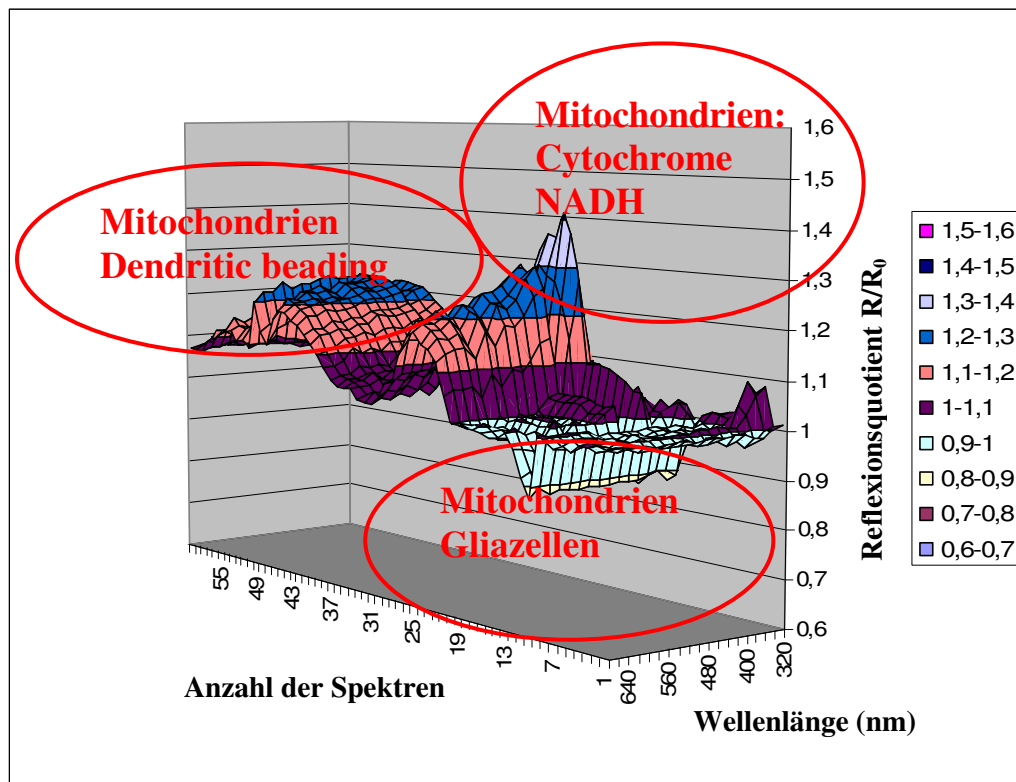


Abb. 30: Zeitliche Entwicklung der IOS-Intensität während einer HSD. Die vermutlich für die Entstehung der IOS verantwortlichen Strukturen sind zeitlich in das Reflexionsprofil eingeordnet.

IOS treten auch bei pharmakologisch ausgeschalteter bzw. verminderter Gliazellfunktion auf, was ihren überwiegend neuronalen Ursprung beweist. Gliazellen tragen aber offenbar deutlich zum initialen Reflexionsrückgang vor der HSD bei.

Mitochondrien sind am initialen Reflexionsrückgang ebenfalls maßgeblich beteiligt. Zudem beeinflussen die Cytochrome der Atmungskette und NADH die IOS in entscheidender Weise. Eine mitochondriale Schädigung könnte zum sekundären

Anstieg bzw. zur unvollständigen Rückbildung der IOS-Intensität beitragen. Die IOS haben zu großen Teilen ihr morphologisches Korrelat in den Mitochondrien. Diese Zellorganellen werden rasch durch Hypoxie in ihrer Funktion beeinflusst. Intrinsische optische Signale zeigen als typische Reaktion des neuronalen Gewebes auf Hypoxie die metabolische Situation der Mitochondrien auf.

Während die Ableitung des DC-Potenzials eher ein quantitatives Messverfahren für den hypoxischen Stress und die elektrische Erregbarkeit des Nervengewebes ist, liefern die IOS in ihrem zeitlichen Verlauf eine qualitative, ergänzende Aussage über metabolische Parameter sowie die ggf. stattfindende Gewebeschädigung.

Der Wellenlängenbereich $\lambda > 460\text{nm}$ ist am Besten geeignet für IOS-Messungen, da hier die stabilsten Signale auftreten.

6 Literaturangaben

Andrew RD, Jarvis CR, Obeidat AS (1999): Potential sources of intrinsic optical signals imaged in live brain slices. *Methods* 18, 185-196, 179

Bahar S, Fayuk D, Somjen GG, Aitken PG, Turner DA (2000): Mitochondrial and intrinsic optical signals imaged during hypoxia and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 84, 311-324

Fayuk D, Aitken PG, Somjen GG, Turner DA (2002): Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87, 1924-1937

Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M (2006): Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 79, 136-171

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

Hepp S, Müller M (2008): Sulfhydryl oxidation: A potential strategy to achieve neuroprotection during severe hypoxia? *Neuroscience* 152, 903-912

Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Müller M (2000): Effects of chloride transport inhibition and chloride substitution on neuron function and on hypoxic spreading-depression-like depolarization in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 97, 33-45

Müller M (2005): Response of central neurons to hypoxia and the role of mitochondria as metabolic sensors. *Recent Res Devel Physiol* 3, 59-90

Müller M, Somjen GG (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

Müller M, Somjen GG (2000a): Na⁺ and K⁺ concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83, 735-745

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

Sah P (1996): Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19, 150-154

Shkirman SF, Solov'ev KN, Kachura TF, Arabei SA, Skakovskii ED (1999): Interpretation of the solet band of porphyrins based on the polarization spectrum of N-Methyltetraphenylporphin fluorescence. *J Appl Spectroscopy* 66, 68-75

Sick TJ, Perez-Pinzon MA (1999): Optical Methods for Probing Mitochondrial Function in Brain Slices. *Methods* 18, 104-108

Somjen GG (2001): Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization. *Physiol Rev* 81, 1065-1096

Danksagung

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. M. Müller der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen für die fachliche Beratung und Unterstützung sowohl bei der Datenerhebung als auch beim Verfassen der Dissertationsschrift, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Müller, bedanken. Besonderer Dank gilt auch Frau Belinda Hildebrandt, die mich an die Arbeiten im Labor herangeführt und dabei stets unterstützt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Sabine Mané und Elke Wolf für das Korrekturlesen der Dissertation herzlich bedanken.

Lebenslauf

Am 15.05.1986 wurde ich als Tochter von Sabine Mané, geborene Erbe, und Norbert Friedrich Mané in Ilmenau geboren.

1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule in Wippra. Im Herbst 1996 erfolgte der Schulwechsel an das Gymnasium am Markt in Hettstedt. Diesen Abschnitt der schulischen Ausbildung schloss ich im Juni 2005 mit der allgemeinen Hochschulreife ab. Im Oktober 2005 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf.

Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im September 2007 war ich zeitweise als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Göttingen tätig. Dabei stand die Betreuung des Neurophysiologiepraktikums für den vorklinischen Studienabschnitt im Vordergrund. Im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit wurden folgende Beiträge auf Tagungen veröffentlicht:

Müller M., and Mané M. (2010). Spectrally resolved recordings of the intrinsic optical signal during hypoxia-induced spreading depression. Society for Neuroscience Abstracts, 353.23.

Mané M., and Müller M. (2009). Spectrally resolved recordings of the intrinsic optical signal in rat hippocampal slices during severe hypoxia. Proceedings of the 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, T11-15A.

Diese Publikationen spiegeln sich inhaltlich auch in der vorliegenden Dissertation wider.