

Aus dem Zentrum der Physiologie  
Des Klinikums der Johann- Wolfgang Goethe-Universität  
Zu Frankfurt am Main

**Optical Imaging intrinsischer Signale am primären auditorischen  
Cortex der Katze. Etablierung der Methode  
und Prüfung ihrer Praktikabilität**

**Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Johann- Wolfgang Goethe- Universität**

**vorgelegt von  
Christoph Mayer  
aus Linz an der Donau**

Frankfurt am Main 2007



Vom Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität als  
Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. J. M. Pfeilschifter  
Referent: Prof Dr. R. Klinke  
Koreferent: Prof. Dr. J. Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: zweiter Juli 2007

In bunten Bildern wenig Klarheit  
Viel Irrtum und ein Fünkchen Wahrheit  
So wird der beste Trank gebraut  
Der alle Welt erquickt und auferbaut

Goethe, Faust I

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der bekannten Tonotopie im primären auditorischen Cortex der Katze mittels optical recording of intrinsic signals (ORIS) mit der Frage, ob ORIS eine funktionelle Bildgebung ermöglicht, die den aufwendigen, etablierten elektrophysiologischen Ableitungsmethoden an räumlicher und zeitlicher Auflösung ebenbürtig oder sogar überlegen ist. Hierzu wurde ein ORIS- Setup erstellt, dessen Schwankungsbreiten von Beleuchtungseinheit und aufzeichnendem System in Ableitung mit grünem Licht bei einer Größenordnung von 0,03% hinreichend niedrig lagen, um stimulusassoziierte Signale in den von den meisten Autoren berichteten Amplituden sicher ableiten zu können. Es wurden spontane wie durch elektrische und akustische Stimuli evozierte Änderungen in den Reflexionseigenschaften des primären auditorischen Cortex (A1) der Ketamin- und Isofluran- anästhesierten Katze beobachtet. In Ruhe stellten sich bei 540nm in sämtlichen Versuchstieren (n=4) spontane Absorptionsszillationen mit einer Grundfrequenz von 0,1Hz und einer Amplitude zwischen 1 und 3,5% dar („Mayer-waves“), deren Ursprung (intra- versus extracerebral) jedoch nicht gesichert werden konnte und die sich von den anliegenden Stimuli unbeeinflusst zeigten.

Ein der bekannten Tonotopie korrespondierendes Muster aktivierter Areale nach Stimulation konnte lediglich bei  $\frac{1}{4}$  der Versuchstiere nachgewiesen werden (P124, elektrische Reizung, 30 Mittelungsdurchgänge).

Die erreichten Absorptionsmaxima nach 12dB überschwelliger elektrischer Reizung des Hörnerven lagen bei etwa 0,5% mit einer Latenz bis zum Signalmaximum von 5,5sec. Bei P126 war erst nach Mittelung von 18 Durchgängen ein zeitlicher Zusammenhang zwischen optisch erhobenen Daten und Stimulus nachweisbar. Bei P125 stellte sich nach 30 Mittelungsschritten zwar ein caudo-rostraler Shift der optischen Maxima bei Stimulation von 1kHz auf 4kHz dar, was der bekannten kortikalen Frequenzrepräsentation entsprach, doch ließ die darauffolgende Reizung mit 16 kHz keinen weiteren Shift nach rostral erkennen. Das cortikale Gebiet maximaler optischer Aktivität lag gegenüber dem Ort der 4kHz-Repräsentation caudomedial versetzt. Dies widerspricht der bekannten kortikalen Cochleotopie.

Es fand sich nach Mittelung über 18 (P126) bzw. 30 (P124 und P125) Durchgänge gleicher Stimulation bei allen Tieren ein fleckiges, stimulusassoziiertes, jedoch nicht tonotop verteiltes Signal in Form einer Absorptionzunahme mit Maximum nach 6-8,5 Sekunden. Es erreichte Amplituden zwischen 1% und 2,5%. Die optischen Aktivitätsmuster zeigten eine erhebliche Varianz unter Durchgängen bei gleichem Stimulus.

In einem Experiment (P126) fand ein Vergleich der optisch generierten Ergebnisse mit elektrophysiologischen Multiunit- Messungen statt. Es konnte nur bei einer Stimulationsfrequenz (8kHz) eine schwache Korrelation der elektrophysiologischen Multiunit- Antworten mit den optisch erhobenen Reflexionsänderungen festgestellt werden.

Wir schließen daher, dass die Darstellung einer Tonotopie mittels ORIS nur in einem Bruchteil der untersuchten Versuchstiere mit gegenüber elektrophysiologischen Methoden deutlich geringerer Reliabilität, Validität und räumlicher Auflösung machbar ist, möglicherweise, weil ORIS am primären auditorischen Cortex der Katze lediglich ein grobes Signal der Tonotopie liefert, ohne hierbei auf die Lokalisation aktiver Neurone beschränkt zu sein. ORIS ist demnach zum Ersatz der etablierten Elektrophysiologie am A1 der Katze nicht geeignet.

#### Abstract

It was the aim of this study to record the known Cochleotopy in the primary auditory cortex of the adult cat by means of optical recording of intrinsic signals (ORIS) in order to determine whether this method was sufficient to assist or even replace the well-established electrophysiological technique in both temporal and spatial resolution. Therefore, an ORIS-setup with sufficient signal/noise ratio was planned and built.

Spontaneous as well as tone- evoked changes in light reflectance were recorded from the primary auditory cortex (A1) of anesthetized cats (ketamine and isoflurane). Spontaneous 0.1Hz- oscillations of reflectance at 540nm light were recorded in quiet and showed unaltered by external stimuli.

Stimulation with tone-pips evoked localized reflectance decreases at 540nm in ¼ cats. The absorption maxima after 12dB suprathreshold stimulation showed an amplitude around 0,5% with a peak- latency of 5,5 sec. In P126, a stimulus- associated alteration in reflectance was only evident after successive averaging over 18 takes. In animal P125, a caudo- rostral shift of maxima was seen after 30 averages, which, however, was not continued when stimulated with 16kHz. The location of maximum activity was then located caudomedially to that of the 4kHz- representation, hereby contradicting the known cochleotopy. The optical recorded patterns showed significant variances, when stimulated equally. In one experiment, stimulus- evoked optical signals at 540nm were compared with multiunit responses to the same stimuli recorded at multiple sites. Only in one stimulus- frequency (8kHz) we saw a weak correlation between electrophysiology and optical data.

Our results suggest, that local cerebral blood volume changes reflect the gross tonotopic organization of A1 but are not restricted to the sites of spiking neurons. We conclude therefore, that determination of tonotopy in the A1 of the adult cat by means of ORIS in concern of reliability and validity is markedly less sufficient than the well- established electrophysiologic technique by means of multiunit- recordings

## Inhaltsverzeichnis

---

### **Zusammenfassung/Abstract**

### **Inhaltsverzeichnis**

### **Vorwort**

V.1.	Gegenstand der Arbeit	1
V.2.	Die Hirnforschung	1

## **1 Einführung** **3**

---

1.1.	Funktionelles Imaging und Karten	3
1.2.	Funktionelles Imaging in der Hirnforschung	3

## **2 Verschiedene Methoden des funktionellen Imaging und die Positionierung von ORIS** **5**

---

2.1.	Methoden auf struktureller Basis: Läsionen	5
2.2.	Funktionelle Färbemethoden mit voltage sensitive dyes (VSD)	5
2.3.	Methoden auf Grundlage neurovaskulärer Kopplung	5
2.3.1.	Single Photon-Emission Computer-Tomographie, „SPECT“	5
2.3.2.	Positronen-Emissions-Tomographie, „PET“	6
2.3.3.	Die funktionelle Magnetresonanztomographie, „fMRT“	6
2.3.4.	Optical Imaging intrinsischer Signale, „ORIS“	7
2.4.	Elektrophysiologie	8
2.5.	Extrinsische und intrinsische optische Registrierungen im Vergleich	9
2.5.1.	Die optische Ableitung extrinsischer Signale	9
2.5.2.	Die optische Ableitung intrinsischer Signale	11
2.5.3.	Tabellarische Gegenüberstellung der Methoden	12
2.6.	Positionierung von ORIS innerhalb der funktionellen Methoden	13

## **3 Die neurovaskuläre Kopplung als Grundlage des ORIS-Signals** **15**

---

3.1.	Gefäße und Signal	15
3.1.1.	Die Angioarchitektur des Kortex	15
3.1.2.	Arterien	16
3.1.3.	Die Mikrozirkulation	17
3.1.4.	Das Kapillarbett	18
3.1.5.	Die Blut-Hirn-Schranke	19
3.1.6.	Die Venen	19
3.2.	Die Ebenen kortikaler Durchblutungsregulation. Blut = Aktivität?	20
3.2.1.	Phys. Mechanismen und morpholog. Korrelate aktivitätsangepasster Durchblutung	20
3.2.1.1.	Capillary recruitment	21
3.2.1.2.	Gesteuerte Dilatation	21
3.2.1.2.1.	Glatte Muskulatur	22
3.2.1.2.2.	Endothel	22
3.2.1.2.3.	Perizyten	22
3.2.1.2.4.	Astrozyten	23
3.2.1.2.5.	Vasoregulation durch gezielte Innervation	25
3.2.1.2.6.	Vasoregulation durch NO	25
3.2.1.2.7.	Vasoregulation durch Stoffwechselmetabolite	26
3.3.	Zusammenschau neurovaskuläre Kopplung	27
3.4.	Neuronal-anatomische Auflösung des ORIS-Signals	28
3.5.	Das Verhältnis von Signal und Aktivität	29

---

**4 Der Ursprung ereignisgekoppelter Reflexionsunterschiede am Kortex 31**

---

4.1.	Die Komponenten intrinsischer Signale	31
4.1.1.	Das Lichtbrechungssignal	32
4.1.2.	Das Desoxysignal	33
4.1.3.	Das Blutflußsignal	35
4.2.	Die Signalerrechnung	37
4.3.	Begriffsbestimmung Globalsignal/Mappingsignal	37
4.3.1.	Globalsignal	37
4.3.2.	Mappingsignal	37
4.4.	Zusammenfassende Wertung	38
4.5.	Die Anwendung von ORIS auf den primären auditorischen Kortex	38

---

**5 Optische Ableitung intrinsischer Signale vom A1 der Katze: Methodenentwicklung 40**

---

5.1.	Die Aufnahmeeinheit	40
5.1.1.	Der CCD-Sensor	40
5.1.2.	Die Funktionsweise des CCD-Sensors	41
5.1.3.	Physikalische Eigenheiten	43
5.1.4.	Betrachtungen zum Rauschen der Aufnahmeeinheit	44
5.1.4.1.	Photonenrauschen	45
5.1.4.2.	Dunkelstrom, thermisches Rauschen (dark current)	46
5.1.4.3.	Empfindlichkeitsunterschiedsfehler	47
5.1.4.4.	Auslesefehler	47
5.1.4.5.	Verstärkerfehler	48
5.1.5.	Überlegungen zur Rauschminimierung	49
5.1.5.1.	Weißbild (flat frame) zur Berücksichtigung des Empfindlichkeitsunterschiedsfehlers	49
5.1.5.3.	Reduktion des Auslesefehlers	49
5.1.5.4.	Ausleseschlieren	50
5.1.6.	Voruntersuchungen zur CCD-Aufnahmeeinheit	50
5.1.6.1.	Pixel- Integerwert- Stabilität über die Zeit	50
5.1.6.2.	Pixel- Integerwert- Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur	54
5.1.6.3.	Intensitätsmodulation	56
5.1.6.4.	Unschärfemodulation und räumliches Auflösungsvermögen	58
5.2.	Die Tandemlinse	61
5.2.1.	Der Aufbau einer Tandemlinse	61
5.2.2.	Die Apertur einer Tandemlinse	62
5.2.3.	Vignettierung	63
5.2.4.	Der Vergrößerungsfaktor	64
5.2.5.	Die abbildbare Gegenstandsgröße	65
5.2.6.	Objektivkorrektur	65
5.2.7.	Schärfentiefe	66
5.2.8.	Scharfstellung	66
5.3.	Die Beleuchtungseinheit: Voruntersuchungen	67
5.3.1.	Bestimmung der Schwankungsbreite in der Lichtintensität	67
5.4.	Die Kortexkammer	68
5.4.1.	Der Aufbau der Kortexkammer	68
5.4.2.	Voruntersuchungen zur Kortexkammer	70
5.5.	Eine zusammenfassende Betrachtung zum Rauschen der vollständigen Anlage	71
5.5.1.	Versuchstechnische Störungen	71
5.5.2.	Biologische Artefakte	71
5.5.3.	Tabellarische Aufstellung von Rauschquellen und Korrekturmöglichkeiten	72

5.6.	Die Reizung	73
5.6.1.	Zur Vergleichbarkeit elektrischer und akustischer Reizung des Hörnerven	73
5.6.2.	Die elektrische Reizung	73
5.6.3.	Die akustische Reizung	74
5.7.	Die Steuereinheit	74
5.8.	Die Datenverarbeitung	79
5.9.	Elektrophysiologische Kontrolle	81
<b>6</b>	<b>Versuchstiere, Tierbehandlung und –Vorbereitung</b>	<b>82</b>
6.1.	Das Versuchstier	82
6.1.1.	Das Narkoseschema	82
6.1.2.	Die operative Versuchstiervorbereitung	85
6.1.3.	Die kortikale Repräsentation auditorischer Verarbeitung	85
6.1.4.	Versuchstiere und Schemata	86
<b>7</b>	<b>Resultate</b>	<b>69</b>
7.1.	EKG-synchrone Schwankungen	89
7.2.	Langsame Wellen	90
7.3.	P126/kleine Felder	91
7.4.	P126/Mittelung sämtlicher Durchgänge und vergleich mit Elektrophysiologie	93
7.4.1.	P126/4kHz	94
7.4.2.	P126/8kHz	94
7.4.3.	P126/16kHz	95
7.5.	Vergleich ORIS-Elektrophysiologie	97
7.6.	Zusammenfassung	97
<b>8</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
8.1	Darstellbarkeit der Tonotopie	99
8.2	0,1Hz-Oszillationen	100
8.3.	Ongoing activity	106
8.4.	Hirndurchblutung und Regulation	113
8.5.	Kortizes unterscheiden sich in Ableitbarkeit über OI	116
8.6.	Antwortverhalten in A1	117
8.7.	Ableittiefe und Lateralverzerrung durch Blutfluß	118
8.8.	Subthreshold-Aktivität und „Inhibitionssignal“	119
8.9.	Narkoseschema	119
8.10.	Säure/Base-Status	122
8.11.	Dauer der Versuche und Zeitfenster	122
8.12.	Zeitverlauf des Signals	123
8.13.	Kammerdruck	123
8.14.	Anzahl der Versuchstiere und Reizschemata	124
8.15.	Gefahr von Fehlinterpretationen und Probleme der Mittelungsprozeduren	124
<b>9</b>	<b>Conclusion</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>162</b>
11.1	Abkürzungsverzeichnis	162
11.2	Abbildungsverzeichnis	163
11.3	Tabellen und Formeln	164
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>165</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf + schriftliche Erklärung</b>	<b>167</b>

## Vorwort

### V.1. Gegenstand der Arbeit

Etwa 0,2% der Kleinkinder in Deutschland sind von angeborener oder früh erworbener Gehörlosigkeit betroffen. Die Forschung nähert sich diesem Problem am Tiermodell. Kongenital gehörlose Katzen werden mit Cochlea-Implantaten versorgt und es wird durch elektrophysiologische Oberflächenableitungen am primären auditorischen Kortex geprüft, in welchem Ausmaß es in den auditorischen Arealen zu einer Verarbeitung akustischer Information kommt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung einer Einheit zur Ableitung intrinsischer, optischer Signale am primären auditorischen Kortex der Katze zur Prüfung der Integrierbarkeit dieser Methode in die bestehenden, an diesem Arbeitskreis bereits etablierten, elektrophysiologischen Ableitetechniken.

Optical Imaging intrinsischer Signale könnte das gebräuchliche Brainmapping lokaler Feldpotentiale ergänzen oder ersetzen. Hieraus ergäbe sich eine erhebliche Zeitersparnis im Versuchsablauf bei annähernd gleicher räumlicher Auflösung.

Es war daher Gegenstand dieser Arbeit, zu prüfen, ob die Resultate optischer Ableitung der Elektrophysiologie in räumlicher und zeitlicher Auflösung, Reliabilität und Validität ebenbürtig sind.

### V.2. Die Hirnforschung

Das Gehirn als biologisches, sensomotorisches Steuer- und Regelorgan, als integratives Element zwischen „Ich“ und Umwelt, ist seit über 2000 Jahren Objekt anatomischer und physiologischer Beschäftigung und Forschung. Es ist Träger einer selbstbestimmten und verantwortlichen „Individualität“, die in ihrem Emanzipationsbestreben gegenüber einem positivistischen, dem Kausalitätsprinzip verpflichteten, kosmologischen Determinismus selbst Gegenstand des philosophischen Diskurses ist. Die Vielgestalt der Problematik in der Betrachtung des Gehirns kommt zum Ausdruck, wenn in der Proklamation 6158 des Präsidenten der Vereinigten Staaten von Amerika von einem „mysterious and magnificent wonder of creation“ gesprochen, die Faszination für dieses Organ, wenn das letzte Jahrzehnt des vergangenen Jahrtausends zur „decade of the brain“ erklärt wird. Seit ein Bewußtsein

besteht, findet es einerseits in der Beschäftigung mit sich und den eigenen Grundlagen seine erkenntnistheoretischen Grenzen, wie es andererseits in der Mannigfaltigkeit neurophysiologischer Untersuchungstechniken zur Erforschung seiner eigenen Voraussetzungen eine grenzenlose Daten- und Ergebnisvielfalt erfährt. Die Beschäftigung mit dem Gehirn datiert weit zurück. Erste, offenbar erfolgreiche Operationen am menschlichen Gehirn haben bereits in vorgeschichtlicher Zeit stattgefunden. 1500 Jahre vor Christus wurden in Ägypten Aufzeichnungen über das Gehirn erstellt, im Mittelalter wurden in die Ventrikel, die man in ihrer vermeintlichen „Leere“ allegorisch für Geistesäquivalente hielt, Gedanken verortet, während Descartes den Sitz der Seele in der Zirbeldrüse vermutete. Erst in den letzten 150 Jahren hat sich die Methodologie der Hirnforschung in einem Grad verfeinert, der auf Basis reliabler und valider Ergebnisse zuverlässige Schlüsse über Feinstruktur, Organisation, Funktion und Pathologie des Gehirns erlaubt. Das methodische Repertoire der Hirnforschung umfaßt invasive Techniken, die aus Substanzdefekten Schlüsse auf lokalisierte Hirnfunktion gestatten, weniger invasive Techniken, die durch Ableitungen auf elektrophysiologischer oder optischer Basis Aktivität darstellen können, sowie noninvasive Methoden, die z.B. durch Magnetfeldveränderungen, Radionuclidverteilungen oder Kopfschwartenableitung synaptischer Potentiale lokale Kortexaktivität abbilden. Das Ziel dieser Ableitungen liegt in der Erstellung funktioneller Karten kortikaler Repräsentation. Karten ermöglichen ein besseres Verständnis von Hirnfunktion und -Organisation.

## Kapitel 1. Einführung

### 1.1. Funktionelles Imaging von Hirnarealen

Die gebräuchlichste Kartierung des menschlichen Kortex ist die von Brodmann 1909 auf Grundlage der vergleichenden Zytoarchitektonik erstellte Felderung in 52 Areale. Auch der österreichische Hirnanatom Economo (1876 bis 1931) und die Französin Cecile Vogt (1874-1962) entwickelten auf Zytoarchitektonik basierende Karten. Funktionelle Karten konnten bereits relativ früh durch Läsionen oder elektrische Reizung (Walther Rudolf Hess, Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 1949) erstellt werden. Von besonderem Wert für die Erstellung funktioneller Hirnkarten ist die Elektrophysiologie. Heute wird auch die Methode der reversiblen, lokal-funktionellen Ausschaltung kleinerer Areale durch Kühlung angewandt, ferner die bildgebenden Verfahren SPECT, fMRi, PET und ORIS, (s.u.).

Ähnlich, wie die Geschichte der geographischen Kartographie eine Bewegung von der separatistischen Beschreibung politischer und geographischer Einheiten hin zur integrativen Darstellung des Verbindenden versinnbildlicht, welches Einzelnes zu einem größeren Ganzen eint, entwickelte sich die neurophysiologische Kartographie weg von der phrenologischen Haltung des 19. Jahrhunderts (Franz Gall 1805), die das Hirnganze als Summe klar voneinander abgegrenzter Bereiche begriff, hin zu einem integrativen Verständnis des Gehirnes als dynamischem Organ, dessen Funktion maßgeblich auf Austausch, Modifikation und Plastizität beruht.

### 1.2. Funktionelles Imaging in der Hirnforschung

In dieser Arbeit wurde funktionelles Imaging neuronaler, kortikaler Aktivität mittels optischer Ableitung intrinsischer Signale („Optical Recording of Intrinsic Signals“), ORIS oder OI, angewendet. Diese Methode soll im Folgenden in ihren Vor- und Nachteilen gegenüber anderen gängigen Methoden positioniert werden. Die Hirnforschung als Disziplin gründet auf der Erkenntnis, daß Modifikationen am Gehirn motorische, sensorische, sensible sowie neuropsychologische, also gewissermaßen „seelische“ Veränderungen verursachen. Demzufolge wurden zur Untersuchung solcher Mechanismen, welche der Hirnfunktion zugrundeliegen, Manipulations- und Ableitungsmethoden so weit verfeinert, daß heute

mithilfe verschiedenster Techniken weitgehend valide und reliable Forschungsergebnisse auf fast allen Ebenen räumlicher und zeitlicher Auflösung möglich sind. In Abhängigkeit von der angewandten Technik ergeben sich im Hinblick auf räumliche und zeitliche Auflösung sowie Invasivität und Reproduzierbarkeit klar begrenzte Aussagen. Hierauf wird weiter unten näher eingegangen. Unter „funktionelles Neuroimaging“ versteht man nach lat. „imago“ die bildhafte Darstellung von Hirnaktivität zur Visualisierung sensibler, sensorischer oder kognitiver Prozesse. Funktionelle Verfahren unterscheiden sich von strukturellen Ansätzen insofern, als sie auf Grundlage struktureller Annahmen gestatten, am Versuchstier oder auch am lebenden Menschen die Aktivität umschriebener Hirnareale in Ruhe oder nach Stimulation durch bestimmte Aufgaben (Fühlen, Sehen, Hören) abzubilden. Funktionelles Imaging leitet natürliche, sensorische Repräsentationen ab und stellt neuronale Aktivität auf der Kortexoberfläche innerhalb einer bestimmten Hirnregion geordnet dar. Grob gesagt betrachten strukturelle Untersuchungen die Hardware, also die Feinanatomie. Funktionelle Untersuchungen hingegen zeigen, auf welche Weise die Software kortikaler Aktivität auf der strukturellen Hardware dynamisch funktioniert. Die Ableitung von Signalen, die Korrelate dieser Aktivität darstellen, kann indirekt durch Anstieg des lokalen Metabolismus oder Blutfluß (OI, MRT, PET, SPECT), aber auch direkt als Ableitung elektrischer Potentiale erfolgen. Ein Grundproblem der funktionellen Imagingverfahren besteht in der Hervorhebung der spezifischen, stimulusgenerierten Aktivität bestimmter Areale aus der umfassenden und unspezifischen Grundaktivität des Kortex. Man bedient sich zur Darstellung der über der Norm liegenden Aktivierung, deren Amplitude in der Regel von der Grundaktivität des Kortex nur mittels Reizkopplung unterschieden werden kann, geeigneter statistischer Mittelungs- sowie Subtraktionsverfahren.

## Kapitel 2. Verschiedene Methoden des funktionellen Imaging und die Positionierung von ORIS

### 2.1. Methoden auf struktureller Basis: Läsionen

Vom Beginn des letzten Jahrhunderts bis heute werden anatomische Karten der Großhirnrinde mithilfe von Läsionen erstellt [Sherk H. et al., 2002; Rudolph KK, Pasternak T., 1996]. Läsionen wurden entweder Versuchstieren beigefügt oder traten an Menschen in Form von kriegs- oder unfallbedingten Verletzungen auf. In jedem Fall konnte man durch die dem peripheren Ausfall zugrundeliegenden, kortikalen Substanzdefekte mit guter räumlicher und schlechter zeitlicher Auflösung auf die jeweilige Repräsentation rückschließen.

### 2.2. Funktionelle Färbemethoden mit „voltage sensitive dyes“ (VSD)

Die optische Ableitung extrinsischer Signale, „ORES“, arbeitet mit spannungsabhängigen Farbstoffen, sogenannten „voltage sensitive dyes (VSD). Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Neurone oder Neuronanteile bis zum Niveau eines Einzelkanals in Abhängigkeit von der anliegenden Aktivität darzustellen. Bei ORES- Ableitungen werden Änderungen im Reflexionsverhalten und Farbumschläge, die infolge neuronal ausgelöster Spannungsschwankungen im Farbstoff ausgelöst werden, mithilfe geeigneter Aufzeichnungsmedien und einer Aufnahmeoptik abgeleitet und als Differenzmessung der Helligkeitsunterschiede vor und nach Stimulusbeginn dargestellt. VSD-gestützte Aufnahmen am auditorischen Kortex des Meerschweinchens wurden von Horikawa, ebenso von Fukunishi [Fukunishi K. et al., 1992; Horikawa J. et al., 2000] durchgeführt. VSD-Aufnahmen sind invasiv und neurotoxisch. Messungen sind aus diesem Grunde nicht wiederhol- oder modifizierbar (vgl. hierzu Gegenüberstellung ORIS/ORES, Kap. 2.5). Eine Signalantwort ist bereits nach 1ms optisch nachweisbar. Die höchste räumliche Auflösung beträgt 0,5-1µm, wiederholte Messungen unter modifizierten Aufbauten sind aufgrund der Toxizität der Farbstoffe nicht möglich.

### 2.3. Methoden auf Grundlage neurovaskulärer Kopplung

#### 2.3.1. Single Photon Emission Computer Tomographie, „SPECT“

SPECT basiert auf der Injektion von  $\gamma$ -strahlenden Tracern mit kurzen Halbwertszeiten, die nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) aufgrund hoher Gewebsaffinität infolge aktivitätsbedingter lokaler Mehrdurchblutung in aktiven Hirnarealen verbleiben. Häufig verwendete Nuclide sind  $^{99m}\text{Tc}$  und  $^{123}\text{Jod}$ . Die lokale Verteilung von Technetium

kann über die ausgesendeten  $\gamma$ -Quanten bis zu zwei Stunden lang tomographisch durch eine Gamma-Kamera abgeleitet werden. Die räumliche Auflösung beträgt etwa 1cm Halbwertsbreite<sup>1</sup>, die zeitliche Auflösung etwa drei bis vier Minuten. Außerdem ist die Markierung einzelner Rezeptoren, wie des Dopamin<sub>2</sub>-Rezeptors und des Benzodiazepinrezeptors möglich.

### 2.3.2 Positronen-Emissions-Tomographie, „PET“

Die PET-Methode arbeitet ebenfalls mit Radionukliden. Die Tracer, je nach Untersuchungsziel bieten sich  $^{18}\text{F}$ -,  $^{13}\text{N}$ -,  $^{15}\text{O}_2$ - oder  $^{11}\text{C}$  Isotope an, im Rahmen funktioneller Untersuchungen genutzt als  $^{18}\text{FDG}$  (Fluordesoxyglucose) oder  $\text{C}^{15}\text{O}_2$ , senden Positronen aus, die beim Auftreffen auf Elektronen (Annihilation) in zwei entgegengesetzt abstrahlende Photonen zerfallen. Durch angepaßte Detektionssysteme ist bei Koinzidenzmessung beider Photonen eine gute S/N-ratio und hohe räumliche Auflösung gegeben. Mittels markiertem  $\text{CO}_2$  lassen sich der regionale kortikale Blutfluß und das regionale kortikale Blutvolumen bestimmen. Mittels  $^{18}\text{FDG}$  (Fluordesoxyglucose) sind auf dem Wege des „Cellular trapping“ stoffwechselaktive Zellen markierbar. Die tomographische Darstellung bietet eine räumliche Auflösung von 5-8mm. Aufgrund der erheblichen Strahlenexposition verbieten sich Folgemessungen.

### 2.3.3. Die funktionelle Magnetresonanz-Tomographie, „fMRT“

Atome mit ungeraden Anzahlen an Protonen oder Neutronen weisen einen Kernspin auf, d.h. sie rotieren um eine Achse. Durch die Drehung der Ladungen entsteht ein Magnetfeld, wodurch das Atom als Dipol erscheint. Im extern angelegten Magnetfeld richten sich die Dipole nach der aufgezwungenen Richtung räumlich aus und rotieren in der durch das äußere Magnetfeld bestimmten Larmorfrequenz. Nach Wegfall des Magnetfeldes findet eine als „Relaxation“ bezeichnete Rückbewegung der Rotationsachse in die Ausgangslage statt, die mit einer detektierbaren, elektromagnetischen Hochfrequenzstrahlung einhergeht. Das fMRI-Signal entsteht auf der Basis der neurovaskulären Kopplung. Dieser Begriff beschreibt eine bedarfsangepaßte Mehrdurchblutung aktiver Hirnareale und damit eine Anflutung frischen oxy-Hämoglobins sowie eine Desoxygenierung lokal vorhandenen Hämoglobins. Oxygeniertes Hämoglobin, „HbO“, ist diamagnetisch, desoxygeniertes „HbR“ hingegen paramagnetisch. HbR ruft daher als „intrinsisches Kontrastmittel“ lokale Magnetfeldveränderungen, sog. Suszeptibilitätsänderungen, hervor, die beim fMRI zur Darstellung der Hirnaktivität gemessen werden. Dieser Effekt einer Kontrastentstehung durch verschiedene Oxygenie-

---

<sup>1</sup> (full width at half height, full width at half maximum) Das Strahlungsspektrum eines optischen Strahlers, dessen Grenzen die beiden 3-dB-Punkte oberhalb und unterhalb des Strahlungsmaximums markieren.

rungszustände von Hämoglobin wird Blood-oxygen-level-dependent effect, „BOLD-Effekt“ genannt. Die funktionelle Methode erlaubt eine räumliche Auflösung in Voxel einer Kantenlänge von etwa 1-3mm. Für funktionelle Untersuchungen werden hoch-auflösenden anatomischen MRI-Darstellungen eines Hirnbereichs funktionelle Ableitungen überlagert. So wird eine Lokalisierung von Aktivitätsprozessen im dreidimensionalen Raum möglich. In der Regel macht man sich bei Kernspin- Untersuchungen das Oxysignal zunutze. Es beruht auf verstärkter Anflutung oxygenierten Hämoglobins. Die momentan gebräuchli-chen Magneten liefern Feldstärken von 1,5-3 Tesla, funktionelle Ableitungen mit guter räumlicher Auflösung sind ab 3Tesla möglich. Mit stärkeren Magnetfeldern ab 7 Tesla kann auch das Desoxysignal mit besserer Kolokalisation an den Ort kortikaler Aktivität abgeleitet werden. Aufgrund des Anregungs- und Ausleseschemas ergibt sich eine zeitliche Auflösung, die in Abhängigkeit vom gemessenen Volumen Sekunden bis Minuten betragen kann. Für Ableitungen beim Menschen wird der Einsatz höherer Feldstärken von über 3 Tesla momentan eingeleitet, für Forschungszwecke an Tieren werden bereits Geräte mit Feldstärken bis 7 Tesla verwendet. Am Zentrum für Magnetresonanzforschung der Universi-tät Chicago unter Keith Thulborne befindet sich seit September diesen Jahres ein 9,4 Tesla-Tomograph. Bislang sind keine Schädigungen biologischer Gewebe durch Magnetfelder bekannt.

#### 2.3.4 Optical Recording Intrinsicischer Signale, „ORIS“

Die Methode der optischen Ableitung intrinsicischer Signale (ORIS) erlaubt durch die Betrachtung intrinsicischer Marker, insbesondere des Blutes, eine vergleichsweise niedriginvasive Ableitung aktivitätskorrelierter Signale. Durch eine Trepanationsöffnung wird über geeignete optische Systeme (Tandemlinsen, CCD-Sensoren, s.u.) durch Differenzbildmessung eine Leuchtdichtedifferenz des rückgestrahlten Lichts einer bestimmten Wellenlänge festgestellt. Diese Differenz ist das ORIS- Signal. Aufgrund des Signalursprungs und der Histologie des Kortex sollen sich in Abhängigkeit vom Typ des genutzten Signals (s.u.), insbesondere aber in Abhängigkeit vom betrachteten Kortex, räumliche Auflösungen von bis zu 50µm [Grinvald A. et al., 1984; Hess A., 1996] bei zeitlichen Auflösungen im Sekundenbereich ergeben. Idealerweise würde hierdurch die Ableitung ganzer Aktivitätskarten vom Kortex innerhalb von Minuten bis Stunden bei hervorragender räumlicher Auflösung möglich (vgl. Gegenüberstellung ORES/ORIS, Kap.2.5).

## 2.4. Elektrophysiologie

Die Elektrophysiologie ist neben „Läsionen“ die älteste und auch valideste Untersuchungstechnik des Kortex. Erste Ableitungen fanden 1870 durch Fritsch und Hitzig am Tier statt [Fritsch G. und Hitzig E., 1870], 1929 datiert die erste EEG- Ableitung durch Berger [Berger H., 1929], 1958 wurden erste Einzelneuronableitungen durch Jasper durchgeführt. Mit elektrophysiologischen Methoden lassen sich strukturelle wie funktionelle Karten motorischer und sensorischer Qualitäten erstellen. Dem Überbegriff der „Elektrophysiologie“ im weitesten Sinne werden EEG-Ableitungen ebenso subsumiert wie Einzelzellableitungen mit Mikroelektroden. Das EEG-Signal entsteht, wenn Ströme über geladene Membranen in eine Zelle hinein oder aus einer Zelle heraus fließen. Das EEG leitet synaptische Potentiale um  $75\mu\text{V}$  von Zellkörpern und Dendriten der Schichten 3-5 ab [Lopes da Silva et al., 1978/1991]. Die Aussagekraft des klinischen EEG ist aufgrund schlechter räumlicher Auflösung bei geringer Elektrodenzahl gering und geht über einschätzende Betrachtungen auf dem Niveau eines Lobus nicht hinaus. Die räumliche Auflösung kann jedoch durch Erhöhung der Elektrodenzahl und dichtere Verteilung auf der Kopfschwarte sowie durch Nutzung von Nadelelektroden erhöht werden. Eine unterstützende Verrechnung mit den Daten anderer funktioneller Methoden wie fMRI ist möglich, sodaß durch Projektion von EEG-Daten auf die dreidimensionale Matritze von MRT-Daten [Gevins et al., 1991] funktionelle Karten, wenn auch von mäßiger räumlicher Auflösung, erstellbar sind. Direkte kortikale Ableitungen durch stereotaktisch platzierte Makro- und Mikroelektroden besitzen eine räumliche Auflösung, die innerhalb der Elektrophysiologie deutlich über der des EEG liegt. Aktivität natürlichen Ursprungs oder evozierte Potentiale können von Clustern, aber auch von Einzelzellen abgeleitet werden. Derartige Einzelzellableitungen sind mithilfe von Mikroelektroden mit Spitzendurchmessern unter  $1\mu\text{m}$  intrazellulär und mit größeren Spitzendurchmessern extrazellulär möglich. Die patch-clamp Technik erlaubt Untersuchungen an Zellen bis auf Einzelkanalniveau. Mit dem Voltage-clamp-verfahren kann eine Zelle auf eine wählbare Spannung „geklemmt“ werden, sodaß Ionenströme durch Kanalproteine meßbar werden. Die zeitliche Auflösung elektrophysiologischer Ableitungen liegt zwischen 1 und 10ms und damit in einem Bereich, der die Ableitung neuronaler Aktivität in Echtzeit erlaubt. Die Erstellung funktioneller Karten in der Elektrophysiologie wird jedoch durch die geringe räumliche Auflösung des EEG zum einen und den hohen Zeitaufwand der stereotaktischen Ableitung mit Einzelelektroden zum andern erschwert.

## 2.5. Extrinsische und Intrinsische Optische Registrierungen im Vergleich

Die Untersuchung kortikaler Aktivität mit optischen Mitteln mithilfe von Emissions-, Reflexions- und Absorptionsunterschieden der Kortexoberfläche, ist sowohl auf der Basis extrinsischer als auch intrinsischer Marker möglich. Die Unterschiede in der Leuchtdichte der reflektierten bzw. emittierten Photonen werden durch unterschiedliche Detektionssysteme wie Photodioden, Photodiodenarrays oder CCD-Sensoren aufgezeichnet. Zur Messung *extrinsischer* Signale werden biologische Gewebe mit Farbstoffen inkubiert, die die optischen Eigenschaften der betrachteten Kortexfläche verändern und durch Fluoreszenz- Absorptions- und Doppelbrechungsänderungen ein optisch ableitbares Signal ergeben. Das Signal bietet eine gute räumliche und zeitliche Auflösung (Aufnahmen sind bis auf Einzelkanalniveau mit einer zeitlichen Auflösung im ms-Bereich möglich), ist aber für chronische Verlaufsbeobachtungen nicht geeignet, da die Versuchsdauer aufgrund der Toxizität der verwendeten Farbstoffe eng begrenzt ist. Die Amplitude extrinsischer Signale ist je nach verwendetem Farbstoff unterschiedlich. Für den Absorptionsfarbstoff NK 3041 etwa ist ein Output von bis zu 3% relativ zur eingestrahnten Lichtintensität beschrieben. Intrinsische und extrinsische Signale werden mit vergleichbaren Techniken und Prozeduren abgeleitet. Allerdings werden beim Imaging intrinsischer Signale statt exogener Substanzen körpereigene Stoffe oder Prozesse als Signalquelle genutzt. Sowohl im Hinblick auf die Belastung des Präparates durch „Phototoxizität“, „Ausbleichen“ und die resultierenden Begrenzungen der Versuchsdauer, als auch bei der Beurteilung des Nutzens der Methode zur Verlaufsbeobachtung über längere Zeiträume ergeben sich hieraus Vorteile. Allerdings ist die Ableitung intrinsischer Signale mit geringerer zeitlicher Auflösung und Signalamplitude verbunden. Die Amplitude des intrinsischen Signals wird allgemein zwischen 0,1% [Bakin J.S. et al., 1996 auditorischer Kortex der Ratte] und 3% [Nemoto M. et al., 1999; somatosensorischer Kortex, Ratte] angegeben.

### 2.5.1. Die optische Ableitung extrinsischer Signale

„Optical Imaging“, als Begriff erstmals von Grinvald anlässlich von Untersuchungen im visuellen Tectum des Frosches eingeführt [Grinvald A., 1984], ist als Imagingmethode in der Neurophysiologie seit etwa 50 Jahren bekannt [Hill und Keynes 1949]. Die Methode beinhaltet die Applikation von Absorptions<sup>3</sup>- oder Fluoreszenzfarbstoffen<sup>4</sup>, die durch Iontophorese in Nervenzellkörper ein- oder als Bad auf Hirngewebsschnitte oder semiintakte,

<sup>3</sup> Mit Absorptionsfarbstoffen können Transmissions- oder Reflexionsmessungen durchgeführt werden.

<sup>4</sup> Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nach Anregung durch bestimmte Wellenlängen Photonen, wenn sie einer Spannungsschwankung ausgesetzt werden

isolierte Hirnstrukturen aufgebracht werden. Fluoreszenzfarbstoffe werden in die Neuronmembran eingelagert und über verschiedene, zu einem großen Teil noch nicht verstandene Mechanismen infolge lokaler elektrischer Aktivität, pH-Wertverschiebung oder Kalziumspiegelveränderungen angeregt, sodaß sie nach Einstrahlung von UV-Licht und Aufnahme durch angepaßte Filtersysteme ein deutlich verändertes und zur Signaldarstellung geeignetes Fluoreszenzverhalten zeigen. Mithilfe der membrangebundenen Farbstoffmoleküle lassen sich axonale Transportmechanismen und die Feinanatomie des Neurons untersuchen, vor allem aber, sofern es sich um spannungsabhängige Farbstoffe handelt, die Propagation und Verarbeitung von Erregungen auf der Ebene von Einzelneuronen, Netzwerken und ganzen Arealen nachweisen. Dies geschieht, je nach Farbstoff, durch Potentialdifferenzen infolge von Membrandepolarisationen einzelner Neurone, pH-Wert-Änderungen oder Kalziumkonzentrationsverschiebungen und hat zur Folge, daß die Farbstoffe ihre optischen Eigenschaften ändern und nach Einstrahlung eines anregenden Lichts z.B. im UV-Bereich ein aktivitätsabhängiges Signal liefern [Cohen L.B. et al., 1974, Cohen L.B. und Salzberg B.M., 1978]. Dieses Signal ist auf optischem Wege durch Linsensysteme auf geeignete Datenträger ableitbar und auf dem Wege einer gewichteten Differenzbildrechnung (s.u.) darstellbar.

Es wurde durch die synchrone Ableitungen elektrophysiologischer Signale am selben Ort validiert [Grinvald A. und Farber I., 1981]. Die Methode ist sowohl im Nonvertebraten [Cohen L.B. et al., 1973] am Tintenfischriesenaxon als auch im Vertebraten [Grinvald A. et al., 1988] anwendbar, allerdings je nach Spezies mit unterschiedlichen Farbstoffen [Ebner T.J. und Chen G., 1995].

Die Signale der optischen Ableitungen beruhen auf Emissions- oder Absorptionsunterschieden eines Prästimuluszustandes gegenüber einem Poststimuluszustand. Das Signal errechnet sich als Verhältnisbildung der Reflexionsänderung infolge Aktivität gegenüber einem Reflexionszustand in Ruhe. Der Vorteil dieser Ableittechnik liegt in der hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung sowie in der Darstellbarkeit von zeitlichen Verläufen räumlicher Erregungsmuster [Grinvald A. et al., 1982] und neuronaler Aktivität über Knotenpunkte funktioneller Netzwerke hinweg. Die Auflösung der Methode hängt vom Ausmaß der gefärbten Membranfläche ab und erlaubt Ableitungen bis auf die Ebene von Nervenzellsegmenten, wie Einzeldendriten, Spines und Synapsen, sowohl in Kultur als auch in vivo. Damit liegt sie im Arbeitsbereich elektrophysiologischer Ableitungen mit Mikroelektroden. Anders als bei elektrophysiologischen Techniken kann man beim O.I. extrinsischer Signale, das bei entsprechender Anwendung in Hirnschnitten oder Kortexpräparaten komplette Netzwerke sichtbar macht, auch unerwartete Muster erhalten. Daher

empfiehlt Grinvald diese Methode zur Suche nach der „Nadel im Heuhaufen“ [Grinvald A. et al., 1988]. Nachteilig wirken sich jedoch zeitliche Reglementierungen infolge von Ausbleichen der Farbstoffe unter Beleuchtung aus, sowie neurotoxische Eigenschaften der VSD<sup>5</sup> aus, ferner pharmakologische Nebeneffekte<sup>6</sup> [Grinvald A., *ibid*], die zur Verfälschung der abgeleiteten Signale führen. Außerdem sind mit dieser Methode keine chronischen Ableitungen möglich, wie sie für die Langzeitbetrachtung neuronaler Plastizität nötig sind.

### 2.5.2. Die optische Ableitung intrinsischer Signale

Die wiederholte Beobachtung langsamer und auf Stimulation hin am Versuchstierkortex zuverlässig auftretender Störsignale bei Reflexionsmessungen mit VSD veranlaßte Grinvald zu dem Versuch, kortikale Aktivität allein mit diesem vermeintlichen Störsignal darzustellen [Grinvald A. et al., 1986]. Obwohl das abgeleitete Signal langsamer war als das Farbstoffsignal, erwies es sich als geeignet zur Darstellung von Aktivität. Grinvald definiert intrinsische Signale als „Veränderungen der optischen Eigenschaften des Gehirnes und von Nervengewebe aufgrund von neuronaler Aktivität.“ [Grinvald A. et al., *ibid*]. Die Messung intrinsischer Signale greift nicht auf externe Färbemethoden zurück, sondern nutzt intrinsische „Chromophore“<sup>7</sup>, d.i. optische Korrelate von Stoffwechselprozessen (zB. Cytochrome, im Wesentlichen jedoch den Blutfarbstoff Hämoglobin, der oxygeniert andere Reflexionseigenschaften bietet, als desoxygeniert- vgl. Kap. 4.1.2. „Das Desoxysignal“), die in Abhängigkeit von lokaler Stoffwechselaktivität wegen erhöhter Feuerraten der Neurone eine Veränderung in der Reflexion eingestrahlt Lichts bewirken. Infolge neuronaler Aktivität steigt der lokale Metabolismus und infolge neurovaskulärer Kopplung steigt die Durchblutung. Beide Mechanismen führen zu einem Absorptionszuwachs, der optisch abgeleitet und nach Verrechnung als Signal dargestellt werden kann (näheres zu Methode und Datenverarbeitung in den entsprechenden Kapiteln der Methode). Die praktischen Vorteile intrinsischer Signale gegenüber externen Farbstoffen ergeben sich aus den methodischen Unterschieden: Signal und Signalträger sind „natürlich“. Daher entfallen äußere Zugaben von Farbstoffen und störende Nebeneffekte wie Bleichen, Phototoxizität und pharmakologische Nebeneffekte. Da diese den zeitlichen Rahmen der Aufnahmesitzung begrenzen, ergibt sich für die Ableitung intrinsischer Signale theoretisch (vgl. Diskussion) ein weiteres Zeitfenster, innerhalb dessen man aufgrund der Stabilität bzw. dauernder Erneuerung der Signalträger reliable Werte aufzeichnen kann. Da das Gehirn beim Ableiten intrinsischer Signale im Optimalfall einer schonenden Trepanation weitgehend unangetastet bleibt - bei langwelligem Licht um 810 nm können aktivitätsabhängige Signale in tiefen kortikalen Schichten, ja sogar

<sup>5</sup> *Unter Phototoxizität oder Photodynamischer Schädigung versteht man die Induktion von reaktiven Sauerstoffradikalen. Sie greifen Membranen an und schädigen die Neurone zunehmend. Als Zeitfaktor bis zum Auftreten von Schäden nimmt man etwa 1-20min an, in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke durch die verwendete Lampe.*

<sup>6</sup> *Diese Effekte treten stets auf, wenn extrinsische Signalmoleküle an neuronale Membranen gebunden werden, insbesondere, wenn hohe Farbstoffkonzentrationen angewendet werden. Starke Farbstoffbindung kann daher zu Schwellenwert-Veränderungen führen: spezifische Ionenleitfähigkeiten können beeinträchtigt werden mit entsprechenden Auswirkungen auf Membranpotential, Depolarisierbarkeit und synaptische Durchlässigkeit.*

<sup>7</sup> *Als intrinsische Chromophore gelten Substanzen, die bei erhöhter Stoffwechselaktivität einen Zustand veränderter Absorption oder Reflexion annehmen [Chance B. et al., 1962, Jöbsis F.F. et al., 1977, Hempel F.G. et al., 1977, LaManna J.C. et al., 1987], oder aufgrund von Konzentrationsänderungen die Erstellung eines Differenzsignals mit optischen Mitteln erlauben. Als Chromophore kommen Cytochrome [LaManna J.C. et al. 1987], insbesondere Hämoglobin [Grinvald A. et al., 1988] aber auch Cytochrome der Atmungskette, ferner NADPH/NADP in Betracht [Frostig R. et al., 1990].*

durch die intakte Dura oder gar die dünngefräste Schädelkalotte abgeleitet werden [Grinvald A. et al., 1988, Frostig R. et al., 1990] - werden prinzipiell auch chronische Ableitungen möglich. Untersuchungen unter Nutzung intrinsischer Signale bieten somit eine Reihe von Vorteilen der VSD- Methode, dies allerdings zum Preis einer deutlich kleineren Signalamplitude – je nach Signaltyp bis in den Zehntelpromillebereich des eingestrahlenen Lichts. Anders als bei spannungsabhängigen Farbstoffen geht das *intrinsische* Signal nicht direkt, sondern indirekt über mehrere Zwischenstufen aus der Nervenzellaktivität hervor. Zur Interpretation des Signals und seiner Implikationen ist daher eine fundierte Kenntnis des Signalursprunges und solcher Mechanismen, die das Signal durch Beeinflussung seiner zugrundeliegenden Determinanten modifizieren können, wesentlich.

### 2.5.3. Tabellarische Gegenüberstellung der Methoden

Gegenüberstellung	OR ES	OR IS
Signalamplitude $\Delta I/I$	bis $30 \times 10^{-4}$ <sup>8</sup>	Zwischen $1 \times 10^{-4}$ <sup>9</sup> und $15 \times 10^{-4}$ <sup>10</sup>
Mechanismus	membranäre Speicherung und aktivitätsabhängige Absorptions- u. Emissionsänderung	Reflexionsänderung aktiver kortikaler Areale infolge verschiedener physiologischer Kompensationsmechanismen
Auflösung zeitlich	Signalantwort erfolgt spontan. Aktivitätsabh. Dye-Markierungen sind ab 1 ms <sup>11</sup> optisch darstellbar. <sup>12</sup>	Das Desoxy-Signal beginnt nach etwa 200-400ms und erreicht einen Peak nach etwa 1,5 sec. Ein zweiter Peak (Blutfluß) baut sich nach 3-10 Sekunden auf.
Auflösung räumlich	Nachweis von Einzelkanälen möglich. Beim Mapping wurden in Barrels mit Ausdehnung von 400µm Signale mit einer Ausdehnung von 1300µm gemessen, wohl wegen Lateralausdehnung der Ausläufer beteiligter Somata. <sup>13</sup> Dyes bieten ein hohes Maß an Kolo-kalisation	Nach Scharrer und Kufflet et al. ist im Kortex kein Neuron über 50mm von einer Kapillare entfernt. Da-aus ergibt sich die theoretische Maximalauflösung der Methode, die aber real aus physiologischen Gründen kaum erreichbar ist (s.u.). Malonek D. et al., 1997 gehen von einer initialen Signalgenese auf kapillärem Niveau aus.
Dargestellte Struktur	Selektive Darstellbarkeit neuronaler Verbände. Einzelstrukturen bis 0,5µm in Kulturen, bis 250µm im Hirnpräparat	Das durch lokale neuronale Aktivität aktivierte vaskuläre Volumen
Belichtungszeit	Kürzer	Länger
Morphologisches Korrelat	Aktive Nervenzelle oder Nervenzellanteile	Signal ist gefäßgebunden. Entstehung durch lok. O <sub>2</sub> -Ausschöpfung ( $\Delta_{Absmax}$ bei 605nm) bzw bedarfsgekop-pelter Durchblutungssteigerung( $\Delta_{Absmax}$ bei 540nm)

<sup>8</sup> Daten für das Absorptions-VSD „NK3041“ (Momose-Sato Y. et al., 1999). Die Kenndaten verschiedener VSD unterscheiden sich erheblich. Übersicht in Momose-Sato Y. et al., 1999.

<sup>9</sup> Amplitude des Desoxy-Signals bei akustischer Stimulation der Katze nach Heß A. und Scheich H., 1996  
<sup>10</sup> Amplitude des Desoxy-Signals bei visueller Stimulation der Katze nach Malonek D. et al., 1997

<sup>11</sup> Nach Grinvald A. et al. 1986

<sup>12</sup> Nach Heß A. und Scheich H., 1996

<sup>13</sup> Grinvald A. et al., 1988

Invasivität	Erheblich, Manipulation direkt am Gehirn unumgänglich. das Gehirn bleibt nicht „unangetastet“	Gering. Manipulationen direkt am Gehirn prinzipiell nicht nötig. Ableitungen ggfs. Auch an dünngefrästem Knochen möglich. (bei $\lambda$ über 800nm)	
Neben- effekte	Phototoxizität	Zeitlich limitierender Faktor	Nein
	Signalverlust durch bleaching	Zeitlich limitierender Faktor	Nein
	Pharmakologische Nebeneffekte	Zeitlich limitierender Faktor	Nein
Ableitg. Am wachen Tier	Nicht möglich	Möglich	
Dynamische Versuchsregimes möglich?	Nein. Farbstoff ist lokal zytotoxisch. Ein abgeleiteter Kortex steht nicht für weiteren Messungen zur Verfügung.	Ja. Intrinsische Signale schädigen das Gewebe nicht. Weitere Messungen am bereits abgeleiteten Kortex sind möglich	
Chronische Ableitungen	Nicht möglich	Möglich	
Klinische Anwendung am Menschen	Nicht möglich	Nach Maßgabe der geeigneten Wellenlänge möglich [Pena M. et al., 2003].	

## 2.5. Positionierung von ORIS innerhalb der funktionellen Methoden

Die Technik des „Optical Recording of Intrinsic Signals“, ORIS (auch: „Optical Imaging of...“, „OI“), stellt innerhalb der funktionellen Methoden das Verbindungsglied dar zwischen räumlich vergleichsweise schlechtauflösenden Methoden wie EEG, MRT oder PET einerseits, die allerdings in der zeitlichen Auflösung einen „Schnappschuß“ über die Aktivität einer relativ großen Kortexfläche gestatten und den räumlich gutauflösenden Methoden wie der optischen Ableitung extrinsischer Signale oder der elektrophysiologischen Summen- und Einzelzelleitungen andererseits, deren gute räumliche Auflösung mit erheblicher Invasivität und langwierigen Sitzungen zur Erstellung detaillierter Karten einhergeht. Anders als bei der Elektrophysiologie oder der Auswertung der VSD- Färbetechniken, ist mit ORIS, abgesehen von der Trepanationsöffnung, soweit es den Kortex selbst betrifft, eine geringe mechanische wie pharmakologische Invasivität verbunden. Daher können Versuchsanordnungen und Reizschemata in weitem Rahmen modifiziert oder wiederholt werden, ohne daß dies die Signalqualität beeinträchtigen würde. Nachteilig wirkt sich allerdings die geringe Signalamplitude aus, die einen optimal rauschminimierten Versuchsaufbau und spezielle Triggertechniken erfordert. Darüberhinaus ist das ORIS- Verfahren aus unbekanntem Gründen nicht an jedem Individuum mit gleichen Erfolgsraten durchführbar. Es besteht von Versuchstier zu Versuchstier aber auch von Kortexareal zu Kortexareal bei demselben Tier

erhebliche Unterschiede im Ableitergebnis, und auch die Variabilität der Antworten auf wiederholte Darbietung identischer Reize in demselben Individuum ist beträchtlich (Dinse H., pers. Mitteilg., Spitzer M., pers. Mitteilg.) Die Anwendbarkeit der Technik ist zudem auf den Kortex beschränkt. Tieferliegende Kerngebiete des Gehirns, wie bei PET- SPECT- und f-MRI, können nicht erreicht werden.

**ABB1 :**

## Kapitel 3. Die neurovaskuläre Kopplung als Grundlage des OI-Signals

### 3.1. Gefäße und Signal

ORIS stellt aktivitätsassoziierte Phänomene, in erster Linie Durchblutungsphänomene, dar. Um die mittels ORIS erhobenen Daten verstehen und diskutieren zu können, ist ein Verständnis des Verhältnisses zwischen lokaler Hirnaktivität und den physiologischen Parametern, die von der Methode erfaßt werden, entscheidend. Das ORIS-Signal ist an Hämoglobin und so an Erythrozyten gebunden. Die Erythrozyten liegen im Gefäßbett der zerebralen Zirkulation. Aufgrund der Bindung des ORIS-Signals an die Vaskularisierung des Kortex ist eine orientierende Betrachtung des Gefäßsystems sinnvoll. Die Entwicklung des Gehirns vollzieht sich aus dem Neuralrohr unter Ausbildung einer multivesikulären Grundstruktur [Kahle W., 1986]. Unter Verdickung der Vesikelwände und Differenzierung des sechslagigen Kortex bildet sich die spätere Hirnsubstanz. Die Vaskulogenese trägt dieser

Entwicklung Rechnung und folgt in Anatomie und Morphologie der Bedarfslage des wachsenden Organs. Hieraus ergibt sich eine Versorgung durch zunächst oberflächliche, dichte Gefäßnetze, die sich im Rahmen der Kortexdifferenzierung zunehmend ausdünnen und senkrecht in die Tiefe fortsetzen. Hier verzweigt sich ein den lokalen Bedürfnissen verschiedener Areale angemessenes, dichtes Kapillarnetz [Panesar J. et al., 2001; Wang D.B. et al., 1992; Harrison R.V., 2002]. Die Entwicklung der zerebralen Gefäßversorgung ist bei der Ratte bis zur dritten postnatalen Woche weitgehend abgeschlossen [Keep R.F. et al., 1990].

### 3.1.1. Die Angioarchitektur des Kortex

Die Angioarchitektur des Kortex kann in drei Stufen eingeteilt werden [Duvernoy H.M. et al., 1981; Duvernoy H.M. 1984; 1999]. Die extrazerebralen Gefäßverläufe größerer Arterien liegen, nach Durchtritt von Pachymeninx und Arachnoidea mater, bindegewebig an die weiche Hirnhaut fixiert, als sogenannte „piale Arterien“ im Subarachnoidalraum. Arterielle Gefäße kleineren Kalibers zweigen von den oberflächlichen Gefäßen ab und bilden, mit der Pia mater als Leitstruktur, ein dichtes Geflecht, das die Kortexoberfläche bis in die Tiefe der Sulci feinmaschig überzieht. Diese Gefäße geben lange Äste ins Marklager und kurze, dünne Äste, die sog. Hirnrindenarterien, senkrecht in den Kortex ab. Die Hirnrindenarterien werden, wie auch die Venen, je nach Eindringtiefe und Kaliber nach Duvernoy in die Gruppen A1 bis A5 eingeteilt: Arterien der Gruppe A1 erreichen Schicht II, A2-Arterien Schicht III, A3-Arterien Schicht V, Arterien die den gesamten Kortex durchwandern, werden als A4 bezeichnet, solche des Typs A5 erreichen das Marklager. Die Kaliber variieren mit der Länge der Gefäße: Arterien der Gruppen A1 und A2 haben Durchmesser zwischen 10 und 15µm, Gefäße der Gruppen A2 und A3 sind zwischen 15 und 25µm stark, die Markarterien der Gruppe 5, die den längsten Weg zurücklegen müssen, messen 25-35µm. Innerhalb des Kortex bilden die Rinden- und Markarterien ein ausgedehntes Kapillarnetz. Dieses variiert in seiner Dichte in Abhängigkeit von der kortikalen Schichte, die es versorgt [Harrison R.V. et al., 2002; Duvernoy H.M. et al., 1981; Lazorthes G. et al., 1968]. Neuere Untersuchungen [Harrison *ibid.*] ergeben Hinweise auf eine lokalisationspezifisch unterschiedliche Distribution und Dichte der Kapillarnetzwerke in den Kortexschichten. Offenbar sind manche Areale dichter kapillarisiert als andere.

### **ABB.2:**

### 3.1.2. Arterien

Die Verzweigungen der Hirngefäße sind in den Säugetierspezies vergleichbar. Die arterielle Versorgung des Gehirns erfolgt durch vier arterielle Zuflüsse. Als „vorderes Stromgebiet“ werden die von den Aa. cerebri anteriores und mediae versorgten Hirnareale bezeichnet, beide gespeist aus der A. carotis. Die Aa. carotides internae treten durch den Canalis caroticus in das Felsenbein ein, durchlaufen den Sinus cavernosus und den Sulcus caroticus, um mit ihrer pars cisternalis in die Pachymeninx einzutreten. Hier münden sie nahe dem Processus clinoides in den Circulus arteriosus Willisii. Nach nasal sind sie über die Aa. communicantes anteriores mit den Aa. cerebri anteriores verbunden, eine Anastomose zwischen letzteren durch die A. communicans anterior schließt den Circulus nach nasal. Zum Versorgungsgebiet der Aa. anteriores zählen: das Frontalhirn, schmale Areale beidseits der Mantelkante mit Anteilen der primären sensiblen und primären motorischen Rinden, die vorderen Anteile des Hypothalamus, Anteile der Capsula interna, der olfaktorische Kortex und der Bulbus olfactorius. Die A. cerebri media versorgt große Anteile des Temporallappens mit primären sensorischen und motorischen Anteilen, Anteile der Capsula interna, des Thalamus und vor allem den auditorischen Kortex über die Arteria temporalis media, Ramus superior und medius. Das hintere Stromgebiet wird durch die Aa. vertebrales gespeist, die sich zur Arteria basilaris vereinigen. Die Arteria basilaris gibt mehrere Äste zur Versorgung von Hirnstamm und Kleinhirn ab, speist zur Versorgung des Okzipitallappens, des primären visuellen Kortex und eines Teils der Basalganglien die Arteria cerebri posterior und schließt durch die Mündung der Aa. communicantes posteriores in die Aa. cerebri mediae beidseits den Willisischen Kreis nach okzipital. Die Carotiden und Vertebrales verlaufen im Cavum subarachnoidale, kleinere Äste angelagert und fixiert an der Pia mater. Hirnarterien und Duraarterien sind durch den Schädelknochen von äußerer Krafteinwirkung geschützt und daher nur mit dünner Adventitia versehen. Die senkrecht in die Gehirnsubstanz eindringenden, funktionellen Endarterien speisen die in der grauen Substanz infolge größerer Stoffwechselaktivität engeren und die in der weißen Substanz weiteren kapillären Netze [Panesar J. et al., 2001]. Der afferente Anteil der Gefäßversorgung umfaßt somit histologisch die großen und mittleren Arterien der Kortexoberfläche, die kleinen Arterien der kortikalen Schichten sowie die Arteriolen und Metarteriolen. Die Gefäße des arteriellen Anteils der zerebralen Strombahn sind nach einem einheitlichen Schema aufgebaute, muskuläre Gefäße: Die innerste Schichte, Tunica intima, besteht aus einem in Flußrichtung scherengitterartig angeordneten Kollagenfasernetz, der Membrana elastica interna, der nach luminal eine Endo-

theliozytenschicht aufgelagert ist. Die Elastica ist das flexible Grundgerüst, das zusammen mit der Tunica muscularis Blutdruckamplituden abpuffert, vor allem aber durch die ringförmig und longitudinal angeordneten, glatten Muskelzellen der Tunica media zur erfordernisangepaßten Durchflußregulation in der Weite verstellt werden kann. Die äußere Schichte besteht aus der feinen, kollagenen Adventitia, die der Fixierung der Gefäße in der Umgebung dient.

### 3.1.3. Die Mikrozirkulation

Arteriolen, terminale Arteriolen, Metarteriolen und Kapillaren sowie postkapilläre Venolen bilden zusammen die terminale Strombahn oder „Mikrozirkulation“. Orientierende Durchmesserangaben sind für:

Arteriolen	40 - 100µm,
terminale Arteriolen.	20 - 40µm,
Metarteriolen	8 - 20µm.

Die Arteriolen gehen mit einem Wanddicken/Innendurchmesser-Verhältnis von 1:1 aus den kleinsten Arterien hervor und sind die kleinsten Äste des arteriellen Gefäßbaumes. Sie gehen als präkapilläre Arteriolen unter Verlust der Myozyten, die zu Anfang noch in Form einer zweischichtigen Wand vorhanden sind, zunächst in die Metarteriolen, schließlich in die Kapillaren über. Das Lumen der Arteriolen, die für die Regulation der Kapillardurchblutung zuständig sind, liegt zwischen 30 und 190µm und unterschreitet somit machmal den Durchmesser der Kapillaren. Die Endotheliozyten sind einer dünnen Elastica interna aufgelagert und von einer aus zirkulär verlaufenden Myozyten gebildeten Media umkleidet. Die Myozyten rücken umso weiter auseinander, je stärker sich die terminale Arteriole verzweigt: die Metarteriole ist nur noch lückenhaft, die Kapillare schließlich gar nicht mehr von Muskelzellen, sondern nur noch von Perizyten umgeben.

### 3.1.4. Das Kapillarbett

Die Kapillarnetze ermöglichen als anatomisch feinste Strukturen des kortikalen Blutkreislaufes, in Abhängigkeit von ihrer Maschenweite, die Nährstoffversorgung des Gewebes. Im Kapillargebiet ist der Gesamtquerschnitt erheblich größer als in den zuführenden Gefäßen. Blutdruck und Strömungsgeschwindigkeit werden hier entsprechend der Kontinuitätsbedingung auf 1/800 (0,5mm/sec) bzw 15-30mmHg herabgesetzt. Hierdurch bleibt mehr Zeit für den Stoff- und Gasaustausch. Die Kapillardichte schwankt nach Maßgabe

des Bedarfes einzelner Regionen. Stoffwechselaktivere Regionen sind dichter kapillarisiert als solche niedrigerer Stoffwechselaktivität, der Kortex ist dichter vaskularisiert als das Mark [Harrison R.V. et al., 2002; Panesar J. et al., 2001], was für die Signalgröße bei ORIS entscheidend ist. Die höchste Kapillardichte tritt in Schicht 4 des Kortex auf. Analog zu der Klassifizierung der Arterien nach Eindringtiefe kann eine Klassifizierung nach Dichte der vorliegenden Kapillarnetze geführt werden [Duvernoy H.M. et al., 1981]. Es bestehen vier zueinander und zur pialen Oberfläche parallele Kapillarnetze, die unterschiedliche Dichten aufweisen (vgl. Abb4). Die größte Kapillardichte tritt in den mittleren und tiefen vaskulären Schichten auf [Reina-De La Torre F. et al., 1998]. Außerdem wurden zirkuläre Einschnürungen an den Verzweigungen der kortikalen Arterien gefunden, die Sphincter sein könnten [ibid.]. Die autoregulatorische Potenz dieser Gebiete wird auf die Kontraktion von glatter Muskulatur der Gefäßwand und Perizyten, die der Wand angelagert sind, zurückgeführt. Bei der Katze liegt der Abstand zwischen zwei Kapillaren bei durchschnittlich  $24\mu\text{m}$ , die Länge eines Segmentes bei durchschnittlich  $108\mu\text{m}$ , der Kapillarquerschnitt bei  $5\mu\text{m}$ , die totale Kapillarlänge pro Volumen bei  $939\text{mm}/\text{mm}^2$  und die durchschnittliche Kapillaroberfläche pro  $\text{mm}^3$  bei etwa  $15,3\text{mm}^2/\text{mm}^3$  [Pawlik G. et al., 1981]. Die wahrscheinlichste Transitzeit für Erythrozyten beträgt 4 sec. [Hudetz A.G. et al., 1989]. Nach Abzug der etwa  $1\mu\text{m}$  in das Lumen reichenden endothelialen Glycokalix ergeben sich für die lichte Weite im Kapillarsystem Werte zwischen  $3\mu\text{m}$  und  $30\mu\text{m}$ . Die Erythrozyten erwachsener Katzen haben Durchmesser von durchschnittlich  $5,8\mu\text{m}$ . Sie können demnach die feinsten Kapillaren nur Dank ihrer Verformbarkeit und nur in „perlschnurartiger Aufreihung“ passieren. Der Blutfluß in Kapillaren weist keine Pulsationen mehr auf, sondern einen weitgehend konstanten und ruhigen Fluß. Die Desoxygenierung des Hb beginnt bereits in intrakortikalen Arteriolen [Gallen C.C. et al., 1993]. Während der Kapillarpassage sinkt der  $\text{O}_2$ -Partialdruck im Blut von  $90\text{mmHg}$  auf  $28\text{mmHg}$  ab [Grote J., 1997]. Die Hämoglobinsättigung beträgt zu Beginn der kortikalen Gefäße nahezu 100% und nimmt bereits in den Arteriolen ab, um Bereich des Kapillarbettes venöse Sättigungen zu erreichen.

### 3.1.5. Die Blut-Hirn-Schranke

Die Kapillarwand besteht aus einer feinen Basallamina, die nach außen hin von einem zarten und elastischen Gitterfasernetz aus retikulären Fasern umspinnen ist. Dem aufgelagert und eingeschrieben von der Basallamina finden sich Perizyten, multifunktionelle Zellen, deren flacher Zelleib mit verzweigten, interdigitierenden Ausläufern [Allt G. et al., 2001] etwa 20-30% des Kapillarröhrchens überziehen [Frank R.N. et al., 1987]. Zudem bestehen enge

Kontakte zwischen Astrozytenausläufern<sup>14</sup> und der Kapillarwand. Alle am Wandaufbau beteiligten Strukturen sind limitierende Elemente im Stoffaustausch durch die Kapillarwand. Die Endothelien kortikaler Kapillaren besitzen ein 1-2µm starkes, nichtgefenstertes, durch Überlappungen der Zellränder, Cytoplasmafalten und Zonulae occludentes abgedichtetes Endothel, das den Stofftransport für diffusionslimitierte Stoffe einschränkt. Die Basallamina hat die Aufgabe eines selektiv permeablen Ultrafilters. Nicht eingeschränkt sind hingegen die durchblutungslimitierten Austauschvorgänge, die keiner besonderen Mechanismen bedürfen, sondern per diffusionem stattfinden. Hierzu gehören der Austausch von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>-Molekülen, denen bei einer Molekülgröße von 0,16 nm die gesamte Kapillaroberfläche zur Verfügung steht, um ins Interstitium bzw. ins Lumen zu gelangen. Hier wird die Transportmenge und -Geschwindigkeit von der Durchblutung gesteuert. Bei geichbleibender Durchflußrate ergibt sich für die Serumkonzentration diffusibler Stoffe ein hyperbolischer Verlauf. Bei hoher Permeabilität wird bereits vor Ende der Kapillare ein Äquilibrium zwischen Plasma und Interstitium erreicht, sodaß bei erhöhter Durchblutung auch peripherere Anteile der Kapillaren am Austausch teilnehmen können. Die kapilläre Diffusionsrate von O<sub>2</sub> liegt bei 1000ml/sec/100g. Movers der Diffusion ist der Partialdruckgradient.

### 3.1.6. Die Venen

Dem Kapillarbett schließt sich das venöse System zur Drainage desoxygenierten, nährstoffarmen Blutes an. Die Venen zeigen ein ähnliches Aufteilungsmuster wie die Arterien und werden nach Duvernoy [Duvernoy H.M., 1984; 1999; Duvernoy H.M. et al., 1981] je nach Eindringtiefe und Länge in fünf Gruppen eingeteilt. Im intrakortikalen Verlauf ist eine Vene häufig von mehreren Arterien begleitet. Die Drainage findet schließlich über superfizielle Venen in die venösen Sinus und die Venae jugulares statt.

## **3.2 Die Ebenen kortikaler Durchblutungsregulation. Blut=Aktivität?**

Funktionelle Neuroimagingverfahren sollen neuronale Aktivität darstellen, messen aber eigentlich assoziierte, vasogene Phänomene. Der Ansatz, eine Aktivitätskarte über den Umweg aktivitätsassoziierter vaskulärer Veränderungen darzustellen, geht auf die 1890 von Roy und Sherrington aufgestellte These der neurovaskuläre Kopplung zurück:

*„We conclude then, that the chemical products of cerebral metabolism ... which bathes the walls of the arterioles of the brain can cause variations of the cerebral vessels:*

---

<sup>14</sup> (80% der Endothel- Perizytenschicht ist von Astrozytenausläufern umschieden (Ambrosi G. et al., 1995)

*that in this re-action the brain possesses an intrinsic mechanism by which its vascular supply can be varied locally in correspondence with local variations of functional activity.*“ ( Roy C.S. und Sherrington C.S., 1890)

...und damit auf die Annahme einer bedarfsangepaßten Regulierbarkeit lokaler Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch metabolische und neuronale Mechanismen nach Maßgabe des lokalen Bedarfs. Dennoch ergeben sich aus der Kenntnis der Nichtunmittelbarkeit des Signals bezüglich seiner Proportionalität verschiedene Überlegungen. Die Frage, mittels welcher Mechanismen, in welchem Ausmaß und auf welcher Ebene innerhalb der kortikalen Mikrozirkulation eine bedarfsangepaßte, lokal gesteuerte Durchblutungsregulation stattfindet, ist im Rahmen der vorliegenden Versuche sowohl in der Bewertung der räumlichen und zeitlichen Auflösung des Systems als auch in der Berücksichtigung assoziierter, biologischer Störgrößen der Signalgewinnung von großer Bedeutung. Die folgenden Betrachtungen gehen daher auf morphologische und physiologische Voraussetzungen dieser Regulationsmechanismen und auf das vielen neurophysiologischen Mappingmethoden zugrundeliegende Prinzip der „neurovaskulären Kopplung“ ein.

### 3.2.1. Physiologische Mechanismen und morphologische Korrelate aktivitätsangepaßter Durchblutung

Für Bereiche, die einen relevanten Beitrag zur Mehrdurchblutung nachgeschalteter Areale leisten, ist zu fordern, daß sie in ihrer Weite justierbar sind und daß ein relevanter Anteil des Widerstandes an ihnen abfällt. Zu klären ist, welche zugrundeliegenden Prinzipien eine Mehrdurchblutung ermöglichen. Seit etwa achtzig Jahren steht der Begriff des „capillary recruitment“ als Prinzip der lokalen Durchflußregulation im Raum. Die lokale Blutflußanpassung an gesteigerten metabolischen Bedarf infolge erhöhter neuronaler Aktivität kann als ein funktionelles Zusammenspiel anatomischer Strukturen mit Metaboliten von Funktions- und Regelkreisen verstanden werden. Als morphologische Bestandteile eines solchen rückgekoppelten Systems gelten sowohl kontraktile Elemente als auch solche, die eine Kontraktion modulieren können.

#### 3.2.1.1. „Capillary recruitment“

Die Annahme, kortikale Durchblutung könne aktivitätsabhängig durch Rekrutierung vormals nichtperfundierter Kapillaren verstärkt werden, wurde als Gedankenspiel 1919 erstmals von

Krogh aufgrund von Versuchen an Froscharterien geäußert [Krogh A., 1919]. Seitdem wird das Prinzip des „Recruitment“, nicht zuletzt wegen uneinheitlicher Definitionen des Begriffes, kontrovers diskutiert. Ursprünglich bezog sich der Ausdruck auf vaskuläre Areale, die weder von Plasma, noch von Erythrozyten durchströmt würden. Die lokale Austauschfläche wüchse bei Inkrafttreten dieses Mechanismus in Entsprechung der Durchblutungszunahme. Ein solcher Mechanismus wird heute weitgehend abgelehnt. Es gibt zwar unterstützende Literatur [Francois-Dainville E. et al., 1986; Shockley J.P. und La Manna J.C., 1988; Weiss H.R. 1988], im Wesentlichen aber Arbeiten, die abschlägige Ergebnisse liefern [Hudetz A.G. et al., 1995; Hudetz A.G., 1997; Villringer A. et al., 1994; Kuschinsky W., 1996; Gobel U. et al., 1991/1990/1989]. Kuschinsky schlägt vor, den Begriff des „recruitment“ durch „recruitment of erythrocytes“ zu ersetzen, um zu unterstreichen, daß Kapillaren stets von Plasma durchströmt würden [Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992]. Es herrscht hingegen Einstimmigkeit in der Ansicht, daß eine Perfusion mit Erythrozyten nach Maßgabe der Gefäßweite moduliert bzw. abgeschaltet werden kann [Villringer *ibid.*, Krolo I. und Hudetz A.G., 2000]. Beim funktionellen Imaging scheint einem „capillary recruitment“ demnach keine entscheidende Bedeutung zuzukommen.

### 3.2.1.2. Gesteuerte Dilatation

Das Prinzip der lokal gesteuerten Durchblutung durch Anpassung des Gefäßdurchmessers beruht auf kontraktile Elementen der Gefäßwand, die durch Metabolite, Innervation und Botenstoffe ansteuerbar sind. Die erreichbare Durchblutungsveränderung, ist nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille proportional der vierten Potenz des Radius. Die hinzugewonnene Austauschfläche ist proportional dem Radius. Kontraktile Elemente oder Mediatoren sind:

#### 3.2.1.2.1. Glatte Muskulatur

Die glatte Gefäßmuskulatur ist sowohl als struktureller Bestandteil in der Tunica media der Gefäßwandung bis zur Ebene der Arteriolen und Metarteriolen als auch in Form umlaufende Sphincter präkapillärer Metarteriolen [Reina-De La Torre F. et al., 1998; Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992] Ziel verschiedenster Regulationsprozesse. Im Kortex scheinen besonders solche Arteriolen mit einer Vielzahl an glattmuskulären Sphincteren ausgestattet zu sein, die kapilläre Netzwerke der Kortexschichten speisen [Harrison R.H. et al., 2002]. Im Rahmen der lokalen Regulation fällt besonders die Dilatation glatter Muskulatur durch endothelial oder neuronal gebildetes NO ins Gewicht [Busse R. et al., 1985/1998a+b]. NO aktiviert die lösliche Guanylylzyclase, was über eine Erhöhung von intrazellulärem cGMP als second

Messenger zur Absenkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und damit zur Vasodilatation führt [Busse R. et al., 1985]. Man nimmt an, daß die glatte Gefäßmuskulatur im Rahmen des Bayliss-Effekts den Grundtonus der Widerstandgefäße aufrechterhält und daß lokale und neurale Einflüsse diesen Grundtonus modulieren.

#### 3.2.1.2.2. Endothel

Das Gefäßendothel der arteriellen Strombahn besitzt kontraktile Anteile [Le Beux Y.J. und Willemot J., 1978a; Nag S. et al., 1978]. Es handelt sich um Aktin- und Myosinfilamente, deren intrazelluläre Konzentration die glatter Muskelzellen erreicht [Schnittler H. et al., 1989; 1990]. Eine Beteiligung der Endothelzellen an der Regulation des mikrovaskulären Tonus ist denkbar [Kelley C. und D'Amore P., 1987; Glyn M.C. und Ward B.J., 2000], der Beweis einer aktiven Beteiligung des Endothels an der bedarfsangepaßten Regulation der zerebralen Mikrozirkulation durch aktive Kontraktion auf Basis kontraktiler Filamente steht noch aus.

#### 3.2.1.2.3. Perizyten

Eine abschließende Klärung von Provenienz und Funktion der Perizyten im arteriellen und kapillären System steht noch aus [Alliot F. et al., 1999]. Sie scheinen den endothelialen Stoffwechsel zu regulieren und fungieren als Macrophagen [Rucker H.K. et al., 2000]. Perizyten sind vorrangig im Kapillarstromgebiet vorhanden, wo sie die glatte Gefäßwandmuskulatur ersetzen. Sie sind komplett von der Basallamina umschieden und überziehen mit ihren verzweigten, interdigitierenden Fortsätzen weite Strecken der Gefäße [Thomas W.E., 1999]. Es liegen Hinweise vor, daß Perizyten sowohl in der Immunabwehr und Regulation endothelialen Stoffwechsels als auch in der Modulation der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke Funktionen wahrnehmen. Außerdem besteht weitgehend Einigkeit in der Annahme einer kontraktilen Potenz der Perizyten [Reina-De La Torre F. et al., 1998; Thomas W.E., 1999; Tusques J. et al., 1975; Castejon O.J., 1984]. Unterstützt wird dies durch den Nachweis kontraktiler, zum Teil zirkulär in den Somata von Perizytenausläufern um das Gefäß geschlungener Aktin- und Myosinfilamente [Le Beux Y.J. und Willemot J., 1978b; Wallow I.H. und Burnside B., 1980; Castejon O.J., 1984; Bandopadhyay R. et al., 2001] sowie durch den Nachweis von Gap- Junctions zwischen Perizyten und Endothelzellen, denen eine Rolle in der Abstimmung der Kapillardurchmesser zur Regulation des lokalen Blutflusses zugeschrieben wird [Cuevas P. et al., 1984]. Ob Perizyten im Kapillarbereich zur Einstellung der Gefäßdurchmesser tatsächlich befähigt sind, wird kontrovers diskutiert. Es liegen Ergebnisse vor, die eine Regulation auf kapillärer Ebene durch Perizyten annehmen

[Bandopadhyay R. et al. 2001; Reina-De La Torre F. et al., 1998; Wallow I.H. und Burnside B., 1980; Malonek D. et al., 1997] und solche, die mit der Dilatierbarkeit von Kapillaren insgesamt zugleich eine Beeinflußbarkeit dieser Dilatation durch Perizyten infragestellen [Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992; Mchedlishvili G. et al., 1987]. In welchem Maße der Perizyten tonus an die Stoffwechselsituation umgebender Gewebe koppelt, ist Gegenstand verschiedener Arbeiten. So wurde ihre *adenosinabhängige* Relaxation auf Basis von A<sub>2</sub>-Rezeptoren nachgewiesen [Matsugi T. et al., 1997; Li Q. und Puro D.G., 2001,] ferner eine Relaxation infolge erhöhten lokalen CO<sup>2</sup> Partialdruckes [Matsugi T. *ibid.*]. Zerebrale Perizyten besitzen Guanylatcyclase [Paakkari I. und Lindsberg P., 1995], die sowohl durch endotheliales als auch durch neuronales NO nitrenger Neurone stimulierbar ist [Paakkari *ibid.*; Poeggel G. et al., 1992]. Eine Kaskade, die in eine verringerte intrazelluläre Konzentration von Ca<sup>2+</sup> und Relaxation mündet, ist für retinale Perizyten beschrieben [Sakagami K. et al., 2001]. Dies entspräche dem Wirkmechanismus, der für glatte Muskulatur bekannt ist. Ebenso ist wie für Astrozyten (s.u.) eine *direkte nitregerge Innervation* von Perizyten beschrieben [Roufail E. et al., 1995, Paakkari I. und Lindsberg P., 1995; Poeggel G. et al., 1992]. Eine Regulation durch Perizyten könnte auf arteriolärem und kapillärem Niveau stattfinden.

#### 3.2.1.2.4. Astrozyten

Astrozyten sind mit einem Masseanteil von 50% die dominierende Zellart im Gehirn. Ihre Fortsätze umscheiden über 80% der kortikalen Mikrozirkulation [Virgintino D. et al., 1997]. Die Funktionen von Astrozyten als Stützzellen, in der Immunabwehr wie in der bedarfsangepaßten Durchblutungsregulation, sind Gegenstand intensiver Forschung. Erhöhte kortikale Stoffwechselaktivität infolge neuronaler Aktivität geht zum einen mit einer Erhöhung des Glucoseverbrauchs [Magistretti P.J. et al., 1997a+b], zum andern mit einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs einher. In der Regulation beider scheinen Astrozyten eine wichtige Rolle zu spielen. Es wurde gezeigt, daß sich an den kapillarseitigen Ausläufern der Astrozyten metabotrope GLUT1-Transporter befinden und daß Astrozyten über ihre synaptischen Kontakte durch ausgeschüttete Transmitter kostimuliert werden [Porter J.T. und McCarthy K.D., 1996]. Aufgrund ihrer engen Kontakte zum synaptischen Spalt einerseits und zur Gefäßmembran andererseits können Astrozyten auf ausgeschüttete Transmitter reagieren und sind damit ideale Sensoren erhöhter neuraler Aktivität und Vermittler bedarfsangepaßter Nährstoff- und Blutversorgung [Porter J.T. und McCarthy K.D., 1996, 1997; Magistretti P.J. und Pellerin L., 1999]. Als Nährstoff wird aus Glucose synthetisiertes Laktat bereitgestellt, das als bevorzugtes Substrat aktiver Neurone gilt [Schurr A. et al., 1988]. Es scheint eine

Kopplung zwischen Glutamataufnahme, Glucoseutilisation und Weitergabe von Laktat als Energiequelle an die Neurone zu bestehen [Magistretti P.J. und Pellerin L., 1999]<sup>15</sup>. Basierend auf einer vergleichbaren Kopplung ist eine bedarfsangepaßte Regulation des lokalen Blutstromes auf Ebene arterieller glatter Muskelzellen, moduliert nach der Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt, nachgewiesen worden [Harder D.R. et al., 1998]. Glutamat-Rezeptoren führen bei Kontakt mit dem Neurotransmitter Cytochrom P450-vermittelt zur Synthese von epoxyeicosatrienen Säuren, die zu einer direkten Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen [Harder D.R. et al., 1998, 2002]. Im Ergebnis findet bei erhöhtem Laktatbedarf des Neurons zusätzlich eine Astrozyteninduzierte Vasodilatation statt. Astrozyten spielen außerdem durch ihre Ausstattung mit Purinozeptoren als Adressaten von Adenosin eine Rolle in der Blutflußregulation. Adenosin bewirkt durch rezeptorvermittelte Stimulation astrozytärer eNOS die Ausschüttung von Stickstoffmonoxyd [Janigro D. et al., 1996]. Aufgrund der engen Kontakte der Astrozyten mit den Gefäßwänden muskulärer Gefäße wird eine Einflußnahme auf die Gefäßweite angenommen [Wiencken A.E. und Casagrande V.A., 1999]. Ein weiterer beschriebener Mechanismus astrozytärer Regulation wäre die Aufnahme von neuronal freigesetztem  $K^+$  und die Abgabe an Myozyten über Astrozytenausläufer mit der Folge einer dilatativen Membranhypolarisation [Paulson O.B. und Newman E.A., 1987]. Auch für Perizyten, zu denen ebenfalls enge astrozytäre Kontakte bestehen, ist eine Dilatierbarkeit durch NO nachgewiesen. Darüberhinaus ist eine direkte neural ausgelöste Ausschüttung astrozytären NOs beschrieben [Murphy T.H. et al., 1993].

#### 3.2.1.2.5. Vasoregulation durch gezielte Innervation

Die neuronale Kontrolle zerebraler Durchblutung soll hier nur insofern erwähnt werden, als sie modulierend auf die bedarfsangepaßte Regulation einwirkt. Serotoninerge wie auch sympathische und parasympathische Innervation regulieren, unabhängig vom lokalen Bedarf, global [Branston N.M., 1995]. Es sind allerdings Nervengeflechte beschrieben, die nitreg eine streng lokale, bedarfsgekoppelte Durchblutung modulieren können. Für diese Neurone ist eine Lage in unmittelbarer Nähe zu intrakortikalen Gefäßen erwähnt. Sie sind im nächsten Abschnitt behandelt.

---

<sup>15</sup> *Laktat wird normalerweise wegen unzulänglicher Permeation durch die BHS kaum metabolisiert, scheint aber unter Aktivität von Neuronen bevorzugt verstoffwechselt zu werden [Schurr et al., 1988]. Offenbar wird Glucose von Astrozyten gezielt aufgenommen und zu Lactat umgesetzt.*

### 3.2.1.2.6. Vasoregulation durch NO

NO ist ein Molekül mit weitreichenden Eigenschaften, das den Gefäßendothelien, Astrozyten und nitregeren Neuronen entstammt. Es ist ein potenter Vasodilatator, Immunmodulator und Neurotransmitter im ZNS [Iwase K. et al. 2000; Mayer B. und Hemmens B., 1997]. Im ZNS ist sowohl eine globale Durchblutungsregulation durch Innervation nitreger Neurone als auch eine in kleinsten funktionellen Einheiten stattfindende, bedarfsangepaßte Vasodilatation in Gebieten erhöhten Durchblutungsbedarfs infolge neuronaler Aktivität beschrieben. Stickstoffmonoxyd kann somit sowohl aus Endothelien als auch aus Astrozyten und Neuronen freigesetzt werden und in glatter Muskulatur durch eine cGMP-gekoppelte Kaskade zur Relaxation und damit Weitstellung betreffender Gefäße führen. Auch in Perizyten, denen im Kapillarbereich eine kontraktile Funktion, vergleichbar der glatter Muskulatur in vorgeschalteten Gefäßabschnitten, zugeschrieben wird, ist eine cGMP- vermittelte, durch NO ausgelöste Dilatation nachweisbar. Einen wesentlichen Anteil der bedarfsangepaßten Durchblutungsregulation im Kortex stellen nitreger Neuronenverbände die lokale Gefäße gezielt innervieren [Estrada C. und DeFelipe J., 1998], und über weite Strecken begleiten. Die nitregeren Neurone sind morphologisch heterogen und reagieren auf Stimulation von Glutamatrezeptoren mit Ausschüttung von NO und „Neuropeptid Y“, NPY [Faraci F.M. und Brian J.E., 1994]. Kontakte nitreger Neurone zu Astrozyten und Perizyten [Estrada C. und De Felipe J., *ibid*; Roufail E. et al., 1995; Paakkari I. und Lindsberg P., 1995] sowie zwischen eNOS-positiven Astrozytenausläufern in unmittelbarer Nähe synaptischer Spalte von Neuronen in Schicht III und Blutgefäßen sind beschrieben [Wiencken A.E. und Casagrande V.A., 1999]. Ein denkbarer Wirkmechanismus der neuronal vermittelten, nitregeren Vasodilatation wäre eine glutamininduzierte, synchrone Ausschüttung von NO und NPY mit der Folge einer  $100\mu\text{m}^{16}$  im Radius umfassenden Vasodilatation [Wood J. und Garthwaite J., 1994] durch NO und einer lateralen Limitierung der Dilatation durch spezifisch ausgeschüttetes NPY [Estrada C. und DeFelipe J., *ibid*.]. Ein weiterer, an den Ort der neuronalen Aktivität gekoppelter Wirkmechanismus von NO besteht in der Ausbildung von SNO-Hb, einer geschützten Transportform von NO, die eine Inaktivierung von NO durch FeII-Hb- Moleküle verhindert. NO lagert sich bei Oxygenierung des Hämoglobin an und wird bei Abgabe des Sauerstoffs aus der Hämoglobinbindung ebenfalls abgegeben. Hierdurch entsteht im Bereich erhöhten Stoffwechsels zusätzlich zur erleichterten  $\text{O}_2$  Abgabe durch den Bohr-Effekt eine verbesserte Durchblutung durch lokale Vasodilatation [Gross S.S. und Lane

<sup>16</sup> *Aufgrund der chemischen Eigenschaften von NO wird angenommen, daß in einem Radius von etwa  $100\mu\text{m}$  um den Ort der Ausschüttung herum Gefäße dilatieren, sodaß in diesem Bereich, bzw. im abhängigen Stromgebiet, ein erhöhter Blutfluß zu erwarten ist.*

P., 1999]. Als verstärkendes Element lokaler Durchblutungserhöhung käme die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch Schubspannung in Frage. Eine lokal verstärkte Durchblutung könnte auf diese Weise zu einer aszendierenden, unterstützenden Weitstellung weiter stromaufwärts gelegener Gefäßabschnitte führen. Dieser Mechanismus, nach Busse [Busse R. et al., 1989] von Fleming und Fisslthaler beschrieben [Fisslthaler B. et al., 2000; Fleming I. und Busse R., 1999; 2002], ist für zerebrale Gefäße allerdings noch nicht bewiesen.

#### 3.2.1.2.7. Vasoregulation durch Stoffwechselmetabolite

Obgleich aktivitätsbedingt angehäuften Stoffwechselmetaboliten eigene dilatatorische Potenz entwickeln, schreibt man ihnen heute eher modulierende Wirkungen auf eine anderweitig ausgelöste Durchblutungserhöhung zu. Man geht nicht mehr von ihrer hauptsächlichen Urhebererschaft an der Bedarfsskopplung aus.

#### *K<sup>+</sup>*

Auf den Stellenwert stoffwechselangepaßten freigesetzten Kaliums auf die Durchblutung wurde im Kapitel „Astrozyten“ hingewiesen. Wahrscheinlich wird K<sup>+</sup> infolge Glutamataufnahme von Astrozyten lokal freigesetzt.

#### *pH- Abhängigkeit*

Das erhöhte Vorkommen von Laktat im Bereich aktiver Neurone trägt zum Abfall des lokalen pH bei. Es wurde gezeigt, daß eine elektrische Stimulation der Kortexoberfläche eine pH-Senkung um 0.2 Punkte ergab. Eine Erhöhung der Azidität in diesem Umfang kann bereits eine lokale Durchblutungserhöhung um 20% bewirken.

#### *Adenosin*

Das erhöhte Vorkommen von Adenosin in Bereichen erhöhter Stoffwechselaktivität wird auf die Metabolisierung energiereicher Adenosinnukleotide zurückgeführt. Die Adenosinhypothese (ibid 217) nimmt an, daß erhöhte Adenosinspiegel über Stimulierung von A<sub>2</sub>-Rezeptoren modulierenden Einfluß auf die lokale Durchblutung nehmen können. Tatsächlich wurden auf Neuronen, Endothelien, Astrozyten und Perizyten, denen ein modulatorisches bzw. kontraktiles Potential bereits nachgewiesen werden konnte, A<sub>2</sub>- Rezeptoren gefunden.

### 3.3. Zusammenschau neurovaskuläre Kopplung

Für die Kenntnis der räumlichen und zeitlichen Auflösung des OI- Signals sowie zur kritischen Beurteilung der Meßmethode sind Kenntnisse der zugrundeliegenden Mechanismen sowohl auf anatomischer als auch physiologischer Ebene unerlässlich. In der Zusammenschau der histologischen und biochemischen Attribute der verschiedenen an der lokalen Feinregulation potentiell beteiligten Zellen, Mediatoren und Transmitter ergibt sich ein ausgesprochen komplexes Bild, das in seinen Facetten bestimmt wird durch die bereits von Roy und Sherrington vermutete, lokale dilatative Wirkung von Stoffwechselmetaboliten, ferner durch gezielte, aktivitätsgesteuert dilatierende Innervation von Arteriolen und möglicherweise Kapillaren [Malonek D. et al., 1997] durch nitrerger Neurone. Als aktivierbare, kontraktile Elemente der Mikrozirkulation gelten glatte Muskelzellen im arteriellen bis arteriolären Bereich sowie Perizyten im arteriolären und möglicherweise kapillären Bereich. Für die Regulation des Kapillardurchflusses wird die Regulation von Einzelkapillaren nicht mehr angenommen. Stattdessen geht man von der Regulation eines zuströmlimitierenden arteriolären Gefäßes durch Relaxation von präkapillären Sphinctern aus. Das nachgeschaltete Segment wäre damit als funktionelle Einheit zu betrachten [Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992] und Signale, die mit einer Stromerhöhung in der betreffenden Einheit einhergehen in ihrer Auflösung an die anatomischen Gefäßstrukturen gebunden. Es hat sich allerdings gezeigt, daß die Kopplung von Aktivität und Sauerstoffversorgung nicht exakt korreliert ist, sondern eine Überversorgung mit vorübergehendem Anstieg des  $PO_2$  über den Ausgangswert hinaus stattfindet [Fox P.T. und Raichle M.E., 1986]. Es wird angenommen, daß die beobachtete Hyperoxygenierung des Blutes notwendig ist, um den Konzentrationsgradienten soweit zu erhöhen, daß lokal eine bedarfsgerechte Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Gewebe erreicht wird. Die Mechanismen, welche letztendlich zur Anpassung des Blutflusses an lokale, kortikale Aktivität führen, sind nicht abschließend geklärt. Unklar bleibt insbesondere, ob mit einer lokalen, ereignisgekoppelten, metabolischen Einflußnahme auf die Durchblutung eine Quasi-Unmittelbarkeit zwischen neuronaler Aktivität und Durchblutungssteigerung gegeben ist oder ob die unmittelbar am Ort stattfindende Regulation vorrangig modulatorischer Natur und die Durchblutungsregulation von übergeordneten Zentren koordiniert ist.

### 3.4. Neuronal - anatomische Auflösung des ORIS-Signals

Bislang wurde gezeigt, auf welchen Ebenen eine bedarfsangepaßte Durchblutungsregulation stattfinden kann und in welcher Weise sie zum ORIS- Signal beiträgt. Im Folgenden soll kurz diskutiert werden, inwieweit diese histologisch- physiologischen Erkenntnisse mit der *Feinstruktur* des abzubildenden Kortex in Einklang zu bringen sind und welche Überlegungen im Hinblick auf die räumliche Auflösung des Signals sich hieraus ergeben. Der arteriolen und kapillären Mikrozirkulation des Kortex wohnt nach rezenter Ansicht [Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992] insofern eine strukturelle Gliederung inne, als die regulierte Dilatation perikapillärer Sphincter oder widerstandsbestimmender präkapillärer Arteriolen zu einer konzertierten Blutflußerhöhung im nachgeschalteten Stromgebiet führt, eventuell unterstützt durch dilatative Mechanismen auf kapillärer Ebene<sup>17</sup>. Die Theorie, eine einzelne Kapillare sei durch das Netzwerk hindurch regulierbar, wurde zugunsten eines modular argumentierenden Ansatzes verlassen [Kuschinsky W. und Paulson O.B., *ibid.*]. Hinweise für eine auf kleine Kapillarnetzwerk-Volumina abgestimmte Sphincterstruktur finden sich bei Harrison et al., 2002, sodaß sich bereits der Rückschluß auf ein „kleinstes Durchblutungsmodul“ gestattet, welches isoliert eine Durchblutungssteigerung erfahren und damit zur Auflösung beitragen kann. Der im Kapillargebiet verteilten Sphincterstruktur konnte insofern ein kausales Muster nachgewiesen werden [Harrison R.V. et al., 2002], als auf morphologischer Untersuchungsebene nicht evidente physiologische und anatomische Einheiten des Gewebes durch lokal abgestimmte Regulation der Mikrozirkulation modular gezielt in ihrer Durchblutung eingestellt werden können. Harrison konnte multiple glattmuskuläre, strategisch positionierte Sphincter nachweisen, die in erster Linie im Bereich von Arteriolenverzweigungen lokalisiert waren. Darüberhinaus wurden zirkumferente, klar definierte Einschnürungen an Kapillaren nachgewiesen, die als Resultate perizytärer Kontraktion gewertet wurden. Für die Interpretation der ORIS-Signale, die auf Basis einer Blutfluß- oder einer kapillären Desoxy-Antwort erstellt werden, ist eine lokal unterschiedliche Kapillardichte verschiedener kortikaler Areale nach Maßgabe ihrer charakteristischen Stoffwechselaktivität [Harrison R.V. et al., *ibid.*] zu berücksichtigen. Das heißt, daß je nach abgeleitetem Areal in Abhängigkeit von der vorliegenden Kapillarisierungsdichte verschieden intensive Signalantworten denkbar sind. Die räumliche Auflösung ist somit bestimmt durch die Größe der lokal aktivierbaren Gefäßeinheiten sowie von der Vaskularisierungsdichte selbst.

---

<sup>17</sup> *Morphologische Hinweise auf Regulationsmechanismen der kapillären Perfusion zuletzt 2002 durch Harrison elektronenmikroskopisch.*

### 3.5. Das Verhältnis von Signal und Aktivität

Die „Gefäßkolumne“, definiert als kleinste, durch lokale neuronale Aktivität beeinflussbare vaskuläre Einheit, versorgt die kleinste funktionelle Einheit des Kortex, die Kortexkolumne. Das Neuron als histologisch kleinste Einheit des Kortex agiert zur Informationsverarbeitung nicht einzeln sondern im Verein mit benachbarten Zellen. Kortexkolumnen sind senkrechte Zellsäulen, die durch den sechsschichtigen Kortex reichen und eine funktionelle Einheit bilden. Die „private“ Blutversorgung der Kortexkolumne durch die „eigene“ Gefäßkolumne stellte also idealerweise die Verbindung dar zwischen Blutfluß und einer aktiven neuronalen Einheit; morphologisch eindeutig einer Kortexkolumne zuordbare Gefäßkolumnen sind im Kortex jedoch die Ausnahme. Als physiologisches, auf die Organfunktion bezogenes Korrelat neuronaler „Aktivität“ gelten exzitatorische und inhibitorische postsynaptische Potentiale („EPSPs“ und „IPSPs“) und das Aktionspotential, „AP“. Daher liefern solche Methoden, die elektrische Aktivität direkt ableiten, unmittelbare Ergebnisse, im Gegensatz zu solchen, die über Umwege wie Reflexionsunterschiede oder Suszeptibilitätsänderungen messen. Funktionelle Imagingmethoden stellen assoziierte Phänomene dar; letztendlich nicht die elektrische Hirnaktivität selbst, sondern Phänomene, die mit jenen Stoffwechselfunktionen einhergehen, die Hirnaktivität ermöglichen oder die Bereitschaft, Potentiale zu generieren, aufrechterhalten. Den stoffwechselaktivsten Teil des Neurons und zugleich die kleinste „Funktionseinheit“ neuronaler Aktivität stellt die Synapse dar. Sie ermöglicht, unterstützt durch Membranpumpen zur Aufrechterhaltung der lokalen Homöostase (insbesondere die Na/K-ATPase), die Entstehung und Weiterleitung eines AP. Der Energieverbrauch einer Synapse bzw. des Neurons variiert mit der Feuerrate, sodaß die Versorgung mit Blut der Bedarfslage angepaßt werden muß. Mit dem Mapping der Blutversorgung als Marker der neuronalen Aktivität treten bereits zwei Stufen zwischen die eigentlich interessierende Größe und das gemessene Signal, außerdem die Annahme einer unmittelbaren lokalen Anpassung von Bedarfslage und Durchblutung. Anatomisch lassen sich kaum Hinweise für eine Aufteilung des Kortex in funktionelle Untereinheiten erkennen, physiologisch ist deren Existenz, vor allem in primären sensorischen Arealen, durch histochemische Färbemethoden wahrscheinlich gemacht worden. Die funktionelle Einheit der Neurone innerhalb der Kolumnen ist nach lateral durch die begrenzte Ausdehnung der Dendriten der Pyramidenzellen und Endigungen verschiedener thalamokortikaler Afferenzen definierbar. Den gemeinsamen Ausgang der Kolumne bildet das Axon der Pyramidenzelle. Für den auditorischen Kortex ist eine Kolumnenstruktur nachgewiesen [Merzenich M.M. et al., 1975; Imig T.J. et al., 1977; Phillips D.P. et al., 1979; Imig T.J. et al., 1981; Galaziuk A.V. et al.,

1988]. Der Kolumnendurchmesser beträgt etwa 50-300µm. Ein gebräuchliches Modell für die Demonstration einer Kolumnenstruktur am Gehirn ist der „Whisker barrel cortex“. Innerhalb der Schnurrhaarrepräsentation von Nagern ist jedem Haar eine eigene Kolumne zugeordnet. Arteriöläre Module und kortikale Kolumnen sind anatomisch und funktionell korreliert [Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992; Woolsey R.T. et al., 1996; Cox S.B. et al., 1993; Moskalenko et al., 1996]. Offenbar definieren kortikale neurale Kolumnen „ihr“ vaskuläres Modul durch lokale Aktivierung aus einem zarten Netzwerk heraus, das sich fein ausspannt und dessen Anteile jeweils lokal von Kolumnen zur Ausschöpfung des augenblicklichen Bedarfes herangezogen werden können. Die Arterien der Kortexoberfläche haben daher keinen direkten Bezug zu den Barrels sondern münden unter vielfachen Verzweigungen in das Netzwerk der Kapillaren. Die Kapillarbüschel, deren Position sich innerhalb des Netzwerkes mit der Lage der Barrels deckt, werden vielmehr von verschiedenen Arteriolen synchron gespeist. Geht man von der Kolumne als kleinster kortikaler Einheit und dem „vaskulären Modul“ als kleinster Gefäßeinheit aus, so ergeben sich in Bezug auf die Auflösung intrinsischer Signale verschiedene Überlegungen. Das Blutflußsignal, das auf streng lokalisierte kapilläre Mechanismen zurückgeht, wird in der Größenordnung der kleinsten autonom regulierbaren Gefäßeinheit auftreten und ist in seiner Auflösung an diese gebunden. Die Auflösung des Blutflußsignals liegt daher unter der des „Desoxysignals“ (siehe unten). Da das Desoxysignal auf eine lokale Sauerstoffausschöpfung im Bereich des aktiven Nervengewebes zurückgeht, die auf kapillärer Ebene stattfindet, bietet das Desoxysignal zwar eine bessere Auflösung, da diese aber lediglich Rückschlüsse auf aktive Barrels erlaubt, dürfte die Bedeutung dieses Zuwachses grundsätzlich nicht groß sein. Ausschlaggebend ist hier vielmehr das Grundprinzip der Durchblutungsregulation, die nur initial auf Barrelgröße beschränkt bleibt, um sich aufgrund der oben beschriebenen Mechanismen zwangsläufig auf angrenzende Gebiete auszubreiten. Hierdurch leidet die Auflösung.

## Kapitel 4. Der Ursprung ereigniskoppelter Reflexionsunterschiede am Kortex

### 4.1. Die Komponenten intrinsischer Signale

Als intrinsische optische Signale werden Amplitudenänderungen in der Reflexion eingestrahelten Lichts über die Zeit bezeichnet, die aus funktionell aneinandergereihten, physiologischen

Funktionen oder Kompensationsmechanismen kortikaler, neuronaler Aktivität resultieren. Kortikale Aktivität kann die Reflexionseigenschaften des Kortex grundsätzlich beeinflussen:

- 1) durch Lichtbrechung,
- 2) durch intrinsische Chromophore infolge aktivitätsgekoppelter, lokaler Stoffwechselprozesse (insbesondere desoxygeniertes Hämoglobin, „Hb<sub>R</sub>“)
- 3) durch eine Blutflußzunahme im aktiven Gewebe, wodurch eine erhöhte Menge an intrinsischen Chromophoren<sup>18</sup> (insbesondere Oxyhämoglobin, „Hb<sub>O</sub>“) pro abgeleiteter Fläche vorhanden ist.

Diese Aufzählung ist orientierend und vereinfachend. So tritt ein isoliertes Lichtbrechungssignal nur am Hirnschnitt auf, dessen optische Ableitung nicht durch Durchblutungsartefakte kontaminiert wird. Eine Ableitung am durchbluteten Gehirn hingegen wird auch durchblutungsassoziierte Lichtbrechungskomponenten beinhalten, die auf intrinsische Chromophore zurückgehen. Eine klare Trennung zwischen den Punkten „intrinsische Chromophore“ und „Blutflußantwort“ ist ebenso schwierig, weil auch beim Blutflußsignal ein intrinsisches Chromophor in Form von Hb<sub>O</sub>, bzw. Hämoglobin<sub>total</sub> abgeleitet wird. Der Haupteffekt kommt durch erhöhten Kontrast infolge vermehrten Volumens dieses Chromophors bei erhöhtem Blutfluß zustande. Die Ableitung optischer Signale auf Basis intrinsischer Chromophore wird in erster Linie mit Desoxyhämoglobin durchgeführt, einem intrinsischen Marker, der eng am Ort neuronaler Aktivität entsteht. Das Blutflußsignal oder „Oxymetriesignal“, entsteht auf Basis von Hämoglobin<sub>total</sub> durch die optische Ableitung einer erhöhten Absorption im Bereich kortikaler Aktivität infolge eines lokal erhöhten Blutvolumens.

#### 4.1.1. Das Lichtbrechungssignal

Aktionspotentiale bewirken eine initiale Zunahme in der Lichtbrechung, gefolgt von einem langandauernden Abfall. Es werden verschiedene physiologische Grundlagen für die Entstehung dieses Lichtbrechungssignals angegeben. In erster Linie scheinen Zellschwellungsphänomene eine Rolle zu spielen [Cohen L. und Keynes R.D., 1971; Lipton P., 1973; MacVicar B.A. und Hochman D., 1991], insbesondere eine K<sup>+</sup>-induzierte Astrozytenschwellung durch den NKCC1-Transporter [MacVicar B.A. et al., 2002]. Eine Verminderung des Extrazellulärvolumens durch Zellschwellung infolge evozierter Aktivität im Kortex wurde

<sup>18</sup> Als Chromophor (griech Farbbeber) bezeichnet man den Teil eines Farbstoffs, der ein System aus

von Dietze et al., 1980, 1982 beschrieben. Zellschwellung würde zu erniedrigter Lichtbrechung, erniedrigter Reflexion und erhöhter Transmission im Gewebe führen [MacVicar B.A. und Hochman D., *ibid.*; Holthoff K. und Witte O.W., 1996]. Astrozyten alleine können so ein auf optischem Wege darstellbares Signal ergeben [MacVicar B.A. et al., 2002; Federico P. et al., 1994]. Als weitere mögliche Ursachen des Signals gelten Ionenbewegungen, Cytochromoxidase-Verminderung und Sekretionsprozesse. Erstmals wurde das Lichtbrechungssignal in Hirnschnitten 1949 von Hill und Keynes beschrieben [Hill D.K. und Keynes R.D., 1949]. Es schien sich um ein korrigierbares Störsignal zu handeln. Bis zum Nachweis eines charakteristischen Signalverlaufs der Lichtbrechung mit guter Kolokalisation an neuronale Aktivität und damit eigener signifikanter Signaleigenschaften durch Grinvald [Grinvald A. et al., 1982] wurde die Lichtbrechung folglich durch Subtraktionsprozesse aus den Aktivierungsmustern der VSD-Signale eliminiert [Grinvald et al., 1982; 1988, Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Mittlerweile gilt die Verwendbarkeit des Lichtbrechungssignals zu Mappingzwecken am somatosensorischen Kortex jedoch als erwiesen [Frostig R. et al., 1990]. Die Amplitude des Lichtbrechungssignals wird zwischen 0,01% und 1% angegeben [Frostig et al., *ibid.*; Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996 *ibid.*]. Die Amplitude scheint entscheidend von der Reizintensität und Reizfrequenz abhängig zu sein [MacVicar et al., 2002], außerdem von der Wellenlänge des aufgestrahlten Lichts [MacVicar et al., 2002; Frostig R. et al., 1990]. Mit Wellenlängen um 540nm wurden Amplituden von 1% erreicht, während bei 850nm lediglich 7% realisierbar waren [Frostig R. et al., *ibid.*]. Der zeitliche Ablauf des Lichtbrechungssignals zeigt dabei keine Wellenlängenabhängigkeit. Bei 4sekündiger Stimulation wird ein Maximum nach etwa 2,5 sec. erreicht, gefolgt von einem Signalabfall bis zur Nulllinie bei etwa 8 Sekunden [Bonhoeffer T. und Grinvald A., *ibid.*; Frostig R. et al., *ibid.*], vgl. Abb.4 . Oberhalb 630nm gewinnt die Lichtbrechung als Anteil des Signals zunehmend an Bedeutung und dominiert im Nahinfrarotbereich bei 800nm vermutlich das Signal [Bonhoeffer T. und Grinvald A., *ibid.*]. Abseits vom gezielten Einsatz als Mappingsignal wirkt die Lichtbrechung bei mikro- und makroskopischer Ableitung jedoch weiter als Störsignal: so beschrieben für Untersuchungen an Gehirnen von Vertebraten und Nonvertebraten [Orbach H.S. et al., 1983]. Insbesondere treten durch Zellschwellungen in aktivierten Arealen Schmiereffekte [Orbach H.S. et al., *ibid.*] und damit Verluste der räumlichen Auflösung auf [Bonhoeffer T. und Grinvald A., *ibid.*], was zu Fehleinschätzung der Aktivitätskarten führen kann. Der Fehler durch „Verschmieren“ liegt im Bereich von etwa 200µm [Orbach H.S. et al., *ibid.*]. Mapping mit

---

*konjugierten Doppelbindungen zur Verfügung stellt und so Voraussetzung für die Farbigkeit ist. Dabei muss das Absorptionsspektrum der Gruppe selbst noch nicht unbedingt im sichtbaren Bereich liegen, es kann aber über Substituenten (Auxochrome) geeignet verschoben werden.*

dem Lichtbrechungssignal kann sowohl in vivo als auch in vitro mit gutem Erfolg durchgeführt werden [Grinvald A. et al., 1986; Stepnoski R.A. et al., 1991], wobei Ableitungen in vivo durch Blutflußsignale erschwert werden [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996].

### **Abb3:**

#### 4.1.2. Das Desoxysignal

Das Desoxysignal wird mit dem intrinsischen Chromophor Desoxy-Hämoglobin dargestellt. Zur Bestimmung der anteiligen Wichtungen der verschiedenen Signalkomponenten am Globalsignal führte Frostig [Frostig et al., 1990] vergleichende spektrometrische Messungen der Signalamplitude als Funktion der Wellenlänge durch. Dabei stellten sich drei verschiedene Signalverläufe dar: eine lichtbrechungsdominierte Absorptionskurve bei 810nm, ein Verlauf bei 570nm, der durchblutungsdominierten, isosbestischen Wellenlänge<sup>19</sup> für Hämoglobin [Nemoto M. et al., 1999], und ein drittes Signal bei Wellenlängen zwischen 600 und 630 nm. Die Absorption bei 600nm setzt bereits etwa 200-400ms nach Stimulusbeginn ein und geht dem Blutflußsignal damit um etwa eine Sekunde voran. Es zeigt außerdem einen von letzterem charakteristisch verschiedenen Verlauf, der bei Reizung über eine Sekunde etwa 1,5sec. nach Stimulusbeginn ein Absorptionsmaximum bietet. Daher nahm man an, es müsse sich hierbei um eine ihrem Ursprung nach von dem Blutflußsignal unterschiedliche Signalquelle handeln. Frostig vermutete „oxygen delivery“ als Ursache [Frostig R. et al., 1990]. Die räumliche Auflösung des Signals gab er mit 100-150µm an, die Amplitude bewegte sich im Promillebereich (s.u.). Physiologischer Hintergrund des Signals ist die molekulare Struktur des Hämoglobinmoleküls, das in der oxygenierten Form eine kompaktere Struktur aufweist als nach Abgabe der Sauerstoffmoleküle. Nach Abgabe des angelagerten Sauerstoffs erfährt HbO eine komplexe Konformationsänderung, sodaß Desoxyhämoglobin andere optische Eigenschaften zeigt als Oxyhämoglobin [Nemoto M. et al., 2004]. Initial kommt es mit der Aktivitätszunahme lokaler Neurone bei sensorischer Reizung innerhalb von 1-1,5sec zu einer lokalen Sauerstoffausschöpfung in dem der jeweiligen Kortexkolumne zugeordneten Kapillargebiet infolge eines lokalen Sauerstoffgradienten zwischen Kapillaren und angrenzendem Gewebe [Nemoto M. et al., 1999]. Anfänglich verläuft dieser Prozeß noch ohne Durchblutungsanpassung [Malonek D. und Grinvald A., 1996; Malonek D. et al., 1997].

<sup>19</sup> *Der Begriff „isosbestisch“ wird bezüglich eines Satzes von Absorptionsspektren innerhalb einer graphischen Darstellung verwendet, in der die Absorptionsspektren zweier Proben einander kreuzen. Die Absorptionskurven, aufgetragen gegen die Wellenlänge, schneiden sich in einem oder in mehreren Punkten, den isosbestischen Punkten. Isosbestisch meint hier „gleiche Absorptionspunkte unabhängig vom Oxygenierungsgrad“.*

Die Desoxygenierung von Hämoglobin wird unterstützt durch den Bohr-Effekt, der eine Affinitätsverminderung des Hämoglobinmoleküls zu O<sub>2</sub> im Bereich stoffwechselbedingt erniedrigter pH-Werte beschreibt [Prichard J. et al., 1991]. Desoxyhämoglobin weist nun im spektralen Bereich von 600-630nm eine erhöhte Absorption auf. [Nemoto M. et al., 1999; Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Das Signal ist bei 605nm von Desoxyhämoglobin dominiert, weil sowohl der Absolutwert für Desoxyhämoglobin als auch die Differenz zwischen  $\epsilon_{\lambda}^{\text{deoxyHb}}$  und  $\epsilon_{\lambda}^{\text{oxyHb}}$  bei 605nm groß ist [Nemoto M. et al., 1999]. Da die Desoxygenierung des Hämoglobin ein stark an den Ort neuronalen Bedarfs gekoppelter Vorgang ist, nimmt man für das „Desoxysignal“ eine bessere räumliche Auflösung an als für das Blutflußsignal [Nemoto M. et al., *ibid.*]. Es herrscht weitgehend Einigkeit darüber, daß die Sauerstoffausschöpfung mit konsekutiver lokaler Erhöhung von Desoxyhämoglobin innerhalb des Signalverlaufs den Zeitpunkt größtmöglicher Kolo-kalisation des gemessenen Signals mit dem hierüber zu messenden Prozeß markiert. Die Auflösung liege dabei initial noch unter der einer Einzelkolumne, was durch Dilatation im lokalen Kapillarbereich erklärt wird [Malonek D. et al. 1997], verschlechtere sich mit Einsetzen des lokalen Blutflusses jedoch zusehens. Das Blutflußsignal setzt dem Desoxysignal schließlich Grenzen: durch den Einstrom frischen Blutes wird die lokal erhöhte HbR- Konzentration und damit die Konzentration des verwendeten Chromophors, verringert [Nemoto M. et al., *ibid.*; Malonek D. et al., *ibid.*]. Die Signalgröße des initialen Desoxysignals wurde von Malonek und Nemoto am somatosensorischen Kortex übereinstimmend auf  $\Delta R/R = 1,5 \times 10^{-3}$  geschätzt. Die Absorption nimmt innerhalb von 200ms nach Stimulusbeginn zu und erreicht 2sec. nach Beginn ein Maximum bei etwa  $1,5 \times 10^{-3}$  bei 600nm [Nemoto M. et al., *ibid.*; Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Die Amplituden der Absorptionen bei längerwelligem Licht bis 620nm sinken mit zunehmender Wellenlänge [Nemoto M. et al., *ibid.*]. Innerhalb der nächsten Sekunde erreicht die Absorptionskurve wieder die Nulllinie. Die Absorption zeigt nach 5sec. ein Minimum bei  $5 \times 10^{-3}$  und erreicht etwa 9sec. nach Stimulusbeginn wieder die Nulllinie. Das Desoxysignal ist in Abb.4 invertiert dargestellt. Abb.5 zeigt die korrespondierenden Konzentrationsverschiebungen von Hb<sub>R</sub>. Der Anteil der initialen Desoxygenierung und des Desoxysignals am Gesamtsignal ist nicht unumstritten [Narayan S.M. et al., 1995]. Einige Gruppen bezweifeln eine initiale Desoxygenierung [Magistretti P.J. und Pellerin L., 1996; Lindauer U. et al., 2001]. In den vorliegenden Versuchen wurde das Desoxysignal wegen seiner niedrigen Amplitude nicht abgeleitet. Das Zusammenspiel von initialer Desoxygenierung und kompensativem Blutfluß wird auch im humanen MRI-Brainmapping als BOLD-Signal genutzt.<sup>20</sup>

<sup>20</sup> *Das BOLD- Signal geht auf dieselben Mechanismen zurück wie das OI-Signal. Dennoch muß eine*

### 4.1.3. Das Blutflußsignal

Das Blutflußsignal muß im Zusammenhang mit dem Desoxysignal betrachtet werden, dessen Zeitverlauf es durch Auswaschen des Signalträgers begrenzt. Das physiologische Korrelat des Signalkurvenverlaufs ist eine bedarfsinduzierte und überkompensierende Durchblutungssteigerung infolge lokaler Vasodilatation nach kortikaler Aktivität, ausgelöst durch Metabolite, Messenger [Benaron D.A. et al., 2000; Villringer A. et al., 1995, 1997 a+b] und direkte Innervation [Estrada C. und DeFelipe J., 1998] kontraktiler Strukturen in Arterien, Arteriolen und vermutlich Kapillarwänden [Malonek D. et al., 1999; Kuschinsky W. und Paulson O.B., 1992; Frostig R. et al., 1990]. Der Beginn des Signals bzw. der Durchblutungssteigerung unterscheidet sich je nach betrachtetem Kortexareal. Das Signal entwickelt sich innerhalb der ersten bis zweiten Sekunde nach Stimulusbeginn [Villringer A. et al., 1995]. Es wird von Nemoto und Malonek übereinstimmend auf rund 1,2 sec nach dem Einsetzen des Desoxysignals terminiert. Dieser Ablauf konnte mit NIR, fMRI, Laser-Dopplerflußmessung und OI [Nemoto M. et al., 1999, Malonek D. et al., 1997] eingegrenzt werden. Im Verlauf erhöht sich innerhalb von mehreren Sekunden der Oxyhämoglobinanteil zunehmend bis auf Werte, die über den Prästimuluskonzentrationen liegen. Die Anstiegszeit beschreibt Nemoto mit etwa 2,5sec., der Peak wird nach etwa 4sec. erreicht. Andere Untersucher berichten von Maxima nach 5-10 Sekunden [Malonek D. und Grinvald A., 1996]. Die Amplitude betrug etwa 3,5% [Nemoto M. et al., 1999, somatosensorische Reizung an der Ratte] Dinse et al. berichten von Absorptionenzuwächsen zwischen 1% und 4,5% (optische Ableitung am A1 der Katze). Kurvendarstellung siehe Abb.3+4. Verläufe und Amplituden des Oxymetriesignals unterscheiden sich je nach Kortex. Der erhöhte Blutfluß ist über oxygeniertes Hämoglobin als Marker spektrometrisch anhand von Absorptions- bzw. Reflexionsunterschieden in den charakteristischen Wellenlängenbereichen für Hämoglobin zu verfolgen. Hierfür bieten sich die isosbestischen (solche Wellenlängen an denen sich die Absorptionskurven von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin schneiden) Wellenlängen bei 569nm [Nemoto et al., ibid.] und 544nm an, bei denen die Absorption unabhängig von der Sauerstoffbeladung des Hämoglobins ist. Die Wellenlängen der Absorptionspeaks für Oxyhämoglobin bei 541nm und 577nm sind ebenfalls geeignet, da eine Differenzierung der Oxygenierungszustände des

---

*semantische Unterscheidung getroffen werden: der Begriff des „BOLD- Kontrastes“ bezeichnet ein Differenzsignal zwischen einer „Stimulus-“ und einer „Poststimulussituation“. Die Meßgröße ist jeweils die über ihre paramagnetischen Eigenschaften abgrenzbare Desoxyhämoglobinkonzentration in einem gegebenen Volumen. Das OI Signal entsteht durch eine Absorptionsvermehrung eingestrahelter Photonen aufgrund erhöhter HbR- Konzentration. Die Verrechnung erfolgt mit einer Prästimulus-Kontrollaufnahme oder einer „cocktail-blanc“-Bedingung.*

Hämoglobins bei der Ableitung des Blutflußsignals nicht entscheidend ist. In den vorliegenden Untersuchungen wurde quasimonochromatisches Licht einer Wellenlänge von 540nm verwendet. Prinzipiell soll das Blutflußsignal mit guter Kollokation an den Ort neuronaler Aktivität, die Kortexkolumne, auftreten, da die kortikale Durchblutung relativ kollokalisiert steigt (Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996). Aus diesem Grund wird es in der funktionellen Bildgebung genutzt (SPECT PET, MRI, SPECT). Da aber die Blutflußantwort auf dem Niveau der jeweils kleinsten autonom aktivierbaren vaskulären Einheit stattfinden soll, während die Desoxyantwort ohne Vasomotionsanteil durch Desoxygenierung auf Kapillarniveau erfolge [Malonek D. et al., 1997], ergibt sich für das Blutflußsignal eine geringere Auflösung [Nemoto M. et al., 1999; Malonek D. et al., *ibid.*; Bonhoeffer T. und Grinvald A. *ibid.*]. Idealerweise wäre für die Blutflußantwort eine Auflösung anzunehmen, die sich nach Maßgabe der lokalen Kolumnengröße in einer Ordnung von 200-300µm bewegt [Woolsey T.A. et al., 1996]. In Kenntnis der Mechanismen der Durchblutungsregulation muß allerdings von geringerer Auflösung ausgegangen werden. Eine Schnurrhaar-Auslenkung erzeugt eine LCBF-Steigerung in einem Bereich von rund 500µm. Eine exakt kollokalisatorische, kapilläre Vasodilatation im Barrelbereich ist aber, sofern sie stattfindet, nur von kurzer Dauer und mittels des Blutflußsignals nicht darstellbar. Mediatoren wie NO oder lokale nitregerge Neurone bewirken darüberhinaus eine Gefäßantwort in einem durch den Diffusionsbereich des Autakoids auf etwa 200µm im Durchmesser geschätzten Bereich, was die lokale Auflösung zusätzlich reduziert. Im Übrigen ist zur Gewährleistung eines suffizienten Blutflusses von einer neurogenen [Estrada C. und DeFelipe J., 1998] oder über Metabolite [Busse R. und Fleming I., 1998; Fisslthaler B. et al., 2000] „aszendierenden Dilatation“ [Busse, R. et al. 1998, Fisslthaler B. et al., 2000; Fleming I. und Busse R., 1999;] auszugehen, sodaß sich für das Blutflußsignal eine räumliche Auflösung von einigen Hundert µm über die Grenzen der Kolumnen hinaus ergibt [Villringer A. und Dirnagl U., 1995]. Trotz der Heterogenität der Quellen, aus denen sich Mappingsignale ableiten lassen, sind nach Frostig mit allen Signalen nahezu identische funktionelle Karten darstellbar [Frostig R. et al., 1990].

#### **4.2. Die Signalerrechnung**

Die Signalamplitude ergibt sich aus dem Verhältnis der Änderung des reflektierten Lichts im stimulierten Zustand ( $\Delta R$ ) gegenüber der Menge reflektierten Lichts im unstimulierten Zustand ( $R$ ) zu

$$S = \Delta R / R \quad (1)$$

Das Signal an sich ist ein gegenüber der Prästimulusaufnahme dunkleres Bild. In den vorliegenden Messungen wurde das Blutflußsignal bei 540nm abgeleitet. Aus methodischen Gründen unterscheidet man bei optischen Registrierungen intrinsischer Signale ein „Globalsignal“ vom „Mappingsignal“.

### **4.3. Begriffsbestimmung Globalsignal/Mappingsignal**

#### 4.3.1. Globalsignal

Der Terminus „Globalsignal“ bezeichnet die Gesamtheit der stimulusinduzierten Reflexionsänderungen am aktiven Kortex. Es besteht aus der schnellen Desoxykomponente, die aufgrund des lokal erhöhten Sauerstoffverbrauchs nach etwa 300ms einsetzt mit Maximum nach etwa 1,5 sec. Sie kann bei 605nm abgeleitet werden. Gefolgt wird die Desoxykomponente von Kompensationsmechanismen, die nach 2-10 Sekunden schließlich zum Blutflußsignal mit starker Erhöhung der Oxyhämoglobinkonzentration im aktiven Bereich führen. Ableitbar ist das Blutflußsignal bei 540nm.

#### 4.3.2. Mappingsignal

Als Mappingsignal [Grinvald A. et al., 1986; Frostig R. et al., 1990] werden die Signalkomponenten bezeichnet, die eine ausreichende Amplitude und Korrelation optischer Aktivität mit dem Ort der neuronalen Aktivität aufweisen, um zur Erstellung von Aktivitätskarten genutzt werden zu können. Das Mappingsignal wurde von Frostig [Frostig R. et al., 1990] daher definiert als die Differenz zwischen zwei Signalen an einem gegebenen Ort des Kortex, davon sei das erste Signal das Abbild der neuronalen Antwort auf einen optimalen Stimulus dieser Region, also akustische Reizung im primären auditorischen Kortex der Katze oder Schnurrhaarauslenkung im Whisker-barrel-cortex<sup>21</sup>, und das zweite Signal die „Antwort“ auf einen Stimulus, der dieses Areal nicht reizt, also etwa die Aktivierung des gleichseitigen Ohres oder Auges bei Erstellung von okulären Dominanzkarten oder Karten des primären auditorischen Kortex. Der Ausdruck „Mappingsignal“ oder auch „Kartierungssignal“ bezeichnet somit nicht die Ätiologie eines Signals sondern ist lediglich ein methodischer Begriff.

---

<sup>21</sup> *Der „Whisker-barrel-cortex“ ist das den Schnurrhaaren von Nagern direkt zugeordnete primäre Feld. Da jedem Schnurrhaar eine eigene kortikale Kolumne zugeordnet ist, bietet sich der WBC für Messungen aktivitätskorrelierter Signale und vaskulärer Kompensationsmechanismen an. Außerdem wurden am WBC richtungsweisende Erkenntnisse zur neurovaskulären Kopplung gewonnen. [Mayhew J. et al., 2000; Jones M. et al., 2001, 2002, 2004]*

#### 4.4 Zusammenfassende Wertung

Heute werden im Rahmen optischer Aufzeichnungen in erster Linie das Blutflußsignal und das Desoxy-signal verwendet. Die Quellen dieser Signale, die im wesentlichen auf desoxygeniertes und oxygeniertes Hämoglobin zurückzuführen sind, wurden zunächst von Malonek [Malonek D. et al., 1997] und kürzlich Nemoto [Nemoto M. et al., 1999] mikrospektrophotometrisch untersucht. Die kortikale Perfusion wurde durch Laser-Doppler-Flußmessung überwacht. Es ergaben sich enge Korrelationen zwischen den Absorptionsverläufen, die als charakteristisch für Desoxy- bzw. Oxyhämoglobin und damit Blutfluß gelten und den jeweiligen Konzentrationen von HbO und HbR (vgl. Abb.4). Messungen des lokalen Blutflusses bestätigen die Annahme, eine initiale Konzentrationssteigerung von Desoxyhämoglobin werde von einer lokalen Durchblutungssteigerung und damit Erhöhung der Oxyhämoglobinkonzentration „ausgewaschen“. [Malonek D. und Grinvald A., 1996; Malonek et al., 1997].

**Abb.4: Abb.5:**

#### 4.5. Die Anwendung von ORIS auf den primären auditorischen Kortex

Optical Imaging wurde zur Betrachtung verschiedener Cortices eingesetzt. Aufgrund der Orientierungsspezifität der Kolumnen im primären visuellen Kortex bot sich V1 für die Darstellung durch intrinsische optische Signale besonders an. Die Definition von Referenzkonditionen zur Datenverrechnung ist hier unkompliziert, die Signalamplituden sind vergleichsweise groß. Berichte über erfolgreiche Untersuchungen, insbesondere zum V1, stammen von Grinvald [Grinvald et al., 1986] Ts'o [Ts'o D.Y. et al., 1990] und Bonhoeffer/Grinvald [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1991; 1993]. Auch der somatosensorische Kortex konnte dargestellt werden [z.B. Godde B. und Dinse H.R., 1995; Frostig R. et al., 1990; Gochin P.M. et al. 1992; Nemoto M. et al., 1996]. Zur Anwendbarkeit und Methodik optischer Ableitungen am akustischen Kortex existieren verschiedene Arbeiten mit unterschiedlichen Ergebnissen und Erfolgsraten. [Harrison R.V. et al., 1998, 2000: Ableitungen am A1 des Chinchilla; Hess A. 1996 sowie Hess A. und Scheich H., 1996: Ableitungen an A1 der Mongolischen Wüstenspringmaus; Horikawa J. et al., 2001, optische Ableitungen an A1 beim Meerschweinchen; Kobuta et al. 1997. Ableitungen am A1 der Katze; Spitzer M. et al., 2000: optische Ableitungen an A1 der Katze; Bakin J.S. et al 1996: optical Imaging an A1 des Meerschweinchens; Dinse H. et al, 1997 a,b am A1 der Katze]. Unterschiede in Signalzeitverlauf und Erfolgsrate bestehen sowohl zwischen Spezies als auch innerhalb derselben Spezies. Bei der optischen Ableitung intrinsischer Signale am AI der Katze durch Spitzer war der Versuch, mithilfe ORIS zu funktionellen Karten des Kortex zu gelangen, nur bei drei von zehn Versuchstieren erfolgreich. Bei optischen Ableitungen vom Chinchillakortex durch Harrison war nur bei der Hälfte der Tiere überhaupt akustisch evozierte, optisch registrierbare Aktivität nachweisbar. Trotz der Speziesunterschiede folgt die Ableittechnik einem einheitlichen Schema. Unterschiede bestehen laut Literatur in Beginn, Dauer und Amplitude der Signalverläufe

sowie in dem Antwortverhalten gegenüber verschiedenen Wellenlängen. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Stimuluscharakteristika verschiedener Arbeiten

	Ratte		Gerbil	Meerschwein	Chinchilla	Katze		
Arbeitsgruppe	Nemoto et al., (somatosensorischer Kortex)		Bakin et al., 1996 AI	Hess et al., AI	Bakin et al., 1996 AI	Harrison et al., 1998 AI	Spitzer et al., AI	
Ableitung bei Wellenlänge	577nm	605nm	630nm	610nm	630nm	540nm	630nm	540
Signalbeginn nach Stimulusbeginn	500ms	500ms	500ms (25kHz, 70dB)		Ablauf in Stimulation und Signalverlauf von Ratten(siehe dort) und Meerschweinchen wurden als identisch beschrieben.	ca.2sec	nicht realisierbar	ca.1,5sec
Peak nach	4sec	„initial dip“- Abs.Zuwachs: 2sec; Ref.Max.: 5sec	6sec	2sec		ca.4,5sec		ca.5sec
Ende nach	10-12 sec	10-12 sec	10-12sec	10-12sec		ca.7sec		ca.10-12sec
Amplitude	$3 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3}$	Maximal $1 \times 10^{-4}$ bis $2 \times 10^{-3}$	bis $15 \times 10^{-4}$ bei akust. Reizg. 1kHz bei 80dB SPL				
Stimulation	somatosens. Stimulation am Lauf		akustisch Tonpips	akust.für1600ms, alternierende Stimuli. Alternieren mit 2Hz, alternativ Einzeltonpulse von 200ms mit 200ms Pause		akustisch, Reintöne	Akustisch	
Frequenzen und Schall-druckpegel			100Hz-40kHz bei 0-80dB SPL	1/2Hz, 6/8Hz, 14/16Hz, bei 20-80dB SPL		500Hz bis 16Khz bei 0-80dB SPL	Verschiedene Frequenzen und SPLs	
Stimulus-Gestaltung			4-8 Pips, 50ms Dauer, 250-500ms Intervall, 10ms Flankensteilheit	10ms Flankensteilheit		4-Sekunden Perioden gegateter Töne mit 10ms Flankensteilheit und 50ms Plateau	5-7 Tonpips a 70ms, 10ms cosinus Flankensteilheit	

## Kapitel 5. Optische Ableitung intrinsischer Signale vom A1 der Katze: Methodenentwicklung

Der folgende Teil zur Methodik beinhaltet allgemeine Vorbetrachtungen zu den Einzelkomponenten, sowie, soweit dies notwendig und sinnvoll war, Vorversuche, um die Eignung der Einzelkomponenten zur Darstellung eines Signals mit 0,1-4 % relativ zum eingestrahlten Licht nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Vorversuche sind dem Methodenteil subsumiert. Das Ende des Kapitels bildet eine zusammenfassende und wichtende Betrachtung zum Rauschen der Einzelkomponenten und zum Gesamtrauschen. Die Anlage bestand aus einer Datenaufnahmeeinheit, einer Beleuchtungseinheit, einer Datenverarbeitungseinheit, einer Steuerungseinheit und einer akustischen Reizeinheit.

### **Abb. 6**

#### **5.1. Die Aufnahmeeinheit**

Zur Aufzeichnung der Differenzbilder am Kortex bietet sich aufgrund der hohen Empfindlichkeit und der hohen Dynamik (unten), hoher Linearität und Quantumeffizienz, vergleichsweise niedrigen Rauschens sowie der effizienten Nachbearbeitungsmöglichkeiten eine Camera mit CCD- Bildsensor an. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde aus diesem Grund eine front- illuminierte CCD- Aufnahmeeinheit des Typs „LightStar2“ [Fa. LaVision, Göttingen] eingesetzt, mit folgenden technischen Spezifikationen:

Typ	LightStar2
spektraler Arbeitsbereich	400-1050nm
Ausleserauschen	<50e <sup>-</sup>
CCD-Chipgröße	384×288
Einzelpixelgröße	23µm
FullWell-Capacity (e <sup>-</sup> /Pixel)	800k
Frames/sec	10
Belichtungszeit in Vielfachen von	20ms (Videonorm)

##### 5.1.1. Der CCD-Sensor

Optische Aufzeichnungsgeräte mit einem CCD-Sensor als lichtspeicherndem Element haben seit ihrer Einführung im Jahre 1970 durch die Bell Laboratorien zunächst im

wissenschaftlichen, mittlerweile auch im Photobereich, an Bedeutung gewonnen. CCDs werden seit Ende der Siebzigerjahre wegen ihrer optischen Eigenschaften und unkomplizierten, rechnergesteuerten Datenverarbeitung in zunehmendem Maße in Technik, Medizin, Biologie, Physik, Chemie und Astronomie eingesetzt. Allein im Jahr 2004 wurden in den Bereichen Chemie, Physik, Medizin und Biologie über 450 Arbeiten unter Zuhilfenahme der CCD-Technologie veröffentlicht.

### 5.1.2. Die Funktionsweise des CCD-Sensors

Die Aufgabe des CCD- Elements besteht in der Aufzeichnung und Weitergabe eingehenden Lichts. Die Funktionsweise der CCD- Camera unterscheidet grundsätzlich nicht von der einer klassischen Photocamera. Das zu belichtende Element, der CCD-Sensor, liegt, wie die Emulsion, in der Schärfenebene eines optischen Systems. Die Belichtung des Elements kann durch dieselben Linsensysteme erfolgen, wie in der klassischen Photographie (Unterschiede ergeben sich in der chromatischen Aberration, da zwischen den relativen Empfindlichkeiten von Auge, Emulsion und CCD-Sensor Unterschiede bestehen). Die Vorteile der Nutzung eines CCD-Sensors bestehen zum einen in der weit höheren Lichtempfindlichkeit des Sensors, der im Bereich von bis zu 40000 ASA liegen kann, daher reichen bereits 5-6 Photonen zur Erregung eines Bildelements aus, während zur Schwärzung des Korns in der Silberhalogenidschicht einer herkömmlichen Photoemulsion durchschnittlich 20-30 Photonen, mindestens jedoch 10-20 Photonen die Emulsion treffen müssen, um ein Korn entwicklungsfähig zu machen. Zudem ist die Dynamik eines CCD-Elements in Abhängigkeit von der Größe der einzelnen Bildelemente und vom Rauschen des Chips bei weitem größer (65536 Stufen bei einem 16bit AD-Wandler) als der eines chemischen Films. Bautechnisch ist der CCD-Sensor ein mehrschichtiges Silizium-Halbleiterelement, das einen Lichtinput registriert, speichert, und, in einen elektronischen Output konvertiert, weitergibt. Halbleiter sind Elemente, die in der Elektrotechnik zwischen Leitern und Isolatoren eingeordnet werden, weil sie nur unter bestimmten Umständen, z.B. bei Lichteinfall oder unter Wärmeeinfluß, leiten. Hieraus erklärt sich sowohl das zugrundeliegende Funktionsprinzip eines CCD-Sensors als auch die Notwendigkeit, mithilfe einer Kühleinrichtung die Menge solcher Ladungen, die lichtunabhängig auf dem Chip entstehen, möglichst klein zu halten. Wie auf einer Photoemulsion lösen eingehende Photonen auf einem „Picture Element“, dem sogenannten „Pixel“ eine proportionale Reaktion aus, die aufgezeichnet und ausgelesen wird, um einen unter vielen Helligkeitskodierten Punkten der Gesamtabbildung zu ergeben. Die lichtabhängige Reaktion entsteht durch den Aufschlag der Photonen, die als Energiepackchen auf die Materie des

Sensors treffen und durch Herausschlagen eines Valenzelektrons aus der Valenzschale in der Siliziumschicht sowohl eine Ladung als auch durch die entstehende Lücke eine „Defektladung“ schaffen. So wird durch Lichteinfall eine proportionale Ladung auf dem Halbleiter erzeugt. Wie viel Ladung erzeugt wird, bemißt sich nach der Quantumeffizienz, „QE“, des Sensors, einem Verhältnis, das als Proportionalitätsfaktor für die Umsetzung von Lichtquanten in Elektronen betrachtet werden kann und von der Wellenlänge des eingestrahelten Lichts abhängt. Die entstandenen Photo-Ladungen wandern, ihrer Polarität entsprechend, im elektrischen Feld. Sie entstehen in jedem Pixel isoliert, werden isoliert gespeichert und ausgewertet. Das hierbei entstehende Signal ist analog. Das bedeutet, daß ein Speicherelement auf dem CCD- Chip, das technisch als Pixel und allegorisch als „Well“, von engl.: „well“ = „Brunnenschacht, Quelle“ bezeichnet wird, in Abhängigkeit von seiner Kapazität, jeden beliebigen Wert zwischen „voll“ und „leer“ annehmen kann. Die durch Integrieren von Photonen entstandenen Ladungen können nun, nachdem sie innerhalb des rasterartig angeordneten Chips zunächst von Zeile zu Zeile in Ausleserichtung verschoben wurden, reihenweise über ein Meßpixel geleitet und ausgewertet werden. Die Ladungsverschiebung findet nach Maßgabe eines externen Taktes, (aus der Videotechnik entlehnter Takt: 20ms) durch Schieberegister statt, die durch wechselweise Polung die an den positiv gepolten Gate-Elektroden haftenden Elektronen in Ausleserichtung verschieben können. Elektronisch einzeln ansteuerbar, entsteht eine „Welle“ positiver Ladungen, die die Elektronen wie einen Wellenreiter vor sich her treibt. Erst im Ausleseregister wird jedes Paket Photoladungen in ein proportionales Spannungssignal konvertiert. Pixel sind der Ort der Lichtintegration. In ihrer Belichtungszeit sind sie durch eine „Control-Unit“ der jeweiligen Aufnahmeeinheit steuerbar. Der Dynamikbereich eines Wells, also das Signal/Rausch- Verhältnis, ist abhängig von der Größe des Elements: ein größeres Pixel kann pro Zeiteinheit eine größere Menge Licht integrieren und bietet damit aufgrund der Abhängigkeit des Photonenrauschens von der Wurzel der Lichtintensität ein günstigeres S/N- Verhältnis als eine kleinere Zelle. Andererseits sind kleinere Pixelgrößen vorteilhaft für das Korn des entstehenden Bildes und können schneller ausgelesen werden. Die Pixelgröße des verwendeten Chips liegt mit  $23\mu\text{m}$  im unteren Mittelfeld. Man unterscheidet in der CCD- Sensortechnik den Interline-Typ und den Frame-Transfer-Chip. Hier kam ein Frame- Transfer-Chip des Typs Thompson TH 7863 zum Einsatz, dessen Ladungen von einem „Belichtungsareal“ in ein „Speicherareal“, das abgedunkelt ist, ausgelesen werden. Hierdurch ist eine effizientere Nutzung der Chipfläche und bessere Auflösung gewährleistet als bei Interline-Transfer-Sensoren, deren Speicherbereiche jeweils neben den Sensorelementen angeordnet sind. Beim Thompson Sensor beträgt

die höchste Zeilen-Transfargeschwindigkeit 300ns. Die „Frametransfer“(FT)-Technik birgt spezifische Rauschquellen. Da der Transfer mit hoher Geschwindigkeit erfolgt, wirkt er wie ein Verschuß. Dennoch können innerhalb der FT-Zeit je nach  $\Delta t_{\text{exp}}$  der jeweiligen Pixelreihen jeweils unterschiedliche Dunkelströme aufaddiert werden. Da eine Lichtexposition auch über die Dauer des FT fortbesteht, kann es zu einem Schmierphänomen, „smear“, kommen. Ferner findet die Dunkelstromakkumulation auch im abgeschirmten Speicherareal statt.

### 5.1.3. Physikalische Eigenheiten

CCD-Sensor, menschliches Auge und die Aufnahmeoptik sind spektral unterschiedlich optimiert. Der CCD- Sensor transportiert keine Farbeindrücke sondern eine von der spektralen Zusammensetzung des Lichts abhängige Ladungsverschiebung, der im Ausleseregister ein Spannungswert zugeordnet wird. Die Quantumeffizienz des Chips ist dabei der Proportionalitätsfaktor zwischen der Menge einfallender Photonen und dem Output des Elements an Elektronen. Indirekt kann damit eine Wellenlängenabhängigkeit des Chips über die Quantumeffizienz festgestellt werden. Die maximale relative Empfindlichkeit eines CCD-Elements liegt aufgrund der physikalischen Gegebenheiten des Halbleiterelements bei 600 bis 700nm. Ähnlich wie beim photographischen Film, der, je nach Einsatzbereich, für unterschiedliche Bandbreiten des sichtbaren Lichts optimiert ist, besitzt das menschlichen Auge eine charakteristische spektrale Empfindlichkeit. Der Empfindlichkeitsbereich des menschlichen Auges umfaßt eine Bandbreite von 400 bis 750nm, mit drei Maxima bei 420, 535 und 565nm beim photopischen und einem Maximum bei 500nm für das skotopische Sehen. Der Wahrnehmungsbereich des Auges beim Farbsehen ergibt sich aus einer Kombination der physikalisch- chemischen Verarbeitung des einfallenden Lichts, der Wellenlänge der Strahlenenergie, durch Zapfenzellen mit Photopigmenten unterschiedlicher Absorptionsmaxima einerseits mit einer Relativberechnung der Einzelfarben einer gegebenen Szene nach Maßgabe der übrigen Farben auf der Ebene höherer Sehrindenabschnitte andererseits. Daher löst der menschliche Betrachter eine Szene bei Glühbirnenlicht farblich ähnlich auf wie bei Tageslicht, während eine chemische Tageslicht-Emulsion aufgrund anderer relativer spektraler Optima einen Rotstich zeigen würde. Die Helligkeits- und Farbwahrnehmung des menschlichen Auges ist somit ein ungenügendes Instrument zur Kontrolle von Art und Menge des Lichts, das den Chip treffen wird. Die Quantumeffizienz eines frontilluminierten Chips ist zudem rotlastig. Handelsübliche Linsensysteme in der Photo- und Astrophototechnik wiederum sind subtraktiv achromatisch auf gelb und magenta hin korrigiert. Eine additive, apochromatische Korrektur von rot grün und blau findet lediglich bei

hochwertigen Reprojektivien oder Optiken in der Farbdunkelkammertechnik statt. Die dem CCD-Sensor vorgeschaltete Optik aus der KB-Phototechnik ist im Hinblick auf chromatische Aberration auf das menschliche Sehvermögen hin korrigiert, nicht aber auf die spektrale Empfindlichkeit eines CCD-Sensors. Die spektralen Anteile des weißen Lichts erfahren in Linsensystemen ihrer Wellenlänge entsprechend unterschiedlich starke Brechungen. Die von Auge und Film wahrnehmbaren Bandbreiten sind daher chromatisch korrigiert- nicht aber die nicht mehr sichtbaren Wellenlängen. Daher stimmen die Schärfenebenen der Brennpunkte solcher Wellenlängen von 600-800nm, die der CCD-Chip mit 100% relativer Empfindlichkeit aufzeichnet nicht mit den korrigierten Wellenlängen, die Film und Auge noch wahrgenommen hätten, überein. Die unzulänglich korrigierte Optik liefert so aufgrund ihrer indifferenten Wertung einfallenden Lichts als Helligkeitswerte „unscharfe“ Bilder wegen zu großer Sensibilität des Sensors im nicht korrigierten Bereich. Wenn monochromatisch im Bereich sichtbaren Lichts gemessen wird, fällt dieser Fehler nicht ins Gewicht. Die verwendeten Meßfilter (540nm und 602nm) wiesen bei 50% Transmission Bandbreiten von 10nm auf. Bei diesem Setup war nicht mit Meßgenauigkeiten aufgrund unzureichender Korrektur zu rechnen.

### **Abb. 7**

#### 5.1.4. Betrachtungen zum Rauschen der Aufnahmeeinheit

Es werden unter dem Begriff „Rauschen“ alle diejenigen thermischen, verarbeitungstechnischen oder funktionsbedingten Störquellen subsumiert, die eine Störung eines klaren Verhältnisses zwischen vorhandener Lichtintensität und gewandeltem Signal bewirken. Das Signal/Rausch-Verhältnis beschreibt die Qualität der Messung. In der CCD- Meßtechnik steht die S/N-ratio für das Verhältnis der relativen Größe des gemessenen Signals zu der Unsicherheit des Signals auf Ebene jedes Pixels. Das Signal/Rausch Verhältnis eines CCD-Sensors ist somit als Verhältnis der Signalelektronen zu den Rauschelektronen darstellbar als:

$$S/N = n_{\text{signal}} / n_{\text{noise}} \quad (2)$$

Das photonenabhängige Signal kann physikalisch definiert werden zu:

$$n_{\text{signal}} = (\Phi / h \times \nu) \times t \times A \times \eta \quad (3)$$

wobei:

$\Phi$	=	Lichtintensität in $W/m^2$
$\eta$	=	Quantenwirkungsgrad
$h\nu$	=	Photonenenergie in Js

A	=	Pixelfläche in m <sup>2</sup>
t	=	Pixel- Integrationszeit in s

Bei Nutzung eines CCD- Sensors mit entsprechender Steuerungs- und Ausleseelektronik sind mehrere Rauschquellen gegeben. Aufgrund der geringen Größe des OI- Signals ist die Betrachtung von Rauschquellen, die das Signal maskieren, sowie deren Kenntnis und Minimierung unerlässlich. Als Quellen für Rauschelektronen können zusammengefaßt werden:

Rauschen

- durch die physik. Natur des Lichts: - Photonenrauschen (shotnoise, photon-noise)
- durch den CCD-Sensor selbst
  - Dunkelstrom (dark current)
  - Empfindlichkeitsunterschiedsrauschen(sensitivity variation-noise, photo response non-uniformity)
  - Ausleseschlieren 1 (smear)
  - Ausleserauschen 2 (readout-, preamplifier-noise)
- durch den Verstärker - Verstärkerrauschen

#### 5.1.4.1. *Photonenrauschen*

Das statistische Photonenrauschen ist eine Grundeigenschaft der Quantumnatur des Lichts. Die statistische Streuung des von einer Lichtquelle über die Zeit emittierten Photonenflux variiert entsprechend einer Poisson- Verteilung, die sich proportional zur Quantumeffizienz der eingestrahlten Wellenlänge als photoelektrische Ladung in der Siliziumschicht des Sensors findet. Die durchschnittliche Abweichung entspricht der zweiten Wurzel aus der Menge der empfangenen Photonen. Für eine Gesamtzahl  $N$  an generierten Photoelektronen bedeutet das eine statistische Streubreite von  $\Delta\sqrt{N}$ . Der relative Fehler (S/N) ergibt sich somit zu:

$$\Delta N/N = 1/\sqrt{N} \quad (4)$$

wobei:

N	=	am CCD-Chip erzeugte Photoelektronen
$\Delta N$	=	statistische Streubreite von N

Aus dieser Abhängigkeit folgt außerdem, da der relative Fehler der Quadratwurzel der Signalgröße proportional ist, ein besseres S/N-Verhältnis bei größeren Signalen als bei kleineren Signalen, sodaß die Sensibilität eines CCD-Sensors bei längeren Integrationszeiten verbessert wird. Voraussetzung hierfür sind allerdings niedrige Dunkelströme, woraus sich die Notwendigkeit zur Kühlung der Anlage ergibt (s.u.). Ein mit 100.000 Photonen beladenes

Pixel hat zB. eine S/N- ratio von  $100000:\sqrt{100000}$ , d.h. das Rauschen beträgt bei 316 Photonen 0,316% der Signalgröße. Bei einer Pixelbeladung von 100 Photonen wüchse das relative Rauschen auf eine  $S/N=100:\sqrt{100} = 100:10= 10\%$  an. Hier wäre die S/N ratio bereits 10%. Das Photonenrauschen kann nur durch hohe Leuchtdichten relativ gemindert werden.

#### 5.1.4.2. Dunkelstrom, thermisches Rauschen (dark current)

Der Dunkelstrom ist als Offset zu betrachten. Er entsteht durch thermische Einflüsse auf das Halbleiterelement des CCD-Sensors selbst, unabhängig von einfallendem. Er wird ebenso über die Zeit integriert wie das eigentliche Bild. Dunkelstrom wird angegeben in Elektronen pro Fläche pro Zeit und ist exponentiell abhängig von der herrschenden Temperatur und proportional der Integrationszeit auf dem Chip. Ein Dunkelstrom von 50 Elektronen /Pixel/Sekunde entspricht bei einer Integrationsdauer von 1min 3000 Elektronen. Der Rauschanteil wäre 54 Elektronen. Bei kurzen Belichtungszeiten unter einer Sekunde hält sich das Dunkelstromrauschen in Grenzen. Die Dunkelstrom-Intensität verdoppelt sich je nach Chip bei einer Temperaturzunahme von 5-10°C und verändert sich pro°C Umgebungstemperatur um etwa 15% (eigene Messungen, vgl. Abb.11). Er kann bis zu 3% der Gesamtkapazität des Pixels betragen und verkleinert Dynamik und Auflösungsvermögen um diesen Wert. Dunkelstromcounts können subtrahiert werden, Dunkelstromrauschen kann aufgrund seiner Proportionalität zur Quadratwurzel des Dunkelstromes durch Kühlung lediglich vermindert werden. Dunkelstrom ist als Offset anzusehen werden, auf den das Dunkelstromrauschen aufgesetzt ist. Als anteilig relevanteste Rauschquelle fiel bei unseren Messungen eher der Dunkelstrom selbst als das Dunkelstromrauschen ins Gewicht, da unter 1/10 Sekunde belichtet wurde. Der anteilige Wert des Dunkelstroms am Gesamtbild unterscheidet sich je nach Sensortyp. Anders als bei Interline-Transfer-Sensoren entsteht bei Frame- Transfer-Sensoren nicht nur auf dem zu belichtenden Bereich des Chips, thermisches Rauschen durch Dunkelstrom, sondern auch im Speicherareal, in den das Bild durch den Frame Transfer geschoben wird. Die Integrationszeit für Dunkelstrom errechnet sich somit zu:

$$t_d = t_i + t_{FT} + t_r \quad (5)$$

wobei:

$t_d$	=	Zeit für Dunkelbildintegration
$t_i$	=	Belichtungszeit (Integrationszeit)
$t_{FT}$	=	Frametransfer- Dauer
$t_r$	=	Readout (=Auslese) - Dauer

Die Größen  $t_i$  und  $t_{FT}$  ergeben einen konstanten Offset des Dunkelbildes, während  $t_r$  je nach Zeilenposition innerhalb des Rasters von unterschiedlicher Dauer ist und in Ausleserichtung abnimmt. Es ergibt sich für das Dunkelbild in Ausleserichtung eine abnehmende Intensität. Dieser Intensitätsshift kann bei 20°C 20-40 counts betragen. Dunkelstromrauschen kann durch Kühlung des Chips auf bis zu 0,4% des Wertes bei Zimmertemperatur gesenkt werden. Eine Minimierung des Betrages des Dunkelstromes ist aufgrund thermischen Ursprungs durch Kühlung (durch Kühlwasserkreislauf oder ein Peltierelement) möglich. Der Chip im Versuch wurde mittels Peltierelement gekühlt. Zur Quantifizierung des Dunkelstromteils im Aufbau und der Verstärkerjustage wurden daher eine Reihe von Aufnahmen bei verschlossener Camera und ansteigender Betriebstemperatur aufgezeichnet, justierbar über Peltierelement.

#### 5.1.4.3. Empfindlichkeitsunterschieds-Fehler (Sensitivity-Variation-Noise, Photo-Response Non-Uniformity)

Die Störung ist bautechnisch bedingt. Ein CCD-Sensor ist als dreischichtiges Sandwich aufgebaut. Der photosensiblen Halbleiterschicht aus Silizium liegt eine Isolatorschicht aus Siliziumoxyd auf, dieser eine Schicht aus geätztem Polysilizium. Durch konstruktionstechnische Ungenauigkeiten bestehen bei CCD-Sensoren aufgrund lokal unterschiedlicher Schichtdicken Varietäten in der Quantumeffizienz. Es treten hierbei Unterschiede benachbarter Pixel um 1%, über den gesamten Chip bis zu 10% auf [Wernli H.R., 1995]. Hinzu kommen Verschmutzungen und Staub, die sowohl auf der Optik als auch auf dem Chip selbst auftreten können. Das Phänomen ist als systematische Störgröße zu betrachten und kann grundsätzlich durch Aufzeichnung einer einheitlich ausgeleuchteten Fläche (Weißbild) bestimmt werden, wird aber infolge seiner Stabilität durch Differenzbildrechnung eliminiert

#### 5.1.4.4. Auslesefehler

Der A. bezeichnet die Unsicherheit im Quantifizierungsprozeß der CCD-Ladungen. Er ist die „Unsicherheit im System“. Der Begriff umfaßt verschiedene Komponenten. Es gehen ein:

- Statistische Fluktuationen als Hauptanteil. Sie treten beim Auslesen eines Signals aus dem CCD- Chip auf. Sie entstehen zum größten Teil im on-chip-output-Vorverstärker beim Verschieben der Ladungen in Richtung auf das Meßpixel, und bei der proportionalen Konversion der gemessenen Ladungen in ein Spannungssignal. Der Spannungssignaloutput eines CCD- Sensorpixels ist daher bei gleichem Lichteinfall in aufeinanderfolgenden Messungen nicht gleich. Der Auslesefehler ist der Quadratwurzel der Ausleserate proportional. Zur Minimierung des Fehlers werden Chips im wissenschaftlichen Einsatzbereich

in der Regel nach dem „slowscan“- Verfahren ausgelesen Der Chip der hier genutzten Anlage wurde im slowscan ausgelesen. AD- Wandler Rauschen: ähnlich wie beim Ausleseprozeß des Sensors bestehen auch für die AD-Wandlung Toleranzen. Die Konversion eines analogen in ein digitales Signal wäre auch dann nicht exakt reproduzierbar, wenn es sich bei aufeinanderfolgenden Konversionen um dasselbe analoge Signal handelte. Die Digitalwerte können leicht variieren.

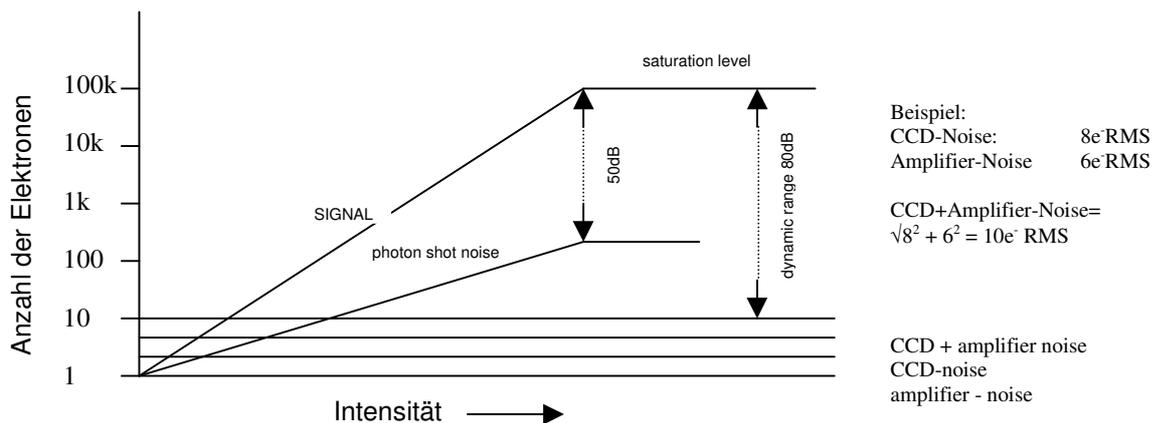
- Die Steuerelektronik im Sensor führt „falsche“ Elektronen ins System ein, die wie Signalelektronen registriert, verstärkt und konvertiert werden. Die Folge sind zufällige Fluktuationen im System.

#### 5.1.4.5. Verstärkerfehler

Der Verstärkerfehler hängt von der Verstärkerbandbreite ab. Er kann Werte von 20 bis 120 e<sup>-</sup> pro Pixel betragen. Da die Einzelkomponenten des Camerarauschens, Photonenrauschen, CCD-Rauschen und Auslesefehler untereinander nicht korreliert sind und sich additiv zueinander verhalten, kann die S/N-ratio unter Berücksichtigung der jeweiligen Anteile am Gesamtrauschen beschrieben werden durch:

$$S/N = \frac{(\phi/h\nu) \times t \times A \times \eta}{\sqrt{\phi/h\nu \times \nu \times t \times A \times \eta + n_{CCD}^2 + n_{AMP}^2}} \quad (6)$$

E	=	1/2mc <sup>2</sup>
φ	=	Intensität [W/m <sup>2</sup> ]
hν	=	Photonenenergie [Ws]
t	=	Belichtungszeit [s]
A	=	Pixelfläche [m <sup>2</sup> ]
n	=	Elektronen
η	=	Quantenwirkungsgrad



**Abb.8** relative Anteile des Rauschens am Nutzsignal. CCD-und Verstärkerfehler als Offset.

Auslesefehler und CCD-Rauschen werden als konstanter Offset (bei konstanter Temperatur, Belichtungszeit und Auslesetakt) vor allem bei niedrigen Signalintensitäten relevant und nehmen in ihrem Anteil am Nutzsignal mit steigender Signalgröße ab, während das

Photonenrauschen bei großer Lichtaussteuerung dominiert. Bei niedriger Lichtintensität übertrifft der Anteil des Auslesefehlers am Signal das Photonengeräusch. Man spricht dann von einer „Auslesefehler-Limitierung“ der Bilddaten. Bei Erhöhung der Integrationszeit nimmt das Photonengeräusch anteilig mehr zu als der Auslesefehler. Hier spricht man von „photonenlimitierten Daten“

### 5.1.5 Überlegungen zur Rauschminimierung

Der unkorrigierte Datensatz einer CCD- Einheit wird als Rohbild (rawframe) bezeichnet. Das „calibrated image“ hingegen ist ein von Artefakten, die auf physikalische Prozesse und technische Mängel zurückgehen, bereinigter Datensatz. Im Folgenden wird kurz dargelegt und begründet, welche Prozeduren zu Rauschminimierung und Signalerhalt durchgeführt wurden und welche Techniken innerhalb des Setups verzichtbar waren.

#### 5.1.5.2. Weißbild (Flat Frame) zur Berücksichtigung des Empfindlichkeitsunterschiedsfehlers

Chip und bündelndes optisches System weisen Abbildungsfehler auf. Beim Sensor treten die erwähnten Dysuniformitäten in der Empfindlichkeit einzelner Pixel auf, während das Linsensystem verschmutzt sein kann. Diese individuellen Fehler treten bei der Aufzeichnung eines Weißbildes zutage und werden durch Division des korrigierten Rawframe durch die Werte dieser „Norm“ herausgerechnet. Hierdurch findet eine Kalibrierung des Systems auf die Fehlerhaftigkeit der Aufnahmehardware statt. Diese Prozedur ist bei unserer Vorgehensweise entbehrlich, da zur Signalerrechnung eine Verhältnisbildung der Prästimulus-Poststimulus – Differenz erfolgte. Hierdurch rechnen sich die im Flatframe dargestellten Fehler heraus.

#### 5.1.5.3. Reduktion des Auslesefehlers

Eine hohe Auslesegeschwindigkeit der Sensorladungen bedingt ein hohes Rauschen. Auslesen, d.h. zeilenweises Verschieben in das Ausleseregister und Auslesen über das Meßpixel in einem langsamen „slow-scan“ Verfahren mit niedrigen Pixelauslesetakten reduziert dieses Rauschen. Der Auslesetakts beträgt hierbei 1,8 MHz, d.h.  $1,8 \times 10^6$  Elektronen werden pro Sekunde registriert. Der Vorgang des zeilenweisen Verschiebens von Ladungen findet nach Maßgabe eines externen Taktsignals statt und dauert je nach Wellgröße und Pixelanzahl des Chips unterschiedlich lange. Das Auslesen einer einzelnen Zeile im slowscan- Modus dauert 0,25ms. Für einen Array von 285 Zeilen ergeben sich rund 75ms. Daher muß die Auslesezeit bei der Planung einer Aufnahmesitzung als konstante zeitliche Größe berücksichtigt und die

Motivgröße ggf. einem Zeitschema angepaßt werden. Bei der „correlated double sampling“ – Technik wird das Ausleserauschen vermindert. Das Ausgangsmeßpixel, wird vor jeder Messung gegenüber einem Referenzwert gemessen und die Pixelladung gegen diesen Leerwert abgeglichen. Das Ergebnis dieser Differenzmessung kommt dem Ladungswert des gemessenen Pixels am nächsten. Correlated double sampling und slowscan bewirken eine drastische Rauschminimierung. Auf diese Weise sind bei „Lightstar 2“ Dynamiken bis 80dB erreichbar (Dynamik=S/N-ratio, ausgedrückt in dB). Der Auslesefehler ist bei Sensoren neuer Bauart relativ gering. Beim Thompson Sensor liegt es bei  $< 50e^-$  pro Pixel.

#### 5.1.5.4. Ausleseschlieren

Aufgrund der Auslesetechnik und des Timings kommt es zur Schlierenbildung oder „smear“. Dies wurde durch sehr kurze Verschiebezeiten um 300ns pro Zeile möglichst klein gehalten.

### 5.6.1. Voruntersuchungen zur CCD-Aufnahmeeinheit

#### 5.1.6.1 Pixel- Integerwert- Stabilität über die Zeit

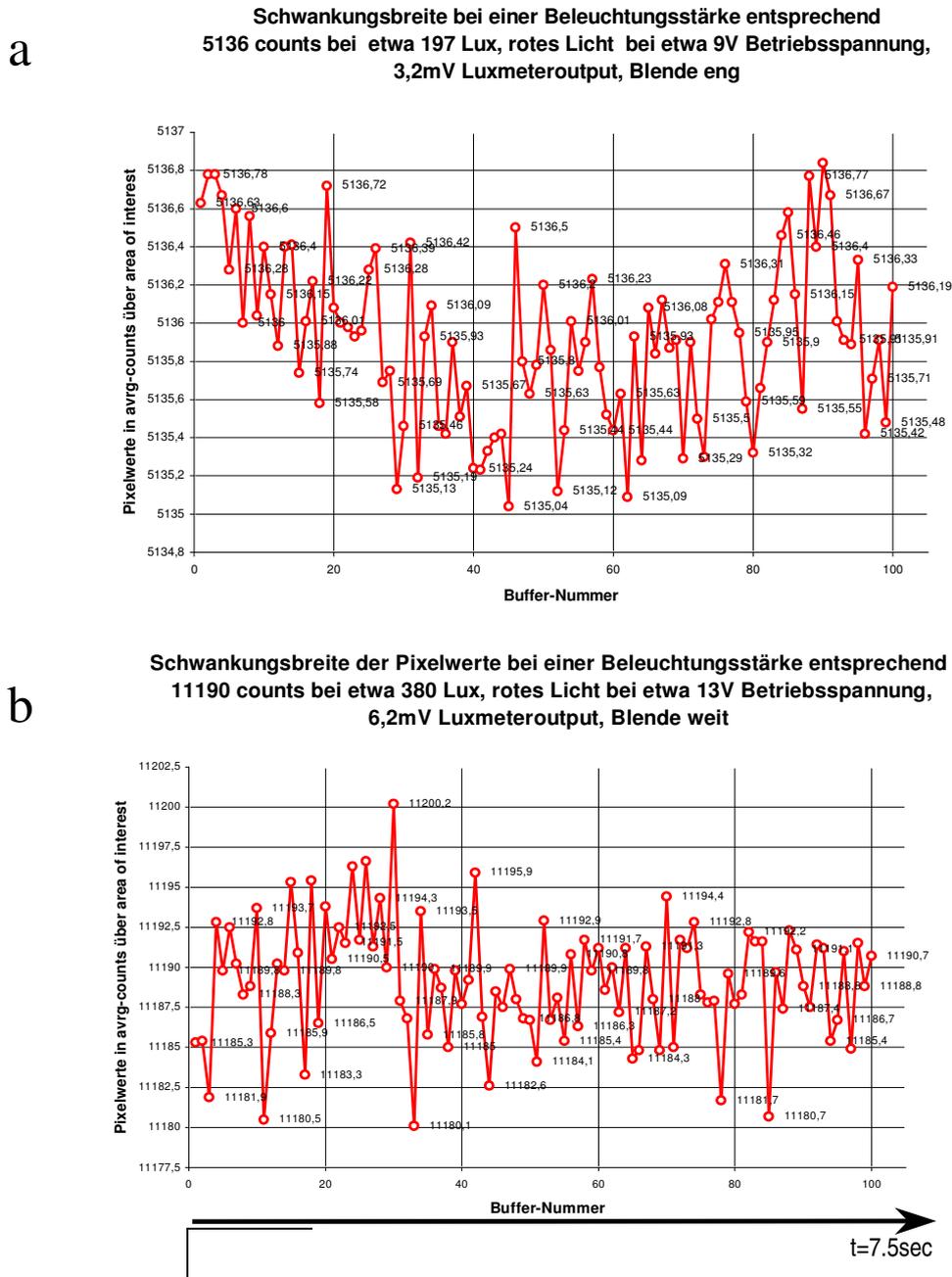
Die Pixelwerte, sog. „counts“, sind als integer-Zahlenwert codierte Helligkeitswerte, die der CCD-Sensor aufzeichnet und der AD-Wandler ausgibt. Aufgrund der geringen Signalgröße war es nötig, die Stabilität der Pixel-Outputwerte der Aufnahmeeinheit bei gegebener Beleuchtungssituation über einen bestimmten Zeitraum hin zu beobachten mit der Fragestellung nach Stabilität der Werte. Dies, um zu beantworten, ob sich ein Signal der beschriebenen Größenordnung vom Rauschen des Systems absetzen kann und bis zu welcher Signalgröße bei gegebener Schwankungsbreite eine Auflösung ohne Mittelungsprozedur möglich ist. Bis zu welcher Signalgröße eine verlässliche Signalerkennung mit Mittelungsprozedur möglich ist, zeigen die folgenden Messungen zur Intensitätsmodulation. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Ripplermessung der Beleuchtungseinheit ergibt sich hieraus eine „Summenschwankungsbreite“ des Systems, bestehend aus Beleuchtungs- und Aufnahmeeinheit. Der Testaufbau bestand aus einer Diffusorfolie, die mit derselben Beleuchtungseinheit bestrahlt wurde wie im Versuch der Katzenkortex. Die Cameraeinheit wurde über den Stepmotor nach Augenmaß in die Schärfenebene gebracht, das Versuchsfeld gegenüber der Umgebung lichtdicht abgeschirmt und das Raumlicht ausgeschaltet. Um stabile Bedingungen zu gewährleisten, wurde der CCD-Sensor mithilfe eines Peltierelements gekühlt. Die Beleuchtungseinheit und die Peltierkühlung erhielten einen Vorlauf von einer Stunde, um sich auf ein stabiles Level einzupendeln. Zur Auswertung wurden nach Augenmaß ein Bereich homogener Ausleuchtung bestimmt und eine „region of interest“ ,

„ROI“, zur Datenauswertung festgelegt. Es wurden über einen Zeitraum von 7,5s. fortlaufend 100 Bilder aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit roten und grünen Filtern. Die Lichtquelle wurde so justiert, daß sich, gemittelt über die Fläche einer ROI, Durchschnittspixelwerte bei rotem und grünem Licht von etwa 5000 und 10000 counts pro Pixel ergaben.

Ergebnis:

Bei der Messung der Stabilität der Pixel-Integerwerte über die Fläche einer ausgewählten ROI ergaben sich bei Verwendung des roten und des grünen Filters vergleichbare Schwankungsbreiten zwischen 0,035% (rotes Licht, niedrige Intensität) und 0,052% (grünes Licht, niedrige Intensität) sowie 0,079% (grünes Licht, hohe Intensität) und 0,179% (rotes Licht, hohe Intensität). Jeweils einhundert Messungen ergaben folgende Kurvenverläufe:

Ergebnisse der Untersuchung der Pixelwertstabilität bei konstanter Beleuchtung mit rotem Licht über einen Zeitraum von 40 Sekunden, jeweils gemessen als Durchschnittswert über die Fläche einer repräsentativen ROI

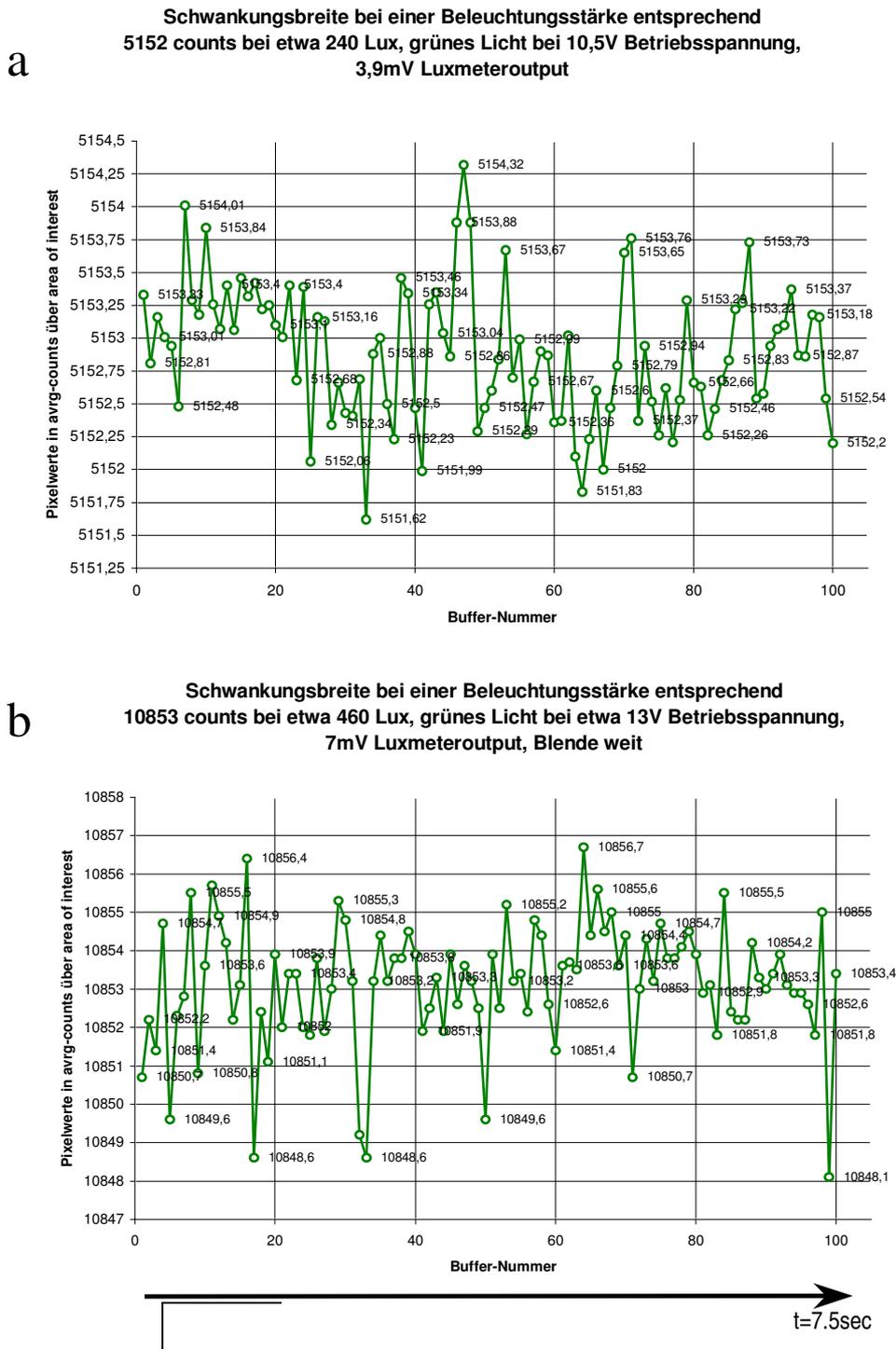


**Abb.9 :** rotes Licht

Diagramme der Schwankungsbreiten für rotes Licht bei verschiedenen Beleuchtungsstärken, aufgenommen wurde eine beleuchtete Diffusorfolie

**a:** 197 Lux Beleuchtungsstärke **b:** 380 Lux Beleuchtungsstärke

Ergebnisse der Untersuchungen der Pixelwertstabilität bei konstanter Beleuchtung mit grünem Licht über einen Zeitraum von 40 Sekunden, jeweils gemessen als Durchschnittswerte über die Fläche einer repräsentativen ROI



**Abb 10:** grünes Licht

Diagramme der Schwankungsbreiten für grünes Licht bei verschiedenen Beleuchtungsstärken, aufgenommen wurde eine beleuchtete Diffusorfolie

**a:** 240 Lux Beleuchtungsstärke **b:** 460 Lux Beleuchtungsstärke

*Rotes Licht:*

Über einhundert Messungen im Zeitraum von etwa 7,5 Sekunden ergab sich folgende Werteverteilung: Bei Beleuchtungsstärken um 197 Lux, die in der ROI Pixelwerte um 5000 counts ergaben, lag der Mittelwert bei 5135,918 counts mit einer Standardabweichung von 0,444 counts. Höchstwerte lagen bei 5136,84 counts, Minimalwerte bei 5135,04 counts. Daraus ergibt sich eine Schwankungsbreite von 1,8 counts oder 0,035%. Bei Beleuchtungsstärken um 380 Lux, die in der ROI Pixelwerte um 10000 counts ergaben, lag der Mittelwert bei 11189,185 counts mit einer Standardabweichung von 3,642 counts. Höchstwerte lagen bei 11200,2 counts, Minimalwerte bei 11180,1 counts. Daraus ergibt sich eine Schwankungsbreite von 20 counts oder 0,179%.

*Grünes Licht:*

Über einhundert Messungen im Zeitraum von etwa 40 Sekunden ergab sich folgende Werteverteilung: Bei Beleuchtungsstärken um 240 Lux, die in der ROI Pixelwerte um 5150 counts ergaben, lag der Mittelwert bei 5152,883 counts mit einer Standardabweichung von 0,514. Höchstwerte lagen bei 5154,32, Minimalwerte bei 5151,62 counts. Daraus ergibt sich eine Schwankungsbreite von 2,7 counts oder 0,052%. Bei Beleuchtungsstärken um 460 Lux, die in der ROI Pixelwerte um 10853 counts ergaben, lag der Mittelwert bei 10853,128 counts mit einer Standardabweichung von 1,607. Höchstwerte lagen bei 10856,7, Minimalwerte bei 10848,1 counts. Daraus ergibt sich eine Schwankungsbreite von 8,6 counts oder 0,079%.

Das Auseinanderklaffen der Werte bei rotem und grünem Licht wird auf Unterschiede in der spektralen Antwort des CCD-Sensors auf rotes und grünes Licht zurückgeführt. Beleuchtungsstärkenangaben haben daher aufgrund unterschiedlicher relativer Empfindlichkeiten des Luxmeters einerseits und des CCD-Sensors andererseits lediglich orientierende Bedeutung. Es zeigt sich als Resultat der Voruntersuchungen eine „Summen-Schwankungsbreite“ des Systems, die eine Aufzeichnung von Signalen im Bereich von  $\Delta R/R = 1 \times 10^{-3}$  erlaubt.

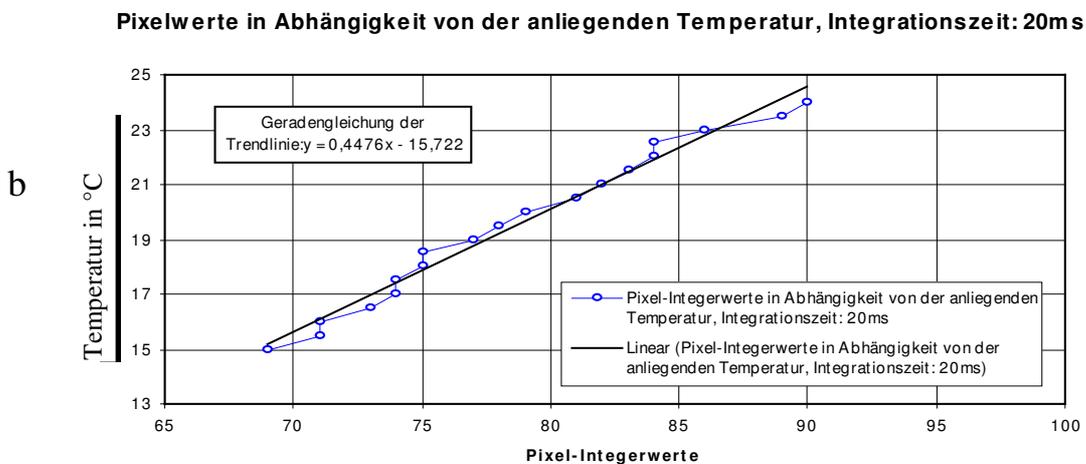
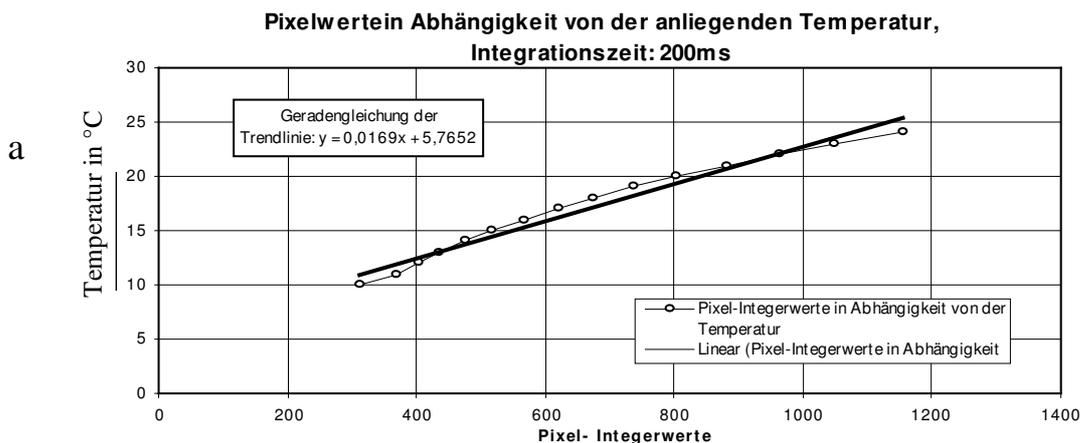
5.1.6.2. Pixel-Integerwert-Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur

Der Sensor des Camerasystems wurde durch ein Peltierelement auf konstanter Temperatur gehalten. Um die Auswirkungen von Temperaturschwankungen auf die Outputwerte des CCD-Sensors zu quantifizieren, wurde der Durchschnittsoutput des Sensors einer ausgewählten ROI und die Standardabweichung in Abhängigkeit von der anliegenden Temperatur bestimmt. Aufgenommen wurde ein Dunkelbild bei verschlossener und abgedunkelter Aufnahmeeinheit. Es wurde die Temperatur des Peltierelements am Sensor

zwischen 10°C und 21°C geregelt und aus je zehn Einzelaufnahmen mit einer Integrationszeit von 200ms Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Dies mit der Fragestellung, ob eine Kühlung des Sensors nötig und sinnvoll ist.

### Ergebnis

Die Bestimmung der Abhängigkeit des CCD-Sensoroutputs ergab eine lineare Abhängigkeit der Pixelintegerwerte von der anliegenden Temperatur. Bei 10°C lagen die Werte bei 300, bei 24°C vervierfachten sich die Werte annähernd auf rund 1170counts. Die Standardabweichung stieg von rund 2 counts an bis 7,5 counts. Hieraus läßt sich einerseits zur Minimierung des Dunkelstroms als Offset eine niedrige Arbeitstemperatur, vor allem aber zur Minimierung des Dunkelstromrauschens eine konstante Temperatur als zweckdienlich ableiten. Bei einer konstanten Arbeitstemperatur von 20°C ergab sich bei 200ms Integrationszeit ein Dunkelstrom des Sensors in der Größenordnung von rund 800counts.



**Abb11:** Abhängigkeit der Pixelwerte von der Anliegenden Temperatur.

**a:** Integrationszeit 200ms, Ordinate: Temperatur in °C, Abszisse: Pixel-Werte

**b:** Integrationszeit 20 ms

### 5.1.6.3. Intensitätsmodulation

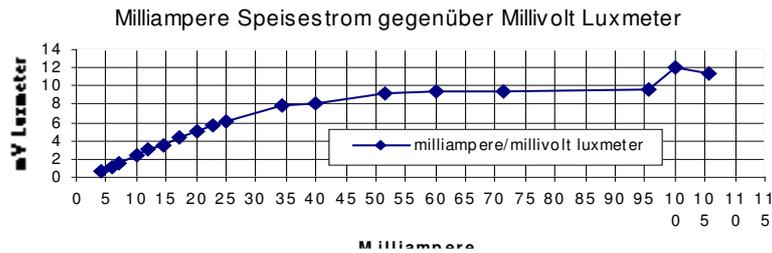
Die intrinsischen Signale Blutflußsignal und Desoxysignal unterscheiden sich in ihren jeweiligen Signalamplituden. Das Blutflußsignal, als Resultat einer bedarfsangepaßten Durchblutungserhöhung (vgl. Kap. zereb. Blutflußregulation), weist eine Amplitude von etwa  $\Delta R/R \ 3 \times 10^{-2}$  nach etw 4 sec [Nemoto M. et al., 1999] der gesamten reflektierten Lichtmenge auf, das Desoxysignal<sup>22</sup>, das durch die Desoxygenierung des örtlichen Hämoglobins entsteht, stellt mit einer Amplitude von  $\Delta R/R = 1,5 \times 10^{-3}$  der Leuchtdichte etwa 1,5 bis 2 sec nach Stimulusbeginn [Malonek D. et al., 1997; Nemoto M. et al., ibid.) sogar noch höhere Ansprüche an die Dynamiken von Aufnahmeoptik und Beleuchtungseinheit. Aus diesem Grund bildete die Verifizierung des Auflösungsvermögens der verwendeten Aufnahmeeinheit und damit der Nachweis, daß das darzustellende Signal mit der verwendeten Technik überhaupt darstellbar war, einen wesentlichen Teil der Vorarbeiten. Der Nachweis eines hinlänglichen Auflösungsvermögens wurde ex vivo mithilfe eines Versuchsaufbaus geführt, der im Arbeitsbereich späterer in vivo Messungen am Versuchstier einen Modulationshub der erwarteten Amplitude realisieren konnte. Da es sich bei dem Nutzsignal um ein ins Verhältnis gesetztes Differenzsignal zwischen hellerer Prästimulussituation und dunklerer, weil absorptionsvermehrter Poststimulussituation handelt, mußte künstlich eine „Prästimulussituation“ sowie eine „Poststimulussituation“ generiert, aufgenommen und verrechnet werden. Die Helligkeitsmodulation am Kortex wurde dabei durch Modulationen des Speisstroms einer Leuchtdiode des Typs Fairchild HLMP-33XX imitiert. Die Leuchtdiode wurde in einem reflexionsarm beschichteten und lichtdichten Zylinder fixiert. Sie befand sich innerhalb des direkt am Cameraobjektiv adaptierten Zylinders in der Schärfenebene der Aufnahmeeinheit. Vor Durchführung des Versuchs wurde der lineare Arbeitsbereich der Diode durch Bestimmung des Luxoutputs gegenüber Speisstrom zwischen 5mA und 25mA festgelegt (vgl. Abb 12a+b). In diesem Bereich bedeuteten Modulationen des Speisstroms gleichsinnig proportionale Modulationen in dem Lichtoutput der Diode. Der Luxoutput wurde durch eine Selenzelle unter Einhaltung einer Einpendelzeit von fünf Minuten bestimmt. Nach Maßgabe von Voraufnahmen am Katzenkortex, die zur Ausleuchtungskontrolle und Justage der Lichtleiter (vgl. Abb. 6) durchgeführt wurden, wurden die Offsets, um die die Modulation stattfinden sollte, auf 10.000 und 5.000 counts festgelegt und die Helligkeit der Diode um diesen Offset moduliert. Als „Offset“ wurde einen

<sup>22</sup> *Die beiden Begriffe sind synonym verwendet.*

Durchschnitt definiert, erstellt aus den Pixel-Integerwerten einer repräsentativ um die LED-Abbildung gelegten ROI.

**Abb. 12a**

Der Speisestrom der Diode wurde über einen Spannungsteiler geleitet. Der Vorwiderstand betrug 6,8k Ohm, der Potentiometerwiderstand 1k $\Omega$ . das Potentiometer wurde von Hand variiert. Die an einem 100 $\Omega$  Widerstand nach der Diode abfallende Spannung wurde



**Abb. 12b:** Kennlinie der Leuchtdiode. Ordinate: Luxmeter-Output in mV, Abszisse: Speisestrom der Leuchtdiode

gemessen und die Stromstärke bestimmt. Dies war die Meßgröße, anhand deren indirekt die Lichtstärke bestimmt und moduliert werden konnten.

Es wurden durch manuelle Einstellung des Potentiometers entsprechend Abb 12a folgende Modulationshübe generiert und aufgezeichnet:

Modulationen bei 10.000 counts um Modulationen bei 5000 counts um:

+10%	+10%
+1%	+1%
+0,3%	+0,3%
+0,2%	+0,2%
+0,1%	+0,1%
+0,05%	+0,035%
+0,04%	
+0,03%	
+0,02%	
+0,01%	

Aufgrund thermischer Drift einzelner Komponenten des Aufbaus wurde insbesondere zur Darstellung der niedrigamplitudigen Modulationshübe unter 1% vor jeder Messung der Offset der Messung nach Maßgabe der

Pixel-Integerwerte der aufgezeichneten CCD-Abbildungen nachjustiert. Anhand der graphischen Darstellung der Outputschwankungen der Diode wird eine erhebliche

Schwankungsbreite um  $3,3 \times 10^{-3}$  deutlich. Der Arbeitsbereich des Verstärkers wurde auf ein Gain von 16000 counts einjustiert. Der Offset der Modulationsmessungen bei 10000counts bewegte sich um 2,37mA Speisstrom, der Offset der Messungen bei 5000 counts lag im Bereich von um 1,615mA. Bei Modulationen um 0,01 % stieß nicht nur die Cameraeinheit an die Grenze ihres Auflösungsvermögens sondern auch die manuelle Justage des Speisstroms der LED.

### Resultate

Die Vorarbeiten zur Einschätzung der Darstellbarkeit eines Signals mit einer Amplitude  $\Delta R/R = 10^{-3}$  durch unsere Cameraeinheit ergaben ein Auflösungsvermögen, das die Darstellung von Signalen einer Größe von 0,01% – 0,03% erlaubt. Die Kurvenverläufe der Werte über einhundert Messungen hinweg zeigten bei den Messungen mit einer Grundhelligkeit, die Durchschnittsintegerwerte um 10.000 und um 5000 counts ergaben, einen ohne Mittelungsprozesse signifikant vom angelegten Offset separierten Verlauf bis etwa 0,03%. Mit Mittelung ist eine Differenz zwischen Offset und Modulation bis 0,02% darstellbar.

### **Abb. 14:**

Da aus den durchgeführten Messungen zum Intensitäts-Auflösungsvermögen der Aufnahmeeinheit ein Auflösungsvermögen von bis zu 0,035% ohne Mittelung und 0,02% der eingestrahnten Lichtintensität mit Mittelung ersichtlich ist, ist die Camera in der Lage, ein Signal der beschriebenen Größe aufzulösen.

#### 5.1.6.4. Unschärfemodulation und räumliches Auflösungsvermögen

Die Justierbarkeit und Beibehaltung der richtigen Schärfenebene stellt bei Messungen intrinsischer Signale am Kortex ein wesentliches Problem dar. Einerseits bietet der Kortex der

Katze eine insgesamt konvexe Oberfläche. Der Radius dieser sphärischen Krümmung am primären auditorischen Kortex variiert in Abhängigkeit vom Alter des Tieres; bei der ausgewachsenen Katze sind etwa 15mm Radius anzunehmen. Dies ergibt bei einem Aufnahmeveld von etwa  $11 \times 11$  mm bereits eine Höhendifferenz von etwa  $105\mu\text{m}$ . Aus elektrophysiologischen Experimenten ist darüberhinaus ab etwa 1h nach Trepanation ein kontinuierliches Absinken der Hirnmasse gegenüber der Schädelkalotte in einer Größenordnung von 1-3mm bekannt [Dr. Tillein, pers. Mitteilung], das trotz Vaseline-Versiegelung der Öffnung auftritt und die Kortexoberfläche massiv aus der geringen Schärfenebene der Tandemoptik bewegt. Hinzu kommen die unebene Kortexoberfläche, die von zahlreichen Gyri und Sulci durchzogen wird, ein atemabhängiger Kortexhub sowie Unschärfe durch Restpulsationen kortikaler Arterien und Arteriolen. Zur Einschätzung, inwieweit die genannten Faktoren zur Veränderung des gemessenen Signals führen, wurde ex vivo eine Verschiebung der Aufnahmeebene aus dem Focus der Aufnahmeeinheit aufgezeichnet und ausgewertet. Hierzu wurde auf eine homogene, weiße Oberfläche (Diffusorfolie) das Abbild einer verzweigten Piaarterie übertragen und, ausgehend von der Schärfenebene bei einem Arbeitsabstand von etwa 62mm, auf das Motiv zu und von dem Motiv weg, defokussiert. Die Defokussierung erfolgte in  $100\mu\text{m}$ -Schritten durch einen steuerbaren Stepmotor. Die Beleuchtung des Motivs erfolgte ohne Raumlicht mithilfe der Beleuchtungseinheit, die auch im Tierversuch eingesetzt wurde. Es wurde nach Augenmaß eine ROI über der Gefäßstruktur definiert. Die Durchschnitts-Pixelwerte des Areal wurden bestimmt, über 20 Aufnahmen gemittelt und im Diagramm gegen den Grad der Defokussierung aufgetragen.

### *Auflösungsvermögen*

Das räumliche Auflösungsvermögen eines optischen Systems ist definiert als der Mindestabstand zweier Punkte, die das System bei gleichbleibendem Betrachtungsabstand noch als getrennt wahrnimmt. Das Auflösungsvermögen der Aufnahmeeinheit setzt sich aus den Einzelvermögen von Aufnahmeoptik und Bildsensor zusammen. Bei einer CCD-Camera stellt der Sensor das begrenzende Element dar. Die Auflösung der Cameraeinheit ergibt sich aus konstruktionstechnischer Sicht somit aus dem Aufbau des eingesetzten CCD-Sensors. Die Camera „Light-StarII“ ist ausgerüstet mit einem Sensor aus 110592 Pixeln, angeordnet in 384 Spalten und 288 Reihen. Bei Unendlichfokussierung der Tandemoptik (vgl Kapitel „Tandemlinse“) ergibt sich mit einem Arbeitsabstand zwischen Frontlinse und Schärfenebene von rund 62mm ein Aufnahmeveld von etwa  $15 \times 20\text{mm}$ . Daraus errechnet sich bei

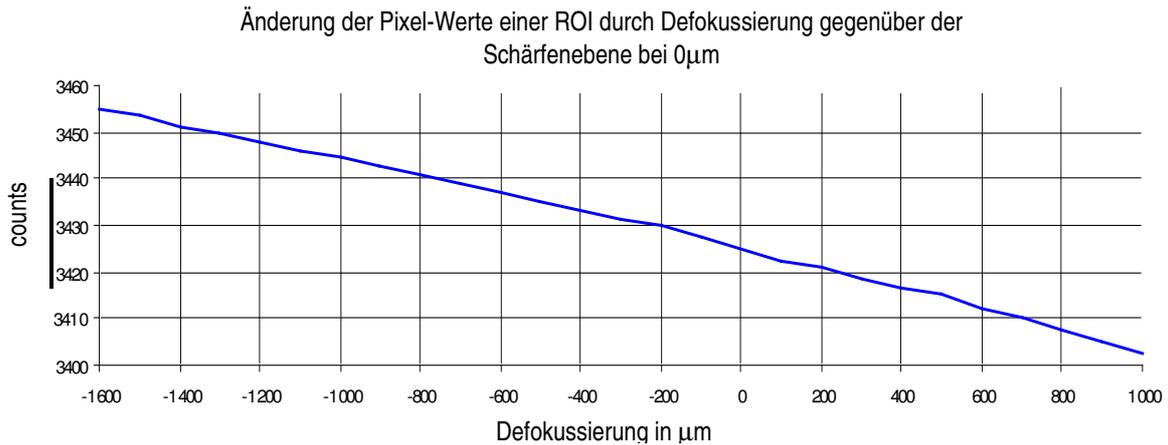
gegebenem Arbeitsabstand ein Auflösungsvermögen auf Basis des Sensoraufbaus von rund  $52\mu\text{m}$ . Der Bestimmung des Auflösungsvermögens in Bezug auf die Betrachtung des aufgenommenen Bildes durch den Menschen sowie unter Berücksichtigung der Auswirkungen weiterer Komponenten auf die Auflösung kommt die in der Photographie gebräuchliche Bestimmung mithilfe von Siemenssternen<sup>23</sup> eher entgegen. Hierbei werden mehrere aus unterschiedlichen Anzahlen von radial angeordneten, alternierend schwarz/weißer Tortenstücke bestehende Kreise aufgenommen. Es wird beurteilt, bis zu welchem Radius noch eine klar getrennte Abbildung der „Tortenstücke“ gegeben ist. Durch den Radius ergibt sich der Kreisumfang des betreffenden Bereiches und wird durch die Anzahl der „Tortenstücke“ des jeweiligen Siemenssternes geteilt. Resultat ist die Auflösung in „getrennte Linien pro Millimeter“. Zur Bestimmung der Auflösung unseres Systems wurde ein Siemenskreis mit 48 und einer mit 72 Balken verwendet.

### Resultate Unschärfemodulation

Bei der Untersuchung der Signalmodulation durch Defokussierung der Aufnahmeebene gegenüber der Schärfenebene infolge sphärischer Krümmung, irregulärer Oberfläche des Kortex sowie Atemhub und Gefäßpulsation ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Pixel-Integerwerte von der relativen Position der Kortexoberfläche zur Aufnahmeeinheit (Abb. 15). Auf der Abszisse ist die Defokussierung in  $100\mu\text{m}$ -Schritten, auf der Ordinate die gemessenen Pixel-Integerwerte in counts aufgetragen. Eine Höhendifferenz der Kortexoberfläche, wie sie im unsynchronisierten Messaufbau als Atemhub bei Trepanation im Bereich des offenliegenden Kortex auftritt, bewirkt somit je nach Ausmaß bereits eine Modulation in der Größenordnung von 0,6% (bei  $500\mu\text{m}$ ), 1,19% (bei  $1000\mu\text{m}$ ) oder 1,79% (bei  $1500\mu\text{m}$ ), peak to peak gegenüber der Durchschnittshelligkeit. Die Ergebnisse dieser Messungen legen die Konstruktion einer Steuereinheit und einer druckdichten Ableitkammer nahe [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996], mit dem Ziel einer Minimierung asynchronen, biologischen Rauschens, ausgelöst durch Atemhub und Herzschlag.

---

<sup>23</sup> *Der Siemensstern wurde von Siemens zur Prüfung von 16mm-Objektiven entwickelt*



**Abb. 15:** Unschärfemodulation

### *Auflösungsvermögen*

Die Auswertung der Aufnahmen zweier Siemenssterne ergab eine Auflösung von  $65\mu\text{m}$ . Die Auflösung der Segmente des 48teiligen Sternes reicht an den Innenkreis. Die Auflösung des 72strahligen Sternes nähert sich dem Innenkreis bis auf  $0,27\text{mm}$  an. Es ergibt sich ein Radius von  $770\mu\text{m}$  für den Unschärfekreis. Dividiert durch 75 Linien errechnet sich die Auflösung zu  $65\mu\text{m}$ .

## **5.2. Die Tandemlinse**

### 5.2.1. Der Aufbau einer Tandemlinse

Bei der optischen Registrierung intrinsischer Signale werden an die Aufzeichnungsoptik hohe Anforderungen gestellt. Um ein möglichst gutes S/N-Verhältnis bei shotnoise-limitierten Messungen zu erreichen (vgl. Kap. 5.1.4.1), war eine hohe Lichtstärke der verwendeten Optik bei großer numerischer Apertur<sup>24</sup> von Bedeutung. Es sollte ein ausreichender Arbeitsabstand zwischen Optik und Objektebene gegeben sein, um genügend Raum für Kortexkammer, Manipulationen an der Kammer sowie die Möglichkeit zu elektrophysiologischen Ableitungen zu gewährleisten. Da ein freigelegtes Kortexareal im Bereich AI der Katze von etwa  $11 \times 11\text{ mm}$ , entsprechend einer Fläche von  $121\text{mm}^2$ , auf einem CCD-Sensor der Größe  $6,6 \times 8,8\text{ mm}$  abzubilden war, waren die Anforderungen an die Vergrößerungsleistung der Optik gering (vgl. Kap. 5.2.4). Der Bildwinkel des Objektivs sollte allerdings die verzerrungsfreie Aufnahme und Abbildung der Gesamtfläche des freigelegten Kortex erlauben. Die Lokalisierung des zu detektierenden Signals in bestimmten kortikalen Ebenen machte einen möglichst niedrigen Schärfentiefenbereich wünschenswert, um in die betreffenden Schichten

<sup>24</sup> Die numerische Apertur ist der brechungsindexgewichtete Sinus des halben Öffnungswinkels  $\sigma$  des Objektivs.

ein fokussieren zu können. Ein optimales Werkzeug für diesen Einsatzbereich stellt die Tandemlinse [Lefkowitz L., 1979; Ratzlaff E.H. und Grinvald A., 1991] dar. Die Tandemlinse ist eine Kombinationsoptik, vergleichbar einem System aus Mikroskopobjektiv und Okular. Sie besteht aus zwei durch einen Gewinding Front zu Front montierten, handelsüblichen KB-Objektiven. Tandemlinsen sind für die gestellten Anforderungen besser geeignet als herkömmliche Mikroskop- oder Makroskopobjektive, die aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Aperturen bei schlechterer Signal/Noise- ratio deutlich längere Belichtungszeiten für vergleichbar helle Bilder erfordern. Tandemobjektive sind außerdem günstig in der Anschaffung, unkompliziert im Aufbau, herstellerseitig auf die meisten Abbildungsfehler hin korrigiert und besitzen aufgrund ihrer hohen Aperturen gute Abbildungseigenschaften. Nachteilig wirkt sich bei selbstgebaute Tandemlinsen hingegen die erhebliche Vignettierung aus, die in Tandemanordnung bei Objektiven mit innenliegenden Blenden auftritt (vgl. Abb.17). Sie wird bei Differenzmessungen weitgehend eliminiert, erschwert aber die Interpretation des Rohbildes.

### **Abb.17**

#### 5.2.2. Die Apertur einer Tandemlinse

Die numerische Apertur ist ein Maß für die Lichtmenge, die maximal durch ein Linsensystem treten kann. Je größer die numerische Apertur, desto besser ist das Auflösungsvermögen eines Objektivs. Mehr Licht bedeutet anteilig weniger Dunkelstrom, weniger Verstärkerrauschen und „shotnoise“- limitiertes Messen. Die Apertur einer Tandemlinse ist zu berechnen nach:

$$n.A. = \eta \times \sin\alpha, \quad (7)$$

wobei:

$$\begin{aligned} nA &= \text{numerische Apertur} \\ \eta &= \text{Brechungsindex des zwischen Linse und Objekt} \\ &\quad \text{liegenden Mediums} \\ k_G &= (\text{Blendenzahl})^{3,35} \\ \alpha &= \text{halber Öffnungswinkel} \end{aligned}$$

wobei sich  $\alpha$  bei einer Tandemoptik errechnet zu:

$$\tan \alpha = \frac{1}{2}k_G$$

Die numerische Apertur unseres Systems errechnet sich somit als:

$$\begin{aligned}\tan\alpha &= \frac{1}{2}(2,8) = 1/5,6 = 0,1785 \\ \alpha &= 10,125^\circ \\ \text{n.A.} &= 1 \times \sin 10,125 = 0,175\end{aligned}$$

### 5.2.3. Vignettierung

Da die in der Tandemoptik verwendeten Objektive auf unendlich fokussiert sind, kann das Ensemble der Linsen annäherungsweise als dünne Linse betrachtet werden, deren Eigenschaften durch die Abbildungsgleichung einer dünnen Linse beschrieben werden:

$$1/s_2 - 1/s_1 = 1/f' \quad (8)$$

wobei

$$\begin{aligned}s_2 &= \text{Bildweite} \\ s_1 &= \text{Gegenstandsweite} \\ f' &= \text{\textit{bildseitige} Brennweite, entspricht der} \\ &\quad \text{„BFL“, „back focal length“.}\end{aligned}$$

Hieraus läßt sich der Strahlenverlauf innerhalb einer Tandemlinse beschreiben: setzt man bei Fokuseinstellung „unendlich“  $s_1$  der bildseitigen Brennweite gleich, muß sich für  $s_2$  ein unendlich hoher Wert ergeben. Die aus einem Bildpunkt in der Brennebene des Objektivs aufgenommenen und durch die Frontlinse des Ensembles austretenden Strahlen verlaufen rechnerisch zwischen den Einzelobjektiven parallel. Tatsächlich verlaufen die Strahlen nicht exakt achsenparallel (s.u.). Im zweiten Objektiv wird das parallele Strahlenbündel aufgefangen und entsprechend fokussiert. Da für das zweite Objektiv die Gegenstandsweite  $s_1$  unendlich zu setzen ist, ergibt sich als Bildebene die Brennebene des zweiten Objektivs. Die Bildebene kann in Fokussstellung „unendlich“ somit aufgrund der erheblichen Differenz zwischen Bildebene und Gegenstandsweite in Näherung vereinfachend der Brennebene des Abbildungsobjektivs gleichgesetzt werden. Ebenso ist die Brennweite der Aufnahmelinse der Gegenstandsweite der Linse gleichsetzbar. Bei der Tandemlinse liegt also die Gegenstandsweite in der Brennweite des vorderen und die Bildebene in der Brennebene des hinteren Objektivs. Der Arbeitsabstand in unserem Aufbau ergab sich bei 100mm Brennweite der Aufnahmelinse (Olympus Zuiko) zu etwa 60mm. Da solche Strahlenbündel, die nicht von axialen Bildpunkten der Brennebene ausgehen, die Aufnahmelinse zwar ebenfalls zueinander, nicht aber zur Achse parallel verlassen (vgl. Abb. 17, Strahlengang), resultiert aus dem Aufbau durch Beschneidung der in der Peripherie des Lichtpfades austretenden Strahlen an der

Linsenfassung des aufnehmenden Objektivs ein von zentral nach peripher zunehmender Abfall in der Beleuchtungsstärke, der am Rohbild bis zu 20% betragen kann. Das Ausmaß der Beschneidung hängt trigonometrisch vom Abstand der Objektive und dem Einfallswinkel ab. Der Verlust wird als „Vignettierung“ bezeichnet. Sie können durch Verwendung von Abbildungsobjektiven mit großen Eintrittspupillen mit hoher Apertur minimiert werden. Die Eingangspupille berechnet sich aus dem Quotienten der Objektivbrennweite und Blendenzahl<sup>25</sup> zu:

$$EP = f/F \quad (9)$$

Das Eingangsmaß der zweiten Optik (50mm AF-Nikkor) unserer Anordnung errechnet sich somit zu  $50:1.8=27,5\text{mm}$ , die Eintrittspupille der Aufnahmelinse zu  $100:2,8=35,7\text{mm}$ . Der Intensitätsverlust durch Totalabschattung fiel in Projektion auf den Sensor bei der Größe unseres Chips nicht ins Gewicht. Der in den Sensorwerten erkennbare anteilige Intensitätsverlust wurde durch die in unserem Ablaufplan vorgesehenen Rechenschritte eliminiert.

#### 5.2.4. Der Vergrößerungsfaktor

Die Auswahl der Einzelbrennweiten bestimmt beim Aufbau der Tandemoptik den Vergrößerungsfaktor, sodaß Einzelbrennweiten nach Maßgabe des zu erreichenden Vergrößerungsmaßstabes gewählt werden. Der Vergrößerungsfaktor des Gesamtobjektivs errechnet sich dabei aus dem Verhältnis der Einzelbrennweiten zu:

$$V = f_B/f_G \quad (10)$$

wobei

$$f_B = \text{Brennweite Abbildungslinse}$$

$$f_G = \text{Brennweite Aufnahmelinse}$$

#### **Abb. 18:**

Um eine Fläche von  $11 \times 11 \text{ mm}$  unter Berücksichtigung des in der CCD-Technik üblichen Seitenverhältnisses von 4:3 komplett auf einem  $2/3$  Zoll CCD-Sensor von  $58\text{mm}^2$  mit einer Diagonalen von 11mm abzubilden, war ein Vergrößerungsfaktor von 0,5 nötig. Daher wurde eine Kombination aus einem 100mm 1:2.8 Olympus Zuiko MF<sup>26</sup> als Aufnahmeobjektiv und

<sup>25</sup> Die F-Zahl oder Blendenzahl wird besonders bei Fotoobjektiven verwendet. Sie errechnet sich zu  $F=f/dep$ . Die Werte 1.2, 1.4, 2.0, etc. sind die Kehrwerte der Brennweite, dividiert durch die „relativen Öffnungen eines Objektivs, d.h. der für den Lichteinfall maßgeblichen Eintrittspupille. Bei 1: 2 ist der Blendendurchmesser halb so groß, wie die Brennweite. Man erhält dadurch eine Normangabe für den blendenabhängigen Lichtdurchlaß und der brennweitenabhängigen Beleuchtungsstärke des Sensors.

<sup>26</sup> MF= manueller Focus, AF= automatischer Focus

einem 50mm AF-Nikkor 1:1.8 ( $V=50/100=1/2$ ) als Abbildungsobjektiv gewählt. Die Objektive wurden über einen handelsüblichen Zwischenring 49→52 der Firma Hama Photo-technik, Monheim adaptiert und über einen C-mount-Adapter an das CCD-Gehäuse gesetzt.

### 5.2.5. Die abbildbare Gegenstandsgröße

Zur verzerrungsfreien Abbildung eines Gegenstandes durch ein Objektiv sollte der Bildwinkel  $\leq 8^\circ$  betragen. Der Bildwinkel errechnet sich als Auslenkung von der optischen Achse zu:

$$\tan w = x/f_G \quad (11)$$

wobei:

$$\begin{aligned} w &= \text{Bildwinkel} \\ x &= \text{Gegenstandsgröße} \\ f_G &= \text{Brennweite des Aufnahmeobjektivs} \end{aligned}$$

Für die Abbildung eines  $11 \times 11$ mm großen Kortexareales wäre somit nach:

$$f_G = 5,5\text{mm}/\tan 8^\circ = 39,15\text{mm}$$

...ein Aufnahmeobjektiv mit einer Brennweite von 50 mm ausreichend gewesen. Aufgrund des Vergrößerungsmaßstabes wurde jedoch ein Aufnahmeobjektiv mit 100mm Brennweite genutzt, um einen ausreichend großen Bildausschnitt auf den Sensor projizieren zu können,

### 5.2.6. Objektivkorrektur

Im Zusammenhang mit der spektralen Empfindlichkeit des CCD-Sensors wurde bereits auf die optischen Eigenschaften der Objektive eingegangen. Die Linsen sind in der Regel bereits herstellerseitig auf die gängigen Abbildungsfehler wie sphärische und chromatische Aberration, Koma, etc. hin korrigiert. Die chromatische Aberration wird in der Regel auf zwei Farben hin korrigiert, diese Objektive werden Achromaten genannt. Alle drei Spektren, rot grün und blau, werden lediglich bei hochwertigen Reobjektiven korrigiert. Die Abbildungsfehler fallen bei weit geöffneter Blende am meisten ins Gewicht<sup>27</sup>. Es wurde mit mit geöffneter Blende gearbeitet, um eine geringe Schärfentiefe zu gewährleisten.

<sup>27</sup> *Im Linsenrandbereich durchtretende Strahlen werden am stärksten gebrochen.*

### 5.2.7. Schärfentiefe

Ein niedriger Schärfentiefenbereich war bei unserer Anordnung wünschenswert, um störende oberflächliche Muster bereits im Rohbild minimieren zu können. Die Schärfentiefe ist eine Funktion der Vergrößerung und der Blendenstellung. Bei der Tandemlinse stellt sich die Berechnung kompliziert dar, weil die Blenden-Marken des Objektivringes aufgrund der Natur des komplett modifizierten optischen Systems kein zuverlässiges Maß mehr für die Lichtmenge bietet, die in das Objektiv eintritt. Das Verhältnis zwischen Blendeneinstellung und einfallendem Licht wird nichtlinear. Da herkömmliche Schärfentiefentabellen ohne valide Orientierung am Blendenindex nutzlos sind, muß der Schärfenbereich errechnet werden.

Berechnungsbeispiel:

Die 2. Linse hat eine kleinere Apertur als die erste Linse : Linse 1: 100mm  
 1:2,8 --> Öffnung = 36mm; Linse 2: 50mm 1:1,8 --> Öffnung =  
 27mm. Damit sind nur die 27mm nutzbar und man erhält eine effektive Apertur für die  
 erste Linse von  **$F_n = 3,6$**

Die zugelassenen Verschmierungsfläche ergibt sich aus der Pixelgröße  **$B$**  ( $= 22\mu\text{m}$ ).  
 Die entsprechende Objektgröße  **$G$**  ist gegeben aus dem Abbildungsmaßstab  **$M = f_2/f_1$**   
 (hier = 0,5) -->  $G = B / M$ .

Ein Objektpunkt verschmiert zu einem Fleck der Größe  $G$  entsprechend der Apertur  
 $f/d = F_n$  nach der Formel  $x/G = F_n$

$$\text{--> } x = F_n * G$$

$$\text{--> } x = F_n * B / M$$

Für die Tiefenschärfe  **$TS$**  ist der Doppelkegel zu nehmen (also  $2x$ ) -->  **$TS = 2 F_n * B / M$**

mit  $F_n = 3.6$ ,  $B = 22\mu\text{m}$  und  $M = 0,5$  ( $= f_2/f_1$ ) ergibt sich damit für die Tiefenschärfe  
 ein Wert von

$$\text{--> } TS = 360\mu\text{m}$$

### 5.2.8. Scharfstellung

Die Fokussierung der Einheit ist prinzipiell über die Linsenelemente der Aufzeichnungsoptik möglich. Da im Versuchsaufbau Blende (maximale Öffnung) und Fokus (Unendlichstellung) der Tandemlinse unverändert bleiben mußten, um maximale Lichtempfindlichkeit bei geringer Schärfentiefe zu gewährleisten, wurde die Fokussierung durch Relativverschiebung der Camera gegenüber dem Objekt geleistet. Die Camera wurde durch einen Stepmotor (LOT Oriel, Darmstadt) der Kortexoberfläche bis in die Schärfenebene angenähert. Die Schärfenebene wurde visuell anhand der Bildschirmdarstellung festgelegt. Um eine annäherungsweise Echtzeit- Übertragung des aufgenommenen Bildes auf den Bildschirm zu erhalten und Schärfenebenenkorrekturen innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens durchführen zu können, wurde eine Softwarefunktion verwendet, die ein „continuous grabbing“ erlaubte, also eine

kontinuierliche, filmähnliche Bildübertragung mit einer Frequenz um 10 Bilder/sec. Die jeweils letzte Abbildung wurde dabei von der darauffolgenden überschrieben. Dieser Modus diente lediglich der Justierung zur Einrichtung des Versuchsaufbaus.

### **5.3. Die Beleuchtungseinheit: Voruntersuchungen**

#### 5.3.1. Bestimmung der Schwankungsbreite in der Lichtintensität

Die geringe Signalgröße von 1‰ der Gesamtleuchtdichte stellt hohe Anforderungen an die Dynamik und Lichtempfindlichkeit der Optik und an die Stabilität der verwendeten Lichtquelle. Der Ripple der Beleuchtungseinheit sollte für optische Registrierungen intrinsischer Signale unter 1:1000 liegen [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Im Versuch kam eine stabilisierte 100 Watt Quartz-Tungsten-Halogenlampe (LOT Oriol, Darmstadt) zum Einsatz. Die Betriebsspannung der Lampe war von 9 bis 12 Volt regulierbar. Zur homogenen Ausleuchtung des betrachteten Kortexareals war ein dual- oder triple-port-Lichtleiterbündel hilfreich. Das Lampengehäuse war mit einem Trifurkations-Lichtleiterbündel ausgestattet. Im Strahlengang der Lichtquelle befand sich eine asphärische Linse zur Bündelung und Kollimation des Lichts, in diesem Bereich war der Einschub von monochromatischen Glasfiltern der genutzten Wellenlängen möglich (vgl. Abb. 6). Das verwendete Filterelement: 541nm; LOT Oriol; bei 23°C und 50% Transmission Bandbreite von 9,926nm. Eine weitere, plankonvexe Linse bündelte den gerichteten Strahl nach dem Filterelement auf den Lichtleitereingang. Die Lichtquelle war mit einer manuell zu bedienenden Irisblende ausgestattet, um eine Lichtbelastung der Kortexoberfläche außerhalb der Experimentdurchgänge zu vermeiden. Herstellerseitig wurde der Ripple der Lampe mit 0,1% peak to peak angegeben. Um sicherzustellen, daß der Restripple der Lichtquelle in einer für die Versuche vertretbaren Größenordnung lag, wurde die Schwankungsbreite in einem eigenen Versuchsaufbau bestimmt. Dazu wurde ein Phototransistor - Photostrom genutzt. Gemessen wurden:

- 1) - die Schwankungsbreite der Lichtintensität im Labor an Position des Setups. Die Beleuchtung des Labors besteht aus Leuchtstoffröhren. Der Phototransistor wurde in 1,5m Abstand auf die Beleuchtung ausgerichtet,
- 2) - die Schwankungsbreite des Raumlichts indirekt als Reflexion über Diffusorfolie an Position des Setups,
- 3) - die Schwankungsbreite eines Mischlichts aus stabilisierter Lichtquelle und Raumlicht als Reflexion über einer Diffusorfolie, sowie
- 4) - die Schwankungsbreite des Outputs der Lichtquelle allein als Reflexion über einer Diffusorfolie.

### Versuchsaufbau

Der Phototransistor war mit dem Kollektor am Pluspol des Netzteiles (Toellner/TCE 8433), mit dem Emitter an einem Arbeitswiderstand von  $1k\Omega$  angeschlossen. Der Widerstand lag mit seinem zweiten Pol an Masse und gleichzeitig parallel zu einem Oszilloskop. Der Ausgang des Oszilloskops war zur besseren Darstellbarkeit und Dokumentation mit dem AD-Wandler-Eingang eines Datenverarbeitungsprogramms Expert 2.8 verbunden, das ansonsten bei der Datenverarbeitung elektrophysiologischer Experimente Verwendung findet.

### **Abb. 19, Abb.20**

### Resultate

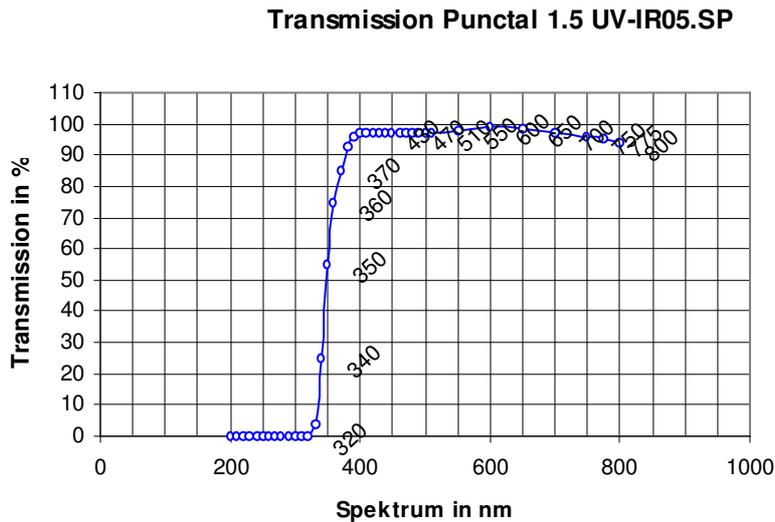
Wie anhand der Kurven (in Abb20) erkennbar, bestehen deutliche Unterschiede in den Schwankungsbreiten der einzelnen Versuchsanordnungen. Den höchsten Ripple mit einer Amplitude von etwa 13mV, entsprechend etwa 0,3% bei 100Hz bot die ungefilterte Deckenbeleuchtung. Die indirekte Aufnahme der Deckenbeleuchtung als Reflexion einer Diffusorfolie ergab einen Ripple bei 100Hz mit einer Amplitude von 1mV peak to peak. Die Aufnahme eines Mischlichts aus Raumlicht und Beleuchtungseinheit ergab einen alternierenden Ripple von 100Hz mit Betonung jedes zweiten Hubes durch Aufmodulation der Netzfrequenz von 50Hz durch die Beleuchtungseinheit. Die Amplitude betrug 2mV bzw 2,5mV peak to peak, entsprechend etwa 0,5%. Die Betrachtung des Lampenlichts alleine, aufgenommen indirekt als Reflexion einer Diffusorfolie im Arbeitsabstand von 6cm ergab einen 50Hz-Ripple einer Amplitude von 0,6mV peak to peak entsprechend etwa 0,01%. Die Prüfung der Beleuchtungseinheit ergab einen Restripple von 0,01% Amplitude mit einer Netzfrequenz von 50Hz. Damit ist die Beleuchtungseinheit zur Darstellung eines Signals im Promillebereich geeignet.

## **5.4.Die Kortexkammer**

### 5.4.1. Der Aufbau der selbstgebauten Kortexkammer

Zusammen mit der Steuereinheit dient die Kortexkammer der Minimierung von Relativbewegungen der Kortexoberfläche bzw. der Fokusebene gegenüber der Aufnahmeeinheit. Aus den Vorversuchen zur Rauschquelle Unschärfe geht hervor, in welchem Ausmaß Pulsationen bzw. Atemhübe zum biologischen Rauschen beitragen. Den Relativbewegungen zu subsumieren ist ein Absinken des Kortex innerhalb des Schädels, das bei elektrophysiologischen Ableitungen durch Trepanationsöffnungen zu beobachten und schwer zu verhindern ist. Dieses Absinken

tritt vor allem bei jüngeren Tieren auf und kann über Stunden hinweg in der Größenordnung mehrerer Millimeter liegen (vgl. Kap. 5.1.4). Die Kortexkammer wurde aus VA-Stahl gedreht. Sie ist nach oben durch eine Platte optischen, bds. entspiegelten Kunststoffes verschließbar (Punctal UV-IR05.SP, Carl Zeiss, Jena) Die optischen Eigenschaftendes Kunststoffes verdeutlicht das folgende Diagramm (Carl Zeiss, Jena). Die Transmission des verwendeten Kunststoffes erreicht bei etwa 380nm 96% und verbleibt stabil auf diesem Niveau bis etwa 750nm.



**Abb. 21:** Transmission Kammerscheibe  
Blau: Transmission in % . Werte von Carl Zeiss/Jena

Die Abdeckplatte war mittels Innengewinding fixierbar. Durch Aufzementieren der Kammer mithilfe von schnellhärtendem Kunststoff aus der Zahntechnik (Paladur® Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts) entstand ein flüssigkeits- und gasdichter Raum, der zur Blutstillung mittels Knochenwachs gegenüber der Diploe abgedichtet wurde. Dieser Raum wurde zunächst von oben durch eine weitlumige Spritze ohne Kanüle mit Silikonöl von 50cS<sup>28</sup> Viskosität (Polytec, Berlin) befüllt und über einen Gewinding mit dem Deckglas verschlossen. Das verbliebene Volumen an Luft wurde über zwei seitliche Zugänge druckneutral durch Silikonöl ersetzt. Die Kammer besaß zwei Zugänge, die im 120°Winkel angeordnet und durch Nadelventile verschließbar waren. So wurde nach Neigen des Tieres das Auffüllen der Kammer mittels einer Metallkanüle der Stärke 1,1mm (Acufirm/Dreieich) durch die untere Öffnung ermöglicht, während die in der Kammer verbliebene Restluft durch die obere Öffnung entweichen konnte. Nach Befüllen wurden die Nadelventile geschlossen. Der homogene Raum zwischen Kortexoberfläche und Deckglas war stabil und eignete sich für optische Ableitungen.

<sup>28</sup> Einheit der kinematischen Viskosität:  $1 \text{ m}^2/\text{s} = 10^4 \text{ S (Stoke)} = 10^6 \text{ cS}$

**Abb. 22:****5.4.2. Voruntersuchungen zur Kortexkammer**

Um einen orientierenden Eindruck über die Lichtintensität am Kortex zu erhalten und um zu einer Einschätzung des Ausmaßes der Abschattung des freigelegten Kortexareales durch die aufgesetzte Kortexkammer, bestehend aus Metallkammer, Silikonbefüllung und Abdeckglas, zu gelangen, wurde eine Aufnahmesituation simuliert, in der die Sensorscheibe eines Selenzellen-Luxmeters, abgedeckt durch eine Diffusorfolie aus der Phototechnik als Kortexäquivalent direkt beleuchtet und durch die Aufnahmeeinheit abgebildet wurde. Die Intensität der auf den Kortex einstrahlenden Lichtquelle wurde über die Spannungsquelle sowie Blendenjustage geregelt. Dies wurde sowohl mit aufgesetzter und befüllter Kammer durchgeführt als auch ohne Kammer. Die drei justierbaren Lichtleiter der Beleuchtungseinheit wurden, wie im Versuch, möglichst senkrecht ausgerichtet, um eine Abschattung der Trepanationsöffnung durch die Kammerwände gering zu halten. Die Sensorfläche des Luxmeters wurde durch eine Lochmaske kaschiert, deren Lochdurchmesser der lichten Weite der Kortexkammer entsprach. Die Meßwerte des Luxmeters wurden nach einer Einpendelzeit von zwei Minuten aufgezeichnet und gegen die Pixel- Integerwerte eines nach Augenmaß über die Fläche des Maskenausschnitts gelegter ROI graphisch aufgetragen. Zur exakteren Ablesbarkeit der Luxmeterwerte wurde das Luxmeter signal über ein Multimeter abgelesen. Aufgrund der unterschiedlichen spektralen Empfindlichkeiten des Luxmetersensors einerseits und des CCD-Sensors andererseits kommt diesen Messungen vor allem orientierende Bedeutung zu.

**Resultate:**

Die Bestimmung des Verhältnisses zwischen eingestrahelter Lichtmenge und Pixelintegerwerten in einer ROI zeigte einen linearen Verlauf. Die Steigungen des durch die Einzelmeßpunkte gelegten, gleitenden Durchschnitts variieren nach Wellenlängen und erhöhen sich durch die Kortexkammer um etwa 30%. Bei rotem Licht führte eine Lichtintensität von rund 300 Lux zu Pixel-Integerwerten um 10000 counts. Demnach sind bei rotem Licht ohne aufgesetzte Kammer rund 0,03Lux nötig, um in der ROI einen Countwert zu ergeben. Bei rotem Licht, aufgesetzter, befüllter und verschlossener Kortexkammer führte eine Bestrahlungsstärke von 300 Lux lediglich zu Integerwerten um 7000 counts. Das aufsetzen der Kammer ergab demnach einen Intensitätsverlust am Kortex durch Abschattung und Absorption in der Größenordnung von 30%. Grünes Licht am Kortex ohne Kortexkammer ergab bei 300 Lux rund 8000 counts, gemittelt über die Fläche der ROI, entsprechend einer Empfindlichkeit von 0,0375 Lux/count. Nach Aufsetzen der Kammer führten 300 Lux nur noch zu rund 6000 counts, gemittelt über die Fläche der ROI, entsprechend einem Verlust von 25%.

### **Abb. 23**

#### **5.5. Eine zusammenfassende Betrachtung zum Rauschen der vollständigen Anlage**

Angesichts der kleinen Amplituden der im Rahmen von ORIS- Untersuchungen abgeleiteten Signale wird die Bedeutung der Rauschminimierung bei der Ableitung intrinsischer Signale evident. Aus den theoretischen und allgemeinen Erwägungen der Vorbetrachtungen und den Ergebnissen der Vorarbeiten zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit der Anlage lassen sich verschiedene Aussagen in Bezug auf das Rauschpotential der bestehenden Anlage sowie zur Minimierung der Rauschamplituden verschiedener Komponenten treffen. Zunächst kann differenziert werden zwischen „biologischen Artefakten“, die aufgrund physiologischer Prozesse von Seiten des Versuchstieres in den Meßablauf eingebracht werden und dem großen Komplex anlagebedingter Störsignale, im Weiteren als „versuchstechnische Störungen“ bezeichnet und seiner Komponenten.

##### 5.5.1. Versuchstechnische Störungen

Relevante Störquellen aus technischer Sicht treten sowohl als Fluktuationen in der Stabilität der Lichtquelle auf als auch innerhalb der Komponenten der Aufnahmeeinheit. Zur Anwendung bei optischen Registrierungen intrinsischer Signale ist ein Ripple der Lichtquelle von unter 0,1% [Bonhoeffer T. und Grinvald A. 1996] nötig, da sich das OI-Signal in Größenordnungen von 0,1-4% bewegt. Die LOT-Lichtquelle zeigte in den Vorversuchen ein Ripple im Bereich von 0,01%. Ebenfalls der Lichtquelle zuzurechnen und durch hohe Lichtintensitäten reduzierbar ist das Photonenrauschen. Die Datenaufnahmeeinheit, bestehend aus einem CCD-Sensor und einer Verstärkereinheit, trägt, wie im Kapitel „CCD“ erwähnt, in relevantem Ausmaß zum Anlagenrauschen bei. Dies durch Dunkelströme, die bei gleichbleibender Temperatur relativ konstant und vor allem temperaturabhängig sind, durch Photonenrauschen durch die Quantumnatur des emittierten Lichts, ferner „photo-response non-uniformity“ und Ausleserauschen. Zur Reduzierung der cameratechnischen Rauschquellen erwies sich eine Temperaturkontrolle und –Regulierung als sinnvoll. Zum Erreichen einer in der S/N -ratio günstigeren shotnoise-limitierten Aufnahmesituation wurde mit der Tandemlinse eine relativ lichtstarke Optik zur Anwendung gebracht und mit hohen Lichtintensitäten gearbeitet.

##### 5.5.2. Biologische Artefakte

Wesentliche biologische Störgrößen stellen Relativbewegungen des Kortex im Trepanationsgebiet durch Atmung, Blutfluß und Herzschlag dar. Bewegungen ergaben in Vorversuchen

bereits Schwankungsbreiten um 0,5%. Unter ungünstigen Umständen kann die Bewegung Rauschen in einer Größenordnung des 5-20fachen des Desoxysignals verursachen [Grinvald A. et al., 1988; Kim, DS, Diplomarbeit]. Diese Artefakte können durch eine Kortexkammer verringert werden. Die synchrone Triggerung auf EKG und künstliche Beatmung wird ebenfalls empfohlen [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Blut-Sauerstoffsättigungsänderungen des zerebralen Gefäßbettes, die mit Frequenzen um 0,1Hz über den Kortex laufen [Heß A., 1996; Mayhew J.E. et al., 1996] und dabei nicht die Physiologie der betreffenden Areale, wohl aber die Ableitung optischer Signale beeinträchtigen, sind eine weitere, wichtige biologische Störquelle. Sie kann nicht korrigiert werden.

### 5.5.3. Tabellarische Aufstellung von Rauschquellen und ihrer Korrekturmöglichkeiten:

Tab.3: Gegenüberstellung verschiedener ORIS- Rauschquellen und Störgrößen

Störquelle		Relevanz	Korrektur durch
Biologische Artefakte			
	0,1Hz-slow waves	hoch	nicht möglich
	<b>Herzschlag Atmung</b>	<b>hoch 5-20×Oxymetriesignal</b>	<b>Kortexkammer und Triggerung auf Atmung und Herzschlag</b>
Versuchstechnische Störungen			
Licht-Quelle	<b>Ripple</b>	<b>hoch mit stabilisierter Stromquelle: rund 0,1×Oxymetriesignal</b>	<b>Verwendung einer Lichtquelle mit regulierter Stromquelle</b>
	<b>Photonenrauschen</b>	<b>mittel Abhängig von Leuchtdichte</b>	<b>Korrektur d. Absolutwerte nicht möglich. Photo- nenrauschen ist die „Unsicherheit im System“. Relativer Anteil am Signal kann durch hohe Licht- intensität verringert werden [Grinvald et al. 1988]</b>
Camera- Rau- schen	<b>thermisches Rauschen</b>	<b>hoch Rauschgröße: je Temperatur bis zu 10×Oxymetriesignal</b>	<b>Kühlung und Temperaturkonstanz, durch regulierbare Peltier-Kühlungseinheit. Dunkelbildsubtraktion</b>
	Tranferrauschen (smear)	gering	kurze Frametransfer-Zeit (300ns)
	Auslese-Fehler	gering (< 50e <sup>-3</sup> )	slowscan-readout
	Photoresponse-non uniformity	gering	wird durch Divisions- und Subtraktionsprozesse, im Rahmen der Datenverrechnung eliminiert.
	Wandler-Fehler	gering	
	Verstärker-Fehler	gering	

Nach Grinvald et al. 1988 stellt sich das Gesamtrauschen aus mehreren Rauschquellen als Wurzel der Summe aus den Quadraten der Einzelrauschquellen dar. Daraus folgt, daß bei mehreren die Beseitigung weniger aber großer Rauschquellen sinnvoller ist, als die Beseitigung mehrerer kleiner Rauschquellen. Die in diesem Sinne wichtigsten Rauschquellen, die durch spezifische, geeignete Maßnahmen minimiert wurden, sind in der tabellarischen Aufstellung fett gedruckt.

## 5.6. Die Reizung

Die kortikalen Ableitorte, A1 und das anteriore akustische Feld, wurden durch akustische und elektrische Reizung über spezielle Kopfhörer (s.u), bzw ein Cochlea-Implantat (s.u) aktiviert.

### 5.6.1 Zur Vergleichbarkeit elektrischer und akustischer Reizung des Hörnerven

Es bestehen Unterschiede im Ergebnis zwischen einer Reizung auf elektrischem und einer Reizung auf akustischem Wege. Bei elektrischer Reizung ist eine hohe zeitliche Kohärenz und Synchronizität zu erwarten, vor allem weil keine Wanderzeiten oder lokale Oszillationen an der Stimulusgenese beteiligt sind. In Entsprechung dieser Annahme stellte Hartmann [Hartmann R. et al., 1984] eine stärkere Phasenkopplung der Antworten auf elektrische als auf akustische Reizung fest [vgl. Dinse H.R. et al., 1997]. Die lokalen Feldpotentiale bei akustischer Stimulation sind weniger akzentuiert und in geringerem Maße an den Stimulus gekoppelt. Andererseits ist die akustische Reizung zum Nachweis einer Frequenz-Ortsabbildung aufgrund der komplizierten anatomischen Gegebenheiten an der kleinen felines Cochlea besser geeignet als die elektrische Stimulation, da der Schall hier auf physiologischem Wege verarbeitet und spektral zerlegt wird. Die elektrische Reizung erlaubt den Nachweis spektraler Auflösung nach Maßgabe der intracochleären Positionen der jeweiligen Reizelektroden. Die Versuchstiere P123, P124 und P125 wurden elektrisch gereizt, akustische Reizungen wurden bei P124, P125 und P126 durchgeführt.

### 5.6.2. Die elektrische Reizung

Die elektrische Stimulation erfolgte über ein selbstgebautes Cochlea-Implantat [Behrendt M., 1998] (vgl. Abb. 34f). Die elektrische Stimulation der Cochlea ist mittels mono,- bi- und triphasischer Reizung über Scala-Tympani-Elektroden möglich. Zur Vermeidung von Gasbildung, Korrosionserscheinungen oder Polarisationsphänomenen ist die biphasische Reizung der monophasischen vorzuziehen. Es werden dabei Nervenfasern des Ganglion Spirale durch biphasische Pulse der unterhalb der Lamina spiralis in unmittelbarer Nähe der Nervenfasern gelegenen Elektrode direkt erregt. Das Ausmaß der Cochleotopie elektrischer Reizung ist dabei von Insertionstiefe des Implantats, der intracochleären Potentialverteilung sowie dem Reiztyp abhängig und durch die Ausbreitung des elektrischen Feldes begrenzt. Wird monopolar gegen eine indifferente Pol gereizt, ergibt sich die geringste, bei tripolarer Reizung mit einer mittleren Quell- und zwei lateralen „sink“-Elektroden prinzipiell die höchste cochleotopie Auflösung [Kral A. et al., 1998]. Das gängigste Schema nutzt bipolare Stimulation, die ausreichende Cochleotopie bei niedriger Komplikationsrate bietet und

unkomplizierter durchführbar ist als die tripolare Reizung. Die Insertionstiefe betrug bei den vorliegenden Experimenten zwischen 5 und 7mm, tiefere Insertion ist ohne Beschädigung der feinatomischen Cochleastrukturen bei der Katze schwierig [Hartmann R. et al., 1997] Gereizt wurde bipolar mithilfe biphasischer Pulse von  $300\mu\text{A}$  pp bei  $200\mu\text{s}$  Phasendauer [Hartmann R. et al., 1984]. Verwendet wurde eine Konstantstromquelle der Firma Med El, wie sie auch bei humanen Cochlea-Implantaten zum Einsatz kommt.

### 5.6.3. Die akustische Reizung

Die akustische Reizung erfolgte an dem dem abgeleiteten Kortex gegenüberliegenden Ohr. Zur akustischen Stimulation wurde die Bulla aufgesucht und freigelegt (vgl. „Versuchstiovorbereitung“). Die akustische Reizung erfolgte mittels Bursts aus 3 50ms Tonbursts in 3 sec, je nach Versuchstier in den Frequenzen 1000, 4000, 8000, 12000 und 16000 Hz, die über einen Sinusgenerator der Firma Rockland und ein Gate ausgegeben wurden. Die Stimuli wurden über invers betriebene Kondensatormikrophone der Firma Brüel & Kjaer (Kopenhagen) im geschlossenen akustischen System eines mit dem Mittelohr verbundenen Kopfhörersystems angeboten. Die Intensität der akustischen Reizung wurde über ein Sennheiser Elektretmikrophon überwacht, das bei einem Schalldruckpegel von 125dB SPL und 250Hz eine Spannung von 190mV rms ausgab, gemessen mit Pistophone Typ 4220 der Firma Brüel & Kjaer. Lautstärken sind als Dämpfung in dB gegenüber einem Bezugswert von 105dB SPL = 0dB Attenuation angegeben. Die Hörfähigkeit und die Schwellen bei den jeweiligen Frequenzen wurde im Voraus elektrophysiologisch mittels ABRs nachgewiesen.

## **5.7. Die Steuereinheit**

Die Steuereinheit übernahm in unserem Aufbau die Aufgabe, Reizung, Datenaufnahme, EKG und Atmung zu synchronisieren. Folgender Steuerbedarf war gegeben:

Die Synchronisation von Datenaufnahme mit Herzschlag und Beatmung gilt als nutzbringend für ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis [Grinvald A. et al., 1986; Frostig R. et al., 1990; Grinvald A. und Bonhoeffer T., 1996; Malonek D. et al., 1997]. Daher wurden bei zwei Versuchen EKG- und Atemfrequenzen in das Triggerschema miteinbezogen. Kortexhebungen und Senkungen aufgrund von Atemexkursionen und Herzschlag erreichten in Vorversuchen Amplituden von bis zu  $1500\mu\text{m}$ , entsprechend einer Rauschamplitude von 1,79%. Die Datenaufnahme sollte darüberhinaus nach Maßgabe der Signalentwicklung über die Zeit nach Reizung innerhalb eines bestimmten Zeitfensters erfolgen. Zur Gewährleistung

reproduzierbarer Aufnahmen unter jeweils gleichen Bedingungen wurde zur Wahrung der Steueraufgaben zu Testzwecken zunächst eine größtenteils aus Hardwarekomponenten aufgebaute Einheit konstruiert. Komplexere Steueraufgaben wurden von einem handelsüblichen C-Control Steuermodul (Conrad Electronic, Frankfurt/Main) übernommen.

Die Synchronisation von Atemzyklus und Herzschlag für den Moment der Datenaufnahme wurde durch kurzzeitigen Halt der Beatmungspumpe und Triggern der Aufnahmeeinheit auf den ersten einfallenden Herzschlag gelöst. Die Umsetzung beinhaltete einen magnetsensiblen Reed-Kontakt zur Registrierung der Beatmungszyklen, der nächst dem Schwungrad der Beatmungspumpe lag und durch einen am Schwungrad der Pumpe sitzenden Magneten ausgelöst wurde. Das Signal wurde dem Steuermodul übermittelt. Daraufhin wurde die Beatmungspumpe über ein ansteuerbares Relais in der Stromeinspeisung abgeschaltet und die Auslaufzeit durch Nachrüstung einer elektromechanischen Bremse innerhalb von 0,3sec bis zum Stillstand zusätzlich verringert. Hierdurch wurde sowohl eine größere Reproduzierbarkeit der Atemexkursionsposition bei Datenaufnahme erreicht als auch die Dauer unphysiologischer Beatmung und „Streß“ beim Versuchstier verkürzt. Die Position des Magneten am Schwungrad wurde so gewählt, daß die Pumpe beim Stop in Expirationsstellung verblieb. Über das Steuermodul wurde mit dem Pumpenhalt ein Signal in ein logisches UND-Gatter ausgegeben. Den anderen Eingang des logischen UND stellten die EKG-Impulse des Versuchstieres, die zur deutlicheren Signaldarstellung über einen Komparator geführt wurden, dar. Waren beide Bedingungen erfüllt, so lag am UND- Ausgang ein Signal an, das abgeleitet wurde und der Aufnahmeeinheit als Triggersignal zur Verfügung stand. So war eine Datenaufnahme nur bei Stillstand der Beatmung und in reproduzierbarem Bezug zur Herzaktion möglich. Die Dauer des Pegels des logischen UND der Atempumpe war über das Steuermodul wählbar. Da stets mehrere EKG-Impulse in die Zeit des anliegenden Pumpen-UND fielen, wurden die EKG-Impulse nach dem Komparator durch ein RS-Flip-Flop geleitet, das ebenfalls durch das C-Modul angesteuert werden konnte. Ein RS-Flip-Flop verriegelt sich durch den ersten transportierten Impuls selbst, sodaß pro Durchlauf innerhalb der Zeit des anliegenden Pumpen-UND nur ein EKG- Impuls zum logischen UND zur Verfügung stand. Auf diese Weise ergab sich nur ein Trigger für die Aufnahmeeinheit und es wurde pro Durchlauf zum gegebenen Zeitpunkt nur ein Aufnahmedurchgang gestartet. Aus diesem Aufbau ergab sich eine Prästimulusaufnahme, von der die Poststimulusaufnahmen zur Gewinnung der topographischen Karten in Abzug zu bringen waren. Die Aufnahme einer Stimulussituation verlangte die Einbeziehung eines akustischen Reizes in das Zeitschema. Das Blutflußsignal bietet einen charakteristischen Signalverlauf mit

Maximum nach 2,5 [Nemoto M. et al., 1999] bis 8 Sekunden [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Im Laufe der Entwicklung der Methode wurden verschiedene Versuchsabläufe ausprobiert. Der erste Ablauf sollte eine möglichst große Menge an Einzelexperimenten bei möglichst geringem Speicherbedarf enthalten. In diesem Ablauf wurde pro Versuchsdurchgang nur ein Prästimulusbild aufgenommen, das mit lediglich einem Stimulusbild verrechnet wurde. Das Stimulusbild wurde zum Zeitpunkt des angenommenen Signalmaximums [Nemoto M. et al., 1999] aufgezeichnet. Dies wurde durch einen Impuls- und Frequenzzähler (Conrad Electronic, Frankfurt am Main) gelöst, der bei Erreichen eines Maximalwertes einen TTL-Triggerimpuls ausgab. Das Outputsignal des logischen UND wurde abgegriffen und diesem Zähler zugeleitet. Bei einem Versuchsablauf, der drei Prästimulusbilder und ein Stimulusbild vorsieht, wurde der Zähler auf eine Schwelle von „drei“ eingestellt und gab anlässlich der dritten VerUNDung und damit des dritten Triggersignals an die Aufnahmeeinheit einen Triggerpuls ab. Dieser Puls wurde über einen justierbaren Verzögerer geleitet und zur Triggerung der akustischen Reizung genutzt. Die Potentiometer des Verzögerers wurden dabei so eingestellt, daß zum Zeitpunkt der Datenaufnahme des „Stimulusbildes“ bei bekannter Pumpenumlaufzeit eine akustische Reizung des Versuchstieres 1,5sec. angedauert haben würde. Bei 2100ms Umlaufzeit ergibt sich eine Verzögerungszeit von rund 100ms. Die Pumpengeschwindigkeit mußte den Bedürfnissen der Versuchstiere angepaßt werden. Beim ersten Setup wurden vor allem solche Funktionen an das Steuermodul übertragen, die nicht ohne weiteres mithilfe elektrotechnischer Komponenten gelöst werden konnten. Hierzu zählten das Rücksetzen und Scharfschalten des Zählers, der Transfer zwischen Pumpe und Steuereinheit, d.h. die Registrierung des Reed-Kontaktes, die Übernahme der Steuerfunktion durch die Triggereinheit, die Anpassung der Durchlaufanzahl und Experimentanzahl an den Bedarf, die Überleitung eines VerUNDungssignals der Pumpe an das logische UND, ferner die Einstellung der Anlauf- und Auslauf- Delays der Pumpe, insbesondere vor Einbau der EMF-Bremse, die Einstellung der Pausenzeit. Die Steuereinheit wurde so konzipiert, daß bei einem eventuellen Ausfall der Einheit lediglich die Steuerfunktion wegfiel, die Pumpe aber ansonsten mit voreingestellter Geschwindigkeit weiterlief. Abbildung 24a stellt das erste Setup dar. Zu sehen sind die zwei Eingänge des logischen UND: oben das EKG-Signal, eingeleitet über Komparator und RS-FlipFlop, unten der Output der Pumpe, gesteuert, registriert und eingeleitet über ein C-Control Modul. Der Ausgang des logischen UND steuert die akustische Reizung und zugleich die Datenaufnahme.

Um die Bedienungsfreundlichkeit und Flexibilität des Systems zur raschen Modifikation innerhalb verschiedener Versuchsansätze zu verbessern, wurde der Aufbau vereinfacht, indem verschiedene Funktionen, die im ersten Setup über Hardwarekomponenten gelöst worden waren, in die Programmsteuerung des Steuermoduls übertragen wurden. Der Zähler wurde in das Steuerprogramm integriert. Auf diese Weise wurde die Anpassung der Durchlaufanzahl und damit des Verhältnisses von Prästimulus- zu Stimulusaufnahmenanzahl an variable experimentelle Anforderungen erleichtert. Die praktische Anwendung des modifizierten Systemes ergab eine problemlose und einfache Handhabung. Anders als zuvor waren nun verschiedene Einstellungen möglich und damit die Anpassung des Setups an verschiedene Triggerschemata. Die Regelung der akustischen Reizung konnte über das Steuermodul ebenfalls flexibler und bedienungsfreundlicher gelöst werden. Die Auswahl der Stimulusdauer war über das Steuerprogramm in Vielfachen von 20ms exakter, flexibler und unkomplizierter zu justieren als dies über das Verzögerungsmodul möglich gewesen war, dessen Potentiometerjustierung vergleichsweise aufwendiges oszilloskopisches Monitoring erfordert hatte.

Der zweite Versuchsaufbau sollte eine Verlaufsbeobachtung des Signalgangs ermöglichen. Um den gesamten Signalverlauf von Prästimulus über Stimulus-Onset bis zum vermuteten Signalende zu erhalten, sodaß eine kritische Betrachtung und Auswertung des Signalverhaltens über die Zeit sowie Mittelungs- und Korrekturrechnungen in den aufgezeichneten Datensätzen möglich wurden, war für die weiteren Versuche eine Modifikation des Aufnahmemodus nötig. Statt drei Prästimulus-Referenzaufnahmen und einer Stimulus-Aufnahme wurde nun über einen Zeitraum von 6,4 Sekunden ein fortlaufender Datensatz im Modus „re-start“ aufgezeichnet. Dieser Betriebsmodus dient der Bildaufzeichnung mit erhöhter Framerate. Während der Datensatz eines Frames im Auslesebereich des Chips digitalisiert wird („read-out“), kann der Aufnahmebereich des Chips bereits wieder Licht integrieren. In dieser Betriebsart verhält sich der Frametransfer wie ein Cameraverschluß. Die Belichtungszeit eines Frames entspricht der readout-Zeit des vorherigen Frames. In unserem Fall ergab sich eine Belichtungszeit von 65 ms/Subframe für 245 Zeilen. Im restart-Modus entsteht eine Reihe von Einzelbildern („subframes“), die in einem „Summenframe“ zusammengefaßt sind, wie die Bilder auf einem Filmstreifen. Signalverläufe werden auf diese Weise besser beurteilbar.

Bei den ersten beiden Versuchen wurde mittels einer Schmitt-Triggereinheit auf Atmung und Herzschlag des Versuchstieres getriggert. Der erste Versuch lieferte lediglich vier Einzelbilder, während beim zweiten Versuch bereits der Restart- Modus verwendet wurde. Hier erfolgte die Unterbrechung der Beatmung für sieben Sekunden und der Einsatz des

Schmitt-Triggers nur noch, um zu einem definierten Zeitpunkt zu Anfang der Datenaufzeichnung ein reproduzierbares Verhältnis zwischen Herzschlag und Atemexkursion zu erhalten. Für das dritte und vierte Experiment wurde auf eine EKG- und Atemtriggerung verzichtet. Die Atempumpe befand sich im „free run“-Modus und wurde nicht mehr angesteuert., weil

- die Triggerung (vgl. Resultate) keinen klaren Vorteil für Signalqualität ergeben hatte
- die Versuchstiere durch die regelmäßigen Unterbrechungen des Atemzyklus trotz Intervallen von 2-5 Minuten unruhig wurden und nicht auf einem stabilen Narkoseniveau gehalten werden konnten
- deutlich geworden war, daß die Pulsbewegungen der Kortexgefäße, die ja durch den Umgebungsdruck weitgehend unbeeinflusst blieben, durch Triggerung nicht in größerem Maße eliminierbar waren, als durch die ohnehin folgende Verrechnung, dies weil die Herzfrequenz am Tier nicht über alle Versuchsdurchgänge stabil blieb und im Rahmen der Datenverarbeitung ein Aufsummieren über acht Subframes stattfand
- die wiederkehrende Unterbrechung der Beatmung für das Tier ein permanent wiederkehrender Stressor war, der die häufig langwierige Einstellung des Tieres auf eine suffiziente Beatmung durch Frequenz und Hub zusätzlich erschwerte.
- Anlaß zur Vermutung bestand, daß die wiederholte Desynchronisation des Atemzyklus der Katze mit der festen Beatmungsfrequenz der Atempumpe nicht nur einen starken Weckreiz für das Tier darstellte, was vor allem für Ableitungen in der frühen Morgenstunden, in denen sich die Tiere physiologisch auf einem oberflächlichen Schlafniveau befinden, problematisch wurde und hohe Narkotikagaben erforderte, sondern auch zu erheblichem Gegenatmen führte, was durch Veränderung der intrathorakalen Druckverhältnisse zu deutlicheren Bewegungsartefakten auf der Kortexoberfläche führte, als dies bei normalen Atemexkursionen der Fall gewesen war.

Die Experimente 3 (P125) und 4 (P126) wurden bei frei durchlaufender Atempumpe durchgeführt. Es wurde weder auf EKG noch auf die Beatmungspumpe getriggert. Die Messung wurde manuell über das CControl-Modul gestartet. Das Modul übernahm die Aufgabe, den Versuchsablauf eines Durchgangs durch Triggerung des Camera-Controllers zu starten sowie den Tonstimulus an den Katzenkopfhörer zu schicken. Die Steuerung der Camera, Datenaufzeichnung und Abspeicherung sowie eine erste orientierende Rohverrechnung der aufgezeichneten Daten nach Beendigung eines Durchgangs erfolgte durch eine selbst entwickelte Software innerhalb der Steuersoftwareumgebung „DaVis“ der Firma LaVision, Göttingen. Nach einem Delay von 3sec. lag am „Weiche“-TTL-Ausgang des Moduls ein

TTL-Puls an, der als externer Trigger dem Davis-Steuermodul eingespeist wurde und die restart-Datenaufnahme startete (vgl. Abb. 26). Nach einem Delay von 8sec. lagen am „Rocklandgate“-Ausgang des Ccontrol-Moduls für 3sec. 5Volt an. Dieser Impuls steuerte ein Hardwaregate, über das der Frequenzgenerator und damit der Sinuston-Stimulus zugeschaltet wurde. Nach 3sec. endete der Stimulus. Die Datenaufzeichnung durch das Davis-Steuermodul endete, wenn es nach einer Aufzeichnungsdauer von 22,75sec. zu einem Handshake zwischen dem CControl-Modul und dem Davis-Steuermodul kam. Nach einer Pause von 10sec. fand ein erneuter Aufnahmedurchgang ohne Tonstimulus statt. Die ersten Aufzeichnungen fanden rund 20h nach Narkoseeinleitung statt. Es wurden zur Darstellung von CF-Bändern (CF= Charakteristische Frequenz) Sinustonstrimuli bei 4kHz, 8kHz und 16kHz (P126) sowie 1,4 und 16kHz (P125) angeboten. P123,124 und 125 wurde elektrisch und akustisch gereizt.

### **5.8. Datenverarbeitung**

Es wurden pro Reizfrequenz drei Ausführungen zu je 12 Durchgängen erstellt. Die zwölf Durchgänge teilten sich in alternierend aufgezeichnete 6 Stimulus- und 6 Nonstimulusdurchgänge auf. Hierdurch wurden Vergleiche zwischen Stimulus- und Nonstimulusdurchgängen einerseits sowie zwischen den verschiedenen Ausführungen andererseits möglich (vgl. Abb. 26). Die Datenaufnahme und -Verrechnung erfolgte unter Windows 98 auf einem 400MHz-Pentium-Computer mit einer Festplattenkapazität von 40 GB und einem Arbeitsspeicher von 512 MB. Pro Stimulusfrequenz wurden in drei Ausführungen zu je 12 Durchgängen insgesamt 36 Summenframes auf ein externes Triggersignal hin aufgezeichnet. Ein Summenframe mit 350 Einzelbildern zu je 383x245 Pixel benötigte 50MB an Speicherplatz. Pro Versuch wurden rund 5,5GB an Speicherplatz allein für die Rohdaten benötigt, nochmals rund 2GB für die Ergebnisse der online-Verrechnungen sowie ein Puffer von 2,5GB für Wiederholungsmessungen. Das Minimum an Speicherbedarf lag demnach bei rund 10GB für einen Versuchsaufbau, der lediglich drei verschiedene Stimuli beinhaltete. Die Daten wurden im DaVis- internen IMX- Format auf einer für die Datenakquisition vorgesehenen Festplatte abgelegt und nach Fertigstellung einer Ausführung online grob ausgewertet. Nach der ersten Auswertung wurden die Datensätze auf einem externen Datenaufnahmerechner abgelegt. Die detaillierte Auswertung erfolgte erst nach Versuchsende. Aus den 350 Subframes wurde eine Periode aus 160 Subframes extrahiert und verrechnet. Diese Periode enthielt acht Prästimulus-Subframes und 152 „Verlaufs-Subframes“, in deren Abfolge der Signalverlauf sich abzeichnen sollte. Zur Darstellung stimulusassoziierter Phänomene im Reflexionsverhalten des Kortex wurden

zunächst sämtliche Stimulusdurchgänge einer Ausführung (=6 Durchgänge) untereinander gemittelt. Innerhalb des Mittelungsergebnisses fand nun eine Aufsummierung einer bestimmten Zahl von Subframes statt, die nach Maßgabe der Herzfrequenz gewählt wurde. Bei Tier P126 fand eine Zusammenfassung von je 8 Subframes statt, sodaß sich die Gesamtzahl der Subframes des resultierenden Summenframes von 160 auf 20 zu je 520ms Integrationszeit reduzierte. Die Signalberechnung fand auf dem Wege einer gewichteten Differenzbildrechnung statt (vgl. Abb. 26). Stimulusframes wurden vom Prästimulusmittel subtrahiert, dann wurde die Differenz durch das Prästimulusmittel geteilt. Weil eine verstärkte Durchblutung von Kortexarealen zu einer vermehrten Absorption grünen Lichts führt, errechnet sich das Signal als Differenz zwischen einer helleren Prästimulusaufnahme und der dunkleren Signal-Aufnahme. Hieraus sollte sich ein Summenframe mit von Subframe zu Subframe ansteigender Intensität ergeben. Die Berechnung ist nötig, weil mit dem bloßen Auge bei einem Offset von bis zu 16000counts keine Modulation der erwarteten Amplitude von 0,5 bis 1,5% auflösbar ist. Die Darstellung der Datensätze auf dem Bildschirm ist von der gewählten Auflösung und der verwendeten Falschfarbcodierung abhängig. Für die Darstellung der Rohdaten-Summenframes mit Dynamiken von 0-16000 wurde daher eine Auflösung von 16k, entsprechend einer Farbstufenänderung alle 256 counts gewählt, hierfür stand eine Programmoption der Steuersoftware zur Verfügung. Für die Darstellung der Differenzbilder, deren Maxima lediglich 0,1-4% der Rohdatenframes ausmachten, wurde eine Auflösung von 512 (jeder 2.count eine neue Farbstufe), 1k (jeder 4. count eine neue Stufe) oder 2k (jeder 8.count eine neue Stufe) gewählt (vgl. Abb. 25). Die Farbverteilung war aus einem Satz bestehender Falschfarbcodierungen (CLUT, "color-lookup-tables") wählbar. Zur Bildschirmdarstellung wurde CLUT 14, gewählt, die eine hohe Farbstufenauflösung bei niedrigen Countwerten und eine geringe Auflösung bei hohen Countwerten bot. Hierdurch konnten die kleineren Dynamiken der Differenzbilder gut aufgelöst, sowie die großen Amplituden der unverrechneten Originalsummenframes in ausreichender Differenzierung dargestellt werden. Das Resultat wurde auf dem Bildschirm angezeigt.

### **Abb. 25:**

Die endgültige Verrechnung nach Versuchsende beinhaltete noch die Kontrolle der Summenframes zur Erkennung von Fehlbelichtungen einzelner Subframes mittels einer selbstgeschriebenen Software. Die Korrektur erfolgte durch Mittelwertbildung des jeweils vorhergehenden und nachfolgenden Subframes. Abb. 26 verdeutlicht die Rechenschritte.

### **Abb. 26, Abb.27**

### **5.9. Elektrophysiologische Kontrolle**

Die optischen Versuche wurden durch elektrophysiologische Bestimmungen der Hörschwelle mittels ABR eingeleitet. Die Schwellen für das Versuchstier P126 lagen beispielsweise für 4000Hz, 8000Hz und 16000Hz bei 50dB, 45dB und 50dB Attenuation. Die Reizintensitäten wurden den Schwellen angepaßt. Darüberhinaus wurde von P126 eine Karte lokaler Feldpotentiale (LFP) der optisch abgeleiteten Frequenzbereiche über den freiliegenden Kortex angefertigt. Diese Karte konnte mit den optischen Karten verglichen werden [vgl. Hartmann R., 1987, Kral A., 2001].

## Kapitel 6. Versuchstiere, Tierbehandlung und -Vorbereitung

### 6.1. Das Versuchstier

Die Versuche wurden an Katzen verschiedener Altersgruppen durchgeführt. Sämtliche Katzen waren hörend. Tiere, die zunächst akustisch und erst dann elektrisch stimuliert wurden, wurden als erstes akustisch gereizt, dann durch Neomycininjektion in die Cochlea ertaubt und elektrisch stimuliert. Es wurden sowohl normalhörende Katzen verwendet (P123, P125) als auch *hörende, weiße* Katzen aus eigener Zucht (P124, P126). Dieser Katzentypus gilt als Modell für Untersuchungen zu prälingualer Taubheit [Heid S. et al. 1997, 1998]. Aufgrund eines genetischen Defekts degenerieren die Cochleae der Tiere innerhalb kurzer Zeit postnatal, sodaß eine der menschlichen prälingualen Taubheit ähnliche Situation fehlenden Inputs bei morphologisch vorhandener, aber nicht genutzter neuraler Zuleitung an AI besteht. Bei einigen Tieren der Zuchtreihe war diese Degeneration nicht (P126) oder nur geringgradig (P124) ausgeprägt, sodaß P126 akustisch gereizt werden konnte, während bei P124 die Daten aus elektrischer Reizung verwertet wurden. Zwei Vorversuche zur Testung und Justage der Messeinheit fanden an Ratten unter Äthernarkose statt. Die Messungen wurden im Rahmen behördlich genehmigter Tierversuche zu Cochlea- Implantaten durchgeführt.

#### 6.1.1. Das Narkoseschema

Der Wahl einer geeigneten Narkose kommt bei OI-Ableitungen große Bedeutung zu. Ideal wäre ein Narkoseschema, das am operativ freigelegten Kortexareal Ableitungen unter Wachbedingungen erlaubt. Augenblicklich ist ein solches Narkoseschema für akute ORIS-Versuche nicht bekannt. Es gilt vielmehr als gesichert, daß sowohl die Ergebnisse elektrophysiologischer Ableitungen als auch die mittels ORIS gewonnenen Karten mehr oder weniger stark von der anliegenden Narkose beeinflusst werden. Die Auswirkungen sind schwer quantifizierbar: einerseits unterscheiden sich die in Frage kommenden Substanzen in Wirkungsweise und Ausmaß der Beeinflussung von OI- und elektrophysiologischen Ableitungen, andererseits bestehen Interspeziesunterschiede dieser Wechselwirkungen, sodaß man von an einer Spezies erhobenen Daten nicht ohne weiteres auf eine andere Spezies schließen kann. Im Rahmen elektrophysiologischer und optischer Ableitungen werden gängigerweise verschiedene Schemata angewandt. Sowohl das volatile Narkotikum Isofluran als auch Barbituratnarkosen finden häufig Anwendung bei elektrophysiologischen und optischen Ableitungen. Isofluran ist ein geometrisches Isomer des Enfluran, mit allerdings

deutlich geringerer Löslichkeit im Blut und daher raschen An- und Abfluteigenschaften. Es wird häufig zusammen mit Distickstoffoxyd (Stickoxydul) und Sauerstoff gegeben. Als Wirkmechanismus werden inhibitorische postsynaptische Potentiale, „IPSPs“, aufgrund erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit GABA-aktivierter Cl-Kanäle [Krnjevic K., 1992] durch Verminderung der Dissoziationskonstante von GABA [Hapfelmeier G. et al., 2001 a/b], eine verminderte Ausschüttung von Glutamat [Larsen M. et al., 1994, 1998], sowie Einflußnahme auf K<sup>+</sup>-Kanäle [Yost C.S. et al., 2000] diskutiert. Die Narkosetiefe ist aufgrund des unmittelbaren Feedbacks über EKG, EEG, endexpiratorischer CO<sub>2</sub> und Narkosegaskonzentration rasch und zuverlässig steuerbar [Kral A. et al., 1999]. Barbiturate erhöhen über eine allosterische Bindungsstelle des GABA-A-Rezeptors die Öffnungswahrscheinlichkeit hyperpolarisierender Cl-Kanäle. So werden erregende synaptische Übertragungen vermindert. Die Gabe erfolgt i.v., für anhaltende Narkose über die Dauer des Versuchsablaufs mittels Perfusor.

Dinse 1997 leitete am AI der Katze optisch unter Barbituratanästhesie ab, Horikawa 2001 an AI und AII beim Meerschweinchen, Bakin 1996 an Meerschweinchen und Ratten. Im Rahmen elektrophysiologischer Untersuchungen ist die Barbituratnarkose ebenfalls gebräuchlich [am AI der Katze: Hartmann et al., 1984/ 1997; Schreiner et al., 1992; Zhang J. et al., 2004 am A1 der Katze]. Wirkstärke und -Dauer der Barbituratnarkose hängen aufgrund der Speicherung des Stoffes in Fett- und Muskelgeweben in höherem Maße als die Isofluranarkose von den individuellen Stoffwechseleigenschaften des Versuchstiers ab. Die Narkosetiefe kann darüberhinaus bei Eliminationshalbwertszeiten von 15-48h [Piatt J.H. und Schiff S.J., 1984] nicht mit der Flexibilität reguliert werden, die bei volatilen Narkotika üblich ist. Ketamin, ein Blocker des ligandenaktivierten NMDA-Kanals, der eine generelle Analgesie und minutenlange Bewußtlosigkeit bewirkt, ist vor allem zur Induktion, aber auch zur Aufrechterhaltung der Narkose in Gebrauch. Harrison [Harrison R.V. et al., 1998,2000] führte OI-Ableitungen am AI des Chinchilla unter Ketavet-Anästhesie durch, ebenso Spitzer [Spitzer M. et al., 2000] am AI der Katze. Sowohl Ketamin als auch volatile und Barbituratnarkosen werden seit langem in der Erforschung der primären auditorischen Kortizes verschiedener Spezies eingesetzt. Der Einfluß der Narkose auf die Funktion zentraler Neurone wird jedoch kontrovers diskutiert. Es bestehen Hinweise auf Unterschiede im Antwortverhalten des anästhesierten gegenüber dem nichtanästhesierten Kortex [Kuwada S. et al., 1989 ; Wang A.K. et al., 1999, Cheung S.W. et al., 2001]. Da die Signalentstehung bei ORIS in erster Linie auf Blutflußunterschieden und Lichtbrechungseffekten infolge von neuronaler Aktivität basiert, gilt es, die Wahl des Narkotikums an möglichst geringer

Beeinträchtigung des einen wie des anderen Parameters auszurichten. Für ORIS- Ableitungen ist besonders interessant, daß die Narkose die Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und lokalem zerebralen Blutfluß beeinträchtigt: unter Barbiturat-Anästhesie scheinen im Wachzustand gegebene, regionale, kapilläre Durchblutungsvariabilitäten weitgehend ausgeglichen zu werden [Buchweitz E. und Weiss H.R., 1986], sodaß eine direkte Einflußnahme der Anästhesie auf das OI- Bild denkbar scheint. Laut Cheung [Cheung S.W. et al., 2001] bieten Barbiturate gegenüber Isofluran verschiedene Vorteile: Die Repräsentation der charakteristischen Frequenzen in AI sowie die exzitatorischen Bandbreiten blieben sowohl bei Isofluran als auch Barbituraten gleich, die Antwort-Schwellenwerte von AI hingegen zeigten unter Isofluran signifikant höhere Werte als unter Barbituratanästhesie. Gleiches gilt für die Latenzen. Die Antworten auf Klickfolgen seien unter Isofluran reduziert. Insgesamt biete die Barbituratanästhesie niedrigere Schwellenwerte, geringere Latenzen und höhere Antwortempfindlichkeit. Es bleibt allerdings fraglich, inwieweit die Antworteigenschaften des Kortex unter Barbituratnarkose dem physiologischen Zustand nahekommen. Außerdem wird das Monitoring der Narkosetiefe von Cheung nicht beschrieben. Laut Bonhoeffer und Grinvald [1996] sind optische Ableitungen sowohl unter volatilen Narkotika wie Halothan und Isofluran als auch unter Barbituratanästhesie durchführbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Narkosen mit Ketavet eingeleitet und mit einem Isofluran/Stickoxydul-Gemisch volatil aufrechterhalten (Katzen P123, P124 und P125). Dies, um die Narkosetiefe unmittelbar und sensibel auf ein Niveau justieren zu können, das vergleichsweise „normale“ Antworteigenschaften des auditorischen Kortex auf akustische und elektrische Reizung ergab. Außerdem war die Isofluran-Narkose geeignet, um Vergleichbarkeit mit elektrophysiologischen Ableitungen unserer Arbeitsgruppe zu gewährleisten. Das letzte Tier erhielt ausschließlich eine Ketamin-Anästhesie (Katze P126).

### 6.1.2. Die operative Versuchstiervorbereitung

Vor Versuchsdurchführung wurden die Hörschwellen der Reizfrequenzen bestimmt. Zur akustischen Stimulation wurde die Bulla, das feline Äquivalent des menschlichen Tympanum, aufgesucht und freigelegt. Die Stimuli wurden über ein geschlossenes akustisches System mit angepaßten Kopfhörern zugeführt. Zur elektrischen Reizung wurde das Innenohr über Zugang durch die Bulla dargestellt. Es wurde die Fenestra cochleae aufgesucht und inzidiert. Daraufhin wurde vorsichtig ein Cochleaimplantat in die Scala Tympani eingeführt. Die Tiere wurden mit Atropin prämediziert, um Speichelfluß sowie Schleimbildung gering zu halten und initial mit Ketamin und Xylazin narkotisiert, tracheotomiert und intubiert. Zur Aufrechterhaltung einer chirurgischen Narkosetiefe wurde nach initialer Ketavet-Narkose

Isofluran gegeben. Herzschlag, endexpiratorisches CO<sub>2</sub>, EKG und Temperatur wurden überwacht; die Körpertemperatur über eine Heizdecke bei etwa 38°C ± 0,5°C stabilisiert. Für die Trepanation des primären auditorischen Kortex wurde das Tier in einem Stereotaxie-Rahmen fixiert. Die Galea aponeurotica wurde teilweise entfernt, der Musculus temporalis mobilisiert. Anhand der cartesianischen Horsley-Clarke Koordinaten wurde nach Reinoso-Suarez der auditorische Kortex unterhalb des Os temporale aufgefunden, auf dem Schädelknochen markiert und die Schädelkalotte mithilfe einer Knochenfräse über AI über auf einer Fläche von rund 11×11mm eröffnet. Die Dura wurde zunächst belassen. Mit Dentalkunststoff (Paladur) wurde die Kortexkammer über der Öffnung fixiert. Diploeblytungen wurden mithilfe von Knochenwachs gestillt. Als nächstes wurde die Dura vorsichtig entfernt, um Blutungen der feinen Duragefäße zu vermeiden und die Kortexkammer durch eine stempellose Spritze mit weitlumigem Ausgang mit Silikonöl befüllt. Die Kammer wurde durch eine transparente Platte aus optischem Kunststoff abgedeckt und fixiert (vgl. Kap. 5.4.). Das Tier wurde daraufhin seitwärts geneigt, um die Kammer zu entlüften. Nach Verschließen der Nadelventile war die Kammer dicht abgeschlossen und Ableitungen konnten durchgeführt werden. Optische und elektrophysiologische Ableitungen erfolgten am der Reizung gegenüberliegenden auditorischen Kortex. Nachdem das Tier vorbereitet war, konnte der CCD-Sensor mit Tandemlinse über einen computerge- steuerten X-Y-Z Micromanipulator (LOT Oriol, Darmstadt), der gesteuerte Steps in 1µm- Größenordnung erlaubte, über der Kammer am Stereotaxie-Rahmen angebracht werden. Die Lichtleiterbündel der Beleuchtungseinheit wurden über ein Rahmengestell zirkulär um die Objektivöffnung herum angeordnet und konnten an Kugelgelenken räumlich ausgerichtet werden, sodaß zugleich ein Optimum an Justierbarkeit erreicht wurde und sich durch die starre Verbindung mit der Aufnahmeoptik eine Nachjustierung der Beleuchtung bei Nach- führen der Optik erübrigte. Nach Abschluß der optischen Ableitungen wurde bei P126 die Abdeckung der Kammer entfernt, sodaß durch die Öffnung Elektroden eingeführt werden konnten. Das Bildfeld der optischen Ableitung beinhaltete am cranialen Rand den suprasylvi- schen Sulcus und zeigte rostral-lateral obere Anteile des anterioren ectosylvischen Sulcus, caudal-lateral die oberen Anteile des posterioren ectosylvischen Sulcus. Dargestellt wurden demnach der primäre auditorische Kortex, AI, und das anteriore auditorische Feld, AAF

### 6.1.3. Die kortikale Repräsentation auditorischer Verarbeitung

Im auditorischen Kortex der Katze sind vier cochleotop organisierte Felder bekannt: der primäre auditorische Kortex (A1), das anteriore auditorische Feld (AAF), das posteriore

auditorische Feld und das ventroposteriore auditorische Feld (VPAF) [Schreiner C.E. und Cynader M.S., 1984] (vgl. Abb. 28). Vergleichbare Latenzen und Amplituden in der Elektrophysiologie [Merzenich M.M. et al., 1974; Phillips D.P. und Irvine D.R., 1982] sowie histologische Studien [Rouiller E.M. et al., 1991] legen nahe, daß A1 und AAF die ersten kortikalen Areale sind, die auditorische Information verarbeiten [Imaizumi K. et al., 2004]. Der primäre auditorische Kortex (A1) der Katze beinhaltet eine komplette und geordnete Repräsentation des hörbaren Frequenzspektrums [Merzenich et al., 1973, 1975; Reale R.A. und Imig T.J., 1980]. Die charakteristische Frequenz, bei der ein gegebenes Neuron am empfindlichsten ist, ist abhängig von der Ableittiefe [Popelár J. und Hartmann R., 1995]. Abweichende Resultate beschreiben Reale et al. [Reale R.A. et al., 1983]. Die Chochleotopie stellt sich dar als rostro-caudal verlaufende Achse mit einer rostral gelegenen Repräsentation hoher Frequenzen und caudal gelegenen Repräsentation der niedrigen Frequenzen. Die charakteristischen Frequenzen (CF) sind als Funktion der Strecke darstellbar mit einer Auflösung von etwa 1mm/Oktave [Hartmann R, et al 1997b; Harrison R.V. et al., 1991; Merzenich M.M. und Reid M.D., 1974; Merzenich M.M. et al., 1975; Rajan R. et al., 1991] (vgl. Abb.28). Nach rostral schließt sich unmittelbar der Hochfrequenzanteil des AAF an [Imaizumi K. et al., 2004; Schreiner C.E. et al., 2000]. Das AAF verfügt ebenfalls über eine geordnete Frequenzrepräsentation, diese ist jedoch diametral zu der des A1 angeordnet. Die Hochfrequenzbereiche des AAF überlappen zum Teil mit denen des A1, während die niederfrequenten Anteile weiter rostral gelegen sind (vgl. Abb 28).

### **Abb.28**

#### 6.1.3 Versuchstiere und Schemata

Es wurden Versuche an vier Katzen und zwei Ratten durchgeführt. Ziel war, durch akustische und/oder elektrische Reizung eine Tonotopie über dem auditorischen Kortex der Tiere darzustellen. Es sollten Anlagensteuerung und Triggerung, Schärfejustage, Verrechnungsalgorithmen und die Möglichkeit der Datenauswertung während des Versuchsablaufs unter realen Bedingungen geprüft und Komplikationsquellen frühzeitig erkannt werden.

*Katze P123:* Die ersten OI- Aufzeichnungen fanden als Zusatzuntersuchung im Rahmen eines bestehenden, elektrophysiologischen Versuchsaufbaus statt. Sie wurden im Einzelbildmodus durchgeführt. Der Beginn der Ableitungen war 32 Stunden nach Narkoseeinleitung. Narkose wurde eingeleitet durch Ketavet/Combelen und aufrechterhalten durch Isofluran/ Stickoxydul. Mittels evozierter Potentiale wurden die Reizschwellen bestimmt. Es wurden nach elektri-

scher Reizung über Cochlea-Implantat lediglich vier Einzelbilder in der Prästimulussituation und in der Stimulussituation angefertigt und nach Mittelung miteinander verrechnet. Die Datenaufnahme erfolgte mittels Triggereinheit, die drei Sekunden vor Stimulusbeginn die Atempumpe stoppte und jeweils bei Einfallen von EKG- Impulsen eine Datenaufnahme triggerte.

*Katze P124:* Der zweite Katzenversuch fand bei elektrische Stimulation nach Ertaubung im Rahmen bestehender Versuche statt. Narkoseeinleitung wurde mit Ketavet/Combelen durchgeführt, die Narkosetiefe mit Isofluran und N<sub>2</sub>O aufrechterhalten. Mittels evozierter Potentiale wurden Reizschwellen bestimmt. Die Cochlea wurde elektrisch über ein Cochlea-Implantat gereizt. Die elektrische Reizung war 12dB überschwellig. Die Reizung fand in Form biphasischer Pulse mit einer Phasenlänge von 200µs und einer Wiederholungsrate von 50/sec statt. Das Interstimulusintervall betrug 60sec. ORIS wurde 20,5h nach Narkoseeinleitung begonnen. Die OI-Ableitungen wurden im Restartmodus durchgeführt, der Aufnahmestart mithilfe des Schmitt-Triggers auf den ersten nach Halt der Atempumpe fallenden EKG-Impuls gelegt. Die Pumpe wurde für 7sec. gestoppt, um eine von Hubartefakten freie Aufnahme zu erhalten.

*Katze P125:* Narkoseeinleitung mit Ketavet und Combelen, Aufrecherhaltung durch Isofluran/Stickoxydul. Beim dritten Versuch wurde im Rahmen laufender elektrophysiologischer Untersuchungen zunächst akustisch über ein geschlossenes akustisches System gereizt. Dann, nach Ertaubung, elektrisch über ein Cochlea-Implantat. Die elektrische Reizung erfolgte wie oben. Die akustische Reizung erfolgte über 2sec.Tonpip-bursts in den Frequenzen 1, 4 und 16kHz statt. ORIS fand 12 Stunden nach Narkoseeinleitung statt. Die Narkose wurde durch Ketavet und Combelen eingeleitet und durch Isofluran und N<sub>2</sub>O aufrechterhalten. Mittels ABR wurden die Reizschwellen bestimmt. Die Datenaufzeichnung wurde im Restartmodus vorgenommen. Auf eine Triggerung nach Maßgabe von Atmung und EKG wurde verzichtet.

*Katze P126:* Narkose nur durch Ketavet. Im vierten Versuch wurde nur akustisch gereizt. Der Reiz bestand in Tonpips von 50ms Länge für eine Dauer von 3sec. in den Frequenzen 4, 8 und 16kHz und wurde über ein geschlossenes akustisches System direkt in die Bulla übertragen. Mittels evozierter Potentiale wurden Reizschwellen bestimmt. Die Daten wurden im Restartmodus aufgezeichnet, auf Schmitt-Triggerung wurde verzichtet. Das Interstimulusintervall betrug 40sec. Beginn von OI war 18 Stunden nach Narkoseeinleitung. Nach Beendigung von ORIS wurden elektrophysiologische Oberflächenableitungen durchgeführt. Die Narkose wurde Durch Ketavet eingeleitet und durch kontinuierliche Infusion aufrechterhalten.

## Kapitel 7. Resultate

Die Vorarbeiten zu den Anlagekomponenten lieferten folgende Resultate:

Die Schwankungsbreite der Beleuchtungseinheit, gemessen als Reflexion einer Diffusorfolie, betrug 0,01% (Kap. 3.1.); die Schwankungsbreite des aufzeichnenden Systems aus CCD-Camera, AD-Wandler und Verstärker bei grünem Licht lag bei etwa 0,08% (Kap.5.1.6.1); Die Intensitätsmodulationsuntersuchungen ergaben ein maximales Auflösungsvermögen der Einheit in der Größenordnung von 0,03%. Diese Schwankungsbreiten liegen hinreichend deutlich unter den von den meisten Autoren angegebenen ORIS-Amplituden (vgl. Kap. 4).

Im Rahmen des ersten OI Versuchs an der Katze P123 wurden lediglich vor Einsetzen des Tonstimulus sowie zur Zeit des erwarteten Signalmaximums Einzelbilder aufgezeichnet, die dann nach Mittelung verrechnet wurden. Bei den folgenden Versuchen an den Katzen P124-P126 wurden „restart“-Serien aufgezeichnet, die sowohl Prästimulusbilder beinhalteten als auch die Signalentwicklung ab Stimulusbeginn über einen Zeitraum von 6,4 (P124, P125) und 10,4 (P126) sec. aufzeichneten. Die Datenverarbeitung erfolgte nach dem im Kapitel „Methode“ geschilderten Schema. Es wurden spontane und stimulusassoziierte Signale im Bereich des primären auditorischen Kortex der Isofluran/N<sub>2</sub>O und Ketamin- anästhesierten Katze sowie der Ketamin- anästhesierten Ratte aufgezeichnet. Bei elektrischer Reizung fand sich bei einem Versuchstier (P124) nach Mittelung über dreißig Durchgänge eine Verteilung der Absorptionsmuster, die die bekannte Cochleotopie des auditorischen Kortex der Katze widerspiegelt. Die erreichten Absorptionsmaxima lagen bei etwa 0,5% (Mittelung über eine gegebene ROI) (vgl. Abb. 34) mit einer Latenz bis zum Signalmaximum von 5,5sec. nach 12dB überschwelliger elektrischer Reizung des Hörnerven. Das Muster trat erst nach Korrektur falsch belichteter Subframes aus dem Summenframe zutage.

Bei den Katzen P123 und P125 konnten durch Elektrostimulation keine stimulusassoziierten Absorptionszuwächse dargestellt werden.

Bei P125 findet nach 30 Mittelungsschritten zwar einen caudo-rostralen shift der optischen Maxima bei Stimulation von 1 auf 4kHz statt, was der bekannten kortikalen Frequenz-Repräsentationsverteilung entspricht (vgl. Abb.35), doch läßt die darauffolgende Reizung mit 16 kHz keinen weiteren shift nach rostral erkennen. Das kortikale Gebiet maximaler optischer Aktivität ist bereits in Subframe 5 erkennbar und liegt gegenüber dem Ort der 4kHz-Repräsentation caudomedial versetzt. Dies widerspricht der bekannten kortikalen Cochleotopie.

Es fand sich nach Mittelung über 18 (P126) bzw. 30 (P124 und P125) Durchgänge gleicher Stimulation bei allen Tieren ein stimulusassoziiertes Signal in Form einer Absorptionszunahme mit Maximum nach 6-8,5 Sekunden. Als Beispiel hierfür sind die Versuchstiere P125<sub>akustisch</sub> (vgl. Abb. 35<sup>29</sup>) und P126<sub>akustisch</sub> (vgl. Abb.33a-c) angeführt. Das Signal stellte sich als fleckiges Muster auf dem Kortex dar und war je nach Stimulus unterschiedlich gelagert, reflektierte jedoch nicht deutlich die bekannte Tonotopie des A1 der Katze. Es erreichte Amplituden zwischen 1% und 2,5%.

Die optischen Aktivitätsmuster zeigten eine erhebliche Varianz unter Durchgängen bei gleichem Stimulus. Ein typisches Beispiel hierfür ist die 1kHz-Serie des Tieres P125. Abbildung 36 verdeutlicht die massive Heterogenität optischer Ableitungen bei identischem Stimulus. Im Einzeldurchgang stellten sich deutliche durchblutungsgekoppelte, EKG-synchrone, pulsatile Absorptionswellen dar, die durch Aufsummieren über einen Zeitraum von 400ms aus den Datensätzen entfernt werden konnten (vgl. Methode, vgl. Abb. 27b,c,f). In jedem Durchgang bei jedem Tier zeigten sich unabhängig von Stimulation deutliche Oszillationen in der Reflexionsdichte des Kortex. Diese Oszillationen traten mit einer relativ stabilen Grundfrequenz von 0,1Hz sowohl bei Ratten als auch Katzen auf und boten eine Amplitude zwischen 1 und 3,5% (vgl. Abb. 29, 30).

### 7.1. EKG-synchrone Schwankungen

Pulssynchrone Absorptionszunahmen mit einer Wiederholungsfrequenz von etwa 2Hz (Abb. 27b,c,f) waren ein durchgängiges Phänomen bei OI-Ableitungen an sämtlichen Versuchstieren. Trotz Stabilisierung durch die Kortexkammer waren EKG-synchrone Leuchtdichteminderungen über dem Kortex in jeder Aufzeichnung vorhanden. Die synchrone Darstellung von EKG und Streifenverlauf in Abb.27 verdeutlicht den Vorgang. Aus der Gefäßbewegung im animierten Aufzeichnungsstreifen läßt sich ablesen, daß die Leuchtdichte der Pulsation in der Systole abnimmt und in der Diastole ansteigt, das invers zur Leuchtdichte errechnete Signal also in der Systole zu- und in der Diastole abnimmt. Dieses Phänomen erklärt sich aus einer vermehrten Absorption grünen Lichts infolge steigender lokaler Durchblutung in der oberflächlichen Kortexarterien und- Arteriolen ohne weiteres. Da der sichtbare Puls die Beurteilung der Signalverläufe erschwert und in der Mittelung mehrerer Durchgänge Artefakte ergeben hätte, wurde die Periode der Herzrate in Subframes bestimmt und die einer Periode entsprechende Anzahl von Subframes aufsummiert. Bei P126 ergab sich eine EKG-Frequenz zwischen 115 und 130/min. Die EKG-Artefakte wurden durch Aufsummieren von 8

<sup>29</sup> Die Datensätze von Katze P125 umfassen lediglich 6,4 sec. Daher kann der Zeitpunkt des Stimulusmaximums jenseits dieser Zeitmarke nicht eindeutig festgelegt werden.

Subframes, entsprechend einem Zeitraum von 520ms, entfernt. Bei Katze P125 mit höherer Herzrate wurden fünf Subframes aufsummiert.

### **Abb. 29**

## **7.2. Langsame Wellen**

Bei allen Tieren war ein weiteres Wellenphänomen zu beobachten. Nach der Verrechnung der Datenframes mit der Prästimulus-Referenz waren in der gewählten Falschfarbdarstellung Helligkeitsschwankungen erkennbar. Die unverrechneten Frames wurden mit CLUT 14 in 16k-Auflösung dargestellt, die verrechneten Frames, je nach Amplitude des Signals in Auflösung 512, 1k, 2k oder 4k (vgl. Kap. 5.8. „Datenverarbeitung“). Alle Tiere zeigten Oszillationen in der Reflexionsdichte, die mit einer Wiederholungsfrequenz von rund 0,1Hz auftraten und Amplituden zwischen 0,5 und 3.75% erreichten. Diese Oszillationen zeigten häufig einen makellos sinusoidalen Verlauf (vgl. Abb. 30) und waren keinem versuchstechnischen Prozeß ohne weiteres zuzuordnen.

### **Abb.30**

Die Kurvenverläufe zeigten keinen klaren Bezug zum Stimuluszeitpunkt oder zur Stimulusfrequenz. Insbesondere kein deutliches „resetting“ der Oszillationsfrequenz langsamer Wellen auf den Stimulus hin und keinen signifikanten Amplitudenunterschied. Die Kurvenverläufe der Nonstimulussituation waren nicht ohne weiteres von denen der Stimulussituation unterscheidbar. Sie traten bei Stimulusdurchgängen ebenso auf, wie bei Kontrolldurchgängen ohne Tonstimulus. Zur Verdeutlichung der Schwankung und der Unabhängigkeit der Oszillation von den wesentlichen versuchstechnischen Parametern wie Herzrate und Beatmungsfrequenz wurde das Phänomen als Schwankung eines über dem gesamten freigelegten primären auditorischen Kortex errechneten Mittels der Pixelwerte über die Zeit graphisch dargestellt. Abb.29 zeigt die Entwicklung der Mittelwerte aus zwei Ableitungssituationen des Tieres P126 bei 8kHz, aufgeteilt in je sechs Stimulus- und sechs Nonstimulusdurchgänge. Jede Kurve stellt einen Durchgang, die Punkte der Kurven stellen jeweils ein Mittel aus acht Rohdatenframes dar. Die Wellenphänomene der gezeigten Ausführungen sind repräsentativ. Erkennbar sind die unterschiedlichen Kurvenverläufe, die sich, untereinander unkorreliert, zueinander verhalten wie Phasenverschiebungen einer einheitlichen Grundfrequenz. Weiters ist kein deutlicher Unterschied der Kurvenverläufe zwischen den beiden Stimulus- (Abb.29, b+d) und den beiden Nonstimulusbedingungen (a+c) evident. Das Angebot eines Stimulus verändert hier weder den Kurvenverlauf noch das Ausmaß der Synchronizität der Kurven zueinander signifikant. Nur bei 8kHz ist in den Stimulussituationen ein annähernd ähnlicher Kurvenverlauf erkennbar. Die Grundfrequenz der langsamen Schwankungen und ihre Indifferenz gegen-

über Tonstimuli wird bei Betrachtung eines größeren Aufnahmezeitraums evidenter: Abb.30 zeigt den Rohdatenverlauf ohne Verrechnung gegen die Referenz. Gezeigt sind drei Nonstimulusdurchgänge aus der 8kHz-Reihe von P126. Deutlich erkennbar sind die sinusförmigen Verläufe mit Schwankungsamplituden von 3,75% peak to peak auf einem Offset von etwa 4000 counts. Die Frequenz der Schwankungen beträgt bei den drei dargestellten Kurven gleichermaßen etwa 0,1 Hz.

### 7.3. P126/kleine Felder

Ein von Stimuluszeitpunkt- und Frequenz weitgehend unabhängige Reflexions-Absorptionsänderung gegenüber der Prästimulusreferenz findet auch im kleineren Rahmen einzelner kortikaler ROIs statt. Nach Verrechnung mit der Referenz waren in verschiedenen Durchgängen „wandernde Maxima“ erkennbar, die sich über die Fläche des Trepanationsareals bewegten. Abb 31 verdeutlicht das Phänomen am Beispiel Versuchstier P126. Die Benennung der Aufnahmestreifen folgt dem Muster Frequenz/Ausführung/Durchgang: die Bezeichnung 8000/1/12 bezieht sich so auf eine Stimulusfrequenz von 8kHz, Ausführung 1, 12. Durchgang.

#### Abb.31.

Da die Absorptionsverläufe der einzelnen Areale sich in Amplitude und, seltener, der Frequenz unterscheiden, war die Betrachtung kleinerer, in ihrem Durchblutungsverhalten nach Aktivierung präsumtiv homogenerer Areale relativ zueinander sinnvoller als lediglich die Bewertung der globalen, über die gesamte Trepanationsfläche gemittelten Kurvenverläufe. Es zeigte sich ein facettenreiches Bild. Je nach Durchgang bewegten sich die Felder maximaler Absorption in unterschiedlichen Richtungen über den Kortex. Um die Absorptions/Reflexionsänderungen im kleineren Maßstab beobachten zu können, wurden innerhalb der Fläche des freigelegten Kortex insgesamt 7 ROIs definiert. So konnten durch Errechnung eines Mittelwertes über den jeweiligen kleineren Flächen Kurvenverläufe erstellt werden, aus denen die Wanderbewegungen ablesbar sind. Abb 32a-m zeigt verschiedene Verläufe der ROI-Mittelwerte dieser sieben ausgewählten Areale. Der Vergleich der Einzelkurvenverläufe innerhalb eines Aufnahmedurchgangs sowie der Vergleich der Aufnahmedurchgänge untereinander am Beispiel von P126 erbrachte folgende Ergebnisse:

Es war keine unmittelbar erkennbare und offensichtliche Korrelation zwischen Stimulusstart, -Frequenz sowie -Dauer und den aufgefundenen Reflexionsänderungen evident. Wellen traten sowohl in Nonstimulusdurchgängen als auch in Stimulusdurchgängen auf. Eine besondere Form oder Pointierung der Wellenverläufe in Stimulussituationen gegenüber den Nonstimulussituationen war nicht ohne weiteres erkennbar. Insbesondere wurde bei der Bewertung der einzelnen Ausführungen keine CF-Abhängigkeit der Absorptionsmaxima deutlich.

Die Helligkeitsdifferenzverläufe der ROIs sind vielgestaltig und uneinheitlich von Durchgang zu Durchgang. Damit ist ein systematischer Fehler wie etwa Streulicht oder ein Bewegungsartefakt als Ursache der Kurven unwahrscheinlich. Beispielsweise zeigt der Verlauf 4000/2/12 (Abb. 32c) ein Absinken der Differenzen der Areale 4 und 5, während bei 4000/3/12 (Abb. 32f) ein initialer Anstieg mit Peak nach etwa 4sec. zu sehen ist. Bei 8000/2/6 (Abb. 32h) ist ein initialer Abfall mit folgendem Anstieg und Peak nach etwa 7,5 sec. zu sehen.

Eine reproduzierbare Systematik in den Kurvenverläufen der ROIs wurde nicht deutlich. Vielmehr scheinen sich die Durchschnittswerte der verschiedenen ROIs relativ unabhängig voneinander zu entwickeln. In 8000/1/4 (Abb.32g) beispielsweise findet sich eine weitgehende Aufspaltung der Absorptionsverläufe der drei suprasylvischen Areale (rot, grün und blau, vgl. Abb.31). ROI4 erreicht bei etwa 3sec. einen Absorptionspeak von 2% während ROI5 eine Reflexionssteigerung zeigt. Der Verlauf der dritten suprasylvische Region, R6, liegt zwischen den beiden Kurven. Die vier infrasylyvischen Regionen R2, R3, R7 und R8 verlaufen bis sec. 5 parallel, spalten sich dann aber auf: R7 und R3 zeigen keine wesentliche Veränderung in der Absorption, R2 und R8 hingegen zeigen deutliche Reflexionszunahmen.

**Abb.32 a-m**, Verläufe kleiner Felder

Die größten Dynamiken scheinen im suprasylvischen Gyrus aufzutreten, hier wiederum in R4, und R5, gefolgt von R6 (16000/1/12 (Abb.32k) , 16000/2/9 (Abb.32l)). Besonders starke Unterschiede in der Amplitude der Kurven bestehen zwischen suprasylvisch und infrasylyvisch (4000/3/11 (Abb.32e), 4000/3/12 (Abb.32f)). Auch innerhalb des suprasylvischen Gyrus treten oft unterschiedliche Verläufe auf: die ROIs 4 und 5 ähneln sich zwar oft bis zur Deckung (4000/3/11 (Abb.32e)), nehmen aber ebenfalls häufig nach anfänglicher Deckung unterschiedliche Verläufe (8000/1/4 (Abb.32g), 16000/1/10(Abb.32j)). Mitunter verlaufen sie trotz ihrer unmittelbaren Nachbarschaft phasenverschoben zueinander (8000/1/4 (Abb.32g), 16000/2/12 (Abb.32m)), oder auch in einer Anfangsphase entgegengesetzt, um sich dann wieder anzunähern (16000/2/12 (Abb.32m)).

In 4000/3/12 (Abb.32f) wiederum ist ein initial gemeinsamer, wenn auch nicht deckungsgleicher Verlauf aller Kurven erkennbar, der sich ab SF80 deutlich in einen suprasylvischen, ansteigenden und einen infrasylyvischen, diametral abfallenden Schenkel differenziert. Diese Schenkel nähern sich zum Ende des Durchgangs hin wieder an. Mitunter zeigt sich sogar ein zweigipfliger Verlauf: 16000/1/10 (Abb.32j)

Interessant ist ferner die Beobachtung, daß sich die Kurvenverläufe der Unterschiedlichen ROIs nicht nur in Amplitude, sondern auch in ihrer Phase unterscheiden. Die Form der Kurven ist häufig die einer Sinuswelle, die Anteile der verschiedenen ROIs verhalten sich wie

Phasenverschiebungen (8000-2-6 (Abb.32h) 4000/1/12 (Abb.32b)). Häufig ergibt sich dadurch das Bild „wandernder Maxima“, weil nacheinander in verschiedenen Arealen Maximalwerte der Differenzrechnung auftauchen (besonders deutlich ist dieses Phänomen zu erkennen in Abb.32 h, i, j, k). Die „Wanderwege“ dieser Maxima über den Kortex sind aber nicht homogen sondern differieren von Durchgang zu Durchgang. Bei 4000/1/12 (Abb.32b) ist gut zu erkennen, daß nach 4sec. die suprasylvischen Areale (R4/R5/R6) einen Peak erreichen, während die auditorischen Areale deutlich negativ werden. Bei etwa 5,5sec. kehrt sich das Verhältnis um, und etwa nach 7-8sec. erreicht der Peak die auditorischen Areale, während die suprasylvischen Areale deutlich ein Tal markieren. Bei 4000/1/11 (Abb.32 a) hingegen zeigt sich ein entgegengesetzter Verlauf. Insgesamt ergibt sich ein vielgestaltiges Bild mit Phasenverschiebungen, unterschiedlichen Amplituden bei gleicher Phase, aber auch unterschiedlichen Peak – Frequenzen: bei 16000-1-10 entstehen im suprasylvischen Bereich zwei Peaks, im auditorischen Bereich hingegen ist nur ein Peak zu sehen.

#### **7.4. P126/Mittelung sämtlicher Durchgänge bei gleichem Reizschema und Vergleich mit Elektrophysiologie**

Bei P126 wurde eine Mittelung aller Durchgänge bei den Stimuli 4kHz, 8kHz bzw. 16kHz durchgeführt, d.h. 18 Durchgänge bei jeder Stimulusfrequenz. Diese Rechnung sollte zum einen aufgrund des evidenten Mittelungsbedarfs angesichts der großen Varianz in den Ausgangsdaten prüfen, ob sich die Mittelung größerer Datenmengen als hilfreich bei der Suche nach stimulusassoziierten Phänomenen im Zeitverlauf der Aufnahme erweisen würde. Zum anderen sollten die deutlichsten Ergebnisse dieser Verrechnungen mit der entsprechenden elektrophysiologischen Karte, die an dem Tier erhoben wurde, verglichen werden. Hierzu wurde am Ende der optischen Ableitung eine elektrophysiologische Ableitung von A1 mittels lokaler Feldpotentiale durchgeführt. Die folgende Auswertung des entstehenden Mittelungssummenframes der optischen Aufzeichnungen beinhaltet die optische Bewertung bei einer Auflösung von 256bit, außerdem wurde die Entwicklung der mittleren Helligkeit in jedem Summenframe in drei verschiedenen ROIs über die Zeit verglichen und bewertet. ROIs:

- das Areal, in dem nach Literatur das entsprechende Frequenzband liegt als R1, aus deren Mittelwerten in ABB. 33 der entsprechende Kurvenverlauf 1 (rot) erstellt wird,
- der Bereich, in dem die Mittelung über 18 Durchgänge der OI-Registrierungen die größten Ausschläge ergeben hatten als R2, der grüne Kurvenverlauf in Abbildung 33,
- der gesamte freigelegte Kortex als R3 mit dem dazugehörigen blauen Kurvenverlauf

Diese ROIs wurden sowohl für die Stimulussituationen als auch für die korrespondierenden Nonstimulussituationen ausgewertet.

#### 7.4.1. P126/4kHz

Die Mittelung von 18 Durchgängen mit der Stimulusfrequenz 4kHz ergab das Bild einer diskreten, ansteigenden Signalaktivität mit einem Maximum nach etwa 8,5-9,5 Sekunden im caudalen, unmittelbar dem suprasylvischen Sulcus nach lateral anliegenden Bereich (Abb.33a). Die Absorptions-Mittelwertskurven der Stimulussituation in sämtlichen ROIs zeigen nach einem Abfall mit Minimum bei Subframe 7 einen moderaten Anstieg der Werte. Kurve 1 (rot in Abb.33) verläuft zunächst im negativen Bereich mit einem Minimum von etwa -0,3%, etwa bei 5 sec., steigt dann an, schneidet die Nulllinie bei 8sec. und erreicht ein Maximum von etwa 0,06% bei 9,5sec. Das Maximum wird von Kurve 2 (grün) nach etwa 8-9,5sec. erreicht, es beträgt mit 10 counts etwa 0,1% der Gesamtleuchtdichte. Die Kurve 3 (blau) nähert sich der Kurve 2 im Verlauf an, erreicht deren Amplitude jedoch nicht sondern verbleibt im negativen Bereich. Ein Maximum wird auch hier bei 8,5-9,5sec. erreicht, es erreicht etwa die Nulllinie, gefolgt von einem erneuten Abfall auf etwa -0,08%.

Die Absorption des gesamten Kortex sinkt initial ab mit einem Tal von etwa -0,18% bei 3,5-4sec., um dann wieder anzusteigen. Die Absorptions-Mittelwertkurven der Nonstimulussituation unterscheiden sich in allen drei Regionen von denen der Stimulussituation. In Region1 kommt es nicht zu dem in den Stimulussituationen beobachteten initialen Abfall der Absorption sondern zu einem moderaten Anstieg um etwa 0,18% mit einem Maximum bei Subframe 4 nach etwa 1,5 Sekunden. Gefolgt wird dieser Anstieg von einem allmählichen Rückgang der Absorption mit Nulldurchgang bei Subframe 12 nach 6sec. und einem Minimum von -0,3%counts (Kurve1) bei 9sec. (Subframe17). Die visuelle Inspektion des Verlaufs zeigt eine initiale Absorptionszunahme, die sich über weite Teile des freigelegten Kortex ausdehnt. Die Absorption nimmt im weiteren Verlauf ab, insgesamt erscheint der Verlauf der Absorptionskurven aber inhomogen. Die peak-to-peak-Amplitude des Absorptionsverlaufs der Nonstimulussituation ist um etwa 20% größer als die der Stimulussituation

**Abb. 33 a,b,c**, aufsummierte Verläufe

#### 7.4.2. P126/8kHz

Die Mittelung von 18 Durchgängen mit der Stimulusfrequenz 8kHz im Vergleich zu dem korrespondierenden Mittel aus 18 DG ohne Stimulus zeigte einen deutlichen Anstieg der Absorptions-Mittelwerte in Region 1 von Beginn an mit einem kurzen Abfall bei Subframe 7 von 3-3,5sec. Der Anstieg ist gleichmäßig und erreicht sein Maximum im 16.-18- Subframe, entsprechend sec.8-9,5 nach Aufnahmebeginn bei 25 counts oder 0,28% Minderung der Geamtleuchtdichte. In Region2 wird ein Maximum von ebenfalls 0,28% bereits im 12. und

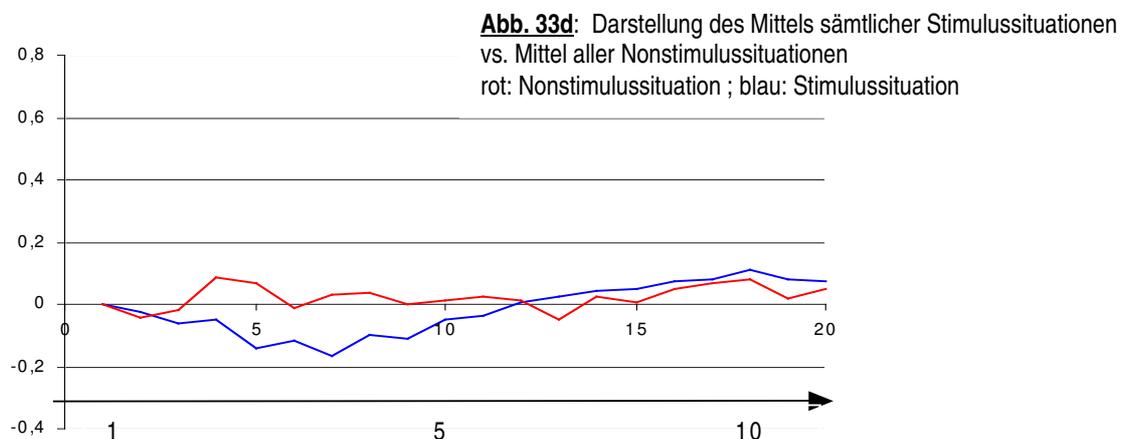
13. Subframe erreicht. Bei Mittelung über den gesamten Kortex in ROI 3 wurde bei 8000kHz auch der größte Absorptionszuwachs von 0,2% im Subframe 17 festgestellt. Alle drei Absorptions- Mittelwertskurven erreichen ihre Maxima zwischen 6,5 und 9sec., um dann wieder abzunehmen. Die visuelle Inspektion des Signalverlaufs zeigt ein homogen entwickelndes Signal, das einen großen Teil des freigelegten Kortex einnimmt, mit Betonung des infrasyllvischen Mittelfeldes. Dieser Bereich entspricht etwa der bekannten Lokalisation der 8kHz-Repräsentation auf dem primären auditorischen Kortex der Katze.

Die Absorptions-Mittelwertskurven der 18 gemittelten Nonstimulussituationen unterscheiden sich in Verlauf und Maxima. Die Mittelwertskurve der ROI 1 erreicht nach etwa 7sec. einen Absorptionszuwachs von 0,5%. Die Kurve der ROI 2 bewegt sich nach einem Peak bei Subframe 4-6 entlang der Nulllinie und erreicht bei Subframe 17 nach 9sec. einen zweiten Peak von etwa 0,2%. Kurve 3 vollzieht ab Subframe 4 bei 2sec. den Verlauf von Kurve 2 nach, versetzt um 0,2% nach unten. Sie beschreibt nach einem Abfall auf -1% etwa 3,5sec. nach Beginn mit Subframe 6 ein erstes Maximum bei null. Daraufhin fällt die Absorption wieder auf negative Werte. Nach 7sec. ist ein Minimum bei etwa -0,18% erreicht. Das zweite Maximum wird nach 9 sec. mit Subframe 17 und etwa 0,1% erreicht. Die visuelle Beurteilung des Verlaufs ergibt ein inhomogenes Bild mit irregulärem Absorptionsverlauf. Ein sich aufbauendes Signal ist nicht ohne weiteres erkennbar.

#### 7.4.3. P126/16kHz

Die Mittelung der 18 Durchgänge mit 16Hz-Stimulus im Vergleich zu dem korrespondierenden Nonstimulusmittel läßt generell nach einem initialen Absorptionsabfall auf etwa -0,24% bis zum 7.Subframe ein stetes Anwachsen der Absorption mit einem Maximum von 0,8% (ROI2) bei den Subframes 18-20 erkennen. Der Signalverlauf der Region 1 ist ab Subframe 7 deutlich flacher. Die Kurve bewegt sich über den gesamten Aufnahmezeitraum im negativen Bereich, ein Minimum wird mit etwa -0,25% bei Subframe 7 nach etwa 3,7sec. erreicht. Es schließt sich ein Absorptionszuwachs an, der stetig ansteigend, bei Subframe 20 ein Maximum im Bereich der Nulllinie erreicht. Region 2 zeigt den steilsten Verlauf. Ab Subframe 7 kommt es zu einem nahezu linearen Absorptionszuwachs, der innerhalb des Meßzeitraumes sein Maximum nicht mehr erreicht. Nach 10,4sec. erreicht die Kurve 0,8% Absorptionszuwachs. Der Absorptionsverlauf der Region 3 sinkt zunächst wie alle Verläufe bei Subframe 7 auf -0,22% counts, steigt dann nahezu linear an mit Nulldurchgang bei Subframe 12/13 und Maximum mit +0,22% bei Subframe 20. Die Inspektion des Verlaufs läßt eine kontinuierliche Zunahme der Signalintensität über die Aufzeichnungsdauer erkennen.

Dieser Zuwachs findet mit starker Betonung im Bereich der multimodalen Felder des Gyrus suprasylvius statt. Die Absorptions-Mittelwertkurven der 18 Nonstimulussituation verlaufen deutlich flacher. Im Gegensatz zur Stimulussituation ergeben alle drei Regionen, teils nach initialem Anstieg, abfallende Kurvenverläufe. Region 1 zeigt zunächst einen ansteigenden Verlauf, der sich bei den Subframes 8-12 der 0,2%-Marke nähert, um danach bei Subframe 20 -0,05% zu erreichen. Die Mittelwertkurve aus Region 2 zeigt einen wellenförmigen Verlauf mit einem Tal von -0,2% bei Subframe 10, gefolgt von einem Peak bis zur Nulllinie bei Subframe 13, gefolgt von einem weiteren Tal mit einem Absorptionsverlust bis etwa -0,4% bei Subframe 20. Die Kurve aus ROI3 vollzieht ab Subframe 10 die Kurve aus ROI 1, etwa um 0,2% in Richtung auf verminderte Absorption versetzt. Die visuelle Beurteilung zeigt einen relativ inhomogenen, abfallenden Verlauf. Beginnend bei Subframe 5 zeichnet sich ein kleines Areal verstärkter Absorption im caudalen, unmittelbar infrasyllvischen Bereich von A1 ab. Das Areal verschwindet bis Subframe 14. In allen drei Stimulussituationen war nach Mittelung über 18 Durchgänge demnach ein sich langsam und homogen entwickelndes Absorptionsphänomen mit Maximalamplitude bei 8,5-10 Sekunden zu erkennen. In den korrespondierenden Nonstimulussituationen, die nach demselben Schema verrechnet und gemittelt wurden, war hingegen keine homogene Entwicklung eines Signals zu sehen. Die Amplituden der Kurven der Nonstimulussituationen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Stimulussituationen. Die Mittelung aller Stimulussituationen (Abb.33c) und aller Nonstimulussituationen zeigte differierende Kurvenverläufe für Stimulus- und Nonstimulusdurchgänge. Die Kurve der Stimulusdurchgänge verläuft nach einem initialen Abfall auf -7 counts bei Subframe 5 stetig ansteigend mit Maximum von 10 counts bei den Subframes 16-18, gefolgt von einem Abfall. Die Nonstimulusdurchgänge zeigen nach einem anfänglich inhomogenen Verlauf mit Maxima bei 2,5 counts ab Subframe 8 einen kontinuierlichen Abfall bis -7 counts bei Subframe 20.



### **7.5. Vergleich ORIS-Elektrophysiologie**

Bei dem Versuchstier P126 wurde eine elektrophysiologische Oberflächenableitung durchgeführt und das Ergebnis mit dem deutlichsten Signal der OI-Ableitungen, das bei 8kHz aufgezeichnet wurde, verglichen. zur Erstellung von Kontur- und dreidimensionalen Aktivitätskarten der elektrophysiologisch abgeleiteten Areale wurde die bei dieser Reizfrequenz häufigste 1fach positive Form der Antwortkurve herangezogen. Die Elektrophysiologie ergab keine klare Tonotopie, jedoch eine Betonung von Aktivität im hochfrequenten Anteil von A1, evtl. bereits in das AAF reichend. die Maxima der optischen Ableitungen befinden sich ebenfalls im hochfrequenten Bereich, decken sich aber nicht mit den Maxima der elektrophysiologischen Ableitungen, sondern befinden sich in einem unmittelbar nach medial angrenzenden Bereich (Abb. 37). Die Maxima der optischen Ableitungen decken außerdem einen deutlich größeren Bereich der Kortexoberfläche ab, als die elektrophysiologischen Maxima.

### **7.6. Zusammenfassung**

Optische Registrierungen nach akustischer Stimulation an vier Katzen ergaben demnach keine klar und zweifelsfrei lokalisierbare Tonotopie der betrachteten auditorischen Kortizes. Nach elektrischer Reizung war lediglich bei einem von drei Tieren eine Cochleotopie erkennbar. Die Auswertungen der optischen Registrierungen am A1 der Katzen P123, 124, 125 und 126 nach akustischer Reizung waren vergleichbar. Die einzelnen optischen Ableitungsergebnisse nach elektrischer Stimulation bei P123 und P125 über ein Cochlea-Implantat unterschieden sich nicht erkennbar von den Ergebnissen, die nach akustischer Stimulation erhoben wurden. Es war bei P126 erst nach Mittelung über 18 Durchgänge ein zeitlicher Zusammenhang zwischen optisch erhobenen Daten und Stimulation nachweisbar. Die ungemittelten Einzelaufnahmen mit Reizung hingegen unterschieden sich nicht erkennbar von den Nonstimulusreferenzen. Bei Katze P124 war erst nach Mittelung von 30 Durchgängen eine Cochleotopie erkennbar. Eine schwache Korrelation zwischen optisch erhobenen Daten und elektrophysiologischen Kontrollen ließ sich bei P126 nur bei einer Stimulusfrequenz, d.i. bei 8kHz, darstellen.

## Kapitel 8. Diskussion der Resultate

Zusammenfassend wurden im Laufe dieser Arbeit wurden vier Versuche an Katzen und zwei Versuche an Ratten durchgeführt. Es wurde mit Tonpips und elektrischen Impulsen in verschiedenen Frequenzbereichen stimuliert und mit grünem Licht der Wellenlänge 540nm abgeleitet. Im Anschluß an ORIS wurden in einem Versuch (P126) elektrophysiologische Oberflächenableitungen durchgeführt. Die elektrische Reizung des Hörnerven durch ein Cochlea-Implantat führte nur bei einer (P124) von drei akut implantierten Katzen zu einer optisch darstellbaren cochleotopen Differenzierung eines Hochfrequenzbereichs durch basale Reizung und eines Bereichs niedriger Frequenz durch apikale Reizung. Die elektrische Reizung war 12dB überschwellig. Die Latenz bis zum Signalmaximum lag bei 5,5sec, die Amplitude bei 1,35%. Es wurde über 30 Durchgänge gemittelt.

Die Ergebnisse nach akustischer Reizung waren bei sämtlichen Versuchstieren vergleichbar. Eine nachvollziehbare und klare Tonotopie infolge akustischer Reizung war bei drei akustisch Stimulierten Katzen und zwei Ratten nicht evident. Bei Katze P125 zeigt sich nach einem mit der bekannten Cochleotopie am auditorischen Kortex der Katze übereinstimmenden shift der optischen Aktivität von caudal nach rostral beim Übergang der Stimulation von 1kHz auf 4kHz ein umgekehrter rostrocaudaler shift beim Übergang zur Stimulation mit 16kHz. Diese Verschiebung ist mit der bekannten Cochleotopie am A1 der Katze nicht vereinbar. Der Versuch des Nachweises charakteristischer Frequenzbänder durch akustische Stimulation ist damit bei drei Katzen nicht geglückt. Darstellbar waren in allen Experimenten Oszillationen der Reflexion im Bereich von 0,1Hz, die sich über den Kortex bewegten und keinem versuchstechnischen Prozeß zugeordnet werden konnten. Außerdem wurde nach Mittelung sämtlicher Durchläufe mit gleicher Reizung (bei P125: 30 Durchgänge, bei P126: 18 Durchgänge) eine Stimulusassoziierte, optische Aktivität am Kortex erkennbar. Diese Aktivierung weiter Kortexareale war aber keinem isolierten CF-Bereich klar zuzuordnen.

Die optischen Ableitungen bei P126 ließen sich nur in bei einer Stimulusfrequenz mit den elektrophysiologischen Ergebnissen, die zur Kontrolle nach den optischen Ableitungen durchgeführt worden waren, vergleichen. Diese Frequenz lag bei 8kHz.

Die Voruntersuchungen zur CCD-Pixelwertstabilität über einen Zeitraum von 200min. zeigten für grünes Licht bei einer Lichtintensität von 240 Lux, entsprechend einem Mittelwert von 5152 counts, ein Grundrauschen in der Größenordnung von 2,7 counts, entsprechend 0,052% bei einer Standardabweichung von 0,514 counts. Bei Beleuchtungsstärken um 460

Lux, die in der ROI Pixelwerte um 10853 counts ergaben, lag der Mittelwert bei 10853,12 counts mit einer Standardabweichung von 1,6. Es ergab sich eine Schwankungsbreite von 8,6 counts oder 0,079%. Das Verhältnis des CCD-Chip-Outputs zum Lichtinput ist bis zur Übersteuerung linear (Abb.7), die Bandbreite reicht von 450-850nm (in diesem Bereich weist der Chip eine Quantumeffizienz von über 25% auf; bei 540nm beträgt die QE 40%, Daten nach Herstellerangaben).

Die 50Hz-Leuchtdichteschwankungen der Lampe lagen nach den Voruntersuchungen mit einer Amplitude von 0,01% über einen Betrachtungszeitraum von 200ms um eine Zehnerpotenz unter dem herstellerseitig angegebenen Wert. Untersuchungen zur Pixelwertstabilität belegten über einen Zeitraum von 2h eine Drift des Offset von 0,014%.

Nach den Ergebnissen der Voruntersuchungen zu den Eigenschaften und zum Auflösungsvermögen der Anlage war diese imstande, einen Modulationsgrad ab 0,03% aufzulösen. Damit war die Anlage empfindlich genug, um Leuchtdichteschwankung in dem beschriebenen Ausmaß von zwischen 0,1% [Hess A. et al., 1996] und 4% [Nemoto M. et al., 1999] darzustellen.

In den durchgeführten Versuchen traten hochfrequente, durch das EKG ausgelöste Modulationshübe um 0,83% peak to peak auf. Langsame Wellen mit einer Grundfrequenz um 0,1 Hz erreichten Amplituden von bis zu 3,95% peak to peak (vgl. Abb 30). Stimulusassoziierte Signalamplituden nach akustischer Stimulation erreichten Maxima zwischen bis 0,8%, nach elektrischer Stimulation wurden bis 0,7% erreicht (Absorptionszuwächse gemittelt über die Fläche einer ROI, vgl. Abb. 33a-d). Absorptionspeaks, die nicht über ein Areal gemittelt wurden, lagen bis 1,35% (P124).

### **8.1. Darstellbarkeit der Tonotopie**

Die elektrophysiologischen Oberflächenableitungen nach akustischer Reizung bei Katze P126 ergaben keine klare Tonotopie. Die deutlichste elektrophysiologische Aktivitätskarte, die mit optischen Ergebnissen bei derselben Reizfrequenz verglichen wurde (Abb. 37), ergab sich bei 8kHz nach selektiver Auswertung einfach positiver Wellen. Die Auswertungen der elektrophysiologischen Ableitungsergebnisse nach Stimulation bei 4 und 16kHz waren minder ergiebig.

Grundsätzlich ist eine Tonotopie in klar strukturierte Bänder charakteristischer Frequenzen durch elektrophysiologische Oberflächenableitungen nicht zwangsläufig bei jedem Versuchstier darstellbar. Nach eigenen Erfahrungen [Hartmann R., pers. Mitteilung] ist eine

klare Tonotopie vielmehr nur etwa bei jedem 3.-5. Tier optimal dargestellt. Daß sich eine Tonotopie aus den lokalen Feldpotentialen nicht deutlich darstellen ließ, bedeutet demnach nicht, daß keine Tonotopie bestanden hätte. Bei 8kHz-Reizung war eine deutliche Annäherung der optischen Maxima mit den elektrophysiologischen Ergebnissen erkennbar. Diese Beobachtung erscheint schlüssig, weil das Gehör der Katze in diesem Frequenzbereich am empfindlichsten ist.

In der Zusammenschau mit den optischen Ergebnissen der Stimulationen bei 4kHz und 16kHz bestehen allerdings Gründe zum Zweifel, ob die Areale maximaler optischer Aktivierung die Repräsentationen der entsprechenden Reizfrequenzen widerspiegeln (Abb.33 a-d). So stellt sich nach Mittelung über 18 Durchgänge bei 16kHz-Stimulation ein Areal (R 4,5,6 in Abb.33) im Bereich des suprasylvischen Gyrus als Ort der größten optischen Aktivität dar, das klassischerweise als polymodal gilt und sensible, visuelle und auditorische Reize verarbeitet. In den rostralen Anteilen von A1, der Repräsentation der hohen Frequenzen, zeigt sich hingegen keine signifikante Signalzunahme in der optischen Ableitung. Ähnlich verhält es sich mit den Ergebnissen der Reizung bei 4kHz. Hier ist zwar in der optischen Ableitung eine dezente Zunahme der Absorption erkennbar, diese zeigt aber ebenfalls nur eine sehr geringe Kolokalisation mit dem bekannten 4kHz-Repräsentation der Katze. Die abgeleiteten Signale sind zeitlich synchron, zeigen aber unterschiedliche Amplituden. Eine klare Tonotopie ist bei P126 und P125 nicht nachvollziehbar. Hierfür könnten verschiedene Vorgänge ursächlich sein.

### **0,1 Hz-Oszillationen**

Das Auftreten von hochamplitudigen, wellenförmigen Signalschwankungen bei sämtlichen Versuchstieren, zwei Ratten und vier Katzen, erschwerte die Signalauswertung deutlich. Es handelt sich hierbei um sinusförmige Veränderungen der Leuchtdichte, gemittelt über einer ROI, die unter Aussparung angrenzender Wundränder oder Kammeranteile selektiv die trepanierten Kortexareale betrafen und Amplituden von bis zu 4% erreichten. Das Phänomen ist bereits beschrieben [Hess, A., 1996; Galluske R., pers. Mitteilg] . Diesen hochamplitudigen, niederfrequenten Pulsationen mit einer Frequenz von rund 0,1 Hz waren hochfrequente Peaks mit amplituden zwischen 0,6 und 0,9% aufgelagert, die aufgrund ihrer Korrelation mit dem EKG als pulssynchrone, arterioläre und vermutlich kapilläre (vgl. Kap. 3) Durchblutungsartefakte identifiziert werden konnten. Der Ursprung der langsamen Wellen hingegen konnte nicht bestimmt werden. Es traten über dem betrachteten Kortexareal, zusätzlich zu den aus Durchschnittswerten des gesamten Bildes errechneten, langsamen Wellen, lokale Peaks der Signaldichte auf, die sich irregulär über den Kortex bewegten, wenn

die Bildfolge animiert wurde [vgl. Mayhew J.E. et al., 1996]. Diese Charakteristik sowie die klare, keiner nichtbiologischen Quelle zuordbare Sinusform der Oszillationen sprechen gegen ein versuchstechnisches Artefakt als Ursache. Ein solches Phänomen könnte durch eine primär zugrundeliegende neuronale Aktivität (s.u.) oder primär durch periodische Schwankungen im Hämatokrit, des vaskulären Volumens oder der Flußgeschwindigkeiten verursacht worden sein. Eine Volumenzunahme wiederum kann auf Änderungen im Gefäßquerschnitt auf arteriöler oder kapillärer Ebene zurückgehen. Angesichts der großen Amplitude muß von der synchronen Aktivierung vieler kleiner Gefäße oder eines großen zuführenden Gefäßes ausgegangen werden, was im Rahmen einer generalisierteren Durchblutungszunahme nachvollziehbar wäre. Eine Abhängigkeit der Frequenz oder Amplitude dieser Oszillationen von der Herzfrequenz der Tiere oder Frequenz und Hub der Beatmungspumpe ließ sich hingegen nicht nachweisen. Ebenso wenig wahrscheinlich ist eine Abhängigkeit von Schwankungen in CO<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub>, da diese Parameter durch endexpiratorisches CO<sub>2</sub>-Monitoring engmaschig überwacht und durch eine Beatmungspumpe konstant gehalten werden konnten. Auch das Durchlaufen verschiedener Narkosetiefen im Laufe eines Versuchs, erkennbar im Rahmen der frühmorgendlichen Vigilanzsteigerung der Katzen bei gleichbleibender Narkosemenge, hatte, den erhobenen Beobachtungen zufolge, keinen erkennbaren Einfluß auf das Phänomen. Die Oszillation als Folge kortikaler Verletzung erscheint wenig wahrscheinlich, da die Schwankungen bei jedem Versuchstier in jeder freigelegten Hirnregion zu beobachten waren, dennoch ist dieser Zusammenhang nicht grundsätzlich auszuschließen (s.u.). Aufgrund von Reproduzierbarkeit und Gleichförmigkeit der Wellencharakteristik sowie der Ausbildung und Bewegung lokaler Amplituden, ferner mangels Korrelation mit externen, überwachten Faktoren ist als Ursache der Schwankung nicht ein durch den Versuchsaufbau oder durch äußere Manipulationen am Versuchstier verursachter Prozeß sondern ein physiologischer Prozeß kortikaler Durchblutungsregulation anzunehmen, der eine optische Ableitung, die selbst auf Durchblutungsphänomenen basiert, erheblich erschwert oder unmöglich macht. Die Amplituden dieses Störsignals liegen mit rund 3,5% im Bereich der optischen Signale [Nemoto M. et al., 1999] bzw. um eine Größenordnung über der von optischen Signalen [Frostig R. et al., 1990; Grinvald A. et al., 1988]. Am eröffneten Kortex sind derartige Blutflußirregularitäten bereits beschrieben [Rosenblum B.R. et al., 1987; Fasano V.A. et al., 1988; Mayhew J. et al., 1996; Hudetz A.G., 1997]. Dort traten Oszillationen im Hirnparenchym und in der Mikrovaskulatur auf. Das Phänomen scheint mit der Vasomotion in peripheren Gefäßen verwandt zu sein [Fagrell B. et al., 1980, Colantuoni A. et al., 1994, Bertuglia S. et al., 1996]. Fraglich ist, ob es sich bei

diesem Phänomen um eine primär autonome Blutdruckschwankung oder um eine primär neuronale Aktivitätsschwankung der betreffenden Areale handelt und inwieweit hiervon die Ableitbarkeit intrinsischer, optischer Signale beeinflusst wird. Aufgrund der beobachteten Charakteristika wäre eine von zentralen Schrittmachern gesteuerte und damit hochsynchron neuronale, vasodilatatorische Aktivität denkbar, die modulatorisch zum Ausgleich lokaler Bedarfslagen mit streng lokalen Dilatationsprozessen zusammenwirkt. Der Nachweis einer solchen, primär neurogene Durchblutungsoszillation wurde durch vergleichende Laserdoppler-Flußmessung (LDF)- [Dirnagl U. et al., 1989] und electrocortikographische Aufzeichnungen versucht [Reis D.J. und Golanov E.V., 1994; Golanov E.V. et al., 1994; Golanov E.V. und Reis D.J. 1996], wobei das generalisiert synchrone Auftreten einer Vasodilatation mit fester Latenz nach dem Auftreten eines EEG-Bursts sowie das Vorhandensein einer „Refraktärzeit“ für evozierbare Bursts [Golanov E.V. und Reis D.J., 1995] mit regelmäßig konsekutiver Durchblutungssteigerung als Hinweis auf den neurogenen Ursprung der Oszillation gewertet wurde. Golanov bezeichnet diese Abfolge als „Burst-Wave-Komplexe“. Die niederfrequenten Oszillationen waren bei Golanov kortikal ubiquitär vorhanden. Das Signal trat bei Mayhew [Mayhew et al., 1996] ohne Stimulation im Kortex, Striatum, Thalamus, Colliculus sup., Colliculus inf. und im Cerebellum auf. Es war bei allen Tieren. (n=30) auf Duraoberfläche und auch durch den dünngefrästen Kortex hindurch gleichermaßen darstellbar. OI und LDF-Messungen ergaben fast identische Resultate. Ihre Amplitude erreichte etwa 5- 10% [Golanov E.V. et al., 1994; Hudetz A.G. et al., 1992]. Anatomischer Ausgangspunkt könnten der Nucleus fastigii (NF) und die rostrale ventrolaterale Medulla oblongata (RVLM) sein [Nakai M. und Iadecola C., 1982,1983; Underwood M.D. und Iadecola C., 1992; Golanov E.V. et al., 1995]. Es bestehen weiters Hinweise auf eine pankortikale Durchblutungssteigerung infolge Stimulation der mesencephalen Formatio reticularis [Soderberg et al, 1990]. Die Funktion des kortikalen Schrittmachers nach mesencephaler Stimulation des NF und der RVLM scheint im Thalamus lokalisiert zu sein [Golanov E.V. und Reis D.J., 1995]. Diese Durchblutungssteigerungen waren nicht durch Schwankungen des mittleren Arteriendruckes [Golanov E.V. et al., 1995,1994], wohl aber durch die Anästhesie [Golanov E.V. et al., 1994] beeinflussbar. Die EcoG-Aktivität wurde durch Laminaranalyse in den Kortexschichten V und VI lokalisiert [Golanov E.V. et al., 95]. Es wäre denkbar, daß dieselben Neurone, die Bursts generieren, nicht über den Umweg einer lokalen Metabolismussteigerung eine Dilatation auslösen [Underwood M.D. und Iadecola C., 1992], sondern entsprechenden Kapillargebiete direkt innervieren. Die Oszillationen wären dann regelmäßig, nicht stimuluskorreliert und

hochamplitudig. In den bei P126 im Anschluß an ORIS durchgeführten, elektrophysiologischen Oberflächenableitungen wurden rhythmische, kortikale Erregungsbursts aufgrund der angewandten Mittelungsalgorithmen nicht dargestellt, da die Aufgabenstellung eines LFP-Mappings lediglich Ableitungen über 300-500ms erforderte und nicht nach EcoG-Bursts gesucht wurde. Es ist also denkbar, daß mit der vorangehenden EcoG- Aktivität das wesentliche Charakteristikum eines Burst- Wave-Komplexes in unserem Aufbau nicht detektiert wurde, obwohl es bestand.

Eine andere Erklärung für 0,1Hz-Oszillationen scheint autonom in der glatten Gefäßmuskulatur zu liegen. Dafür sprechen Untersuchungsergebnisse, die von den oben beschriebenen in verschiedenen Punkten abweichen. Sinusoidale, frequenzstabile rCBF-Oszillationen um 0,1Hz *ohne* vorausgehende neuronale Aktivität und *ohne* Sensitivität gegenüber Anästhesie werden von verschiedenen Gruppen beschrieben [Auer L.M. und Gallhofer B., 1981 an der Katze; Golanov E.V. et al., 1994; Hudetz A.G. et al., 1992]. Die Oszillationsfrequenz beträgt hier ebenfalls etwa 0,1 Hz. Generell ist aufgrund der großen Amplitude der nichtneuronalen Oszillationen eine synchrone Beteiligung [Auer L.M. und Gallhofer B., 1981] mehrerer kleiner oder eines großen Gefäßes anzunehmen. Es gibt Hinweise auf eine ursächliche Beteiligung pialer und größerer zerebraler Arterien [Fujii K. et al., 1990 a+b]. Da an den pialen und größeren Arterien rund 1/4 des gesamten zerebralen Widerstandes abfällt [Rosenblum W.I. und Commonwealth V., 1977; Kontos H.A. et al., 1978; Werber A.H. und Heistad D.D., 1984; Hudetz A.G. et al., 1987], würde bereits eine kohärente Durchmesseroszillation um 5% [Auer L.M. und Gallhofer B., 1981] bis zu 15% [Gotoh F. et al., 1982] zu einer lokalen Resistanceänderung von 20-70% führen. Hieraus könnten regionale Flußoszillationen von 10-40% entstehen [Hudetz A.G. et al., 1992] mit entsprechenden Konsequenzen für optische Ableitungen. Es scheinen in Abhängigkeit vom betrachteten Gefäßkaliber unterschiedliche Hauptfrequenzen in der Oszillation aufzutreten [Colantuoni A. et al., 1994]. Bertuglia et al. haben in Arteriolen dritten Grades (vgl. Duvernoy H. 1981, 1984, 1999) als dominierende Frequenz ebenfalls 0,1Hz ausgemacht [Bertuglia S. et al., 1996]. Dieselbe Frequenz war an der A. basilaris der Ratte darstellbar [Fujii K. et al., 1991a+b], aber auch im Kapillargebiet [Mayhew J.E. et al., 1996]. Golanov et al. bezeichnen diese stabilen, sinusoidalen Oszillationen ohne assoziierte neuronale Aktivität als „spontan“ [Golanov E.V. et al., 1994]. Sie scheinen in Auftreten und Amplitude von Blutdruckniveau und -Änderungen abzuhängen [Auer L.M. und Gallhofer B. 1981; Golanov E.V. et al., 1994; Hudetz A.G. et al., 1992]; eine Erhöhung der Amplitude trat auf, wenn der arterielle Blutdruck gesenkt wurde. Hinweise auf eine  $\Delta$ MABP-Abhängigkeit (Mean Arterial Blood

Pressure) des Auftretens von Oszillationen finden sich ebenfalls bei Rosenblum [Rosenblum B.R. et al., 1987] und Fasano [Fasano V.A. et al., 1988]. Blutdruckschwankungen, in erster Linie Abfall des MABP, scheinen die Entstehung von Oszillationen also zu fördern [Hudetz A.G. et al., 1992; Auer L.M. und Gallhofer B., 1981], ebenso wie zerebrale Blutungen [Auer L.M. und Gallhofer B., 1981].

Blutdruckschwankungen durch Manipulationen an der Katze beim Umlagern oder infolge von Narkosetiefenschwankungen und kleinere arterielle Blutungen sind im Versuchsablauf kaum vermeidbar und bei jeder Katze aufgetreten. Eine engmaschige, blutige Blutdruckmessung wurde nicht durchgeführt, um durch den Meßvorgang keine Störgröße wegen Blutverlustes in das System einzubringen. Der Literatur nach halten die Oszillationen nach Blutdruckschwankung über Minuten bis Stunden an. Navari [Navari R.M. et al., 1978] schlägt als zugrundeliegende Ursache des Vorgangs eine Exposition des trepanierten Kortex gegenüber der Atmosphäre vor und führt die Oszillationen auf eine Vasokonstriktion infolge Hyperkapnie und Alkalose zurück. Hudetz 1992 hingegen hat bei LDF-Messungen das Cranium nicht eröffnet und trotzdem Oszillationen beobachtet, die für primär vasogen gehalten wurden. In den vorliegenden Versuchen konnten Oszillationen beobachtet werden, obwohl der trepanierte Kortex zunächst durch temperierte, blutisotone Kochsalzlösung und ab Beginn der Aufnahmen durch Silikonöl abgedeckt wurde.

Der Einfluß der Anästhesie auf diesen Typ von Oszillation wird kontrovers diskutiert. Hundley [Hundley W.G. et al., 1988] hat eine Einflußnahme des Anästhetikums auf das Auftreten der Schwankungen vermutet. Mayhew hingegen hält einen solchen Zusammenhang für unwahrscheinlich [Mayhew J.E. et al., 1996].

Betrachtungen der Einflußnahme verschiedener Blutdrucksituationen auf die Oszillationen [Fujii K. et al., 1990] lassen eine autoregulative, im Rahmen normaler vasomotorischer Parameter lokal ablaufende, oszillatorische Durchblutungsanpassung möglich scheinen [Cooper R. et al., 1966], die sowohl bei deutlicher Hypotension als auch massiver Hypertension auf mechanischem Wege außer Kraft gesetzt wird. Denkbar wäre eine primär muskuläre Kompensationsmethode. Auer und Gallhofer [ibid.] sehen in der rhythmischen, glattmuskulären Aktivität einen myogenen Regulationsprozeß des Blutflusses im Hirn. Bedarfslagen könnten von muskulären Sensoren detektiert und auf muskulärem Niveau behoben werden. Modulatoreischen Einfluß auf Amplitude und Vasomotionsfrequenz scheinen die lokale  $K^+$  sowie  $Ca^{2+}$ -Konzentration auszuüben [Fujii K. et al., 1990; Gustafsson H., 1993]. Morita Tsuzuki 92 fanden Hinweise auf eine Beeinflussung der Frequenz durch Wandspannung und pH, während die Amplitude eine Abhängigkeit vom Abfall des lokalen

pO<sub>2</sub> zeigte. Für eine ubiquitäre Durchblutungsoszillation mit definierten funktionellen Eigenschaften ist zu fordern, daß sie auch mithilfe anderer Imagingmethoden nachweisbar ist. Weisskoff und Mitra [Weisskoff R.M. et al., 1992,1993; Mitra P.P. et al., 1997] haben Hinweise auf 0,1 Hz- Oszillationen auch in fMRI-Daten gefunden.

Tab.4: Gegenüberstellung von Arbeiten zu niederfrequenten Oszillationen

<u>Frequenz</u> (pro Minute)	<u>Amplitude</u> (Maximum)	<u>gemessen</u>		<u>Species</u>	<u>Referenz</u>
4.7	18%		A.basilaris	Ratte	Fujii et al. (1990)
4-6	k.A.	CBV	Kortex	Katze	Tomita et al. (1981)
5-10	k.A.	CBV	Kortex	Katze	Dora und Kovach (1980)
3-4	k.A.	Cyt	Kortex	Mensch	Jöbssis (1978)
6-12	k.A.	LDF	Kortex	Mensch	Fasano et al. (1988)
6-12	k.A.	LDF	Kortex	Mensch	Rosenblum et al. (1987)
0,5-8	30%	LDF	Kortex	Ratte	Dirnagl et al. (1989)
4-11	40%	LDF	Kortex	Ratte	Hudetz et al. (1992)
5-10	k.A.	NADH	Kortex	Katze	Dora und Kovach (1980)
6-12	± 30%	O <sub>2</sub> a	Kortex	Katze	Clark et al. (1958)
6	20%	O <sub>2</sub> a	Kortex	Mensch	Cooper et al. (1966)
2-9	10-15%		Piaarterien	Katze	Gotoh et al. (1982)
5-8	5%		Piaarterien	Katze	Auer und Gallhofer (1981)
5-6	10%		Piaarterien	Ratte	Lefler et al. (1990)
6	2-5%	CBV/ORIS	Kortex	Katze	Mayer (2004)

*CBV: cerebral blood volume; Cyt: Cytochrome a-a3 Redoxstatus; LDF: Laserdoppler- Flußmessung, O<sub>2</sub>a: Sauerstoff-Zustrom; NADH: NADH- Fluoreszenz; OI: optical Imaging, Differenzbildmessung, k.A.: keine Angaben*

Welche Rolle eine globalere Regulation der Durchblutung durch dopaminerge Neurone aus dem Mesencephalon, noradrenerge Fasern aus dem Locus coeruleus, serotoninerge Fasern aus dem Nucleus raphe und cholinerge Fasern aus dem basalen Frontalhirn, wie bei Attwell [Attwell D. und Iadecola C., 2002] beschrieben, für die Entstehung der 0,1 Hz- Oszillationen neuronalen Ursprungs spielt, ist bislang nicht geklärt. Verschiedene Arbeitsgruppen verwenden bei optische Ableitungen kreislaufstabilisierende Präparate wie Angiotensin [Palmer A.R., pers. Mitteilg]. Unter Medikation erweisen sich die Oszillationen als weniger gravierend und es können mit geringerem Nachbearbeitungs- und Mittelungsaufwand optische Maps des Kortex angefertigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Realisierung eines möglichst überschaubaren und einfachen Versuchsablaufs mit möglichst

wenigen unkalkulierbaren Variablen auf eine zusätzliche Medikation der Tiere zur Stabilisierung der Hirndurchblutung verzichtet. Hintergrund dieser Entscheidung war die Sorge, das Signal durch Manipulation an den dem Signal unmittelbar zugrundeliegenden Mechanismen der Gefäß- und Blutdruckregulation in unbekanntem Ausmaß und auf nicht nachvollziehbare Weise zu verfälschen und durch Manipulation an der Kopplung von Aktivität und Durchblutung letztlich ein nicht valides Signal abzuleiten.

## **8.2. Ongoing Activity**

Ein weiteres, mit dem vorgenannten verschwistertes Phänomen, dessen Einfluß auf das optische Signal gegenwärtig nicht hinreichend eingeschätzt werden kann, ist die über allen Kortexarealen elektrophysiologisch ableitbare Grundaktivität des Kortex, : „ongoing activity“. Die große Antwortvariabilität bei kortikalen elektrophysiologischen Ableitungen und damit die Maskierung des Signals durch „Noise“ stellt in der Neurophysiologie von jeher ein methodisches Grundproblem dar. Aus rezenter Sicht, die eine Neubewertung des Phänomens „Noise“ und „ongoing activity“ vornimmt, wird daraus ein grundsätzliches Problem. Die gängigen neurophysiologischen Verfahren zur Signaldarstellung nach Aktivierung eines bestimmten Gebietes nehmen ein einfaches Input-Output-Modell an, demzufolge der Output in einem reproduzierbaren und reliablen Verhältnis zum Input stehen sollte. Tatsächlich ist die Antwortvariabilität im anästhesierten wie im unanästhesierten Kortex jedoch erheblich. Der Stellenwert dieses Phänomens ist nicht völlig geklärt. Es ist unklar, ob es sich bei der im Kortex vorherrschenden Grundaktivität um ein unkoordiniertes Rauschen oder um einen koordinierten Vorgang handelt, dem ein System zugrunde liegt. Diese Frage bezeichnet zugleich die Probleme im Umgang mit der Grundaktivität, insbesondere die Fragestellung, ob sie durch Mittelung extrahiert werden soll und ob ein völliges Eliminieren überhaupt möglich ist. Die Mittelung elektrophysiologischer Daten ist durch kurze Latenzen aufgrund der Signalunmittelbarkeit und der hohen Repetitionsraten vergleichsweise unkompliziert, während beim ORIS keine Signalunmittelbarkeit besteht und zudem hohe Repetitionsraten, soll ein von Experiment-Beginn bis Ende konstanter physiologischer Zustand des Tieres gewährleistet sein, insbesondere bei langen Experimentdauern wegen des Biorhythmus des Tieres nur schwer realisierbar sind. Bei ORIS ist außerdem denkbar, daß die neuronale Grundaktivität, die mitunter erhebliche Amplituden erreichen kann, selbst solche Mechanismen in Gang setzt, die sich in der optischen Ableitungen als Signal darstellen. In der konsequenten praktischen Anwendung des „Signal plus Noise“- Konzeptes, das von einer Extrahierbarkeit eines Signals aus unkorreliertem Rauschen aufgrund einer festen

Zeitkopplung an den Reizzeitpunkt durch geeignete Mittelungsprozeduren ausgeht, wird die zunehmend diskutierte physiologische Bedeutung dieses scheinbaren Rauschens zwangsläufig übersehen und marginalisiert. Das gängige Averaging über eine große Anzahl von Durchgängen eliminiert die Dynamiken einer ursprünglich konzertierten, gegenüber dem Reizzeitpunkt von Durchgang zu Durchgang aber phasenverschobenen Grundaktivität zwangsläufig und ignoriert mit dem initialen Zustand des Kortex zugleich dessen Einflußmöglichkeit auf die Signalentstehung im Kortex und so auch die sich ergebenden Probleme für die Signaldarstellung. Es bestehen aber deutliche Hinweise auf einen erheblichen Einfluß der OA auf die evozierte Antwort. Auch in primären sensorischen Arealen ist die OA so groß wie das Signal [Tortorolo P. et al., 1998; Brandt M.E. et al., 1991]. Verschiedene Untersucher haben unabhängig voneinander beobachtet, daß bei wiederholtem Angebot desselben Stimulus erhebliche Unterschiede in der Amplitude der elektrophysiologisch abgeleiteten Antworten auftraten [Mainen C.F. und Sejnowski T.J., 1995; Arieli A. et al., 1995, 1996]. Diese Grundaktivität des Kortex und die dadurch ausgelöste Variabilität des Signals auf einen optimalen Stimulus hin scheint ebensogroß zu sein, wie das durch einen optimalen Stimulus evozierbare, gemittelte Signal selbst [Arieli A., 1995, Softky W.R., und Koch C., 1993; Snowden R.J. et al., 1992], mitunter sogar größer. Evozierte Aktivität scheint in großem Umfang deterministisch von äußeren Einflüssen bestimmt und nicht autonom und stabil zu sein. Angesichts solcher Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die Variabilität in ORES, LFPs, Single Units, EEG/ERP tatsächlich „Noise“ darstellt, der auszumitteln ist oder ob sich hierin ein zusätzlicher Input verbirgt, der eine Rolle in der kortikalen Funktion spielen könnte. Die OA könnte ein signalassoziierter, nichtzufälliger, möglicherweise konzertierter Mechanismus sein [Arieli A. et al., 1996]. Ungemittelte neuronale Antworten sind weder reliabel, noch korrelieren sie mit den Verhaltensreaktionen der Versuchstiere. Das Tier reagiert unter Umständen bei mehrfacher Reizung mit demselben optimalen Stimulus sowohl auf neuronaler wie auf behavioraler Ebene signifikant variabel [Arieli A. et al., 1995]. Die kortikalen Fluktuationen evozierter Aktivität scheinen dabei nicht notwendigerweise von der Verarbeitung der Eingänge abzuhängen. Kortikale Neurone sind vielmehr auch ohne optimalen Stimulus, auch in sensorischen Arealen und in konzertierter Weise aktiv [Noda H. und Adey WR., 1970, Abeles M. et al., 1995; Lampl I. et al., 1999] und die Spontanaktivität weist auch ohne Stimulus eine erhebliche Schwankungsbreite auf [Arieli A. et al., 1995, Tsodyks M. et al., 1999]. Tatsächlich treten bei Angebot eines optimalen Stimulus sehr ähnliche Muster auf, wie sie aufgrund von Spontanaktivität am ungereizten Kortex zu beobachten sind. Arieli hat

zudem beobachtet, daß die Amplitude evozierter Aktivität in Einzelneuronen dem zugrundeliegenden Kortexstatus von Millionen umgebenden Neuronen hochkorreliert ist [Arieli A. et al., 1995,1996]. Auch Einzelfaserableitungen und die Ableitung von lokalen Feldpotentialen (LFP) lieferten Hinweise auf konzertierte Aktivität in größeren Neuronenpopulationen [Tsodyks M. et al., 1999]. Bei niedriger Grundaktivität ergab sich eine niedrigamplitudige evozierte Aktivität, bei hoher Grundaktivität waren größere Amplituden zu beobachten. Es bestehen Hinweise darauf, daß bei gegebener Heterogenität der Antwortverhalten im Kortex bei subsequenten Reizen eine in sich korrelierte, stimulusunabhängige Aktivität größerer Neuronenpopulationen stattfindet [Tsodyks M. et al, ibid.], d.h. daß die Feuerrate eines spontanaktiven Einzelneurons erheblich von der bestehenden OA abhängt. Diese Beobachtung könnte das elektrophysiologische Korrelat zu den beobachteten ORIS-Wellen, die über den Kortex liefen, darstellen.

Da es sich bei OA um reguläre, neuronale Hirnaktivität mit allen assoziierten Prozessen handelt, kann sie mit allen gängigen funktionellen Methoden, von Einzelzelleitungen über LFPs, ORIS, ORES bis hin zu EEG und ERPs sowie MRT dargestellt werden und stört daher auch in entsprechender Weise alle genannten Ableittechniken. Die im EEG darstellbare OA ist behavioralen Zuständen korreliert [Arieli A. et al., 1992, 1995]. Bereits Sayers et al., 74 haben aus einer ERP-Studie im primären auditorischen Kortex auf eine phasenmodulatorische Reorganisation der Spontanaktivität durch auditorische Stimuli geschlossen. [Sayers B.M. et al., 1974 a+b], gleiches bei Torterolo am Meerschweinchen-A1 [Torterolo P. et al., 1998] und Brandt et al. im visuellen Kortex [Brandt M.E. et al., 1991a]. Die Nachweisbarkeit einer OA mittels ERP entspricht einer mittlerweile gängigen Ansicht in der Neurowissenschaft, derzufolge die Rhythmen der OA die funktionelle Integration externer Stimuli in einen aktuellen Kontext leisten und so zur situationsadäquaten Lösung höherer Aufgaben beitragen [Penny W.D. et al., 2002]. Die Bedeutung der Fluktuationen für die Informationsverarbeitung im Kortex wird kontrovers diskutiert. Denkbar wäre ein modulatorischer Prozeß durch übergeordnete Zentren, etwa den Thalamus, eine Art "Boostereffekt" durch Schaffung von Transienten [Mainen Z.F. und Sejnowski T.J., 1995] oder auch die Beibehaltung der herkömmlichen Betrachtung der Grundaktivität als ungeordnetes Rauschen, also „Noise“. Aus anatomischer und physiologischer Sicht lassen sich kortikale Fluktuationen erklären. Man weiß, daß ein einzelnes Neuron über 10.000 bis 20.000 synaptische Kontakte verfügt [O’Kusky J. und Colonnier M., 1981 Colonnier M. und O’Kusky J., 1981, Cragg B.G., 1975]. Da die durchschnittliche Spontanfeuerrate bei 5 Spikes/sec. liegt, empfängt jedes Neuron zwischen 50.000 und 100.000 synaptische Inputs/sec. [Abeles M., 1982; Legendy C.R. und

Salzman M., 1985], wobei viele der synaptischen Kontakte von identischen Neuronen Stämmen und zumindest kohärent sind. Diese spontane synaptische Aktivität ist bekannt dafür, deutliche Fluktuationen im neuronalen Membranpotential auslösen zu können. Diese gleichen dem EEG einer Oberflächenelektrode [Elul R., 1971; Klee M.R. et al., 1965; Steriade M. et al., 1993]. Dadurch wechselt die Rate, bei der das Membranpotential den Schwellenwert für eine Entladung überschreitet, ständig. Der physiologische Nutzen dieses Prozesses in der Informationsverarbeitung ist noch nicht vollständig verstanden.

Die Kenntnis dieser Vorgänge wirft die Frage auf, inwieweit bei Annahme einer erheblichen Beeinflussung des Spikeverhaltens einzelner Neurone wie Neuronengruppen eine sinnvolle Informationsübertragung denkbar ist. Es ist nicht bekannt, wie das Gehirn in Sekundenbruchteilen eine Information erkennen und verwerten kann, wenn das Signal ständig gestört wird. Bis heute bleibt unklar, wie Neurone Informationen durch den Kortex transportieren, obwohl man weiß, daß diese Informationen durch IPSPs und EPSPs bzw. Aktionspotentiale signalisiert werden. Grundsätzlich verarbeiten Neurone Informationen, indem sie dauernd variierende Inputsignale in Abläufe klarer Aktionspotentiale umsetzen. Das Codingschema, welches die Umsetzung zwischen Stimulus und Antwort leistet, ist bislang angesichts des hochgradig variablen Timings sukzessiver Spikes [Softky W.R. und Koch C., 1993] dennoch eines der ungelösten Probleme in der Neurophysiologie. Die Beobachtung und Interpretation dieser Unregelmäßigkeit hat zu unterschiedlichen Konzepten über kortikale Organisation und Informationsübertragung geführt.

Das „integrate-and-fire“-Modell [Shadlen M.N. und Newsome W.T., 1994; Softky W.R. und Koch C., 1993] beschäftigt sich mit der Möglichkeit einer Entladung als Resultat einer bestimmten Anzahl von Inputs. Die einfachste Codierung wäre ein Spike für jeden Inputpuls. Synaptische Ströme sind hierfür allerdings zu klein und intrazelluläre Ableitungen sehen sehr verrauscht aus. Eine 1:1 Umsetzung wäre nur denkbar, wenn das intrinsische Rauschen der Neuronen klein wäre. Diese Voraussetzung wird mittlerweile kritisch diskutiert [Mainen Z.F. und Sejnowski T.J., 1995; Schellart N.A. und Spekreijse H., 1973; Levine M.W. et al., 1988; Shadlen M.N. und Newsome W.T., 1994].

Hingegen wurden Hinweise auf die Umsetzung eines Reizes in eine Durchschnittsfeuerrate gefunden [Mainen Z.F. und Sejnowski T.J., 1995; Shadlen M.N. und Newsome W.T., 1994]. Außerdem sind kortikale Aufnahmen durch hochgradig irreguläre Interspikeintervalle gekennzeichnet, sowohl in Stimulus- als auch in Ruhebedingungen. Es müßten demnach mehrere Impulse integriert werden. Mathematische Modellbetrachtungen [Mainen Z.F. und Sejnowski T.J., *ibid.*; Shadlen M.N. und Newsome W.T., *ibid.*] erwiesen jedoch, daß bei

zufälligem Input-Timing und nach Integration einer bestimmten Zahl an Inputs eine weitgehend regelmäßige Entladung eines solchen hypothetischen Neurons zu erwarten wäre, wie auch ein Geigerzähler trotz stochastisch auftretender Zählereignisse ein relativ regelmäßiges akustisches Muster ausgibt.

Ein reizvolleres Konzept, das von einer Koinzidenzdetektion durch Neurone ausgeht, also eine Mustererkennung annimmt und damit eine Vielfalt an verschiedenen Informationsqualitäten übermitteln könnte [Softky W.R., und Koch C., 1993], wäre nichtredundant und erheblich stör anfällig, zudem ist ein reliabel gleichförmiger Output bei gleichen, subsequenten Reizen, der nach Softky ja nur ein „scheinbares Rauschen“ wäre, angesichts der nachweislich ablaufenden inhibitorisch-exzitatorischen Wechselwirkungen [Shadlen M.N. und Newsome W.T., *ibid.*] theoretisch nicht nachvollziehbar und in der Praxis nicht beobachtet worden. Das gegenwärtig überzeugendste Modell, das allen Anforderungen, wie den gegebenen stochastischen Inputs und Outputs bei Berücksichtigung modulierender, parallel stattfindender Aktivität, am ehesten gerecht wird, präsentierten Gerstein G.L. und Mandelbrot B. bereits 1964. Der Ansatz dieses „random walk“- Modells wurde von Shadlen und Newsome übernommen. Es stellt die Verarbeitung von Information in den breiten Kontext einer situativ modulierenden OA. Der Output eines Neurons wäre hierbei durch konkurrierende hemmende und exzitatorische Reize einer parallelen Aktivität justabel wie der Arbeitsbereich eines Meßgerätes. Hierdurch wäre ein konstantes Ansprechen des betreffenden Neurons durch eine dauernde Neueinstellung des intrazellulären Potentials gegeben. Das random-walk- Konzept kann einerseits das hochirreguläre Feuermuster und die Inkohärenz von Outputs und Inputs erklären und andererseits überzeugend die sich hieraus ergebenden Vorteile für das Neuron darlegen, das nicht übersättigt werden könnte und auch bei wechselnder Beanspruchung weitestgehend empfangsbereit bliebe. Dies wäre vereinbar mit den Ergebnissen von Galarreta und Hestrin, die zeigten, daß sich neokortikale exzitatorische Neurone in Gegenwart von OA rascher von einer use-dependent-depression infolge hochfrequenten Feuerns erholen und damit schneller wieder zur Verfügung stehen [Galarreta M. und Hestrin S., 2000]. Diese Hypothese wird sowohl von neueren neurophysiologischen Erkenntnissen [Rosenmund C. et al., 1993, Bekkers J.M. et al., 1990; Gulyas A.I. et al., 1993] über die Reliabilität und Stärke inhibitorischer gegenüber exzitatorischen Potentialen, als auch durch mikroanatomische Erkenntnisse über zahlenmäßige Verteilung und relative Lage am Soma von inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen, ferner durch Verhaltensstudien an Versuchstieren bestätigt [Shadlen M.N. und Newsome W.T. 1995]. Weitere Unterstützung erfährt das Konzept durch den Nachweis, daß Neurone reproduzierbar auf relativ schwache

Input-Fluktuationen antworten können und regelmäßige Entladungsmuster vor allem durch Transienten im Stimulusinput zustandekommen. Ein dynamisch justiertes Neuron könnte demnach regelmäßiger und reliabler feuern [Mainen Z.F. und Sejnowski T.J., 1995]. Aufgrund neuerer Ansätze im Verständnis des kortikalen „Noise“ verläßt man heute zunehmend das Konzept eines präzisen temporalen Codes, der die reizvolle Möglichkeit eines praktisch omnipotenten Mustererkennungs-codes beinhalten würde. Man nimmt vielmehr an, daß das Timing neuronaler Spikes an sich wenig, wenn überhaupt, Information transportiert; stattdessen geht man von einem „noisy rate code“ [Shadlen M.N. und Newsome W.T., 1994] aus, der zwar eine weit geringere Vielfalt in der Informationsübermittlung zuläßt und im Wesentlichen einem Zeit-Averaging entspricht, dabei aber eine größere Zuverlässigkeit in der Ansprechbarkeit und Signalübertragung bietet. Inhibitorische Neurone balancieren in diesem Modell das exzitatorische Bombardement, damit das Neuron nicht übersättigt.

Die Spontanaktivität wie auch das Antwortverhalten des Kortex nach Reizung mit einem optimalen Stimulus ist nach diesem Ansatz von dynamisch veränderlichen, vorbestehenden kortikalen Zuständen zumindest beeinflußt, wenn nicht determiniert. Die kortikalen Antworten auf einen präsentierten Stimulus sind mithin nicht als verhältnismäßige Reflexion und Entsprechung des Inputs zu verstehen, sondern als Simile eher vergleichbar mit dem zusätzlichen Wellenschlag, den ein ins Wasser geworfener Stein auf ohnehin unruhiger Wasseroberfläche hervorruft. Was in der Elektrophysiologie häufig als stochastischer „Noise“ verstanden wird, könnte auch der konzertierte Prozeß einer „ongoing activity“ zu sein.

Auf einem höheren Organisationsniveau scheint der OA-Rhythmus mit dem Ursprung der kortikalen Inputs in Verbindung zu stehen [Arieli A. et al., 1995]. Einflußnahmen auf den Grundzustand des Kortex scheinen aus höheren und niedrigeren Zentren möglich [Felleman D.J. und Van Essen D.C., 1991; Salin P.A. und Bullier J., 1995;]. Kortikale Neurone empfangen ihre Inputs hauptsächlich aus subkortikalen und kortikalen Quellen. Obwohl weniger als 1% der Afferenzen, die im Kortex enden, aus dem Thalamus stammen [Braitenberg V., 1978], ist ein Großteil der EEG-Aktivität das Resultat synaptischen Inputs vom Thalamus an den Kortex, vor allem an die Pyramidenzellen [Ball G.J. et al., 1977]. Weil es viel rückgekoppelte Aktivitäten zwischen Kortex und Thalamus und kortikalen Feldern untereinander gibt, liegt die Annahme einer maßgeblichen Beeinflussung durch thalamische Aktivität nahe.

Da die OA jedoch als kohärente Aktivität größerer Neuronengruppen auftritt [Arieli A. et al., 1996], ist für Signalleitung und den Signalerhalt davon auszugehen, daß sich die kortikale evozierte Aktivität aus einem reproduzierbaren Antwortteil und einem veränderlichen Anteil

an OA zusammensetzt, der den Hirnzustand reflektiert- und wegen seines nichtstochastischen Auftretens physiologisch auch nicht ohne weiteres weggemittelt werden kann, zumindest nicht über einen population-coding Prozeß. Nur Mittelung über fortlaufende Durchgänge könnte das leisten und das nur, wenn während der Aufnahme verschiedene, statistisch verteilte OA-Muster durchlaufen werden. Ein Problem, das ohne Kenntnis des jeweiligen OA- Zustandes nur schwer lösbar ist. Dasselbe Problem besteht daher bei den Mittelungsprozeduren im Versuch. Einen deutlichen Hinweis auf die Determiniertheit des kortikalen Antwortverhaltens durch OA liefert Arieli [Arieli et al., 1995]: in ORES-Aufnahmen wurde ein initialer Schnappschuß der OA auf fortlaufende Recordings durch geeignete Verrechnungsalgorithmen in Abzug gebracht, um idealerweise eine reine Aktivitätskarte zu erhalten. Der Signalverlauf konnte mit hoher Validität vorhergesagt werden; allerdings verschlechterte sich die Qualität der Vorhersage mit zunehmendem zeitlichen Abstand zum Initialzustand, da sich die OA im Verlauf dynamisch änderte und der Algorithmus lediglich einen festen, initialen Zustand zur Verrechnung bringen konnte. Hieran wird ein möglicherweise erheblicher Einfluß der OA auf optische Ableitungen deutlich.

Die großen Amplituden und Dynamiken der OA, die mit ORES, LFPs und single units activity gemessen wurden und im EEG, in ERPs und fMRI darstellbar sind, lassen auf wichtige, der kortikalen Informationsverarbeitung zugrundeliegende Mechanismen schließen. Hierfür kämen thalamische Inputs, aber auch intra- und interkortikale Verbindungen infrage, denn letztere sind reichlicher und wären geeigneter, den Kortex zu beeinflussen. Die OA könnte die Antworteigenschaften des Kortex modulieren und sie könnte eine Rolle in der Verarbeitung langsamer Prozesse, wie Aufmerksamkeit und Konzentration, spielen. Ihre Eigenschaft einer zustandsabhängigen Beeinflussung neuronaler Aktivität könnte auf eine Rolle in der Anpassung des Verhaltens eines Individuums an den herrschenden Kontext hindeuten. Hinweis darauf wären ferner die Interdependenzen zwischen einem sensorischen Input und dem Verhalten des Tieres nach Maßgabe äußerer Determinanten.

Möglicherweise stellt die OA das Substrat der Integration sensorischer und kognitiver Prozesse in Verhaltens- und Bewußtseinszustände dar [Arieli A. et al., 1996]. Es würde eine innerhalb des behavioralen Umfeldes des Tieres adäquate Reaktion auf einen Stimulus moduliert. Ongoing Activity könnte im Zusammenspiel mit evozierter Aktivität eine Manifestation von „Kontext“ sein [Aertsen A. und Preissl H., 1991]. Das OA-Muster, welches Arieli et al. beobachteten, bewegte sich mit wechselnden Maxima wie in Zeitlupe über den Kortex [Arieli A. et al., 1995, 1996], damit entspricht es dem Phänomen der 0,1Hz Oszillation, das in den vorliegenden Ableitungen bei sämtlichen Versuchstieren dargestellt

werden konnte. Es ist denkbar und wahrscheinlich, daß die OA aufgrund ihrer angenommenen physiologischen Natur, nämlich der neuronalen Antwort infolge intrakortikaler und thalamischer Triggerung, dieselben physiologischen Mechanismen zur Erzeugung, Aufrechterhaltung und Elimination ihrer neuronalen Aktivität nutzt wie die Neuronen, die mit der evozierten Signalverarbeitung selbst beschäftigt sind. Demnach ist nicht auszuschließen, daß auch infolge von OA eine aktivitätsgekoppelte Gefäßantwort erfolgt und damit der gleiche Mechanismus in Gang kommt, der sich auch im ORIS als Signal darstellt. Die OA würde sich damit als mächtiges OI-Signal ohne Bezug zum Reiz und auch in Ruhesituationen in der ORIS- Ableitung zeigen. Dies entspricht den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen von reizunabhängiger, konzertierter Aktivität. Die Eliminierung einer solchen, konzertierten Aktivität ist theoretisch schwierig und auch praktisch in einem gegebenen neurophysiologischen Versuchsaufbau nicht ohne weiteres realisierbar. Durch die feste Latenz gegenüber dem Reizzeitpunkt, mit der das OI-Signal auftreten sollte, besteht nach dem „Antwort = OA+evoziertes Signal“-Modell zwar grundsätzlich die Möglichkeit einer Mittelung über mehrere Trials. Da die OA jedoch aktuellen Beobachtungen zufolge keine stochastische Aktivität im bisherigen Verständnis von „Noise“ darstellt, sondern offenbar im hohen Maße konzertiert ist und über längere Zeiten wellenförmig mit gleicher Frequenz auftritt, ist eine Eliminierung des Phänomens durch Mittelung nicht trivial. Anders als in der Elektrophysiologie dauert ein Durchgang im ORIS rund eine Minute, was die Zahl möglicher Mittelungs-Durchgänge bei einem durch den Vitalzustand des Versuchstieres vorgegebenen Zeitrahmen deutlich reduziert. Außerdem baut sich ein ORIS- Signal über einen Zeitraum von etwa 6-10sec. langsam auf, was die Störanfälligkeit weiter erhöht- insbesondere weil die Signalamplituden auch innerhalb eines abgeleiteten Kortextyps mit der Zeit parallel zur OA variieren. Ein Umstand, der die Errechnung des Signals weiter erschwert. Zur Darstellung eines brauchbaren und deutlichen Signals ist demnach ein exzessives Averaging von hunderten, u.U tausenden Durchgängen pro Versuch nötig.

#### **8.4. Hirndurchblutung und Regulation**

Es wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sowohl spontane als auch stimulusassoziierte Signale vom primären auditorischen Kortex abgeleitet, wobei die lokale Verteilung der optischen Signale, ausgelöst durch vermehrten Blutfluß als Antwort auf Stimulation, offensichtlich nicht direkt die aus elektrophysiologischen Ableitungen bekannten Orte der CF-Bänder reflektierte. Eine naheliegende Erklärung für dieses Phänomen wäre die

Annahme einer für ORIS-Zwecke unzureichenden Übereinstimmung der topographischen Ausdehnung von Durchblutung und lokaler Spikeaktivität im primären auditorischen Kortex der Katze.

Nach rezenter Meinung besteht zwischen der kleinsten morphologisch autonomen Einheit neuronaler Aktivität, der Kortexkolumne, und der kleinsten aktivierbaren Einheit kortikaler Durchblutung keine unmittelbare anatomische Beziehung. Kortexkolumnen scheinen keine individuelle, „private“ Blutversorgung durch deckungsgleiche vaskuläre Kolumnen zu erhalten. Darüberhinaus wird mittlerweile das Konzept streng lokal in Reaktion auf lokale Aktivität regulierter Durchblutung, und damit eine der wichtigsten theoretischen Grundlagen für die gängige Annahme hoher Auflösung in der OI-Ableitung, infrage gestellt. Die Ergebnisse neuerer Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß die gängige Vorstellung, erhöhter Blutfluß sei eine Konsequenz lokalen Metabolismus oder einer lokalen O<sub>2</sub>-Ausschöpfung [Roy C. und Sherrington C., 1890; Hoge R.D. et al., 1999a+b; Magistretti P.J. et al., 1999; Magistretti P.J. und Pellerin L., 1999; Jueptner M. und Weiller C., 1995], zur Erklärung der bedarfsgesteuerten Durchblutungsregulation im Kortex möglicherweise nicht ausreichend ist. Auch Golanov und Yamamoto [1994] halten gesteigerten lokalen Metabolismus nicht für ausschlaggebend sondern nehmen stattdessen eine maßgeblich zerebrovaskuläre bzw. neuronal gesteuerte Genese an, da diese die für eine sinnvolle Bedarfskopplung zu fordernden, kurzen Latenz zwischen neuronaler Aktivität und Durchbutungssteigerung eher gewährleisten könnte. Obgleich also aktivitätsbedingt angehäuften Metabolite wie die Anhäufung von H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, sauren Valenzen, K<sup>+</sup> etc., wie zahllose Studien verdeutlicht haben, jeweils selbst eine vasodilatatorische Wirkung entfalten, könnte für die unmittelbare, bedarfsgekoppelte Versorgung aktiver Areale ein anderer Mechanismus mitverantwortlich sein.

Im ZNS wird Energie vor allem zur Wiederherstellung der Homöostase nach exzitatorischen postsynaptischen Potentialen gebraucht, mit einem kleineren Anteil für die Repolarisation nach APs, außerdem zur Aufrechterhaltung des Ruhepotentials von Nerven- und Gliazellen sowie für das Transmitterrecycling (vornehmlich in Astrozyten). Dieser Energieverbrauch scheint die Durchblutung nicht unmittelbar zu steigern [Attwell D. und Iadecola C., 2002]. Lokale rCBF Veränderungen korrelieren zwar mit O<sub>2</sub> Verbrauch [Hoge R.D. et al., 1999], H<sup>+</sup> und CO<sub>2</sub> Anstieg, dies besagt aber nicht, daß diese Faktoren den Blutfluß unmittelbar bedingen. O<sub>2</sub> und Glucosebereitstellung scheinen nicht durch eine Mehrdurchblutung aufgrund einer Verarmung dieser Stoffe ausgelöst zu sein [Mintun M.A. et al., 2001; Powers W.J. et al., 1996]. Vielmehr häufen sich mittlerweile Hinweise auf eine Beeinflussung der

lokalen Durchblutung durch schnelle, glutamaterge und GABAerge Innervation im Hippokampus, Cerebellum und Neokortex. Die Hemmbarkeit der Durchblutungssteigerung durch non-NMDA-Rezeptor-Antagonisten, NOS-Hemmung und Adenosin-Antagonisten [Akgören N. et al., 1994; Li J. und Iadecola C., 1994; Yang G. et al., 1999], Dilatationen an Gefäßen durch GABA<sub>A</sub>-Stimulation und Konstriktion durch GABA<sub>A</sub>-Blockade sowie eine blutflußsteigernde Wirkung zerebellärer Parallelfasern infolge lokaler Glutamininjektion scheinen diese Annahme zu unterstützen. Topisch appliziertes Glutamat oder NMDA dilatiert darüberhinaus Piaarteriolen und präkapilläre Arteriolen. Der Effekt wird durch NOS-Inhibition abgeschwächt. [Iadecola C. et al., 1996; Faraci F.M. und Breese K.R., 1993; Fergus A. Lee K.S., 1997]. Offenbar findet ein Glutamat-gesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Influx in postsynaptischen Neuronen statt, der zu einer Erhöhung von Adenosin und NOS-Aktivierung führt. Hierdurch würde eine Dilatation ausgelöst, als Resultat einer Depolarisation der NO- und adenosinausschüttenden Zellen, wie auch der präsynaptischen, glutamatergen Neurone. Lokale rCBF-Änderungen korrelieren zudem nicht immer mit den Spikeraten der betreffenden Neurone [Mathiesen C. et al., 1998; Lauritzen M., 2001; Logothetis N.K. et al., 2001] auch im visuellen Kortex korrelieren sie eher mit Feldpotentialen, was gegen eine eins zu eins Umsetzbarkeit des Blutflußsignals in ein Aktivitätssignal spricht- und damit gegen eine unmittelbare vor-Ort- Regulation.

An einer globaleren, nicht unmittelbar auf aktuellen Bedarf hin ausgerichteten Kontrolle der Durchblutung scheinen dopaminerge [Krimmer L.S. et al., 1998], noradrenerge [Raichle M.E. et al., 1975] und serotoninerge [Cohen Z., et al., 1997], an der Dilatation cholinerge [Chedotal A. et al., 1994; Sato A. und Sato Y., 1992] Neurone beteiligt zu sein. Eine globalere Regulation durch dopaminerge Neurone aus dem Mesencephalon, noradrenerge Fasern aus dem Locus coeruleus, serotoninerge Fasern aus dem Nucleus raphe und cholinerge Fasern aus dem basalen Frontalhirn wäre denkbar [Attwell D. und Iadecola C., 2002]. Darüberhinaus verursacht die Aktivierung verschiedener neuronaler Wege durch den NF und die RVLM, Area C1, eine Steigerung des Flusses ohne Metabolismussteigerung [Reis D.J. und Golanov E.V. 1997], moduliert durch muskarinische Rezeptoren und NO. Das heißt, daß eine lokale Änderung der Spikeaktivität, die nicht zugleich die Signalwege, welche den Blutfluß kontrollieren, beeinflusst, keine blutflußabhängigen Signale (BOLD und OI) ergeben würde. RCBF- und lokaler Energieverbrauch laufen zwar meist parallel ab, können aber offenbar auch dissoziiert sein. Eine lokale CBF- Änderung kann also ohne lokalen Energieverbrauch stattfinden und eine lokale Spikeerhöhung kann ohne Erhöhung des rCBF stattfinden, womit rCBF von lokaler Aktivität entkoppelt wäre. Natürlich ergeben sich hieraus Konsequenzen für

die Validität und Reliabilität des OI- Signals. Eine denkbare Erklärung für die Inkongruenz der optischen und elektrophysiologischen Daten wäre demnach eine möglicherweise unzulängliche Übereinstimmung zwischen dem Prozeß neuronaler Spikeaktivität und dem Prozeß der lokalen Durchblutungserhöhung am auditorischen Kortex der Katze.

### **8.5. Kortizes unterscheiden sich in Ableitbarkeit über OI**

Es ist bekannt, daß an anderen als den akustischen Kortizes optische Ableitungen ohne größeren Mittelungs-Aufwand und mit brauchbarer räumlicher Auflösung gelingen. Insbesondere am sensiblen Nagerkortex [Dinse H.R., Spitzer M., pers Mittlg., Heß A. und Scheich H., 1996; Nemoto M. et al., 1999], am visuellen Kortex [Grinvald A., Bonhoeffer T., 1996] oder am Whisker- Barrel-Kortex der Nager [Martindale J. et al., 2003]. Interessant ist in diesem Zusammenhang insbesondere der Vergleich zwischen den ORIS-Ableitungen von Bakin J.S. et al., 1996 am auditorischen Kortex der Ratte und den Ableitungen von Nemoto M. et al., 1999 am somatosensorischen Kortex der gleichen Spezies: Nemoto erhielt Signale von  $3 \times 10^{-2}$  am sensorischen Kortex, während Bakin am auditorischen Kortex maximal Amplituden bis  $1 \times 10^{-4}$  erreichte. Eine Vielzahl von Aussagen über die hohe räumliche Auflösung des OI-Signals stammen von Ableitungen des visuellen, sensiblen oder des Whisker-Barrekkortex. An den genannten Kortizes unterscheiden sich Amplituden und Latenzen des OI-Signals deutlich von den am auditorischen Kortex ableitbaren Signalen. Darüberhinaus ist die Ableitbarkeit der Kortizes mit verschiedenen Wellenlängen äußerst unterschiedlich. Die Ableitung des auditorischen Kortex der Katze mit rotem Licht etwa scheint eine Herausforderung zu sein [Dinse H.R., pers. Mittlg, Bakin J.S. et al., 1996], während für Ableitungen *mit rotem* Licht an sensiblen Kortizes [Godde B. et al., 1995]) und am Whisker-Barrel-Kortex bessere Ergebnisse bei geringerem Mittelungsaufwand berichtet werden (Dinse H.R. et al., Nemoto et al 1999). Die Ursache der unterschiedlichen Ableitbarkeit verschiedener Kortizes mit optischen Mitteln könnte in unterschiedlichen Vaskularisierungsdichten dieser Kortizes [Panesar J. et al., 2001; Harrison R.V. et al., 2002; Spitzer M et al., 2001] liegen oder auch in der unterschiedlichen Ausprägung der Mechanismen, welche letztlich lokale Aktivität an erhöhte Durchblutung koppeln. So ist für die hochspezialisierten und in histologischen Färbemethoden als morphologische Einheiten klar separierbaren Barrels des Whisker-Barrel-Kortex eine relativ eng an die histologische Barrelstruktur gekoppelte Gefäßversorgung wahrscheinlich [Peterson P.E. et al., 1998; Woolsey T.A. et al., 1996] und damit eine enge Aktivitätskopplung des Gefäßvolumens nachvollziehbar. Auf dieser Basis ist ein Absorptionssignal von hoher Amplitude und

Kolokalisation möglich. Ähnliches gilt für die orientierungsspezifischen Kolumnen am visuellen Kortex, dessen Kolumnenstrukturierung nachgewiesen ist [Horton J.C. und Hubel D.H., 1981; Livingstone M.S. und Hubel D.H. 1984; Wong-Riley M., 1979]. Ableitungen am auditorischen Kortex der Katze hingegen scheinen in erster Linie mit grünem Licht machbar zu sein, sind aber auch dann nicht trivial: während Dinse/Bochum Erfolgsraten um 90% angibt [Dinse H.R., pers. Mittlg.], erhielt Spitzer/Australien nur bei 3/10 seiner Katzen stimulusassoziierte Absorptionszuwächse nach akustischer Reizung [Spitzer M. et al, 2001]. Nur in einer Stimulussituation einer bei zwei Tieren zusätzlich vorgenommenen elektrophysiologischen Ableitung konnte Spitzer eine signifikante Korrelation elektrophysiologischer Daten mit optisch erhobenen Daten feststellen. [Spitzer M. et al., 2001]. Bedenkenswert im Hinblick auf Anwendungen, bei denen eine hohe räumliche Auflösung eine Rolle spielt, ist außerdem die Tatsache, daß die Methode hohe intraindividuelle Schwankungsbreiten in der räumlichen Auflösung mit sich bringt. Innerhalb einer Experimentalausführung mit einem bestimmten, festen Tonstimulus waren bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen selten zwei Durchgänge mit identischen optischen Aktivierungsmustern erkennbar. Andere Gruppen bestätigen diese Beobachtungen [Dinse H.R., pers. Mitteilung, Spitzer M., pers. Mitteilung]. Dieser Punkt ist bei der Beurteilung der räumlichen Auflösung der Methode zweifellos ausschlaggebend. Ein Signal ergibt sich erst aus der Mittelung einer Vielzahl von Einzeldurchgängen. Die Notwendigkeit zur Durchführung einer großen Zahl von Durchgängen wegen des hohen Mittelungsbedarfes läßt die Vorteile der Methode, die ja in hoher Auflösung bei geringem Zeitaufwand bestehen sollten, schwinden.

### **8.6. Antwortverhalten in A1**

Die charakteristischen Antwortigenschaften des A1 der Katze könnten anteilig an der mäßigen Übereinstimmung der elektrophysiologischen und optischen Datensätze und auch an der unterschiedlichen Ableitbarkeit verschiedener Kortizes beteiligt sein. Ein großer Anteil der auditorischen Neurone antwortet im Bereich ihrer besten Frequenz mit einer aus einer kurzen Serie von Spikes bestehenden on- Antwort, gefolgt von einer Spike-Unterdrückung für die Dauer des Stimulus. Als Reiz wurde ein dreisekündiger Ablauf von Sinustonpips (vgl. Harrison R.V. et al., 1998) verwendet. Möglicherweise war dieser Stimulus am auditorischen Kortex zur Darstellung optischer Signale nicht ausreichend. Am visuellen Kortex, der als deutlich besser ableitbar gilt, hat visuelle Stimulierung anders als am auditorischen Kortex eine mehrsekündige kortikale Aktivität zur Folge [Hubel D.H. und Wiesel T.N., 1959; Spitzer

M., 2001]. Aufgrund dieser Unterschiede kann die Feuerrate optimal stimulierter Neurone im visuellen Kortex die im auditorischen Kortex um das 15fache übersteigen [Roe A.W. und Ts'o D.Y., 1995; Sengpiel F. und Blakemore C., 1994]. Auch die Entladungsraten im Schnurrhaarkortex liegen deutlich über denen im auditorischen Kortex. Es wäre demnach denkbar, daß die niedrige Entladungsrate im auditorischen Kortex nach akustischer Stimulation des Hörnerven zur Erzeugung eines verlässlichen und starken Signals nicht ausreichend ist. Die Darstellbarkeit einer Cochleotopie bei Versuchstier P124 in der Folge elektrischer Stimulation nach Mittelung über 30 Durchgänge scheint diese Annahme zu bestätigen.

### **8.7. Ableittiefe und Lateralverzerrung durch Blutfluß**

ORIS und elektrophysiologische Ableitungen arbeiten mit verschiedenen Ableittiefen. Optische Signale werden, je nach Eindringtiefe des Lichts und Einfokussierung, in erster Linie von Kortexschichten bis 500µm aufgenommen. [Dinse H.R., pers. Mittlg., Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996]. Die elektrophysiologischen Daten wurden oberflächlich abgeleitet. Es stellt sich die Frage, ob die Antworteigenschaften des Kortex mit zunehmender Tiefe variieren. Eine Reihe von Untersuchern hat unter Bestätigung der bekannten Kolumnenorganisation des Kortex einheitliche Antworteigenschaften über alle Tiefen des Kortex ausgemacht [Abeles M. und Goldstein M.H., 1970; Imig T.J. und Adrian H.O., 1977, Reser D.H. et al., 2000] Clarey stellte eine Signalhomogenität durch alle Kortexschichten bei 72% aller Ableitungen fest [Clarey J.C. et al., 1994]. Damit wäre eine Inhomogenität von Signalen auf eine geringe Anzahl von Ableitorten beschränkt. Zudem ist unklar, in welchem Maße derartige Tiefeneffekte die Vergleichbarkeit der optischen und der elektrophysiologischen Methoden stören könnten, weil unklar ist, ob optische Signale infolge von subthreshold- Aktivität der Neurone in den oberflächlichen kortikalen Schichten erzeugt werden oder infolge von supratreshold-Aktivität in den mittleren Schichten. Die Tiefendifferenz wäre nur im letzteren Falle relevant. Ein weiterer Punkt ist die Frage, inwieweit es wegen Blutflusses zu einer Lateralverzerrung des optischen Signals parallel zur Kortexoberfläche gekommen sein könnte. Diese Möglichkeit erscheint unwahrscheinlich, weil die den Kortex speisenden Arteriolen senkrecht in den Kortex penetrieren [Edvinsson L. et al., 1982; Duvernoy H.M., 1981, 1984, 1999]. Da die Durchblutung des Kortex aber nicht ohne weiteres als kolumnenorientiert gelten kann, sondern sich wahrscheinlich als ein feines Netzwerk verzweigter Kapillaren durch den Kortex erstreckt, mit jeweils bedarfsgekoppelter Mehrdurchblutung, erscheint eine anatomische Ursache einer Lateralverschiebung des

optischen Signals über das Areal elektrophysiologischer Aktivität hinaus, wie z.B. anlässlich des Vergleichs ORIS/Elektrophysiologie bei P126 vermutet werden könnte, denkbar.

### **8.8. Subthreshold-Aktivität und „Inhibitionssignal“**

Bei lokaler, visueller Stimulation einzelner Neurone stellten Das und Gilbert [Das A. und Gilbert C.D., 1995] fest, daß die lokale Ausbreitung des aufgezeichneten optical- Imaging-Signals eine 20fach größere Ausdehnung hatte, als die elektrophysiologisch abgeleitete Spikeaktivität. In einer zweiten Studie wurde subthreshold Aktivität ohne Spikes gefunden, aber dennoch optische Signale festgestellt [Toth L.J. et al. 1996]. Demnach zeigen zumindest am visuellen Kortex Stimuli, die lokal begrenzte Spikemuster erzeugen, wie auch Tonstimuli Aktivitätsmuster im auditorischen Kortex erzeugen, erhebliche Differenzen zwischen den elektrophysiologischen und optischen Ableitungsbildern, die möglicherweise auf die Darstellung von Subthreshold- Aktivität in der optischen Ableitung zurückzuführen sind. Viele A1-Neurone sind innerhalb ihrer Frequenzdomäne von inhibitorischen Seitenbändern eingerahmt [Calford M.B. und Semple M.N., 1995; Calford M.B. et al., 1993; Phillips D.P. et al., 1988; Schreiner C.E. und Mendelson J.R., 1990]

Eine weitere Mögliche Ursache für die unzureichende Deckung der beiden Ableitungsergebnisse könnte demnach ein durch inhibitorische Interneurone ausgelöstes optisches Signal sein, während gleichzeitig benachbarte Pyramidenzellen gehemmt werden, sodaß in der Elektrophysiologie keine regulär feuernenden Zellen abgeleitet werden können. Die Ableitung von inhibitorischen Interneuronen mit normalen extrazellulären Elektroden ist schwierig; hierzu werden spezielle Glaselektroden mit Spitzendurchmessern deutlich unter 1µm benötigt [Mountcastle V.B. et al., 1969;]. Inkonsistent mit der Annahme, die Darstellung von subthreshold-Aktivität durch ORIS wäre in erster Linie für die Diskrepanzen zwischen elektrophysiologischer Ableitung und optischen Signalen verantwortlich gewesen, ist jedoch der Anteil an falschnegativen Ergebnissen. In den Stimulationen bei 4 und bei 16kHz (P126) konnten jeweils in dem erwarteten Areal der präsumtiv höchsten Aktivität keine optischen Signale festgestellt werden, ebensowenig waren deutlich kolokalisierte optische Antworten in den Bereichen der LFP-Maxima auszumachen.

### **8.9. Narkoseschema**

Die Substanzen, die zur Anästhesie der Versuchstiere verwendet werden, haben in der Regel signifikante Auswirkungen auf die meisten Parameter, die üblicherweise zur Beschreibung von kortikalen Antworten benutzt werden. Es herrscht heute weitgehend Übereinstimmung in

der Beurteilung der vaskulären und neuronalen Nebenwirkungsspektren gängiger volatiler und i.v.- Narkotika. Weniger bekannt ist der Grad der Einflußnahme dieser Wirkungen auf die funktionelle Bildgebung. Da Anästhetika den zerebralen Stoffwechsel reduzieren, ist die Annahme einer Beeinträchtigung der Kopplung von Metabolismus und Durchblutung naheliegend. In unseren Versuchen wurden zwei verschiedene Narkoseschemata angewandt: bei drei Katzen wurde eine gemischte Isofluran/Stickoxydul- Narkose gegeben, die letzte Katze erhielt eine iv-Ketamin- Narkose. Für Isofluran ist einerseits bereits an Hirnschnitten eine vasodilatierende Wirkung [Farber N.E. et al., 1997], nachgewiesen worden, andererseits ist eine Erniedrigung des systemischen Blutdruckes infolge Isofluran [Hartman J.C. et al., 1992] bekannt. Ausprägung und Ausmaß der kortikalen Durchblutungsveränderung durch Isofluran scheinen letztlich maßgeblich vom Ventilationszustand des Organismus abzuhängen: Hyperkapnie bewirkt eine deutliche Durchblutungszunahme, während Hyperventilation zu einer deutlichen Durchblutungsabnahme führt [Scheller M.S. et al., 1986]. Wird ein Gemisch aus Isofluran und N<sub>2</sub>O verwendet, so sinkt die Hirndurchblutung signifikant ab [Scheller M.S. et al., *ibid*; Ishikawa T. et al., 1989]. Ferner ist eine dezente, aber signifikante Hirndrucksteigerung durch Isofluran beschrieben [Scheller M.S. et al., 1986]. Die Parameter der Einflußnahme von Ketamin auf die kortikale Durchblutung sind noch strittig. Es gibt Hinweise auf eine generelle Erhöhung des CBF unter Ketamin [Burdett N.G. et al., 1995] und solche, die eine Erhöhung nur im CI feststellen [Lo E.H. et al., 1991]. Generell wird jedoch von einer Durchblutungszunahme im Kortex durch Ketamin ausgegangen, insbesondere bei niedrigen pH-Werten [Oren R.E. et al., 1987]. Die neurophysiologischen Eigenschaften des Kortex sind unter Isofluran und Ketamin sowie Stickoxydul ebenfalls verändert. Unter beiden Anästhetika vergrößern sich, bei normaler Leitung bis zum Hirnstamm [Schwender D. et al., 1993; Bobbin R.P. et al., 1979], die Mittellatenzantworten [Schwender D. et al., 1993; Cheung S.W. et al., 2001; Bobbin R.P. et al., 1997], dies sowohl im auditorischen Kortex [Smith D.I. und Kraus N., 1987] als auch im somatosensiblen Kortex [Angel A. und Gratton D.A., 1982]. Die Amplituden lokaler Feldpotentiale werden unter beiden Anästhetika geringer [Schwender D. et al., 1993 am Menschen], sodaß ein Störung im Stimulusprocessing in A1 angenommen wird. Andererseits findet eine Verschärfung der Tonselktivität im Kortex statt [Zurita P. et al., 1994], die Sontanaktivität vergrößert sich und es entstehen verstärkt IPSPs. Dieser Vorgang wird als Hinweis auf eine Verstärkung lokaler Hemmung gewertet. Barbituratnarkosen haben vergleichbare Nebeneffekte: Latenzverlängerung, Amplitudenabfall, verstärkte Frequenzselektivität durch Verstärkung der Inhibition [Gaese B.H. und Ostwald J., 2001;

Untersuchungen am A1 der Ratte], deutliche on/off- Antworteigenschaften [Volkov I.O. et al., 1985; Untersuchungen am A1 der Katze]. Für Barbiturate ist darüberhinaus ein nivellierender Effekt auf die lokale Durchblutung beschrieben [Buchweiz E. und Weiß H.R., 1986]. Daß eine Barbituratnarkose insgesamt schonender und für elektrophysiologische oder optische Ableitungen am Versuchstier besser geeignet wäre als eine Ketamin- oder Stickoxydul/ Isoflurannarkose, wie von Cheung et al. behauptet, ist demnach nicht ohne weiteres anzunehmen. Insgesamt scheint sich infolge von Isofluran und Ketamin die Durchblutung des Kortex nach Maßgabe von Dosierung [Langsjö J.W. et al., 2003], pH [Oren R.E. et al., 1987], Ventilation [Scheller M.S. et al., 1986] und Zusatzmedikation deutlich zu erhöhen, während kortikale Aktivität in unterschiedlichem Maße unterdrückt wird. In welchem Ausmaß diese Veränderungen als grundlegende Störung der Kopplung von rCBF und Metabolismus gewertet werden müssen, als funktionelle Dyskonnektion vom peripheren Input [Hammer R.P. und Herkenham M., 1983] oder ob hierdurch eine Verschärfung der Antwort bei optischen, durchblutungsabhängigen Signalen eintritt, ist gegenwärtig nicht bekannt.

Trotz einer dichten Datenlage bezüglich der physiologischen Wirkspektren dieser Pharmaka gerade im Hinblick auf den Ursprung des OI- Signals ist daher eine abschließende Einschätzung der Einflußnahme der Narkose auf das Signal wegen der mannigfaltigen Interdependenzen der Variablen, die sich auch innerhalb eines experimentellen Ablaufs mehrfach ändern können, nicht möglich. Angesichts der Vielzahl an unterschiedlichen Narkoseschemata, die im OI bislang eingesetzt wurden, ist eine ausschließliche Konzentration auf das verwendete Pharmakon in der Bewertung der vorliegenden Resultate somit nicht zielführend. So haben Dinse et al. unter Barbituratnarkose vom A1 der Katze optisch abgeleitet (Dinse H.R. et al., 1996, 1997, 2001) Nemoto [Nemoto M. et al., 1999, 2004] unter Chloralose, Hess [Hess A. und Scheich H., 1996] am Gerbil unter Halothan, Harrison am Chinchilla [Harrison R.V. et al., 1996] unter Ketamin. In der Diskussion der vorliegenden Ergebnisse ist allerdings nicht auszuschließen, daß bei der schlecht überschaubaren und in ihrem Zusammenspiel ungeklärten Vielzahl der gegenseitigen Einflußnahmen von Anästhesie, Ventilation, pH-Wert und Vormedikation sowie unter Berücksichtigung der begrenzten Möglichkeiten des physiologischen Monitorings eines Tieres im Versuch, ein oder mehrere Parameter suboptimal waren. In Anbetracht der Komplexität des Systems könnte etwa eine unzureichende Abstimmung von Beatmung, Säure-Base- Status und Narkosetiefe bereits eine lokale Kopplung zwischen Aktivität und Durchblutung beeinträchtigt haben. Die Barbiturat-Narkose, wie sie von Dinse et al. zur Anwendung kommt, könnte wiederum durch

die oben beschriebene Nivellierung der Mikrozirkulation und klarer Frequenzdiskriminierung zu einem optisch homogeneren Ableitfeld geführt haben. Laut Detsch [Detsch O. et al., 1999] reduziert Isofluran den Output von sensomotorischen Signalen im Thalamus, während Eingänge nur geringgradig eingeschränkt werden. Die beobachteten Veränderungen der thalamischen neuronalen Antwortcharakteristik, könnten zumindest anteilig an dem Mangel sensorischer Diskriminierung beteiligt sein, der in den optischen Ableitungen beobachtet wurde.

### **8.10. Säure/Base-Status**

Eigene Untersuchungen zum Säure/Base-Status der Tiere nähren den Verdacht, daß OP-Situation, Medikation, Immobilisation und striktes Atemregime bei den Versuchstieren eine Verschiebung des Säure-Base-Status in Richtung auf einen erniedrigten pH oder, bei problematischer Ventilation, etwa eine Hyperventilationsalkalose bewirken können. Eine Verschiebung des pH in Richtung Azidose kann durch die Änderung der lokalen Homöostase einerseits zu einer verminderten neuronalen Aktivität führen, andererseits gefäßerweiternd wirken. Zusätzlich müssen die Komplikationen berücksichtigt werden, die im Zusammenhang mit dem jeweiligen Narkoseschema (s.o.) auftreten können.

### **8.11. Dauer der Versuche und Zeitfenster**

Verschiedene Arbeitsgruppen [Dinse H.R. pers. Mitteilg, Schreiner, pers. Mittlg.] berichten übereinstimmend, daß vor allem innerhalb eines Zeitrahmens von etwa 24h reliable Ergebnisse optischer Ableitungen erwartet werden können. Außerhalb dieses Zeitfensters sei die Qualität der optischen Ableitung reduziert, obwohl elektrophysiologische Ableitungen noch bis zu vier Tage länger Ergebnisse liefern.

Eine klassische elektrophysiologische Ableitsitzung zur Bestimmung der höchsten reizkorrelierten Aktivität am Katzenkortex an unserem Arbeitskreis dauert üblicherweise drei bis vier Tage, längere Messungen scheinen möglich. Offenbar sind die Mechanismen, die zur lokalen Mehrdurchblutung infolge von neuronaler Aktivität führen, weniger stabil als die neuronalen Zellstrukturen selbst. Da die Versuchstiervorbereitung inklusive Katheterisierung, Operation zur Kammerimplantation, Fixierung des Tieres im stereotaktischen Rahmen, Justierung der Einheit etc. und wegen vorangehender elektrophysiologischer Ableitungen am gegenüberliegenden Kortex häufig erst über 10 Stunden nach Narkoseeinleitung abgeschlossen waren (P123: ORIS-Beginn nach 32h, P124: 20,5h; P125: 12h; P126:18h), konnte eine ORIS-Sitzung häufig erst nach diesem Zeitraum beginnen. Die relativ große Zahl

an Durchgängen sowie diverse Wiederholungsmessungen, die insbesondere bei akustischer Stimulation infolge von externen Störgeräuschen durchgeführt werden mußten, führten zu deutlich längeren Versuchsdauern als den empfohlenen 24 Stunden. Die Versuchsdauer könnte daher an der mäßigen topographischen Auflösung der Methode Anteil haben.

### **8.12. Zeitverlauf des Signals**

Wie oben bereits erwähnt, unterscheiden sich die verschiedenen primären Kortizes in Bezug auf das OI-Signal bei einer gegebenen Wellenlänge deutlich in Latenz und Amplitude. Für Ableitungen an der primären visuellen Rinde werden Latenzen in der Größenordnung von 7-8sec berichtet [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996], während Dinse für die Ableitung des auditorischen Kortex der Katze eine Latenz von 5sec. berichtet. Nemoto findet am somatosensorischen Kortex der Ratte nach 4sec. Maxima, Spitzer an der Katze ebenfalls nach etwa 6-7sec. [Nemoto M. et al., 1999]. In den vorliegenden Ergebnissen traten bei P126 Peaks nach etwa 8-9sec. auf. Diese „Verspätung“ entspricht der Latenz, die an der Sehrinde zu erwarten wäre und ist am auditorischen Kortex nicht ohne weiteres erklärbar. Die Maximalamplituden bei O125 und P124 traten hingegen nach 5,5sec. auf (Abb. 34 und 35) und entsprachen damit dem beschriebenen Timing.

### **8.13. Kammerdruck**

Bei der Befüllung der Kammer zeigten sich bei drei der vier Katzen vegetative Reaktionen. Es traten Blutdruck- und EKG-Schwankungen auf sowie Desynchronisationen des Atemrhythmus. Es ist nicht auszuschließen, daß der über dem Kortex durch die Silikonbefüllung aufgebaute Druck Auswirkungen auf den physiologischen Zustand des Hirngewebes hatte. Andere Arbeitsgruppen berichten von ähnlichen Erfahrungen [Dinse H.R., pers. Mittlg.; Spitzer M., pers. Mittlg.]. Dieses Phänomen ist nicht abschließend bewertbar, da die am Ende des Versuchs durchgeführte elektrophysiologische Ableitung (bei P126) keine ungewöhnlichen Ergebnisse lieferten. Die von uns genutzte Kammer war zudem unter Druckausgleich befüllbar (vgl. Methode) und faßte ein gegenüber der Gruppe Dinse/Bochum deutlich geringeres Volumen an Silikonöl (etwa 1,5ml gegenüber etwa 5ml), dies war konstruktionstechnisch ausdrücklich vorgesehen, um den Druck auf das Hirngewebe gering zu halten. Die auditorische Rinde gilt als überaus empfindlich gegenüber mechanischen und thermischen Einflüssen [Popelar J. et al., 1992]. Trotz großer Sorgfalt bei der Präparation und Temperierung des Silikonöls ist nicht auszuschließen, daß es während

der Operation oder im Rahmen der langandauernden Ableitsitzungen zu Irritationen des Kortex gekommen sein kann.

#### **8.14. Anzahl der Versuchstiere und Reizschemata**

Aufgrund der bekannten Variabilität in den optischen Antworten am auditorischen Kortex [Spitzer M. et al., 2001] scheint es denkbar, daß die Zahl der abgeleiteten Versuchstiere zu gering war, um valide und reliable Aussagen zur Methode zu erlauben. Die Gruppe um Matt Spitzer/ Queensland, Australien hatte 10 Katzen im Versuch und konnte lediglich bei 2/10 Katzen stimulusassoziierte Veränderungen im Reflexionsverhalten nachweisen. Bei beiden Katzen war in nur einer Stimuluskondtion eine signifikante Korrelation zwischen den optischen SÍgnalen und der Elektrophysiologie evident. In unserer Versuchsreihe wurden lediglich vier Katzen gemessen und nur bei einem Versuchstier fanden vergleichende elektrophysiologische Ableitungen statt, was, soweit bei den geringen Fallzahlen bestimmbar, am ehesten ein mit den Daten Spitzers vergleichbares Resultat bedeutet.

#### **8.15. Gefahr von Fehlinterpretationen und Probleme der Mittelungsprozeduren**

Die Oszillationen können zu Fehlinterpretationen im Rahmen der Onlineauswertung der Datensätze führen. Das eigentliche, stimulusassoziierte Signal tritt offenbar erst durch die Mittelung vieler Durchgänge (bei P126 wurden zunächst sechs, schließlich 18 Durchgänge gemittelt, bei P124 und P125 wurden 30 Gurchgänge gemittelt) auf. Die Gefahr von Fehlinterpretationen besteht vor allem, wenn der Grundtakt der Datenaufnahme in Vielfachen von 10sec. erfolgt, weil sich ein solches Timingschema relativ nahe an der Frequenz des offenbar stimulusunabhängigen Wellenphänomens befindet. Die kortikale Topographie des vermeintlichen Signals kann als Ausschlußkriterium nur in begrenztem Ausmaß dienen, weil die physiologisch- reale räumliche Auflösung der ORIS- Methode letztendlich nicht an die der Elektrophysiologie heranreicht [vgl. eigene Ergebnisse, Dinse H.R., pers. Mitteilg; Spitzer M. et al., 2001; Spitzer M. pers. Mitteilg.], sodaß der Untersucher bei mehreren nacheinander durchgeführten Experimenten mit identischem Versuchsaufbau und Reiz letztlich mehrere verschiedene optische Ableitergebnisse erhält. Zweifellos ist diese Variabilität der Ergebnisse interindividuell unterschiedlich, aber die maximale, aufgrund der Kapillarisdichte im Kortex angenommene Auflösung bei ORIS in einer Größenordnung von 50µm [Bonhoeffer T. und Grinvald A., 1996; Hess A. und Scheich H. 1996] dürfte am auditorischen Kortex der Katze keine realistische Anforderung an das System sein. Inwieweit die jeweils vorliegende Kontrollauswertung einer akustischen Ableitung im gegebenen Fall eine im Rahmen der norma-len Variabilität des tatsächlichen Signals liegende Variante oder aber ein

signalunabhängiges, physiologisch eigenständiges Phänomen darstellt, wird im Einzelfall nur schwer zu entscheiden sein.

Aber auch eine Mittelung über mehrere Durchgänge löst das Problem nicht verlässlich, solange nicht eine sehr hohe Zahl an Durchgängen in die Mittelungen eingeht und die Wiederholungsfrequenz der Datenaufnahme nicht der physiologischen Frequenz des Phänomens dahingehend angeglichen ist, daß die versehentliche Aufmittlung des nichtstimulusabhängigen Phänomens zu einem vermeintlichen Signal ausgeschlossen ist. Auch dies ist in der Praxis schwer realisierbar. Zum einen ist die Aufzeichnung der Grundfrequenz des Phänomens im engen Zeitplan des Versuchsablaufs mit einem Zeitaufwand verbunden, den der Untersucher angesichts des kritischen Zeitplans bei optischen Ableitungen nicht ohne weiteres eingehen kann. Nach R. Frostig ist mit reliablen Ergebnissen bei optical imagings ab 24 Stunden nach Narkoseeinleitung nicht mehr zu rechnen [Dinse H.R., pers. Mitteilg, Scheich H., pers. Mitteilg]. Daher wird der Versuchsleiter jede Verzögerung des Versuchsablaufs, die nicht unmittelbar geboten scheint, vermeiden. Aber auch nach erfolgter Feststellung der Grundfrequenz der Oszillationen und einer Justierung der Aufnahmetaktrate ist nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, daß sich durch Fluktuationen der Frequenz des physiologischen Phänomens nicht trotz initialer Taktanpassung im Ergebnis der Auswertung vermeintliche Signale einschleichen, die tatsächlich 0,1Hz-Artefakte sind. Die Anzahl der realisierten Durchgänge zu erhöhen und extensive Mittelungsprozeduren durchzuführen ist hier nicht zwangsläufig die Lösung des Problems. Denn zum einen ist dies wegen der festgelegten Datenaufnahmedauern und der ISIs von reellen 40sec. von Stimulusdurchgang zu Stimulusdurchgang mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden und würde zu einer deutliche Reduzierung der durchführbaren Experimente pro Versuchstier führen, zum anderen wäre auch ein extensives Averaging bei einem Prozeß, der nicht randomisiert, sondern im Rahmen gewisser, unbekannter Schwankungsbreiten reproduzierbar auftritt und damit eine Zwischenstellung zwischen zufälligem und systematischem Fehler einnimmt, keine Garantie für bessere Datenreinheit. Rechnerisch sollten sich biologische Störsignale, von denen eine nichtsynchronisierte Phasenlage angenommen wird, gemäß  $\sqrt{N}/N$  vermindern; bei 18 Mittelungen entspricht das ( $\sqrt{18}/18 = 0,23$ ) einer Verminderung auf etwa  $1/4$  der Ausgangsamplitude. Allerdings kann bei einer Datenaufnahmefrequenz, die u.U. ein Vielfaches der Oszillationsgrundfrequenz darstellt oder zumindest nahe bei dieser liegt, bei niedrigen Wiederholungsraten nicht zwangsläufig von einer Verkleinerung des Störsignals ausgegangen werden, da sich bei nahe am Datenaufnahmetakt liegender Grundfrequenz des Störsignals unter Umständen die Phasen verschiedener Durchgänge in der Mittelung überlagern.

## Kapitel 9. Conclusion

Optical recording of intrinsic signals, "ORIS", ist eine funktionelle, kortikale Imagingmethode, die auf Basis von Absorptionsunterschieden durch aktivitätskorrelierte Durchblutungssteigerungen Bilder stimulusassoziierter kortikaler Aktivität liefern kann. Diese Arbeit sollte prüfen, ob die Methode im Rahmen von Untersuchungen zur Entwicklung der primären auditorischen Kortextareale der Katze nach elektrischer Stimulation zusätzlich zu den bisher gebräuchlichen Methoden der Elektrophysiologie oder ausschließlich anstelle elektrophysiologischer Methoden zur Anwendung kommen sollte. Die Motivation dieser Untersuchung war die verschiedentlich beschriebene hohe Auflösung der ORIS- Aktivitätskarten, die mit  $50\mu\text{m}$  [Bonhoeffer und Grinvald, *ibid*, Heß A., *ibid.*] deutlich über der Auflösung liegt, die mit durchschnittlich 150 Ableitpunkten einer elektrophysiologischen Sitzung erreicht wird. Da eine Sitzung zur Erstellung optischer Aufzeichnungen aus einer begrenzten Anzahl von Mitteilungsdurchgängen pro Stimulus besteht, die mit geringem Aufwand durchführbar sein sollten, ergab sich die Aussicht auf deutlich kürzere Aufnahmezeiten als die bei elektrophysiologischen Ableitungen üblichen 3-4 Stunden. Die aus der Elektrophysiologie bekannten Ableitdauern von 3-4 Tagen am Versuchstier schienen bei gleichbleibender oder sogar verbesserter Auflösung auf einen Bruchteil reduzierbar zu sein. Da bei ORIS idealerweise über die Trepanation hinaus keine Manipulation am Gehirn stattfindet, schienen darüberhinaus niedriginvasive Untersuchungen mit einer Vielzahl verschiedener Fragestellungen am selben Kortex sowie chronische Ableitungen am wachen, kammerimplantierten Versuchstier möglich.

Die in Bezug auf Zeitersparnis und Auflösung an die Methode gestellten Erwartungen haben sich im Ergebnis nicht erfüllt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten waren zur Darstellung einer Tonotopie in der bekannten Form am primären auditorischen Kortex der Katze trotz Mittelungsprozeduren nur bei elektrischer Stimulation über ein Cochlea-Implantat und nur bei einem von drei Tieren ausreichend. Bei akustischer Stimulation stellte sich keine klare Tonotopie dar, obwohl die Anlagekomponenten, wie die Vortests ergeben haben, zur Auflösung einer Leuchtdichteschwankung im Bereich von bis zu 0,03% in der Lage waren und die Amplitude des ORIS- Signals bei 540nm mit etwa 0,1-3% beschrieben ist. Die in der Literatur beschriebene Mittelung über 6 Durchgänge [Dinse H.R. et al., 2000] ergab weder eine differenzierte Tonotopie, noch einen nachvollziehbaren globalen Signalverlauf. Erst nach 18 Mittelungen bei P126, nach 30 Mittelungen bei P125 zeichnete sich ein globaler

Signalverlauf ab, in dem jedoch keine Tonotopie erkennbar war. P124 zeigte erst nach 30 Mittelungen eine Cochleotopie. Es ist denkbar, daß eine Mittelung über eine Vielzahl von Durchgängen eine bessere funktionelle Auflösung liefern würde, als unsere Mittelung über 18 Durchgänge. Da die Erhebung entsprechend großer Datenmengen wegen der Aufnahmedauern von etwa 60sec./Durchgang und der feststehenden Interstimuluszeiten allerdings zu einer erheblichen Verlängerung der Versuchsdauer führen würde, die wegen des kurzen Aufnahmezeitfensters von 24 Stunden ohnehin knapp bemessen sein muß, scheint ein solches Verfahren kaum realistisch. Eine zeitliche Ersparnis ist somit nicht festzustellen, vielmehr ergibt sich ein deutlicher Zeitverlust durch den hohen Mittelungsaufwand. Die Durchführung einer Vielzahl modifizierter Versuchsschemata zur Klärung differenzierterer Fragestellungen wird dadurch obsolet. Um im Fenster von 24 Stunden zu bleiben, gilt es vielmehr, eine blutfreie Trepanation in möglichst kurzer Zeit durchzuführen und zur Darstellung valider Ergebnisse ein mögliches Minimum an Fragestellungen mit einem möglichen Maximum an Mittelungsdaten abzuarbeiten.

Die Methode ist zwar hirmorphologisch weniger invasiv als die singleunit oder multiunit-Ableitung der Elektrophysiologie, allerdings könnte der geringe Invasivitätsgrad dennoch ausreichen, das sensible und leicht veränderliche Signal physiologisch zu beeinträchtigen. Mögliche Faktoren wären: Blutdruckschwankungen, pH-Wert, lokale Manipulationen am Kortex infolge Trepanation, Druckausübung durch die Kortexkammer, Druckausübung durch die Beatmungspumpe. Die in der Elektrophysiologie aufgezeichneten neuronalen Entladungsmuster scheinen gegenüber Manipulationen bei weitem unempfindlicher zu sein, sodaß trotz Trepanation und häufiger Kortexbewegungen infolge der Atemexkursion im mehrere Tage anhaltenden Versuch dennoch ein solides, valides, reproduzierbares Signal ableitbar bleibt.

In den Versuchen hat sich, in Übereinstimmung mit den Erfahrungen anderer Gruppen (Dinse H.R., pers. Mittlg; Spitzer M. et al., 2001) ferner gezeigt, daß die Variabilitäten in den optischen Antworten auf einen gleichbleibenden Reiz erheblich sind. Es ist zudem aufgrund der vermuteten Ursachen dieser Variabilitäten, die in Lateralverschiebungen des Signals infolge von Blutfluß und Inhomogenitäten in der jeweiligen Blutflußantwort auf eine gegebenes Signal, ferner in oszillierenden, sogenannten „slow waves“ der kortikalen Aktivität oder Durchblutung (vgl. Diskussion) gesehen werden können, nicht gesichert, daß durch Mittelung größerer Datenmengen ein Signal entstünde, welches die zugrundeliegenden kortikalen Aktivitäten originalgetreuer wiedergeben würde, als dies bei geringerem Mittelungsaufwand der Fall wäre. Dies insbesondere, weil die prominenten 0,1Hz-Oszillationen, die ubiquitär nachgewiesen werden konnten, eine biologische Störgröße

darstellen, die weder rein stochastisch, noch systematisch genug ist, um durch einfache Mittelungsprozeduren zuverlässig aus den Datensätzen entfernt zu werden.

Die vorliegenden Daten zu Untersuchungsergebnissen anderer Gruppen zeigen, daß Aussagen zu Validität, Reliabilität, Signalgröße, Latenz und räumlicher Auflösung des ORIS- Signals, die an anderen Kortizes, wie am visuellen, somatosensorischen oder am Schnurrhaarkortex aufgenommen worden sind, mit den Eigenschaften des optischen Signals am auditorischen Kortex nicht ohne weiteres vergleichbar sind.

Die dem Signal zugrundeliegenden Mechanismen neurovaskulärer Kopplung, bzw. die morphologischen Korrelate dieser Mechanismen scheinen sich vielmehr je nach Kortex in einem solchen Maße zu unterscheiden, daß beispielsweise die für den somatosensorischen Kortex publizierten, zuversichtlichen Aussagen zu den Signalparametern Latenz, Amplitude und räumliche Auflösung am auditorischen Kortex nicht ohne weiteres erreicht werden können. Ferner scheinen deutliche inter- aber auch intraindividuelle Schwankungen in Signalamplitude und Latenz zu bestehen. Es ist daher nicht abschließend beantwortbar, ob die mäßige räumliche und zeitliche Auflösung des Signals am auditorischen Kortex bei 540nm ein Spezifikum des auditorischen Kortex ist oder eine individuelle Schwankung; die Daten der Arbeitsgruppe um Prof. Dinse in Bochum lassen jedoch letzteres vermuten.

Solange keine hinreichende Klärung der Kopplungsmechanismen zwischen neuronaler Aktivität und begleitender Blutflußantwort gegeben ist und es an Daten über die lokale Repräsentationen und Ausprägungen dieser Mechanismen mangelt, können keine abschließenden Aussagen zur räumlichen und zeitlichen Auflösung der Methode gemacht werden. Diese Tatsache hat zur Folge, daß optische Registrierungen als mit einem weit höheren Unsicherheitsfaktor behaftet gelten müssen denn elektrophysiologische Aufnahmen. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge ist die physiologische Auflösung des Systems von den auf Basis anatomischer Gegebenheiten und technischer Auflösungsvermögen der Cameraeinheit getroffenen Schätzungen in der Größenordnung von 50µm weit entfernt.

Es ist nicht auszuschließen, daß die Ursache für die schlechte räumliche Auflösung am akustischen Kortex ein Spezifikum dieses Kortex ist, weil andere Arbeiten an anderen Kortizes zuverlässige Ergebnisse mit niedrigem Mittelungsaufwand und deutlich besserer Auflösung erzielt haben. Um im Vergleich mit der etablierten und im Ergebnis weithin vergleichbaren Methode der Elektrophysiologie bestehen oder diese ersetzen zu können, muß eine Methode zuverlässige und in ihrer Entstehung nachvollziehbare Daten liefern. Die Methode muß an sich bestehen können, ohne ihrerseits der Bestätigung durch eine weitere, bereits etablierte Methode zu bedürfen. Hierzu ist zumindest der empirische Nachweis

reproduzierbarer, durch den Vergleich mit der Elektrophysiologie validierter Datensätze zu fordern, wenn nicht der detaillierte Nachweis der zugrundeliegenden neurophysiologischen Prozesse. Von letzterem ist die ORIS- Methode, anders als die Methode der Färbung mittels VSDs, trotz einer Vielzahl erfolversprechender Ansätze noch weit entfernt. Beispielsweise ist nach wie vor unklar, auf Basis welcher physiologischen Grundlagen ein Signal im somatosensorischen Kortex andere Latenzen und Amplituden bietet, als ein Signal im auditorischen Kortex. Die Ursachen interindividueller und intraindividuelle Schwankungen in den Signalverläufen und Amplituden sind ebensowenig geklärt und in dieser Bandbreite aus der Elektrophysiologie nicht bekannt. Der Untersucher kann bei einem gegebenen Versuchstier, bei dem optische Registrierungen durchgeführt werden, nicht sicher sein, ob die Signalarmut der optischen Aufnahmen auf eine Armut an kortikaler Aktivität hindeutet oder ob sie besteht, weil auf Basis von u.U. komplexen neurophysiologischen Mechanismen eine Kopplung des lokalen Blutflusses an den Ort der neuronalen Aktivität beeinträchtigt ist. Eine Korrektur einer eventuell vorübergehenden oder durch Lagerungsfehler, Manipulationen am Kortex oder pH-Verschiebungen ausgelösten Beeinträchtigung ist mangels genauer Kenntnisse der Zusammenhänge kaum möglich. Lokale rCBF- Änderungen korrelieren zudem nicht immer mit den Spikeraten der lokalen Neurone [Mathiesen C. et al., 1998; Lauritzen M. et al., 2001; Logothetis N.K. et al., 2001]. Das heißt, daß eine lokale Änderung der Spikeaktivität, die nicht zugleich die Signalwege, welche den Blutfluß kontrollieren, beeinflusst, keine blutflußabhängigen Signale ergeben würde. RCBF- und lokaler Energieverbrauch laufen zwar meist parallel ab, können aber auch dissoziiert sein. Eine lokale CBF- Änderung kann also ohne lokalen Energieverbrauch stattfinden und eine lokale Spikeerhöhung kann ohne Erhöhung des rCBF stattfinden, womit CBF von Aktivität entkoppelt wäre. Für eine nichtunmittelbare Kopplung lokalen Blutflusses an den Ort der neuronalen Aktivität und eine Steuerung der Durchblutung durch nichtlokale Mechanismen finden sich zunehmend Hinweise. Natürlich ergeben sich hieraus Komplikationen für die Validität und Reliabilität des OI- Signals. Eine funktionelle Methode sollte eine gewisse Spezifität gegenüber der interessierenden Aktivität mit einer angemessenen Unspezifität gegenüber Störsignalen verbinden. Die dargestellten Signale sollten in einem reproduzierbaren Verhältnis zu der Hirnaktivität stehen, die man abzuleiten wünscht. Bei der optischen Registrierung am A1 der Katze mittels grünem Licht ist man von einer Signalspezifität und einem nachvollziehbaren Verhältnis zwischen Signal und Aktivität augenblicklich noch entfernt. Mittelungsprozeduren, die hochamplitudige Störsignale aus den Datensätzen entfernen, sind aufgrund der zugleich nichtzufälligen wie nichtsystematischen

Natur der Haupterschwerung nicht trivial. Angesichts dieser Fülle von Unsicherheitsfaktoren stellt sich ORIS nicht als Methode dar, die für sich beanspruchen könnte, Datensätze zu erheben, die in Validität und Reliabilität die von der Elektrophysiologie gewohnten Standards erreichen. Die Methode scheint den Schritt von einem noch nicht in allen Details verstandenen, optischen Phänomen hin zu einer anwendbaren und nachvollziehbaren funktionellen Methode noch nicht getan zu haben. Daher ist ORIS kaum geeignet, außerhalb eines selbstreferentiellen Rahmens eigenständige Daten zu erheben, die über eine reine Phänomenologie hinaus zuverlässige Rückschlüsse auf kortikale Prozesse erlauben. Vielmehr erscheint eine elektrophysiologische Validierung der optischen Ergebnisse nach wie vor geboten. Damit ist die Methode zur funktionellen Darstellung von Hirnaktivität, ergänzend zu oder anstelle von der etablierten und gängigen Elektrophysiologie nach der Datenlage nicht geeignet.



## Kapitel 10      Literaturverzeichnis

Abeles M, Bergman H, Gat I, Meilijson I, Seidemann E, Tishby N, Vaadia E.  
Cortical activity flips among quasi-stationary states.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8616-20.

Abeles M.  
Quantification, smoothing, and confidence limits for single-units' histograms.  
J Neurosci Methods. 1982 May;5(4):317-25.

Abeles M, Goldstein MH Jr.  
Functional architecture in cat primary auditory cortex: columnar organization  
and organization according to depth.  
J Neurophysiol. 1970 Jan;33(1):172-87.

Aertsen A und Preissl H.  
*Dynamics of activity and connectivity in physiological neuronal networks*  
In: Nonlinear Dynamics and Neuronal Networks,  
Schuster HG, ed, Weinheim, Deutschland, VCH-Verlag, 1991, pp281-301

Akgoren N, Fabricius M, Lauritzen M.  
Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar  
cortex during electrical stimulation.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jun 21;91(13):5903-7.

Alliot F, Rutin J, Leenen PJ, Pessac B.  
Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express  
aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin.  
J Neurosci Res. 1999 Nov 1;58(3):367-78.

Allt G, Lawrenson JG.  
Pericytes: cell biology and pathology.  
Cells Tissues Organs. 2001;169(1):1-11. Review.

Ambrosi G, Virgintino D, Benagiano V, Maiorano E, Bertossi M, Roncali L.  
Glial cells and blood-brain barrier in the human cerebral cortex.  
Ital J Anat Embryol. 1995;100 Suppl 1:177-84.

Angel A, Gratton DA.  
The effect of anaesthetic agents on cerebral cortical responses in the rat.  
Br J Pharmacol. 1982 Aug;76(4):541-9.

Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A.  
Dynamics of ongoing activity: explanation of the large variability in evoked  
cortical responses.  
Science. 1996 Sep 27;273(5283):1868-71.

Arieli A, Shoham D, Hildesheim R, Grinvald A.  
Coherent spatiotemporal patterns of ongoing activity revealed by real-time  
optical imaging coupled with single-unit recording in the cat visual cortex.  
J Neurophysiol. 1995 May;73(5):2072-93.

Arieli A

in: Information Processing in the Cortex: Experiments and Theory,  
A. Aertsen and V. Braitenberg, Eds, (Springer Verlag, Berlin, 1992) pp.123-138

Attwell D, Iadecola C.

The neural basis of functional brain imaging signals.  
Trends Neurosci. 2002 Dec;25(12):621-5. Review.

Auer LM, Gallhofer B.

Rhythmic activity of cat pial vessels in vivo.  
Eur Neurol. 1981;20(6):448-68.

Bakin JS, Kwon MC, Masino SA, Weinberger NM, Frostig RD.

Suprathreshold auditory cortex activation visualized by intrinsic signal  
optical imaging.  
Cereb Cortex. 1996 Mar-Apr;6(2):120-30.

Ball GJ, Gloor P, Thompson CJ.

Computed unit-EEG correlations and laminar profiles of spindle waves in the  
electroencephalogram of cats.  
Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1977 Sep;43(3):330-45.

Bandopadhyay R, Orte C, Lawrenson JG, Reid AR, De Silva S, Allt G.

Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal  
barriers.  
J Neurocytol. 2001 Jan;30(1):35-44.

Behrendt M.

Entwicklung und Herstellung eines Cochlea-Implantates zur chronischen Stimulation von gehörlosen  
weißen Katzen  
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin des Fachbereiches  
Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
1998

Bekkers JM, Richerson GB, Stevens CF.

Origin of variability in quantal size in cultured hippocampal neurons and  
hippocampal slices.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul;87(14):5359-62.

Benaron DA, Hintz SR, Villringer A, Boas D, Kleinschmidt A, Frahm J, Hirth

C, Obrig H, van Houten JC, Kermit EL, Cheong WF, Stevenson DK.

Noninvasive functional imaging of human brain using light.  
J Cereb Blood Flow Metab. 2000 Mar;20(3):469-77.  
PMID: 10724111 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Berger H.

Über das Elektroencephalogramm des Menschen.  
Arch. f. Psychiat 87, 1929, 527-570

Bertuglia S, Colantuoni A, Arnold M, Witte H.

Dynamic coherence analysis of vasomotion and flow motion in skeletal muscle microcirculation.

Microvasc Res. 1996 Nov;52(3):235-44.

Blasdel GG, Salama G.

Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex.

Nature. 1986 Jun 5-11;321(6070):579-85.

Bobbin RP, May JG, Lemoine RL.

Effects of pentobarbital and ketamine on brain stem auditory potentials.

Latency and amplitude intensity functions after intraperitoneal administration.

Arch Otolaryngol. 1979 Aug;105(8):467-70.

Bonhoeffer T. Grinvald A. 1996

Optical Imaging Based on Intrinsic Signals, The Methodology

In : "Brain Mapping The Methods", Toga A.W. und Mazziotta J.C., Eds.

Academic Press. London

Brandt ME, Jansen BH.

The relationship between prestimulus-alpha amplitude and visual evoked potential amplitude.

Int J Neurosci. 1991 Dec;61(3-4):261-8.

Brandt ME, Jansen BH, Carbonari JP.

Pre-stimulus spectral EEG patterns and the visual evoked response.

Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1991 Jan-Feb;80(1):16-20.

Branston NM.

The physiology of the cerebrovascular parasympathetic innervation.

Br J Neurosurg. 1995;9(3):319-29. Review.

Braitenberg V.

Cortical architectonics: general and areal

In: IBRO Monograph Series. Architectonics of the Cerebral Cortex.

Brazier M.A.B and Petsche H. eds., Raven/New York 1978, vol. 3, pp. 443-466

Buchweitz E, Weiss HR.

Alterations in perfused capillary morphometry in awake vs anesthetized brain.

Brain Res. 1986 Jul 2;377(1):105-11.

Burdett NG, Menon DK, Carpenter TA, Jones JG, Hall LD.

Visualisation of changes in regional cerebral blood flow (rCBF) produced by ketamine using long TE gradient-echo sequences: preliminary results.

Magn Reson Imaging. 1995;13(4):549-53.

Busse R, Fleming I.

Nitric oxide, nitric oxide synthase, and hypertensive vascular disease.

Curr Hypertens Rep. 1999 Feb-Mar;1(1):88-95. Review.

Busse R, Fleming I.

Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production

of endothelium-derived relaxing factors.  
*J Vasc Res.* 1998 Mar-Apr;35(2):73-84. Review.

Busse R, Fleming I.  
 Regulation of NO synthesis in endothelial cells.  
*Kidney Blood Press Res.* 1998;21(2-4):264-6. Review.

Busse R, Pohl U, Luckhoff A.  
 Mechanisms controlling the production of endothelial autacoids.  
*Z Kardiol.* 1989;78 Suppl 6:64-9. Review.

Busse R, Trogisch G, Bassenge E.  
 The role of endothelium in the control of vascular tone.  
*Basic Res Cardiol.* 1985 Sep-Oct;80(5):475-90. Review.

Calford MB, Semple MN.  
 Monaural inhibition in cat auditory cortex.  
*J Neurophysiol.* 1995 May;73(5):1876-91.

Calford MB, Rajan R, Irvine DR.  
 Rapid changes in the frequency tuning of neurons in cat auditory cortex  
 resulting from pure-tone-induced temporary threshold shift.  
*Neuroscience.* 1993 Aug;55(4):953-64.

Castejon OJ.  
 Submicroscopic changes of cortical capillary pericytes in human perifocal brain  
 edema.  
*J Submicrosc Cytol.* 1984 Jul;16(3):601-18.

Chance B, Le Gallais V, Schoener B.  
 Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat  
 brain, kidney and adrenal gland.  
*Nauchni Tr Vissh Med Inst Sofiia.* 1962 Sep 15;195:1073-5.

Chance B, Villringer A, Dirnagl V, Einhaupl KM.  
 Optical imaging of brain function and metabolism. Garmisch-Partenkirchen, 21-22  
 October 1991.  
*J Neurol.* 1992 Aug;239(7):359-60.

Chedotal A, Cozzari C, Faure MP, Hartman BK, Hamel E.  
 Distinct choline acetyltransferase (ChAT) and vasoactive intestinal polypeptide  
 (VIP) bipolar neurons project to local blood vessels in the rat cerebral cortex.  
*Brain Res.* 1994 May 23;646(2):181-93.

Cheung SW, Nagarajan SS, Bedenbaugh PH, Schreiner CE, Wang X, Wong A.  
 Auditory cortical neuron response differences under isoflurane versus  
 pentobarbital anesthesia.  
*Hear Res.* 2001 Jun;156(1-2):115-27.

Clarey JC, Barone P, Imig TJ.  
 Functional organization of sound direction and sound pressure level in primary

auditory cortex of the cat.

J Neurophysiol. 1994 Nov;72(5):2383-405.

Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, Waggoner AS, Wang CH.  
Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential.

J Membr Biol. 1974;19(1):1-36.

Cohen LB.

Changes in neuron structure during action potential propagation and synaptic transmission.

Physiol Rev. 1973 Apr;53(2):373-418. Review.

Cohen LB, Keynes RD.

Changes in light scattering associated with the action potential in crab nerves.

J Physiol. 1971 Jan;212(1):259-75.

Cohen Z, Molinatti G, Hamel E.

Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex.

J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Aug;17(8):894-904.

Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M.

Microvascular vasomotion: origin of laser Doppler flux motion.

Int J Microcirc Clin Exp. 1994 May-Jun;14(3):151-8.

Colonnier M, O'Kusky J.

[Number of neurons and synapses in the visual cortex of different species]

Rev Can Biol. 1981 Mar;40(1):91-9. French.

PMID: 7244322 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Cooper R, Crow HJ, Walter WG, Winter AL.

Regional control of cerebral vascular reactivity and oxygen supply in man.

Brain Res. 1966 Dec;3(2):174-91.

Cox SB, Woolsey TA, Rovainen CM.

Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels.

J Cereb Blood Flow Metab. 1993 Nov;13(6):899-913.

Cragg BG.

The development of synapses in the visual system of the cat.

J Comp Neurol. 1975 Mar 15;160(2):147-66.

Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, Dujovny M, Diaz FG, Ausman JI.

Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries.

Anat Embryol (Berl). 1984;170(2):155-9.

Das A, Gilbert CD.

Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization

revealed by optical recording of cat primary visual cortex.

Nature. 1995 Jun 29;375(6534):780-4.

Detsch O, Vahle-Hinz C, Kochs E, Siemers M, Bromm B.

Isoflurane induces dose-dependent changes of thalamic somatosensory information transfer.

Brain Res. 1999 May 22;829(1-2):77-89.

Dinse H. et al.

Optical imaging of relationships between functional topographies in cat auditory cortex

Institut für Neuroinformatik

Internal Report 2000-2001

Dinse HR, Godde B, Hilger T, Reuter G, Cords SM, Lenarz T, von Seelen W.

Optical imaging of cat auditory cortex cochleotopic selectivity evoked by acute electrical stimulation of a multi-channel cochlear implant.

Eur J Neurosci. 1997 Jan;9(1):113-9.

Dinse HR, Reuter G, Cords SM, Godde B, Hilger T, Lenarz T.

Optical imaging of cat auditory cortical organization after electrical stimulation of a multichannel cochlear implant: differential effects of acute and chronic stimulation.

Am J Otol. 1997 Nov;18(6 Suppl):S17-8.

Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U, Villringer A.

Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide.?

Am J Physiol. 1994 Jul;267(1 Pt 2):H296-301.

Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W.

Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model.

J Cereb Blood Flow Metab. 1989 Oct;9(5):589-96.

Duvernoy HM.

Vascularization of the cerebral cortex

Rev Neurol (Paris). 1999;155(9):684-7.

Duvernoy HM.

Vascular microarchitecture of the cerebral cortex

Union Med Can. 1984 Apr;113(4):267-70, 282.

Duvernoy HM, Delon S, Vannson JL.

Cortical blood vessels of the human brain.

Brain Res Bull. 1981 Nov;7(5):519-79.

Edvinsson L, McCulloch J, Uddman R.

Feline cerebral veins and arteries: comparison of autonomic innervation and vasomotor responses.

J Physiol. 1982 Apr;325:161-73.

Ebner TJ, Chen G.

Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system.

Prog Neurobiol. 1995 Aug;46(5):463-506. Review.

Elul R.

The genesis of the EEG.

Int Rev Neurobiol. 1971 Jul;15:227-72.

Estrada C, DeFelipe J.

Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature.

Cereb Cortex. 1998 Apr-May;8(3):193-203. Review.

Fagrell B, Intaglietta M, Ostergren J.

Relative hematocrit in human skin capillaries and its relation to capillary blood flow velocity.

Microvasc Res. 1980 Nov;20(3):327-35.

Faraci FM, Brian JE Jr.

Nitric oxide and the cerebral circulation.

Stroke. 1994 Mar;25(3):692-703. Review.

Faraci FM, Breese KR.

Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain.

Circ Res. 1993 Feb;72(2):476-80.

Farber NE, Harkin CP, Niedfeldt J, Hudetz AG, Kampine JP, Schmeling WT.

Region-specific and agent-specific dilation of intracerebral microvessels by volatile anesthetics in rat brain slices.

Anesthesiology. 1997 Nov;87(5):1191-8.

Fasano VA, Urciuoli R, Bolognese P, Mostert M.

Intraoperative use of laser Doppler in the study of cerebral microvascular circulation.

Acta Neurochir (Wien). 1988;95(1-2):40-8.

Federico P, Borg SG, Salkauskus AG, MacVicar BA.

Mapping patterns of neuronal activity and seizure propagation by imaging intrinsic optical signals in the isolated whole brain of the guinea-pig.

Neuroscience. 1994 Feb;58(3):461-80.

Felleman DJ, Van Essen DC.

Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex.

Cereb Cortex. 1991 Jan-Feb;1(1):1-47. Review.

Fergus A, Lee KS.

GABAergic regulation of cerebral microvascular tone in the rat.

J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Sep;17(9):992-1003.

Fleming I, Busse R.

Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003 Jan;284(1):R1-12. Review.  
PMID: 12482742 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I.  
Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress.

Acta Physiol Scand. 2000 Jan;168(1):81-8.  
PMID: 10691783 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Fleming I, Busse R.  
Signal transduction of eNOS activation.  
Cardiovasc Res. 1999 Aug 15;43(3):532-41. Review.  
PMID: 10690325 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Fox PT, Raichle ME.  
Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Feb;83(4):1140-4.

Francois-Dainville E, Buchweitz E, Weiss HR.  
Effect of hypoxia on percent of arteriolar and capillary beds perfused in the rat brain.  
J Appl Physiol. 1986 Jan;60(1):280-8.

Frank RN, Dutta S, Mancini MA.  
Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1987 Jul;28(7):1086-91.

Fritsch G and Hitzig, E  
Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns  
*Arch. f. Anat., Physiol. und wissenschaftl. Mediz.*, Leipzig, 37, 1870, 300-32.

Frostig RD, Lieke EE, Ts'o DY, Grinvald A.  
Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(16):6082-6.

Fujii K, Heistad DD, Faraci FM.  
Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo.  
Circ Res. 1991 Sep;69(3):697-705.

Fujii K, Heistad DD, Faraci FM.  
Role of the basilar artery in regulation of blood flow to the brain stem in rats.  
Stroke. 1991 Jun;22(6):763-7.

Fujii K, Heistad DD, Faraci FM.

Ionic mechanisms in spontaneous vasomotion of the rat basilar artery in vivo.  
 J Physiol. 1990 Nov;430:389-98.  
 PMID: 2086768 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Fujii K, Heistad DD, Faraci FM.  
 Vasomotion of basilar arteries in vivo.  
 Am J Physiol. 1990 Jun;258(6 Pt 2):H1829-34.  
 PMID: 2360673 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Fukunishi K, Murai N, Uno H.  
 Dynamic characteristics of the auditory cortex of guinea pigs observed with  
 multichannel optical recording.  
 Biol Cybern. 1992;67(6):501-9.

Gaese BH, Ostwald J.  
 Anesthesia changes frequency tuning of neurons in the rat primary auditory  
 cortex.  
 J Neurophysiol. 2001 Aug;86(2):1062-6.

Galarreta M, Hestrin S.  
 Burst firing induces a rebound of synaptic strength at unitary neocortical  
 synapses.  
 J Neurophysiol. 2000 Jan;83(1):621-4.

Galaziuk AV, Volkov IO.  
 [Tonotopic organization of the dorsocaudal zone of auditory area All of the  
 cerebral cortex in the cat]  
 Neurofiziologija. 1988;20(2):220-7. Russian.

Gallen CC, Sobel DF, Lewine JD, Sanders JA, Hart BL, Davis LE, Orrison WW  
 Jr.  
 Neuromagnetic mapping of brain function.  
 Radiology. 1993 Jun;187(3):863-7.

Gerstein GL, Mandelbrot B.  
 random walk models for the spike activity of a single.  
 Biophys J. 1964 Jan;71:41-68.

Gevins A, Le J, Brickett P, Reutter B, Desmond J.  
 Seeing through the skull: advanced EEGs use MRIs to accurately measure cortical  
 activity from the scalp.  
 Brain Topogr. 1991 Winter;4(2):125-31. Review. Erratum in: Brain Topogr 1993  
 Fall;6(1):83.

Glyn MC, Ward BJ.  
 Contraction in cardiac endothelial cells contributes to changes in capillary  
 dimensions following ischaemia and reperfusion.  
 Cardiovasc Res. 2000 Nov;48(2):346-56.

Gobel U, Theilen H, Schrock H, Kuschinsky W.  
 Dynamics of capillary perfusion in the brain.

Blood Vessels. 1991;28(1-3):190-6.

Gobel U, Theilen H, Kuschinsky W.  
Congruence of total and perfused capillary network in rat brains.  
Circ Res. 1990 Feb;66(2):271-81.

Gobel U, Klein B, Schrock H, Kuschinsky W.  
Lack of capillary recruitment in the brains of awake rats during hypercapnia.  
J Cereb Blood Flow Metab. 1989 Aug;9(4):491-9.

Gochin PM, Bedenbaugh P, Gelfand JJ, Gross CG, Gerstein GL.  
Intrinsic signal optical imaging in the forepaw area of rat somatosensory cortex.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1;89(17):8381-3.

Godde B, Hilger T, von Seelen W, Berkefeld T, Dinse HR.  
Optical imaging of rat somatosensory cortex reveals representational overlap as topographic principle.  
Neuroreport. 1995 Dec 29;7(1):24-8.

Golanov EV, Reis DJ.  
Cerebral cortical neurons with activity linked to central neurogenic spontaneous and evoked elevations in cerebral blood flow.  
Neurosci Lett. 1996 May 10;209(2):101-4.

Golanov EV, Reis DJ.  
Vasodilation evoked from medulla and cerebellum is coupled to bursts of cortical EEG activity in rats.  
Am J Physiol. 1995 Feb;268(2 Pt 2):R454-67.

Golanov EV, Yamamoto S, Reis DJ.  
Spontaneous waves of cerebral blood flow associated with a pattern of electrocortical activity.  
Am J Physiol. 1994 Jan;266(1 Pt 2):R204-14.

Gotoh F, Fukuuchi Y, Okayasu H, Tanaka K, Suzuki N, Kobari M.  
*Rhythmic changes in diameter of pial vessels and function of autonomic nervous system.* In: Cerebral Blood Flow: Effects of Nerves and Neurotransmitters (Heistad D.D., Marcus M.L., eds) Amsterdam, Elsevier North Holland, pp409-417 1982

Grote J.  
Kap "Gewebeatmung", Schmidt, Thews "  
Physiologie des Menschen"  
27. Aufl, 1997  
S.631  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Grinvald A, Ross WN, Farber I.  
Simultaneous optical measurements of electrical activity from multiple sites on processes of cultured neurons.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 May;78(5):3245-9.

- Grinvald A, Manker A, Segal M.  
Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes.  
J Physiol. 1982 Dec;333:269-91.
- Grinvald A, Anglister L, Freeman JA, Hildesheim R, Manker A.  
Real-time optical imaging of naturally evoked electrical activity in intact frog brain.  
Nature. 1984 Apr 26-May 2;308(5962):848-50.
- Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN.  
Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals.  
Nature. 1986 Nov 27-Dec 3;324(6095):361-4.
- Grinvald A, Segal M, Kuhnt U, Hildesheim R, Manker A, Anglister L, Freeman JA.  
Real-time optical mapping of neuronal activity in vertebrate CNS in vitro and in vivo.  
Soc Gen Physiol Ser. 1986;40:165-97.
- Grinvald A, Frostig RD, Lieke E, Hildesheim R.  
Optical imaging of neuronal activity.  
Physiol Rev. 1988 Oct;68(4):1285-366.
- Gross SS, Lane P.  
Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 31;96(18):9967-9. Review.
- Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF.  
Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region.  
Eur J Neurosci. 1993 Dec 1;5(12):1729-51.
- Gustafsson H.  
Vasomotion and underlying mechanisms in small arteries. An in vitro study of rat blood vessels.  
Acta Physiol Scand Suppl. 1993;614:1-44. Review.
- Hammer RP Jr, Herkenham M.  
Altered metabolic activity in the cerebral cortex of rats exposed to ketamine.  
J Comp Neurol. 1983 Nov 10;220(4):396-404.
- Hapfelmeier G, Haseneder R, Eder M, Adelsberger H, Kochs E, Rammes G, Zieglgansberger W.  
Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block.  
Neurosci Lett. 2001 Jul 13;307(2):97-100.

Hapfelmeier G, Haseneder R, Kochs E, Beyerle M, Zieglgansberger W.

Coadministered nitrous oxide enhances the effect of isoflurane on GABAergic transmission by an increase in open-channel block.

J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jul;298(1):201-8.

Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D.

Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity.

News Physiol Sci. 2002 Feb;17:27-31. Review.

Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ.

Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites.

Stroke. 1998 Jan;29(1):229-34. Review.

Harrison RV, Harel N, Panesar J, Mount RJ.

Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex.

Cereb Cortex. 2002 Mar;12(3):225-33.

Harrison RV, Harel N, Hamrahi H, Panesar J, Mori N, Mount RJ.

Local haemodynamic changes associated with neural activity in auditory cortex.

Acta Otolaryngol. 2000 Mar;120(2):255-8.

Harrison RV, Ibrahim D, Mount RJ.

Plasticity of tonotopic maps in auditory midbrain following partial cochlear damage in the developing chinchilla.

Exp Brain Res. 1998 Dec;123(4):449-60.

Harrison RV, Nagasawa A, Smith DW, Stanton S, Mount RJ.

Reorganization of auditory cortex after neonatal high frequency cochlear hearing loss.

Hear Res. 1991 Jul;54(1):11-9.

Hartmann R, Shepherd RK, Heid S, Klinke R.

Response of the primary auditory cortex to electrical stimulation of the auditory nerve in the congenitally deaf white cat.

Hear Res. 1997 Oct;112(1-2):115-33.

Hartmann R, Klinke R, Heid S.

Functional organization of the auditory cortex in the congenitally deaf white cat In: "Acoustical Signal Processing in the Central Auditory System"

Syka J. Ed

Plenum Press, New York, London 1997b

Hartmann R, Topp G, Klinke R.

Discharge patterns of cat primary auditory fibers with electrical stimulation of the cochlea.

Hear Res. 1984 Jan;13(1):47-62.

Hartman JC, Pagel PS, Proctor LT, Kampine JP, Schmeling WT, Wartier DC.

Influence of desflurane, isoflurane and halothane on regional tissue perfusion

in dogs.

Can J Anaesth. 1992 Oct;39(8):877-87.

Heid S, Hartmann R, Klinke R.

A model for prelingual deafness, the congenitally deaf white cat--population statistics and degenerative changes.

Hear Res. 1998 Jan;115(1-2):101-12.

Heid S, Jahn-Siebert TK, Klinke R, Hartmann R, Langner G.

Afferent projection patterns in the auditory brainstem in normal and congenitally deaf white cats.

Hear Res. 1997 Aug;110(1-2):191-9.

Hempel FG, Jobsis FF, LaManna JL, Rosenthal MR, Saltzman HA.

Oxidation of cerebral cytochrome aa3 by oxygen plus carbon dioxide at hyperbaric pressures.

J Appl Physiol. 1977 Nov;43(5):873-9.

Hess A.

Inaugural-Dissertation: „Intrinsische optische Registrierungen im auditorischen Cortex der Mongolischen Wüsterenmaus“ (Meriones unguiculatus)

Darmstadt 1996

Hess A, Scheich H.

Optical and FDG mapping of frequency-specific activity in auditory cortex.

Neuroreport. 1996 Nov 4;7(15-17):2643-7.

Hill, D.K. & Keynes, R.D.

Opacity changes in stimulated nerve.

J. Physiol. 1949, 108, 278 281.

Hoge RD, Atkinson J, Gill B, Crelier GR, Marrett S, Pike GB.

Investigation of BOLD signal dependence on cerebral blood flow and oxygen consumption: the deoxyhemoglobin dilution model.

Magn Reson Med. 1999 Nov;42(5):849-63.

PMID: 10542343 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Hoge RD, Atkinson J, Gill B, Crelier GR, Marrett S, Pike GB.

Linear coupling between cerebral blood flow and oxygen consumption in activated human cortex.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 3;96(16):9403-8.

PMID: 10430955 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Holthoff K, Witte OW.

Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space.

J Neurosci. 1996 Apr 15;16(8):2740-9.

Horikawa J, Hess A, Nasu M, Hosokawa Y, Scheich H, Taniguchi I.

Optical imaging of neural activity in multiple auditory cortical fields of guinea pigs.

Neuroreport. 2001 Oct 29;12(15):3335-9.

Horton JC, Hubel DH.

Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey.

Nature. 1981 Aug 20;292(5825):762-4.

Hubel DH, Wiesel TN.

Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex.

J Physiol. 1959 Oct;148:574-91.

Hudetz AG.

Blood flow in the cerebral capillary network: a review emphasizing observations with intravital microscopy.

Microcirculation. 1997 Jun;4(2):233-52. Review.

Hudetz AG, Feher G, Weigle CG, Knuese DE, Kampine JP.

Video microscopy of cerebrocortical capillary flow: response to hypotension and intracranial hypertension.

Am J Physiol. 1995 Jun;268(6 Pt 2):H2202-10.

Hudetz AG, Roman RJ, Harder DR.

Spontaneous flow oscillations in the cerebral cortex during acute changes in mean arterial pressure.

J Cereb Blood Flow Metab. 1992 May;12(3):491-9.

Hudetz AG, Spaulding JG, Kiani MF.

Computer simulation of cerebral microhemodynamics.

Adv Exp Med Biol. 1989;248:293-304.

Hudetz AG, Conger KA, Halsey JH Jr, Pal M, Dohan O, Kovach AG.

Pressure distribution in the pial arterial system of rats based on morphometric data and mathematical models.

J Cereb Blood Flow Metab. 1987 Jun;7(3):342-55.

Hundley WG, Renaldo GJ, Levasseur JE, Kontos HA.

Vasomotion in cerebral microcirculation of awake rabbits.

Am J Physiol. 1988 Jan;254(1 Pt 2):H67-71.

Iadecola C, Yang G, Xu S.

7-Nitroindazole attenuates vasodilation from cerebellar parallel fiber stimulation but not acetylcholine.

Am J Physiol. 1996 Apr;270(4 Pt 2):R914-9.

Imaizumi K, Priebe NJ, Crum PA, Bedenbaugh PH, Cheung SW, Schreiner CE.

Modular functional organization of cat anterior auditory field.

J Neurophysiol. 2004 Jul;92(1):444-57. Epub 2004 Mar 10.

Imig TJ, Reale RA.

Ipsilateral corticocortical projections related to binaural columns in cat primary auditory cortex.

J Comp Neurol. 1981 Nov 20;203(1):1-14.

Imig TJ, Adrian HO.

Binaural columns in the primary field (A1) of cat auditory cortex.  
Brain Res. 1977 Dec 16;138(2):241-57.

Ishikawa T, Maekawa T, Shinohara K, Sakabe T, Takeshita H.

[Differential effects of isoflurane and nitrous oxide on cerebral blood flow, metabolism and electrocorticogram after incomplete cerebral ischemia in the rat]  
Nippon Yakurigaku Zasshi. 1989 Jul;94(1):73-80.

Iwase K, Miyanaka K, Shimizu A, Nagasaki A, Gotoh T, Mori M, Takiguchi M.

Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment.  
J Biol Chem. 2000 Apr 21;275(16):11929-33.

Janigro D, Wender R, Ransom G, Tinklepaugh DL, Winn HR.

Adenosine-induced release of nitric oxide from cortical astrocytes.  
Neuroreport. 1996 Jul 8;7(10):1640-4.

Jobsis FF, Keizer JH, LaManna JC, Rosenthal M.

Reflectance spectrophotometry of cytochrome aa3 in vivo.  
J Appl Physiol. 1977 Nov;43(5):858-72. No abstract available.

Jones M, Hewson-Stoate N, Martindale J, Redgrave P, Mayhew J.

Nonlinear coupling of neural activity and CBF in rodent barrel cortex.  
Neuroimage. 2004 Jun;22(2):956-65.

Jones M, Berwick J, Mayhew J.

Changes in blood flow, oxygenation, and volume following extended stimulation of rodent barrel cortex.  
Neuroimage. 2002 Mar;15(3):474-87.

Jones M, Berwick J, Johnston D, Mayhew J.

Concurrent optical imaging spectroscopy and laser-Doppler flowmetry: the relationship between blood flow, oxygenation, and volume in rodent barrel cortex.  
Neuroimage. 2001 Jun;13(6 Pt 1):1002-15.

Jueptner M, Weiller C.

Review: does measurement of regional cerebral blood flow reflect synaptic activity? Implications for PET and fMRI.  
Neuroimage. 1995 Jun;2(2):148-56. Review.

Kahle W.

Taschenatlas der Anatomie, S.158 f., 5. überarbeitete Ausgabe 1986  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York  
Deutscher Taschenbuchverlag

Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D.

Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall.

J Cell Biol. 1987 Mar;104(3):483-90.

Keep RF, Jones HC.

Cortical microvessels during brain development: a morphometric study in the rat.

Microvasc Res. 1990 Nov;40(3):412-26.

Kim, DS

Diplomarbeit

Kleinschmidt A, Obrig H, Requardt M, Merboldt KD, Dirnagl U, Villringer A, Frahm J.

Simultaneous recording of cerebral blood oxygenation changes during human brain activation by magnetic resonance imaging and near-infrared spectroscopy.

J Cereb Blood Flow Metab. 1996 Sep;16(5):817-26.

Klee MR, Offenloch K, Tigges J.

Cross-correlation analysis of electroencephalographic potentials and slow membrane transients

Science. 1965 Jan 29;147:519-21.

Kral A, Tillein J, Hartmann R, Klinke R.

Monitoring of anaesthesia in neurophysiological experiments.

Neuroreport. 1999 Mar 17;10(4):781-7.

Kral A, Hartmann R, Mortazavi D, Klinke R.

Spatial resolution of cochlear implants: the electrical field and excitation of auditory afferents.

Hear Res. 1998 Jul;121(1-2):11-28.

Krogh, A. 1919. The number and distribution of capillaries in muscle with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue.

J. Physiol. (Lond.). 52:409-415.

Krolo I, Hudetz AG.

Hypoxemia alters erythrocyte perfusion pattern in the cerebral capillary network.

Microvasc Res. 2000 Jan;59(1):72-9.

Krnjevic K.

Cellular and synaptic actions of general anaesthetics.

Gen Pharmacol. 1992 Nov;23(6):965-75. Review.

Kontos HA, Wei EP, Navari RM, Levasseur JE, Rosenblum WI, Patterson JL Jr.

Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension.

Am J Physiol. 1978 Apr;234(4):H371-83.

Krimer LS, Muly EC 3rd, Williams GV, Goldman-Rakic PS.

Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation.

Nat Neurosci. 1998 Aug;1(4):286-9.

Kuschinsky W.

Capillary perfusion in the brain.  
Pflugers Arch. 1996;432(3 Suppl):R42-6.

Kuschinsky W, Paulson OB.

Capillary circulation in the brain.  
Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1992 Fall;4(3):261-86. Review.

Kuwada S, Batra R, Stanford TR.

Monaural and binaural response properties of neurons in the inferior colliculus of the rabbit: effects of sodium pentobarbital.  
J Neurophysiol. 1989 Feb;61(2):269-82.

LaManna JC, Sick TJ, Pikarsky SM, Rosenthal M.

Detection of an oxidizable fraction of cytochrome oxidase in intact rat brain.  
Am J Physiol. 1987 Sep;253(3 Pt 1):C477-83.

Lampl I, Reichova I, Ferster D.

Synchronous membrane potential fluctuations in neurons of the cat visual cortex.  
Neuron. 1999 Feb;22(2):361-74.

Langsjö JW, Kaisti KK, Aalto S, Hinkka S, Aantaa R, Oikonen V, Sipilä H, Kurki T, Silvanto M, Scheinin H.

Effects of subanesthetic doses of ketamine on regional cerebral blood flow, oxygen consumption, and blood volume in humans.  
Anesthesiology. 2003 Sep;99(3):614-23.

Larsen M, Langmoen IA.

The effect of volatile anaesthetics on synaptic release and uptake of glutamate.  
Toxicol Lett. 1998 Nov 23;100-101:59-64. Review.

Larsen M, Grondahl TO, Haugstad TS, Langmoen IA.

The effect of the volatile anesthetic isoflurane on Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release from rat cerebral cortex.  
Brain Res. 1994 Nov 14;663(2):335-7.

Lauritzen M.

Relationship of spikes, synaptic activity, and local changes of cerebral blood flow.  
J Cereb Blood Flow Metab. 2001 Dec;21(12):1367-83. Review.

Lazorthes G, Espagno J, Lazorthes Y, Zadeh JO.

The vascular architecture of the cortex and the cortical blood flow.  
Prog Brain Res. 1968;30:27-32.

Le Beux YJ, Willemot J.

Actin- and myosin-like filaments in rat brain pericytes.  
Anat Rec. 1978 Apr;190(4):811-26.

Le Beux YJ, Willemot J.

Actin-like filaments in the endothelial cells of adult rat brain capillaries.  
Exp Neurol. 1978 Feb;58(3):446-54. No abstract available.

Legendy CR, Salzman M.

Bursts and recurrences of bursts in the spike trains of spontaneously active striate cortex neurons.  
J Neurophysiol. 1985 Apr;53(4):926-39.

Levine MW, Saleh EJ, Yarnold PR.

Statistical properties of the maintained discharge of chemically isolated ganglion cells in goldfish retina.  
Vis Neurosci. 1988;1(1):31-46.

Levkowitz, Lester

Manual of Close-Up Photography  
Watson-Guipill Pubns June 1979

Li J, Iadecola C.

Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex.  
Neuropharmacology. 1994 Nov;33(11):1453-61.

Li Q, Puro DG.

Adenosine activates ATP-sensitive K(+) currents in pericytes of rat retinal microvessels: role of A1 and A2a receptors.  
Brain Res. 2001 Jul 13;907(1-2):93-9.

Lindauer U, Royl G, Leithner C, Kuhl M, Gold L, Gethmann J, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U.

No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation.  
Neuroimage. 2001 Jun;13(6 Pt 1):988-1001.

Lipton P.

Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebral cortical slices.  
J Physiol. 1973 Jun;231(2):365-83.

Livingstone MS, Hubel DH.

Anatomy and physiology of a color system in the primate visual cortex.  
J Neurosci. 1984 Jan;4(1):309-56.

Lo EH, Sun GH, Steinberg GK.

Effects of NMDA and calcium channel antagonists on regional cerebral blood flow.  
Neurosci Lett. 1991 Sep 30;131(1):17-20.

Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A.

Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal.  
Nature. 2001 Jul 12;412(6843):150-7.

- Lopes da Silva FH, Wieringa HJ, Peters MJ.  
Source localization of EEG versus MEG: empirical comparison using visually evoked responses and theoretical considerations.  
Brain Topogr. 1991 Winter;4(2):133-42.
- Lopes Da Silva FH.  
Analysis of EEG non-stationarities.  
Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl. 1978(34):163-79. Review.
- MacVicar BA, Feighan D, Brown A, Ransom B.  
Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: role for K(+) uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes.  
Glia. 2002 Feb;37(2):114-23.
- MacVicar BA, Hochman D.  
Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices.  
J Neurosci. 1991 May;11(5):1458-69.
- Magistretti PJ, Pellerin L.  
Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain.  
News Physiol Sci. 1999 Oct;14:177-182.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG.  
Energy on demand.  
Science. 1999 Jan 22;283(5401):496-7.
- Magistretti PJ, Pellerin L.  
Regulation by neurotransmitters of glial energy metabolism.  
Adv Exp Med Biol. 1997;429:137-43. Review. No abstract available.
- Magistretti PJ, Pellerin L.  
Metabolic coupling during activation. A cellular view.  
Adv Exp Med Biol. 1997;413:161-6. Review. No abstract available.
- Magistretti PJ, Pellerin L.  
Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes.  
Cereb Cortex. 1996 Jan-Feb;6(1):50-61. Review.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ.  
Reliability of spike timing in neocortical neurons.  
Science. 1995 Jun 9;268(5216):1503-6.
- Malonek D, Dirnagl U, Lindauer U, Yamada K, Kanno I, Grinvald A.  
Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 23;94(26):14826-31.
- Martindale J, Mayhew J, Berwick J, Jones M, Martin C, Johnston D, Redgrave

P, Zheng Y.

The hemodynamic impulse response to a single neural event.  
J Cereb Blood Flow Metab. 2003 May;23(5):546-55.

Matsugi T, Chen Q, Anderson DR.

Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997 Dec;38(13):2695-701.

Mathiesen C, Caesar K, Akgoren N, Lauritzen M.

Modification of activity-dependent increases of cerebral blood flow by excitatory synaptic activity and spikes in rat cerebellar cortex.  
J Physiol. 1998 Oct 15;512 ( Pt 2):555-66.

Mayer B, Hemmens B.

Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells.  
Trends Biochem Sci. 1997 Dec;22(12):477-81. Review. Erratum in: Trends Biochem Sci 1998 Feb;23(2):87.

Mayhew J, Johnston D, Berwick J, Jones M, Coffey P, Zheng Y.

Spectroscopic analysis of neural activity in brain: increased oxygen consumption following activation of barrel cortex.  
Neuroimage. 2000 Dec;12(6):664-75. Erratum in: Neuroimage 2001 Mar;13(3):540-3.

Mayhew JE, Askew S, Zheng Y, Porrill J, Westby GW, Redgrave P, Rector DM, Harper RM.

Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity.  
Neuroimage. 1996 Dec;4(3 Pt 1):183-93.

Mchedlishvili G, Varazashvili M.

Hematocrit in cerebral capillaries and veins under control and ischemic conditions.  
J Cereb Blood Flow Metab. 1987 Dec;7(6):739-44.

Merzenich MM, Knight PL, Roth GL.

Representation of cochlea within primary auditory cortex in the cat.  
J Neurophysiol. 1975 Mar;38(2):231-49.

Merzenich MM, Reid MD.

Representation of the cochlea within the inferior colliculus of the cat.  
Brain Res. 1974 Sep 13;77(3):397-415.

Merzenich MM, Knight PL, Roth GL.

Cochleotopic organization of primary auditory cortex in the cat.  
Brain Res. 1973 Dec 7;63:343-6. No abstract available.  
PMID: 4764302 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Mintun MA, Lundstrom BN, Snyder AZ, Vlassenko AG, Shulman GL, Raichle ME.

Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 5;98(12):6859-64. Epub 2001 May 29.

Mitra PP, Ogawa S, Hu X, Ugurbil K.  
The nature of spatiotemporal changes in cerebral hemodynamics as manifested in functional magnetic resonance imaging.  
Magn Reson Med. 1997 Apr;37(4):511-8.

Momose-Sato Y, Sato K, Arai Y, Yazawa I, Mochida H, Kamino K.  
Evaluation of voltage-sensitive dyes for long-term recording of neural activity in the hippocampus.  
J Membr Biol. 1999 Nov 15;172(2):145-57.

Moskalenko YE, Dowling JL, Liu D, Rovainen CM, Semernia VN, Woolsey TA.  
LCBF changes in rat somatosensory cortex during whisker stimulation monitored by dynamic H<sub>2</sub> clearance.  
Int J Psychophysiol. 1996 Jan;21(1):45-59.

Mountcastle VB, Talbot WH, Sakata H, Hyvarinen J.  
Cortical neuronal mechanisms in flutter-vibration studied in unanesthetized monkeys. Neuronal periodicity and frequency discrimination.  
J Neurophysiol. 1969 May;32(3):452-84.

Murphy TH, Blatter LA, Wier WG, Baraban JM.  
Rapid communication between neurons and astrocytes in primary cortical cultures.  
J Neurosci. 1993 Jun;13(6):2672-9.

Nag S, Robertson DM, Dinsdale HB.  
Cytoplasmic filaments in intracerebral cortical vessels.  
Ann Neurol. 1978 Jun;3(6):555-9.

Nakai M, Iadecola C, Ruggiero DA, Tucker LW, Reis DJ.  
Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus increases cerebral cortical blood flow without change in local metabolism: evidence for an intrinsic system in brain for primary vasodilation.  
Brain Res. 1983 Jan 31;260(1):35-49.

Nakai M, Iadecola C, Reis DJ.  
Global cerebral vasodilation by stimulation of rat fastigial cerebellar nucleus.  
Am J Physiol. 1982 Aug;243(2):H226-35.

Narayan SM, Esfahani P, Blood AJ, Sikkens L, Toga AW.  
Functional increases in cerebral blood volume over somatosensory cortex.  
J Cereb Blood Flow Metab. 1995 Sep;15(5):754-65.

Navari RM, Wei EP, Kontos HA, Patterson JL Jr.

Comparison of the open skull and cranial window preparations in the study of the cerebral microcirculation.

Microvasc Res. 1978 Nov;16(3):304-15.

Nemoto M, Sheth S, Guiou M, Pouratian N, Chen JW, Toga AW.

Functional signal- and paradigm-dependent linear relationships between synaptic activity and hemodynamic responses in rat somatosensory cortex.

J Neurosci. 2004 Apr 14;24(15):3850-61.

Nemoto M, Nomura Y, Sato C, Tamura M, Houkin K, Koyanagi I, Abe H.

Analysis of optical signals evoked by peripheral nerve stimulation in rat somatosensory cortex: dynamic changes in hemoglobin concentration and oxygenation.

J Cereb Blood Flow Metab. 1999 Mar;19(3):246-59.

Noda H, Adey WR.

Firing variability in cat association cortex during sleep and wakefulness.

Brain Res. 1970 Mar 17;18(3):513-26.

O'Kusky J, Colonnier M.

A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the adult cortex (area 17) of adult macaque monkeys.

J Comp Neurol. 1982 Sep 20;210(3):278-90.

Orbach HS, Cohen LB.

Optical monitoring of activity from many areas of the in vitro and in vivo salamander olfactory bulb: a new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system.

J Neurosci. 1983 Nov;3(11):2251-62.

Oren RE, Rasool NA, Rubinstein EH.

Effect of ketamine on cerebral cortical blood flow and metabolism in rabbits.

Stroke. 1987 Mar-Apr;18(2):441-4.

Paakkari I, Lindsberg P.

Nitric oxide in the central nervous system.

Ann Med. 1995 Jun;27(3):369-77. Review.

Panesar J, Hamrahi H, Harel N, Mori N, Mount RJ, Harrison RV.

Arterial blood supply to the auditory cortex of the chinchilla.

Acta Otolaryngol. 2001 Oct;121(7):839-43.

Paulson OB, Newman EA.

Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?

Science. 1987 Aug 21;237(4817):896-8.

Pawlik G, Rackl A, Bing RJ.

Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study.

Brain Res. 1981 Mar 9;208(1):35-58.

Pena M, Maki A, Kovacic D, Dehaene-Lambertz G, Koizumi H, Bouquet F, Mehler J.  
Sounds and silence: an optical topography study of language recognition at birth.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 30;100(20):11702-5. Epub 2003 Sep 19.

Penny WD, Kiebel SJ, Kilner JM, Rugg MD.

Event-related brain dynamics.

Trends Neurosci. 2002 Aug;25(8):387-9. Review.

Peterson BE, Goldreich D, Merzenich MM.

Optical imaging and electrophysiology of rat barrel cortex. I. Responses to small single-vibrissa deflections.

Cereb Cortex. 1998 Mar;8(2):173-83.

Phillips DP.

Effect of tone-pulse rise time on rate-level functions of cat auditory cortex neurons: excitatory and inhibitory processes shaping responses to tone onset.

J Neurophysiol. 1988 May;59(5):1524-39.

Phillips DP, Irvine DR.

Properties of single neurons in the anterior auditory field (AAF) of cat cerebral cortex.

Brain Res. 1982 Sep 30;248(2):237-44.

Phillips DP, Irvine DR.

Methodological considerations in mapping auditory cortex: binaural columns in AI of cat.

Brain Res. 1979 Feb 2;161(2):342-6.

Piatt JH Jr, Schiff SJ.

High dose barbiturate therapy in neurosurgery and intensive care.

Neurosurgery. 1984 Sep;15(3):427-44.

Poeggel G, Muller M, Seidel I, Rechartd L, Bernstein HG.

Histochemistry of guanylate cyclase, phosphodiesterase, and NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) in rat brain vasculature.

J Cardiovasc Pharmacol. 1992;20 Suppl 12:S76-9.

Popelar J, Hartmann R, Syka J, Klinke R.

Middle latency responses to acoustical and electrical stimulation of the cochlea in cats.

Hear Res. 1995 Dec;92(1-2):63-77.

Porter JT, McCarthy KD.

Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo.

Prog Neurobiol. 1997 Mar;51(4):439-55. Review.

Porter JT, McCarthy KD.

Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals.

J Neurosci. 1996 Aug 15;16(16):5073-81.

Powers WJ, Hirsch IB, Cryer PE.

Effect of stepped hypoglycemia on regional cerebral blood flow response to physiological brain activation.

Am J Physiol. 1996 Feb;270(2 Pt 2):H554-9.

Prichard J, Rothman D, Novotny E, Petroff O, Kuwabara T, Avison M, Howseman A, Hanstock C, Shulman R.

Lactate rise detected by <sup>1</sup>H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jul 1;88(13):5829-31.

Rajan R, Irvine DR, Cassell JF.

Normative N1 audiogram data for the barbiturate-anaesthetised domestic cat.

Hear Res. 1991 May;53(1):153-8.

Raichle ME, Hartman BK, Eichling JO, Sharpe LG.

Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Sep;72(9):3726-30.

Ransom BR, Yamate CL, Connors BW.

Activity-dependent shrinkage of extracellular space in rat optic nerve: a developmental study.

J Neurosci. 1985 Feb;5(2):532-5.

Ratzlaff EH, Grinvald A.

A tandem-lens epifluorescence microscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging.

J Neurosci Methods. 1991 Feb;36(2-3):127-37.

Reale RA, Brugge JF, Feng JZ.

Geometry and orientation of neuronal processes in cat primary auditory cortex (AI) related to characteristic-frequency maps.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Sep;80(17):5449-53.

Reale RA, Imig TJ.

Tonotopic organization in auditory cortex of the cat.

J Comp Neurol. 1980 Jul 15;192(2):265-91.

Reina-De La Torre F, Rodriguez-Baeza A, Sahuquillo-Barris J.

Morphological characteristics and distribution pattern of the arterial vessels in human cerebral cortex: a scanning electron microscope study.

Anat Rec. 1998 May;251(1):87-96.

Reis DJ, Golanov EV, Ruggiero DA, Sun MK.

Sympatho-excitatory neurons of the rostral ventrolateral medulla are oxygen sensors and essential elements in the tonic and reflex control of the systemic and cerebral circulations.

J Hypertens Suppl. 1994 Dec;12(10):S159-80. Review.

- Reser DH, Fishman YI, Arezzo JC, Steinschneider M.  
Binaural interactions in primary auditory cortex of the awake macaque.  
Cereb Cortex. 2000 Jun;10(6):574-84.
- Roe AW, Ts'o DY.  
Visual topography in primate V2: multiple representation across functional stripes.  
J Neurosci. 1995 May;15(5 Pt 2):3689-715.
- Rosenmund C, Clements JD, Westbrook GL.  
Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse.  
Science. 1993 Oct 29;262(5134):754-7.
- Rosenblum BR, Bonner RF, Oldfield EH.  
Intraoperative measurement of cortical blood flow adjacent to cerebral AVM using laser Doppler velocimetry.  
J Neurosurg. 1987 Mar;66(3):396-9.
- Rosenblum WI, Commonwealth V.  
Vascular resistance in the cerebral circulation: *Location and potential consequences with respect to the effect of neurogenic stimuli on flow*. In: Neurogenic Control of Brain Circulation (Owman C, Edvinsson L eds), Oxford, New York, Pergamon Press, pp 221-229. 1977
- Roufail E, Stringer M, Rees S.  
Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining are co-localised in neurons closely associated with the vasculature in rat and human retina.  
Brain Res. 1995 Jun 26;684(1):36-46.
- Rouiller EM, Simm GM, Villa AE, de Ribaupierre Y, de Ribaupierre F.  
Auditory corticocortical interconnections in the cat: evidence for parallel and hierarchical arrangement of the auditory cortical areas.  
Exp Brain Res. 1991;86(3):483-505.
- Roy C, Sherrington C.  
On the regulation of the blood-supply of the brain,  
Journal of Physiology 11:85-108, 1890
- Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE.  
Cellular mechanisms of CNS pericytes.  
Brain Res Bull. 2000 Mar 15;51(5):363-9. Review.
- Rudolph KK, Pasternak T.  
Lesions in cat lateral suprasylvian cortex affect the perception of complex motion.  
Cereb Cortex. 1996 Nov-Dec;6(6):814-22.
- Sakagami K, Kawamura H, Wu DM, Puro DG.  
Nitric oxide/cGMP-induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes.

Microvasc Res. 2001 Sep;62(2):196-203.

Salin PA, Bullier J.

Corticocortical connections in the visual system: structure and function.  
Physiol Rev. 1995 Jan;75(1):107-54. Review.

Sato A, Sato Y.

Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain.  
Neurosci Res. 1992 Sep;14(4):242-74. Review.

Schellart NA, Spekreijse H.

Origin of the stochastic nature of ganglion cell activity in isolated goldfish retina.  
Vision Res. 1973 Feb;13(2):337-45.

Scheller MS, Todd MM, Drummond JC, Zornow MH.

The intracranial pressure effects of isoflurane and halothane administered following cryogenic brain injury in rabbits.  
Anesthesiology. 1987 Oct;67(4):507-12.

Scheller MS, Todd MM, Drummond JC.

Isoflurane, halothane, and regional cerebral blood flow at various levels of PaCO<sub>2</sub> in rabbits.  
Anesthesiology. 1986 May;64(5):598-604.

Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D.

Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium.  
J Physiol. 1990 Dec;431:379-401.

Schnittler H, Franke RP, Drenckhahn D.

Role of the endothelial actin filament cytoskeleton in rheology and permeability.  
Z Kardiol. 1989;78 Suppl 6:1-4.

Schreiner CE, Read HL, Sutter ML.

Modular organization of frequency integration in primary auditory cortex.  
Annu Rev Neurosci. 2000;23:501-29. Review.

Schreiner CE, Mendelson JR.

Functional topography of cat primary auditory cortex: distribution of integrated excitation.  
J Neurophysiol. 1990 Nov;64(5):1442-59.

Schreiner CE, Cynader MS.

Basic functional organization of second auditory cortical field (AII) of the cat.  
J Neurophysiol. 1984 Jun;51(6):1284-305.

Schurr A, West CA, Rigor BM.

Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation.  
*Science*. 1988 Jun 3;240(4857):1326-8.

Schwender D, Klasing S, Madler C, Poppel E, Peter K.  
 Mid-latency auditory evoked potentials during ketamine anaesthesia in humans.  
*Br J Anaesth*. 1993 Nov;71(5):629-32.

Shadlen MN, Newsome WT.  
 Is there a signal in the noise?  
*Curr Opin Neurobiol*. 1995 Apr;5(2):248-50.

Shadlen MN, Newsome WT.  
 Noise, neural codes and cortical organization.  
*Curr Opin Neurobiol*. 1994 Aug;4(4):569-79. Review.

Sherk H, Fowler GA.  
 Lesions of extrastriate cortex and consequences for visual guidance during locomotion.  
*Exp Brain Res*. 2002 May;144(2):159-71. Epub 2002 Mar 26.

Shockley RP, LaManna JC.  
 Determination of rat cerebral cortical blood volume changes by capillary mean transit time analysis during hypoxia, hypercapnia and hyperventilation.  
*Brain Res*. 1988 Jun 28;454(1-2):170-8.

Sengpiel F, Blakemore C.  
 Interocular control of neuronal responsiveness in cat visual cortex.  
*Nature*. 1994 Apr 28;368(6474):847-50.

Smith DI, Kraus N.  
 Effects of chloral hydrate, pentobarbital, ketamine, and curare on the auditory middle latency response.  
*Am J Otolaryngol*. 1987 Jul-Aug;8(4):241-8.

Snowden RJ, Treue S, Andersen RA.  
 The response of neurons in areas V1 and MT of the alert rhesus monkey to moving random dot patterns.  
*Exp Brain Res*. 1992;88(2):389-400.

Softky WR, Koch C.  
 The highly irregular firing of cortical cells is inconsistent with temporal integration of random EPSPs.  
*J Neurosci*. 1993 Jan;13(1):334-50. Review.

Spitzer MW, Calford MB, Clarey JC, Pettigrew JD, Roe AW.  
 Spontaneous and stimulus-evoked intrinsic optical signals in primary auditory cortex of the cat.  
*J Neurophysiol*. 2001 Mar;85(3):1283-98.

Stepnoski RA, LaPorta A, Raccuia-Behling F, Blonder GE, Slusher RE, Kleinfeld D.

Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 1;88(21):9382-6.

Steriade M, Nunez A, Amzica F.

A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components.

J Neurosci. 1993 Aug;13(8):3252-65.

Thomas WE.

Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells.

Brain Res Brain Res Rev. 1999 Dec;31(1):42-57. Review.

Torterolo P, Zurita P, Pedemonte M, Velluti RA.

Auditory cortical efferent actions upon inferior colliculus unitary activity in the guinea pig.

Neurosci Lett. 1998 Jun 19;249(2-3):172-6.

Toth LJ, Rao SC, Kim DS, Somers D, Sur M.

Subthreshold facilitation and suppression in primary visual cortex revealed by intrinsic signal imaging.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9869-74.

Ts'o DY, Frostig RD, Lieke EE, Grinvald A.

Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging.

Science. 1990 Jul 27;249(4967):417-20.

Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A, Arieli A.

Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture.

Science. 1999 Dec 3;286(5446):1943-6.

**Tusques J**, Couderc M, George Y.

[Microglia and pericytes of the human cerebral cortex]

Bull Assoc Anat (Nancy). 1975 Jun;59(165):535-44.

Underwood MD, Iadecola C, Sved A, Reis DJ.

Stimulation of CI area neurons globally increases regional cerebral blood flow but not metabolism.

J Cereb Blood Flow Metab. 1992 Sep;12(5):844-55.

Virgintino D, Monaghan P, Robertson D, Errede M, Bertossi M, Ambrosi G, Roncali L.

An immunohistochemical and morphometric study on astrocytes and microvasculature in the human cerebral cortex.

Histochem J. 1997 Sep;29(9):655-60.

Villringer A.

Understanding functional neuroimaging methods based on neurovascular coupling.

Adv Exp Med Biol. 1997;413:177-93. Review.

Villringer A.

Functional neuroimaging. Optical approaches.  
Adv Exp Med Biol. 1997;413:1-18. Review.

Kleinschmidt A, Obrig H, Requardt M, Merboldt KD, Dirnagl U, Villringer A, Frahm J.

Simultaneous recording of cerebral blood oxygenation changes during human brain activation by magnetic resonance imaging and near-infrared spectroscopy.  
J Cereb Blood Flow Metab. 1996 Sep;16(5):817-26.

Villringer A, Dirnagl U.

Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging.  
Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1995 Fall;7(3):240-76. Review.

Villringer A, Them A, Lindauer U, Einhaupl K, Dirnagl U.

Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study.  
Circ Res. 1994 Jul;75(1):55-62.

**Volkov IO**, Dembnovetskii OF, Galaziuk AV.

[Characteristics of the responses of auditory cortex neurons in the cat to tonal stimulation during nembutal anesthesia and after recovery from it]  
Neirofiziologiia. 1985;17(6):728-37.

**Wallow IH**, Burnside B.

Actin filaments in retinal pericytes and endothelial cells.  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1980 Dec;19(12):1433-41.

**Wang AK**, Gillen DA, Dyck PJ.

Effect of simple analgesics on quantitative sensation test threshold.  
Neurology. 1999 Nov 10;53(8):1865-7.

**Wang DB**, Blocher NC, Spence ME, Rovainen CM, Woolsey TA.

Development and remodeling of cerebral blood vessels and their flow in postnatal mice observed with in vivo videomicroscopy.  
J Cereb Blood Flow Metab. 1992 Nov;12(6):935-46.

**Weiss HR.**

Measurement of cerebral capillary perfusion with a fluorescent label.  
Microvasc Res. 1988 Sep;36(2):172-80.

**Weisskoff RM**, Chesler D, Boxerman JL, Rosen BR.

Pitfalls in MR measurement of tissue blood flow with intravascular tracers: which mean transit time?  
Magn Reson Med. 1993 Apr;29(4):553-8.

**Weisskoff RM**, Rosen BR.

Noninvasive determination of regional cerebral blood flow in rats using dynamic imaging with Gd(DTPA)

Magn Reson Med. 1992 May;25(1):211-2.

Werber AH, Heistad DD.

Effects of chronic hypertension and sympathetic nerves on the cerebral microvasculature of stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Circ Res. 1984 Sep;55(3):286-94.

Wernli H.R.

Die CCD-Astrocamera für den Amateur

Kosmos-Verlag 1995

Wiencken AE, Casagrande VA.

Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex.

Glia. 1999 Jun;26(4):280-90.

Wong-Riley M.

Columnar cortico-cortical interconnections within the visual system of the squirrel and macaque monkeys.

Brain Res. 1979 Feb 23;162(2):201-17.

Wood J, Garthwaite J.

Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties.

Neuropharmacology. 1994 Nov;33(11):1235-44.

Woolsey TA, Rovainen CM, Cox SB, Henegar MH, Liang GE, Liu D, Moskalenko YE, Sui J, Wei L.

Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain.

Cereb Cortex. 1996 Sep-Oct;6(5):647-60. Review.

Yang G, Chen G, Ebner TJ, Iadecola C.

Nitric oxide is the predominant mediator of cerebellar hyperemia during somatosensory activation in rats.

Am J Physiol. 1999 Dec;277(6 Pt 2):R1760-70.

Yost CS.

Tandem pore domain K channels: an important site of volatile anesthetic action?

Curr Drug Targets. 2000 Sep;1(2):207-17. Review.

Zhang J, Nakamoto KT, Kitzes LM.

Binaural interaction revisited in the cat primary auditory cortex.

J Neurophysiol. 2004 Jan;91(1):101-17. Epub 2003 Sep 24.

Zurita P, Villa AE, de Ribaupierre Y, de Ribaupierre F, Rouiller EM.

Changes of single unit activity in the cat's auditory thalamus and cortex associated to different anesthetic conditions.

Neurosci Res. 1994 May;19(3):303-16.

## Kapitel 11 Anhang

### 11.1 Abkürzungsverzeichnis

AAF	anteriores auditorisches Feld
A1	primärer auditorischer Kortex
ABR	acoustic evoked brainstem response, akustisch evozierte Hirnstamm- Antwort
AF	Autofocus
AP	Aktionspotential
AU	arbitrary units
Avrg	average, Mittelwert
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BOLD	Blood- Oxygen- Level Dependant (Signal)
CCD	Charge Coupled Device
CI	Colliculus inferior
CF	charakteristische Frequenz
DG	Durchgang
ECSA	anteriöer ectosylvischer Sulcus
ECSP	posteriöer ectosylvischer Sulcus
EEG	Elektroenzephalogramm
EMF	Elektromechanische Bremse der Atempumpe
<sup>18</sup> FDG	18-Fluor-desoxyglucose
Hb	Hämoglobin
HbO	oxygeniertes Hämoglobin
HbR	desoxygeniertes Hämoglobin
KB	Kleinbild
LCBF	Local Cortical Blood Flow (lokale kortikale Durchblutung)
LFP	lokale Feldpotentiale
MABP	mean arterial blood pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MF	Manualfocus
NF	Nucleus fastigii
NO	Stickstoffmonoxyd
NOS	Stickstoffmonoxyd-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NR	Nucleus raphe
OA	ongoing activity
OI	optical imaging (intrinsischer Signale)
ORES	optical recording of extrinsic signals
ORIS	optical recording of intrinsic signals
QE	Quantumeffizienz
rCBF	regionaler corticaler Blutfluß
RVLM	rostrale, ventrolaterale Medulla oblongata
ROI	region of interest
S/N-ratio	Signal-Rausch-Verhältnis
VPAF	ventroposteriores auditorisches Feld
VSD	voltage sensitive dyes
ZNS	Zentralnervensystem

## 11.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.Nr	Abb.
1	Auflösungen der Methoden
2	Gefäßgrafik n. Duvernoy
3	Absorptionsspektren von HbO und HbR
4	ORIS- Kurven n. Malonek
5	Kurven n. Nemoto
6	Schema des Versuchsaufbaus
7	Spektral- und Intensitätsantwort des TH7863 Sensors
8	eingebunden: relative Anteile des Rauschens am Nutzsignal
9	eingebunden: rotes Licht Schwankungsbreite Chip
10	eingebunden: grünes Licht Schwankungsbreite Chip
11	eingebunden: Abhängigkeit der Pixelwerte von der anliegenden Temperatur
12	a Versuchsaufbau Intensitätsmodulation
	b eingebunden: Kennlinie Leuchtdiode
13	eingebunden: Offsetdrift bei LED-Test
14	Intensitätsmodulationen
15	eingebunden: Unschärfemodulation
16	Siemenssterne
17	Strahlengang Tandemlinse und Vignettierung
18	Vergrößerungseffekt durch Objektivwahl
19	Versuchsaufbau Lichtoutputschwankungen der Beleuchtungseinheit
20	Outputschwankungen in der Leuchtdichte der Beleuchtungseinheit
21	eingebunden: Transmission der Kammerscheibe
22	Technische Zeichnung Kortexkammer
23	Leuchtdichteminderung durch Kortexkammer
24	Schemata der verschiedenen Aufbauten
25	Beispielrechnung in Falschfarbdarstellung
26	Schema Datenverarbeitung
27	Signalverlauf und physiologische Parameter
28	Katzengehirn, Ausschnitt und Felder
29	native Kurvenverläufe
30	langsame Wellen
31	ROIs P126
32	Absorptionsverläufe in kleinen Feldern
33	a Signalverlauf 4kHz
	b Signalverlauf 8kHz
	c Signalverlauf 16kHz
	d Signalverlauf totStim
34	P124 elektrische Reizung mit Cochlea-Implantat
35	P125 akustische Reizung
36	Vergleich optical Imaging/Elektrophysiologie

## 11.3 Tabellen und Formeln

Tabelle 1: Gegenüberstellung ORES/ORIS

Tabelle 2: Gegenüberstellung verschiedener ORIS- Untersuchungen und Parameter

Tabelle 3: Gegenüberstellung verschiedener ORIS- Rauschquellen und Störgrößen

Tabelle 4: Gegenüberstellung anderer Arbeiten zu 0,1Hz-Oszillationen

Formel 1:	$S = \Delta R/R$ oder $S = R - \Delta R$	Errechnung eines optischen Signals
Formel 2:	$S/N = n_{\text{signal}}/n_{\text{noise}}$	Signal/Rauschverhältnis: Verhältnis der Signalelektronen zu den Rauschelektronen
Formel 3:	$n_{\text{signal}} = (\Phi/h \times \nu) \times t \times A \times \eta$	Photonenabhängiges Signal physikalisch
Formel 4:	$\Delta N/N = 1/\sqrt{N}$	Photonenrauschen
Formel 5:	$t_d = t_i + t_{\text{FT}} + t_r$	Integrationszeit für Dunkelstrom auf einem Frame-transfer- CCD-Chip

$$\text{Formel 6 : } S/N = \frac{(\Phi/h \times \nu) \times t \times A \times \eta}{\sqrt{\Phi/h \times \nu} \times t \times A \times \eta + n_{\text{CCD}}^2 + n_{\text{AMP}}^2}$$

Zusammenhang zwischen CCD-Rauschen, Verstärkerrauschen und Photonenrauschen

Formel 7:	$n.A. = \eta \times \sin \alpha,$	numerische Apertur
Formel 8:	$1/s_2 - 1/s_1 = 1/f'$	Linsengleichung
Formel 9	$EP = f/F$	Eingangspupille

Formel 10:	$V = f_B/f_G$	Vergrößerungsfaktor
Formel 11:	$\tan w = x/f_G$	abbildbare Gegenstandsgröße
Formel 12:	aus Grinvald et al.1988	

## Kap.12 Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt *Herrn Prof. Dr. med. Rainer Klinke*, der mir als „Mediziner des zweiten Bildungsweges“ während des Medizinstudiums und nach dessen Abschluß die Möglichkeit zu einer erfüllenden Forschungstätigkeit im Umfeld seiner fachlich renommierten, aber auch- und das habe ich immer als überaus angenehm empfunden - geradezu familiären Arbeitsgruppe gab, die mir für mehrere Jahre zu einer zweiten Heimat wurde. Das angenehme, von Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude bestimmte Klima im „AK Klinke“, der unter dieser Bezeichnung leider nicht mehr existiert, war sowohl der fachlichen als auch der menschlichen Kompetenz des „Chefs“ zu verdanken, der, väterlicher Freund ganz im Sinne des Doktorvatergedankens, für meine Doktoranden-Probleme stets zwei offene Ohren, für fachlichen oder auch völlig fachfremden Diskussionsbedarf stets einen geschärften Geist und für Kulinarika stets einen feinsinnigen Gaumen hatte. Inkommensurable Einblicke in die Gebiete der Caseologie, Botulogie, Önologie, der Metereologie und der Montanologie, der Kunstgeschichte sowie der Restaurationskunde alter Gemälde habe ich Prof. Klinke daher zu verdanken. Im Wesentlichen bin ich Herrn Prof. Klinke jedoch für seinen fachlichen Rat, seine Begeisterungsfähigkeit, sein Vertrauen sowie seine erhebliche Geduld, insbesondere aber für seine rechtzeitige Ungeduld, alles in Allem für prägende Einblicke in die Hirnforschung zu Dank verpflichtet

*Herr Dr. Ing. Rainer Hartmann* ist als gelernter Nachrichtentechniker die Person, die man um sich haben möchte, wenn auf der Raumstation plötzlich das Licht ausgeht und man die Sache mit einem Schweizertaschenmesser reparieren muß.

Herr Hartmann initiierte das Projekt optischer Ableitungen vom Katzenkortex und war unermüdlich bereit, willens und in der Lage, allfällige Fragen aus Hörphysiologie, Elektrotechnik oder der jeweils zugrundeliegenden Physik in einer selbst für einen geisteswissenschaftlich angedauten Medizinstudenten verständlichen Art zu kommunizieren. Dies mit einer Geduld, die als stoisch zu bezeichnen ist und mit einem Idealismus, den man wahrscheinlich nur im wissenschaftlichen Umfeld antrifft.

Für seine väterliche Betreuung und die stets freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre sowie die weitgehende Freiheit, die mir in meiner Arbeit gestattet wurde, möchte ich mich bedanken. Wenn man sich auch verrannt hatte, im finstren Tal, so war doch auf Herrn Hartmann verlaß, dem Willen das Lichtlein des Intellekts anzuzünden.

*Herrn Prof. Dr. mud SK Andrej Kral* danke ich für zahllose Beiträge im Rahmen des chronisch progredienten Troubleshootings, für richtungsweisende und wertvolle Anregungen und neue Perspektiven. Ich habe außerdem zu danken für die Vermittlung des „Funkens“, der Lust am Erkenntnisgewinn, die unverzichtbarer Kern aller Wissenschaft ist. Ferner für seinen Anteil an zahllosen, wertvollen Gesprächen und Diskussionen zur gegenseitigen Erbauung, für einen verläßlich scharfen Geist und – insbesondere - für seine Freundschaft.

*Herrn Dr. Jean Smolders* bin ich für viele Tips zur Anlagenoptimierung zu Dank verpflichtet wie auch für die Vermittlung einer weit über den Bereich der Cochlea- Implantate hinausgehenden Perspektive der „Akustik“, die auch vor Instrumentenkunde und gar: Gesang! nicht haltmachte.

*Herrn Dr. Jochen Tillein*, meinem Schreibtischnachbarn, dessen unchristliche Arbeitszeiten ich zum Schrecken der morgendlichen Reinigungskräfte („Huch! Wer sind sie?“- „bleiben sie ruhig, ich arbeite hier.“) mehr und mehr übernommen habe, bin ich für seine unersetzlichen Hilfestellungen bei multiunit- Ableitungen zu Dank verpflichtet, ohne die elektrophysiologi-

sche Vergleichsmessungen nach mehreren Tagen optischer Ableitungen schon aus humanphysiologischen Gründen nicht mehr möglich gewesen wären.

Darüberhinaus für Antworten auf fast alle nebenbei gestellten Fragen, so zu den Themenbereichen Hörphysiologie, Sliceableitungen, Katzenphysiologie, durchaus aber auch Oldtimerkunde (insbesondere Motorräder), Jazz (insbesondere Posaune) oder Mode (insbesondere modernes Schuhwerk mit weicher Sohle); manch durcharbeitete Nacht wäre ohne JTs Anwesenheit deutlich zäher verlaufen. Außerdem danke ich Herrn Tillein für die Gelegenheit, am amorphen Objekt seines Arbeitsplatzes das aus dem Reich der Pilze bekannte Prinzip des konsumierenden Wachstums, aber auch erdgeschichtliche Prozesse wie Tektonik, Sedimentation und Fossilienbildung auf manchmal bestürzende Weise nachvollziehen zu dürfen. Der älteste bekannte Brötchenfund konnte anhand der Radiocarbonmethode ins Paläozän datiert werden, die rechte Ecke des Schreibtisches ist jedoch bislang noch nicht beschürft worden. Der einzig bekannte natürliche Feind dieses schützenswerten Lebensraumes ist die Putzfrau.

Meine Arbeit am Institut für Hörphysiologie wäre nicht denkbar gewesen ohne die "Jungs im Keller", *Herrn Dipl. Ing. Karl Uwe Winter* und *Herrn Thomas Wulf*, deren Aufgabe darin bestand, physikalisch oder EDV-technisch unlösbare elektrotechnische Aufgabenstellungen und Probleme zu - ...lösen. Thomas: mancher Strom, und nicht der schlechteste, würde ohne dich nicht fließen, danke für ungezählte Überstunden ! Charly: vielen Dank für Rat, Hilfe und manch nächtliches Popup auf meinem Bildschirm. We are not alone!

*Dittmar Ludwig* gebührt mein Dank für die Bereitstellung der administrativen Voraussetzungen meiner Arbeit, *Herrn Harald Schalk* und *Frau Regina Wagner* für unermüdlige medizinisch- technische Assistenz.

*Frau Dr. Silvia Heid* bin ich sowohl für Ihre unersetzlichen veterinärmedizinischen Hilfestellungen in Bezug auf die spezielle Physiologie des DWC-Ohres zu Dank verpflichtet als auch für Trost und Hilfe in manch fachlichem Problem und oft genug über ein solches hinaus. Vielen Dank, daß man stets auf Dich zählen konnte!

Ein Dankeschön an *Dr. Carsten Thierfelder* für eine Reihe wichtiger Männergespräche und manch physikalischen Gimmick. *Herrn Dr. Ulrich Biebel* danke ich für seine richtige „Wellenlänge“, die ihm ermöglichte, stets den rechten Ton zu treffen, sowohl bei seinen Chinchillas als auch bei den Kollegen, mit Gitarre oder ohne. Sein Repertoire ist Legion und seine szenische Verkörperung des Großknechts legendär. *Uly Lein* danke ich für manch faszinierenden Ausflug in die Abgründe der elektronischen Datenverarbeitung, manch ermunternden Zuruf („biedni maltschuk! Biedni, biedni..!“) und seine an Fatalismus grenzenden positive Weltsicht, die ich mir, da sie sich unter widrigsten Umständen bewährt hatte, ebenfalls zueigen machte.

Abschließend möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung, Erbauung und Geduld diese Arbeit nicht vorstellbar gewesen wäre und meiner Lebensgefährtin, deren Zuversicht, Witz und Zuneigung mir in trübere Tagen das Fundament waren. Für Gespräche, Gedankenaustausch, Unterstützung, Hilfe und für Freundschaft ein Dankeschön an AK, JT, CT, UB, SH, KW, TW, HS, KvH, RH, RK und Sohn.

## Lebenslauf

Christoph Mayer

Kinigstrasse 11

61352 Bad Homburg v.d.H.

09.11.1972	geboren in Linz/Österreich
1976	Übersiedelung nach Frankfurt am Main
1978	Grundschule in Obertshausen
1982	Gymnasium Anna- Schmidt- Schule Frankfurt am Main
1992	Abitur an der Anna-Schmidt-Schule
WS92/93	Beginndes Studiums der Germanistik an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt
WS94/95	Beginndes Studiums der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt
März 1997	Ärztliche Vorprüfung
März 1998	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Dezember 2001	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	Promotionsbeginn im Zentrum der Physiologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt
2004	Ende der Promotionstätigkeit
Januar 2005	Beginn der ärztlichen Tätigkeit im Zentrum der Neurologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre hierdurch, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

***Optical Imaging intrinsischer Signale am primären auditorischen  
Cortex der Katze. Etablierung der Methode  
und Prüfung ihrer Praktikabilität***

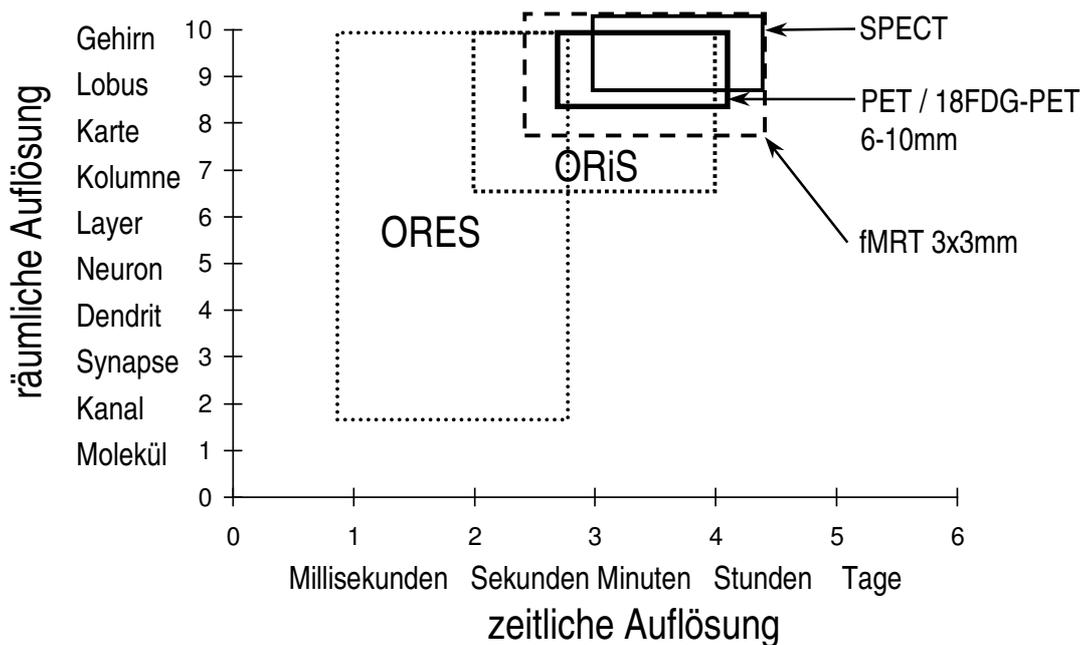
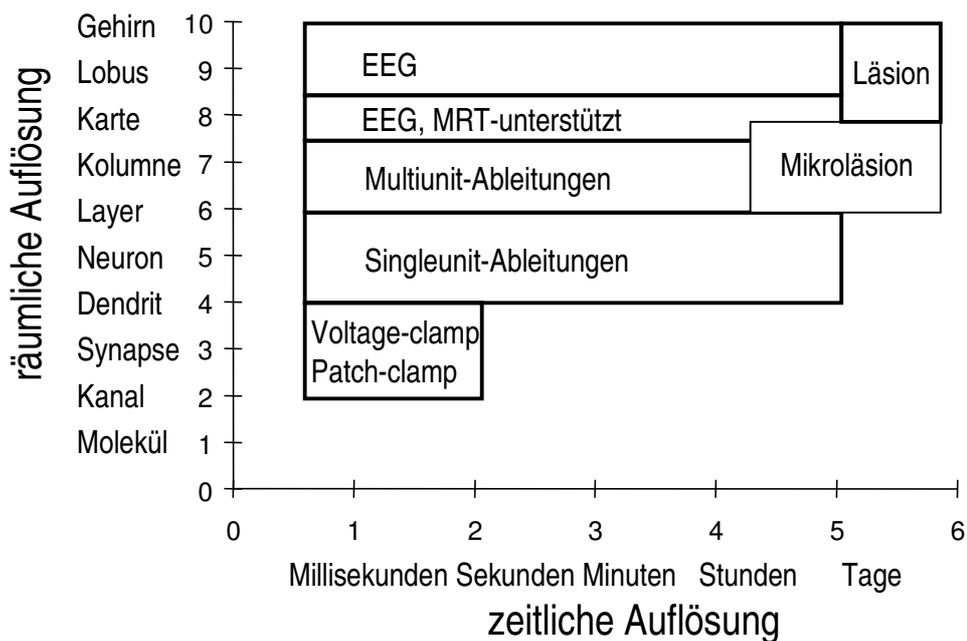
Im Zentrum der Physiologie Frankfurt unter Betreuung und Anleitung von Prof Dr. med Rainer Klinke mit Unterstützung durch Dr. Ing. Rainer Hartmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

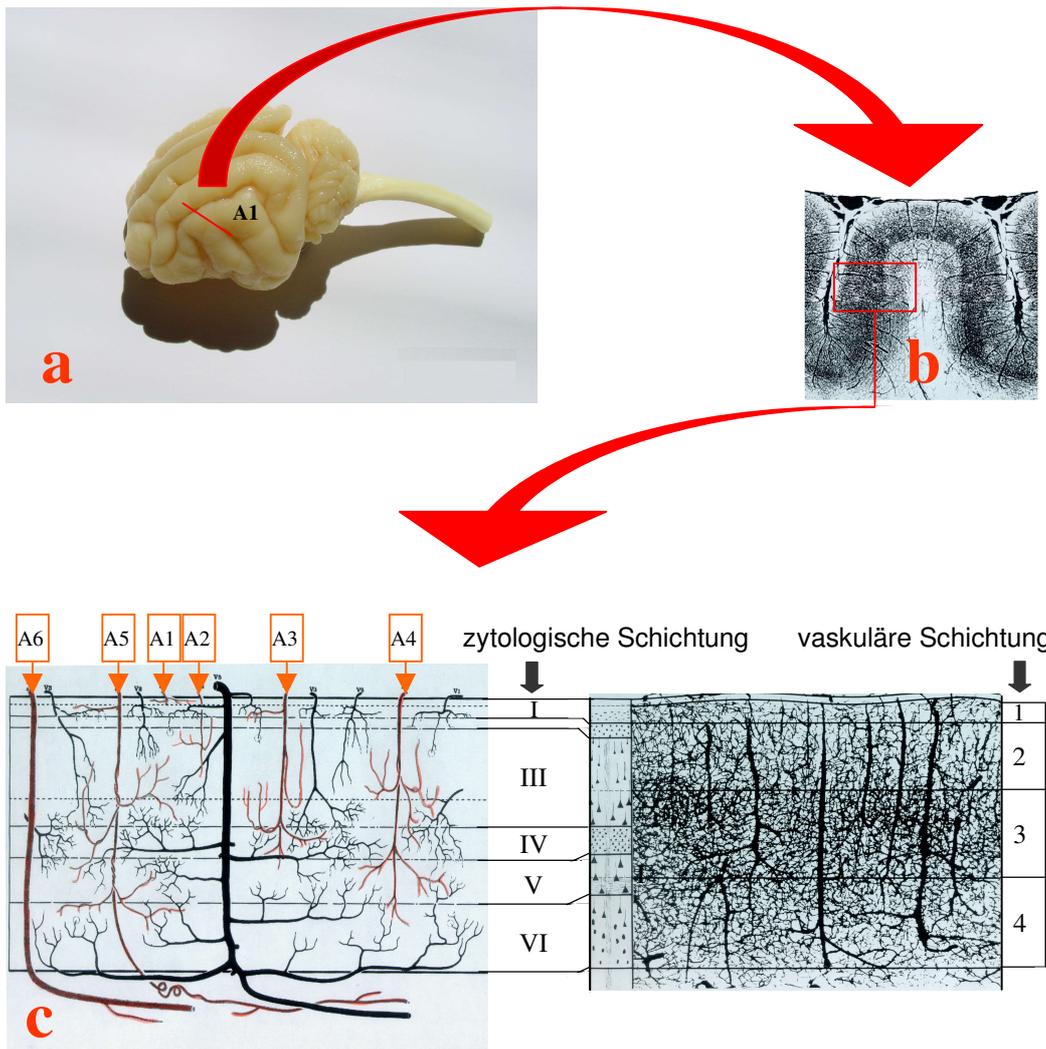
Frankfurt/Main, im August 2007

---



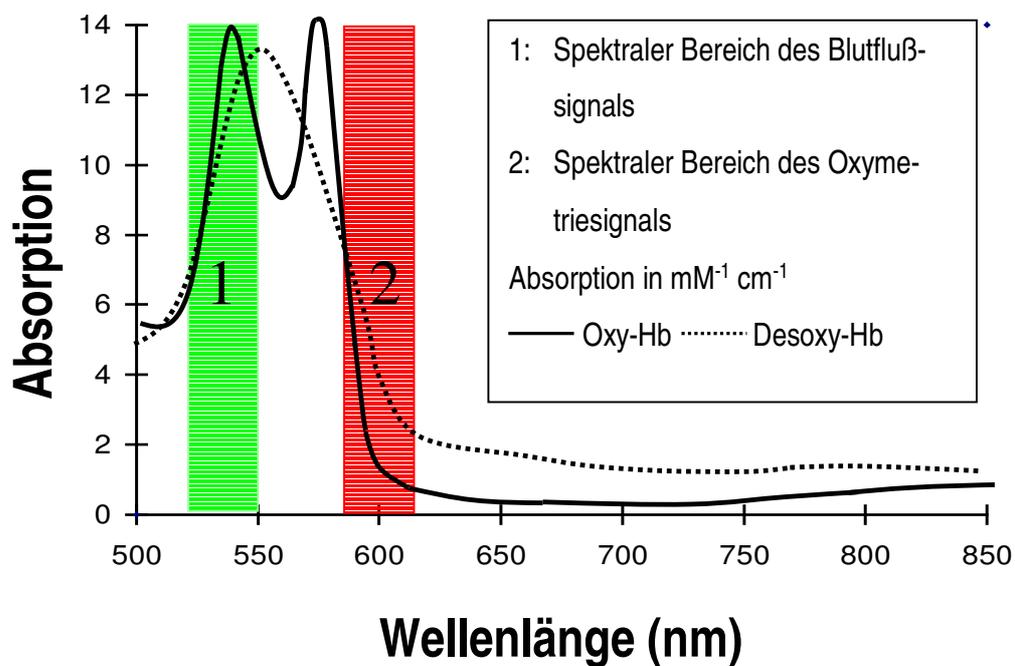
**Abb.1 a:** Elektrophysiologie. EEG, MRI-unterstütztes EEG, Multiunit- und Singleunit-Aufnahmen können eine zeitliche Auflösung im Millisekundenbereich erreichen. Läsionen und Mikroläsionen erreichen eine räumliche Auflösung von Lobus- bis Layer-niveau, die zeitliche Auflösung liegt im Bereich Minuten bis Tage. Die Auflösung der funktionellen Ausschaltung einzelner Bereiche durch Kühlung ist dem „Läsion“- Begriff gleichzusetzen. Voltage-clamp und Patch-clamp untersuchen einzelne Nervenzellen bzw. Einzelkanäle.

**b:** funktionelle bildgebende Methoden. SPECT, PET und fMRI bieten ähnliche räumliche und zeitliche Auflösungen. ORIS ist bei geeigneter Präparation auch chronisch durchführbar. Die feinstauflösende Methode ist ORES. Mittels extrinsischer Signale ist eine Darstellung bis auf Einzelkanalniveau durchführbar. ORES wird sowohl zur funktionellen Bildgebung als auch zur anatomischen Darstellung genutzt.



**Abb.2** **a:** Katzenhirn mit Schnitt in A1 **b:** Schnitt durch einen repräsentativen Gyrus mit zwei angeschnittenen Blutgefäßen über den beiden Sulci. Indiaink/Gelatine Injektionspräparat **c:** schematische Darstellung der Arteriolenverläufe, die relativ zum sechsschichtigen Kortexaufbau vier Kapillarschichten ausbilden. Abb. modifiziert nach Duvernoy, HM, 1981.

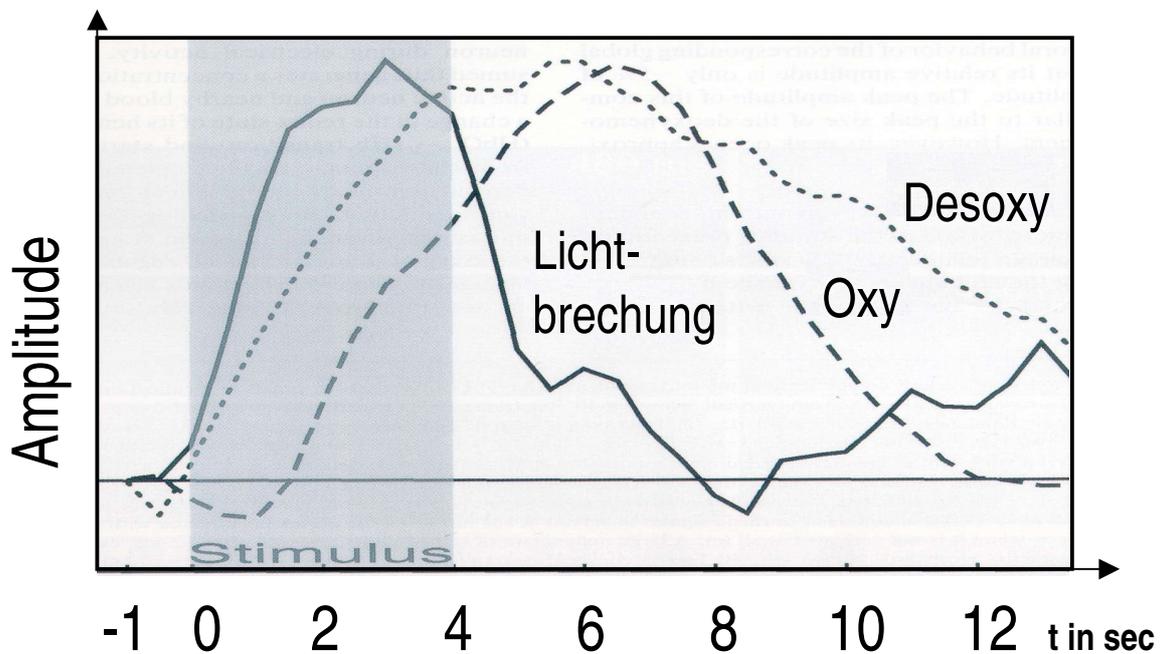
- A1 kurze Arteriolen mit Penetration der obersten Kortexschicht (Molekularschicht)
- A2 Arteriolen, die bis in die zweite Schichte penetrieren. Die Schichte III wird bereits erreicht (Pyramidenschicht)
- A3 Arteriolen, die die Schichte III penetrieren und viele kandellaberartige, sinusoid rekurrierende Äste zeigen. Erreicht werden die Pyramidenschicht, innere Körnerschicht und die Ganglionzellschicht.
- A4 Arteriolen, die zusätzlich die Schichte IV penetrieren und versorgen. Es wird teilweise Schichte V erreicht
- A5 Arteriolen, die den Kortex versorgen und die angrenzende Substantia alba erreichen
- A6 Arteriolen, die den Kortex lediglich durchlaufen und die weiße Substanz versorgen.



**Abb.3** Absorptionsspektren von HbO und HbR.

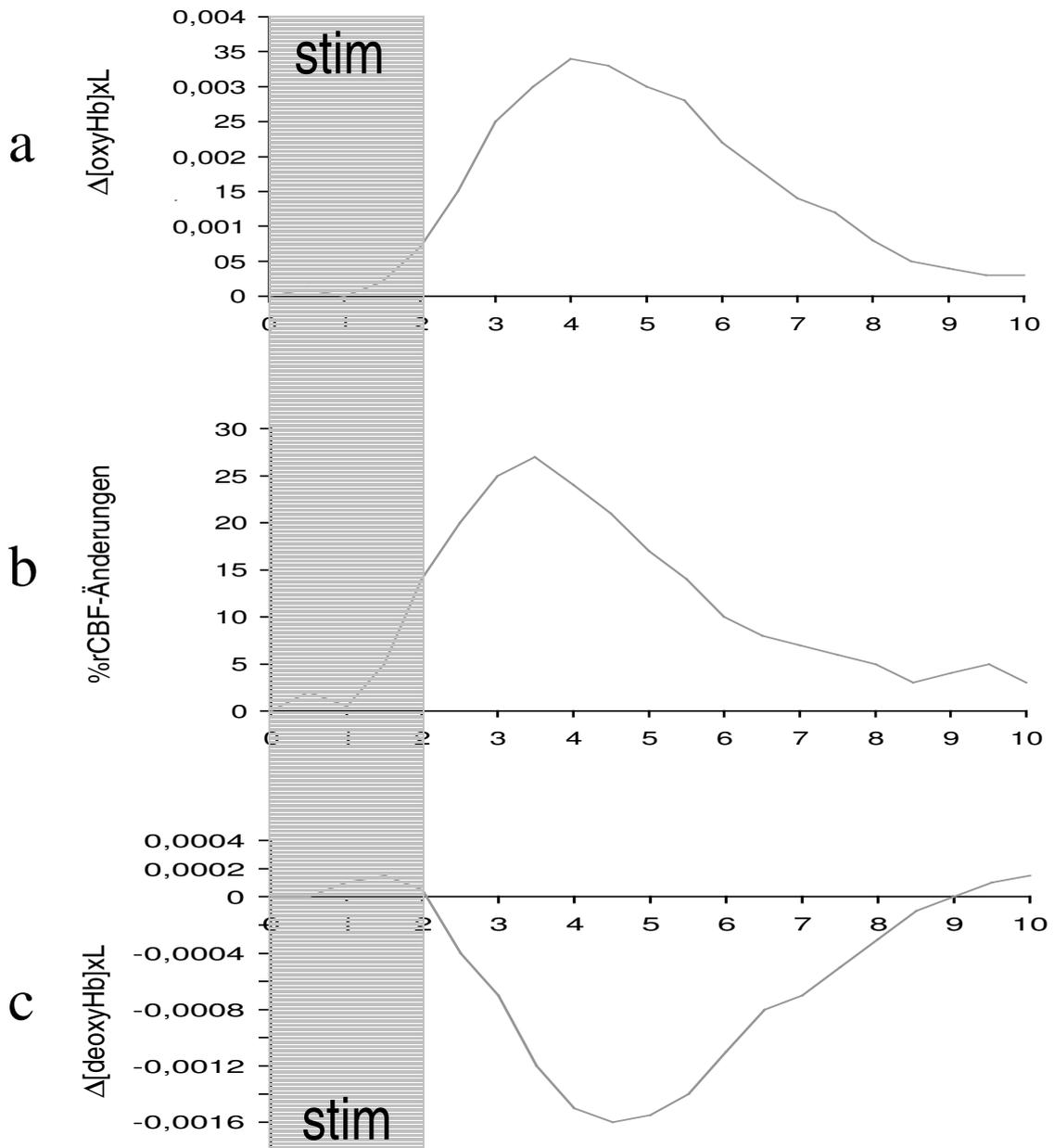
Grünes Feld (1): der übliche spektrale Bereich für die Ableitung des Blutflußsignales liegt im Bereich von 540nm. Rotes Feld (2): der spektrale Bereich für die Ableitung des Desoxysignals beschränkt sich auf die Wellenlängen, die eine Differenzierung der Oxygenierungszustände des Hämoglobin erlauben. Man leitet üblicherweise mit Wellenlängen um 600nm ab. Einheit der Absorption ist  $1/\text{mM} \times \text{cm}$ .

— = Oxyhämoglobin, ..... = Desoxyhämoglobin

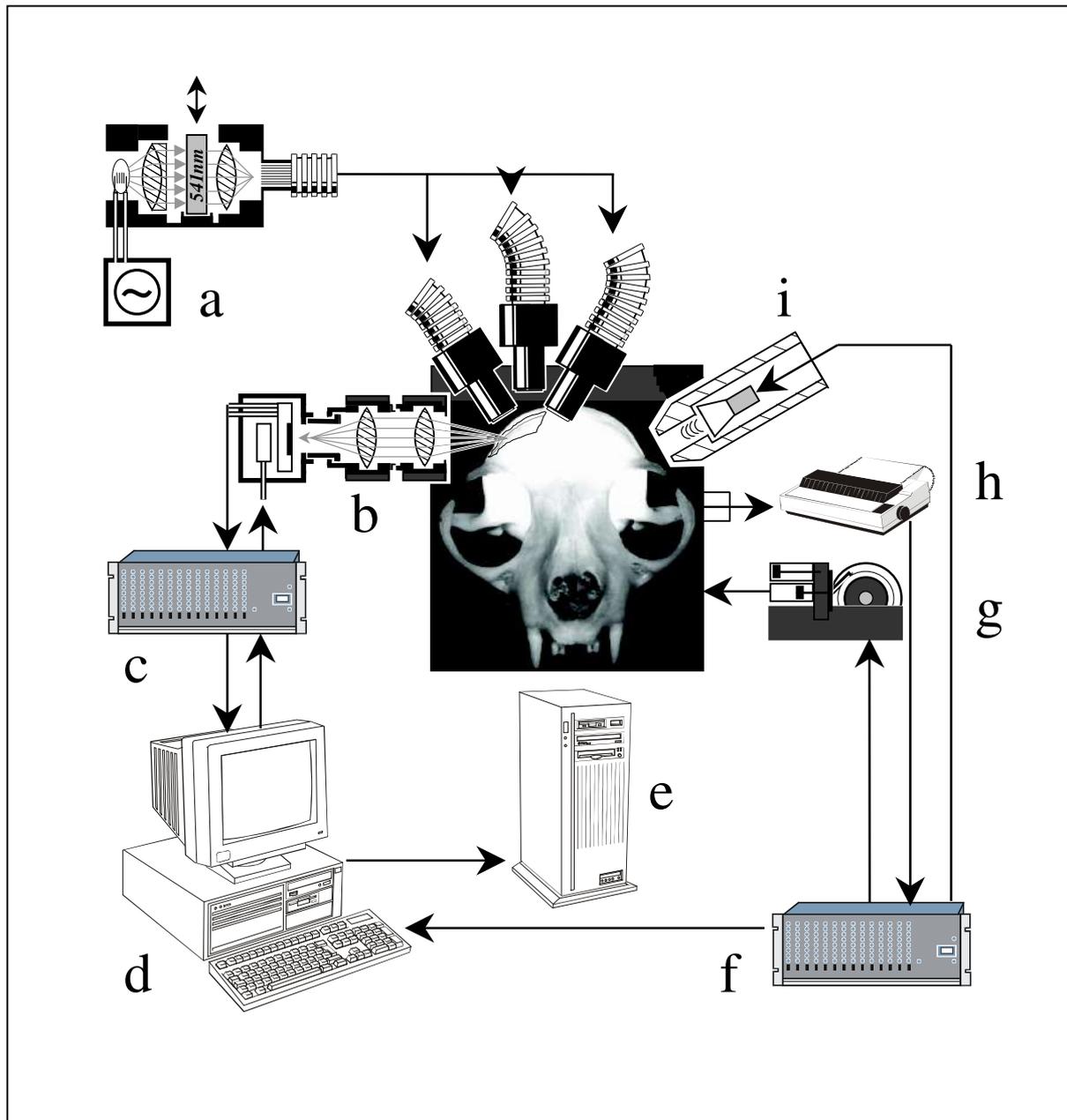


**Abb4** Die Hauptkomponenten des ORIS-Signals im Vergleich. Die Amplituden sind auf Maximum normiert. Das Lichtbrechungssignal erreicht Maxima zwischen 0,01% und 1%, Die Maxima des Desoxyssignals werden zwischen 0,1% (Nemoto et al 1999) und 0,01% (Bakin et al. 1996) angegeben. Die Kurve des Desoxyssignals ist invertiert dargestellt; die Beschreibung im Text bezieht sich auf den initialen Undershoot. Die Amplitude des Blutflußsignals („oxy“) macht je nach Untersucher bis zwischen 1% und 4,9 % aus (Dinse et al., 2001IntRep, Messung am A1 der Katze)

Modifiziert nach D. Malonek, unpublished Results [Malonek D. und Bonhoeffer T, 1996]



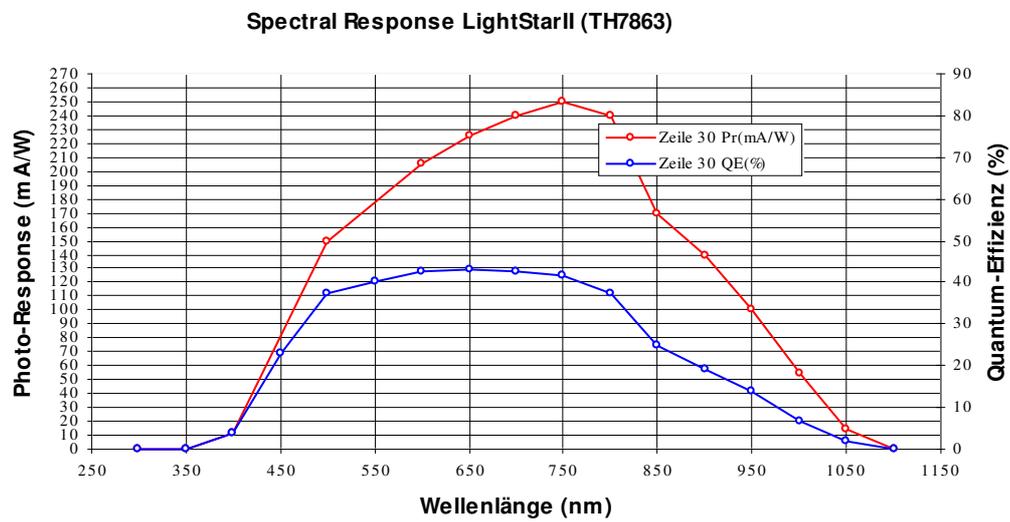
**Abb.5** Verläufe verschiedener physiologischer Parameter nach Reizung.  
**a:** regionaler kortikaler Blutfluß prozentual gegenüber Nonstimulus.  
**b:** Konzentrationsänderung Oxyhämoglobin gegenüber Nonstimulus  
**c:** Konzentration von Desoxyhämoglobin gegenüber Nonstimulus.  
 ( $\Delta[\text{oxyHb}, \text{deoxyHb}]$ : Konzentrationsänderungen in jedem Absorber,  
 L: „mean light pass length“.)  
 modifiziert Nach Nemoto et al. 1999 (sensible Stimulation an der Pfote der Ratte)



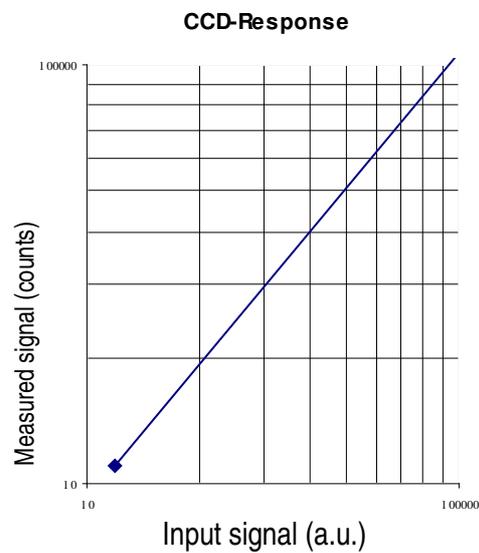
**Abb. 6** Schema des Versuchsaufbaus

**a:** Tungsten-Halogen-Lampe mit stabilisiertem Netzteil, Filtereinschub und Trifurkations-Lichtleiterbündel **b:** CCD-Camera mit Tandemlinse, CCD-Chip und Peltier-Kühlungselement hinter dem Chip **c:** Camera- und Peltiercontroller **d:** Datenaufnahmerechner **e:** Transferrechner für Datenspeicherung **f:** C-Control-Modul **g:** Atempumpe **h:** EKG-Schreiber **i:** geschlossenes Kopfhörersystem für akustische Reizung

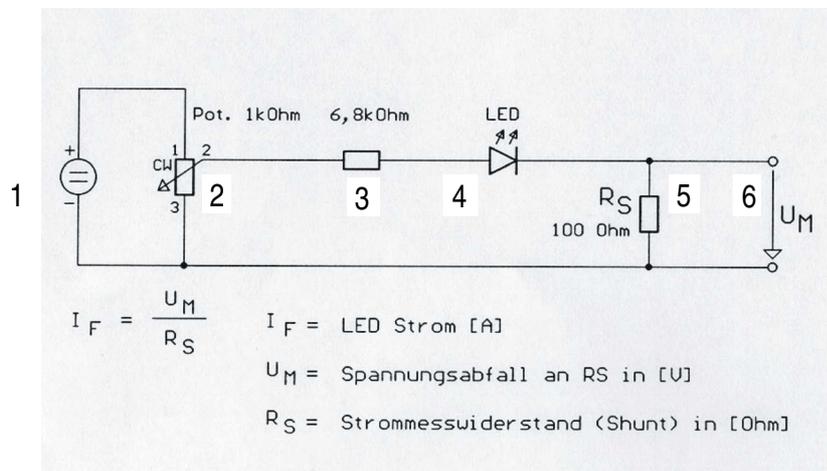
a



b



**Abb. 7** spektrale Antwort und CCD-Response Light Star 2, Sensortyp: TH7863  
**a:** spektrale Empfindlichkeit Lightstar2, mA/W gegen Wellenlänge in nm, zweite Achse: Quantum- Effizienz in % **b:** Lichtintensitäts-Antwort: counts gegen arbitrary units

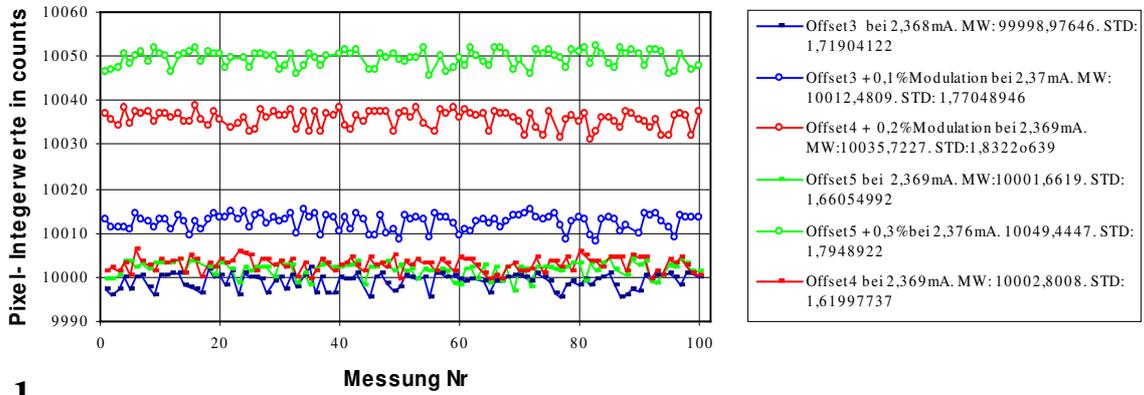


**Abb. 12a:** Versuchsaufbau Intensitätsmodulation

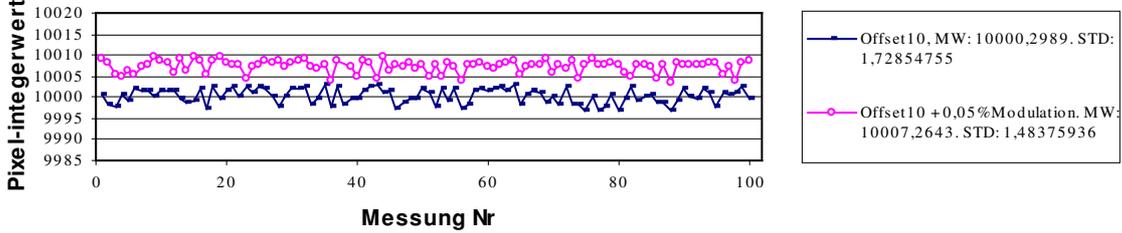
Der Speisstrom der Diode wird über einen Spannungsteiler geführt. Vorwiderstand:  $6,8\text{k}\Omega$ , Potentiometer:  $1\text{k}\Omega$ . Die an einem  $100\Omega$  RS-Widerstand nach der Diode abfallende Spannung wird gemessen, die Stromstärke bestimmt.

1: Spannungsquelle 2: Spannungsteiler (Potentiometer) 3: Vorwiderstand  
4: LED 5: Strommesswiderstand 6: Spannungsmessung

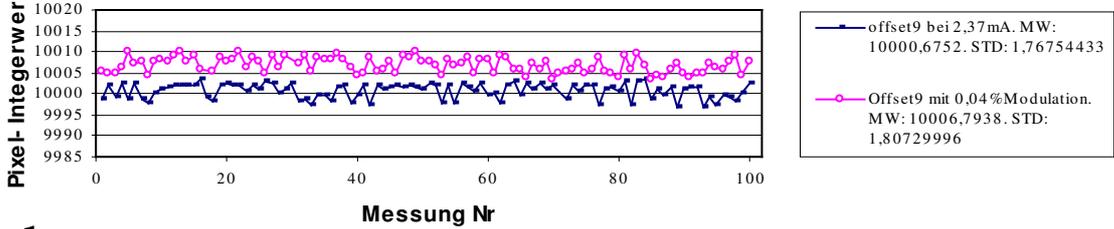
**a** Prüfung des Auflösungsvermögens der CCD-Camera. Modulationsversuche bei jeweils neu auf 10.000 counts justiertem Offset um 0,1%, 0,2%, 0,3%



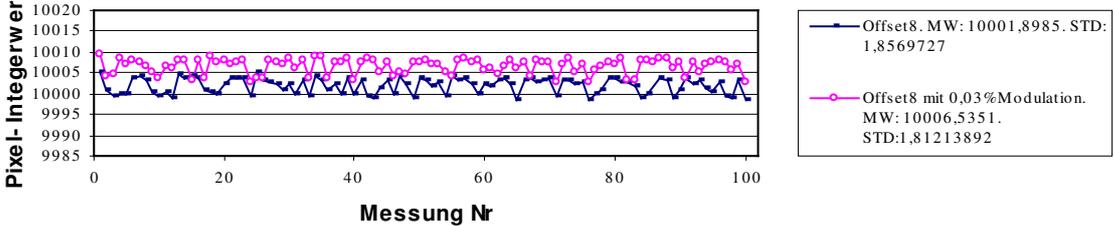
**b** Offset10 bei 2,37mA mit Modulation um 0,05%



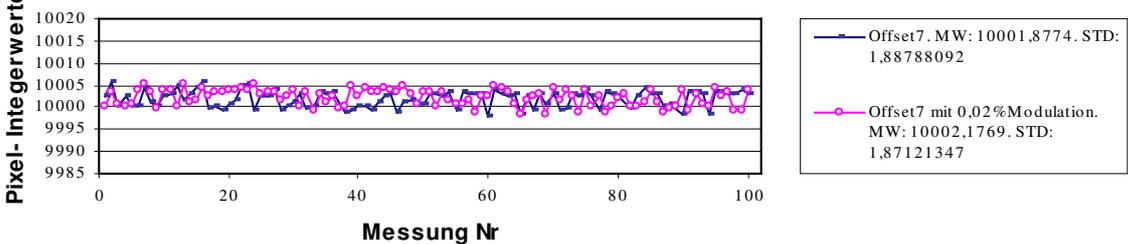
**c** Offset9 bei 2,37mA mit 0,04% Modulation



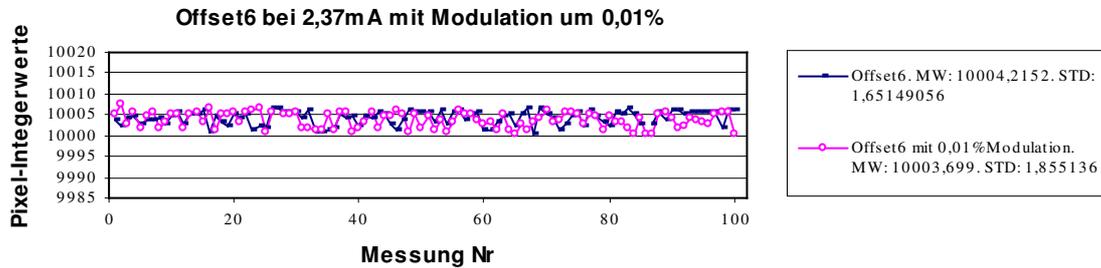
**d** Offset8 bei 2,37mA mit 0,03% Modulation



**e** Offset7 bei 2,369mA mit 0,02% Modulation

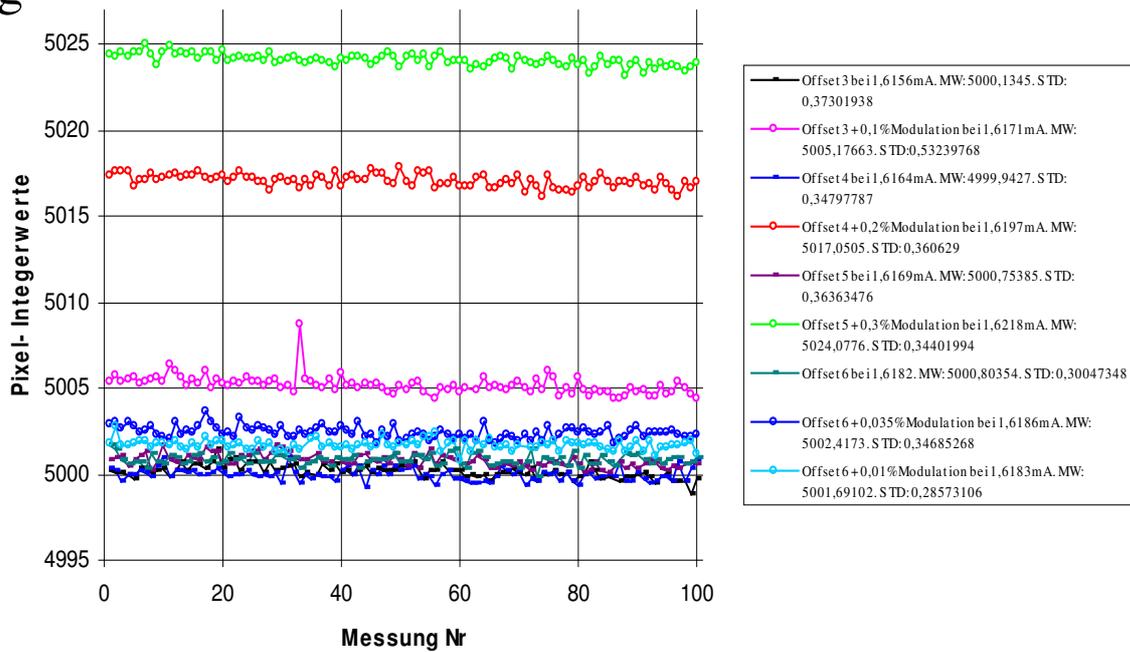


f



**Modulationmessungen zum Auflösungsvermögen der CCD-Camera bei etwa 5000 counts. Messungen bei 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,035%, 0,001% Modulation des Speisestroms einer Leuchtdiode**

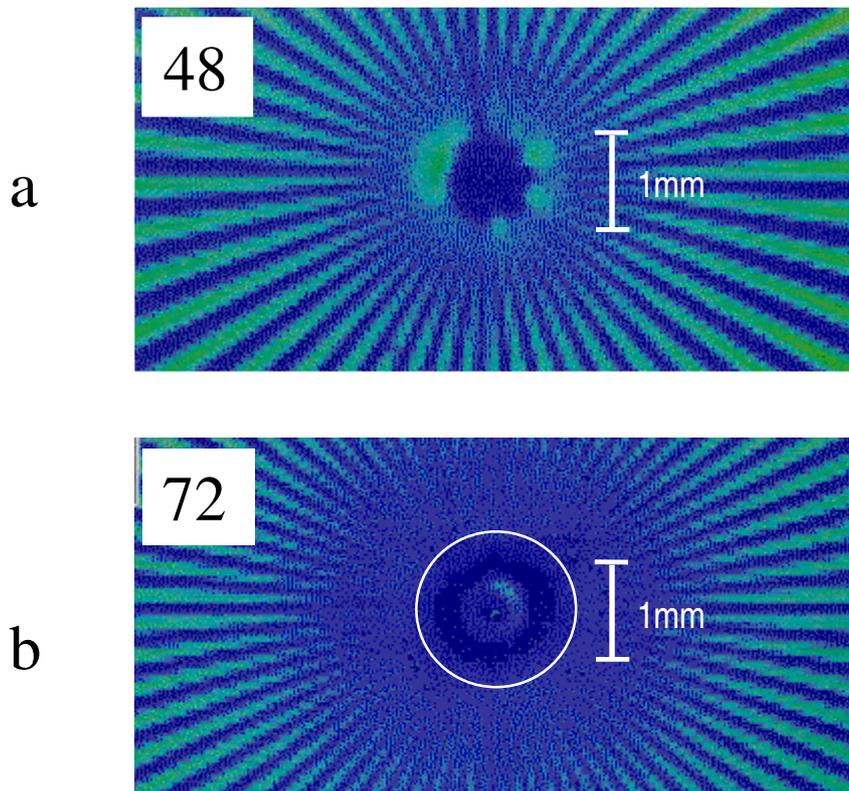
g



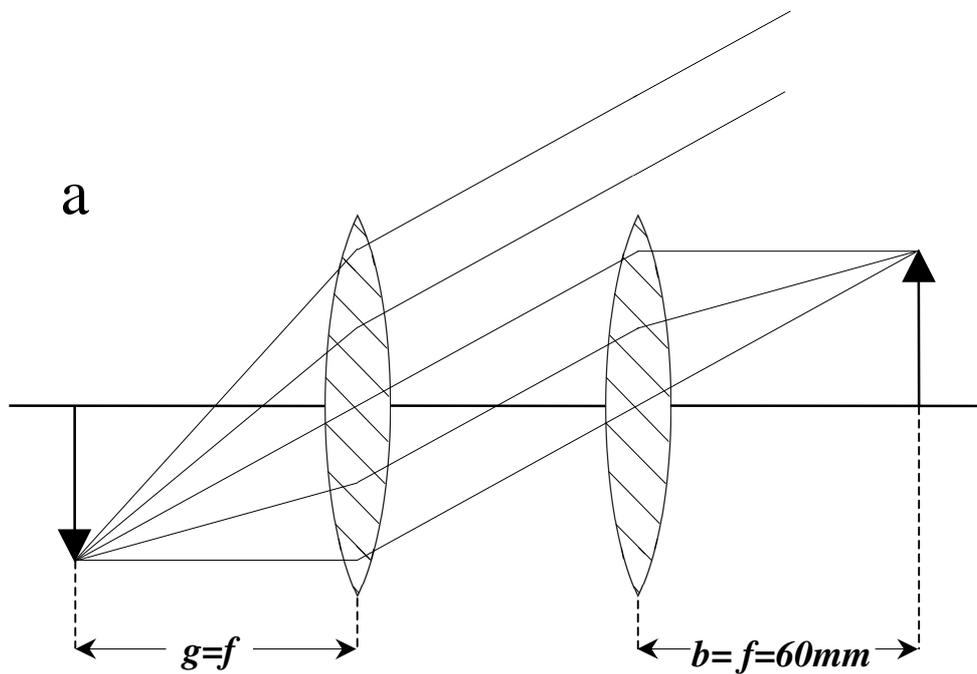
**Abb. 14:** Intensitätsmodulationen

**a-f:** manuell justierte Modulationshübe um 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 und 0,01% bei 10000 counts

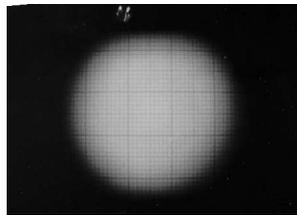
**g:** manuell justierte Modulationshübe um 0,3, 0,2, 0,1, 0,035 und 0,01% bei 5000 counts



**Abb. 16** räumliches Auflösungsvermögen des aufzeichnenden Systems  
**a:** Siemensstern mit 48 Segmenten **b:** Siemensstern mit 72 Segmenten. Maßstab: 1mm. Unschärfekreis mit einem Durchmesser von 1,54mm. Detail siehe Text



**b**



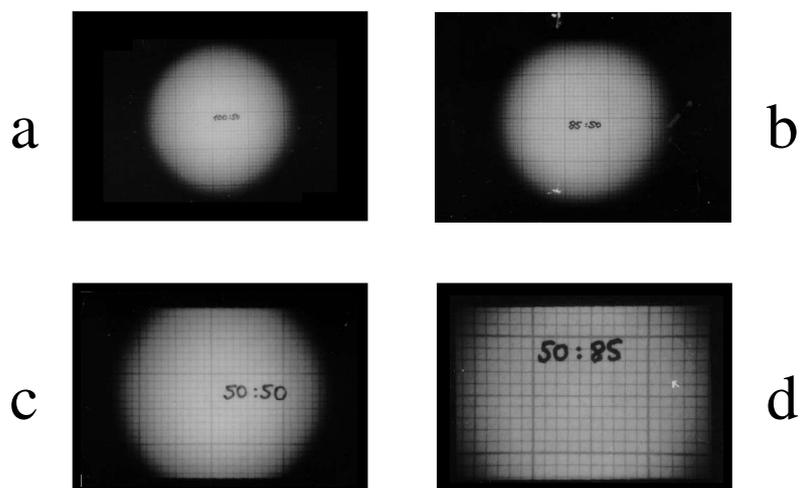
**Abb.17:** Strahlengang Tandemlinse und Vignettierung

**a:**  $g$ : Gegenstandsweite    $b$ : Bildweite    $f$ : Brennweite

Gestrichelte Linie: vignettierte Strahlen

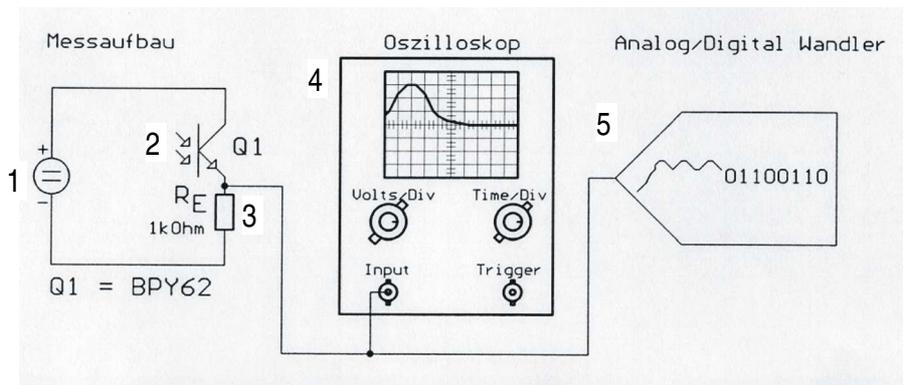
Bereich zwischen den Linsen: bei unendlichfokussierter Optik parallelverlaufende Strahlen

**b:** Vignettierung auf Millimeterpapier, aufgezeichnet mit der Originaloptik.



**Abb. 18:** Vergrößerungseffekte durch die Objektivwahl

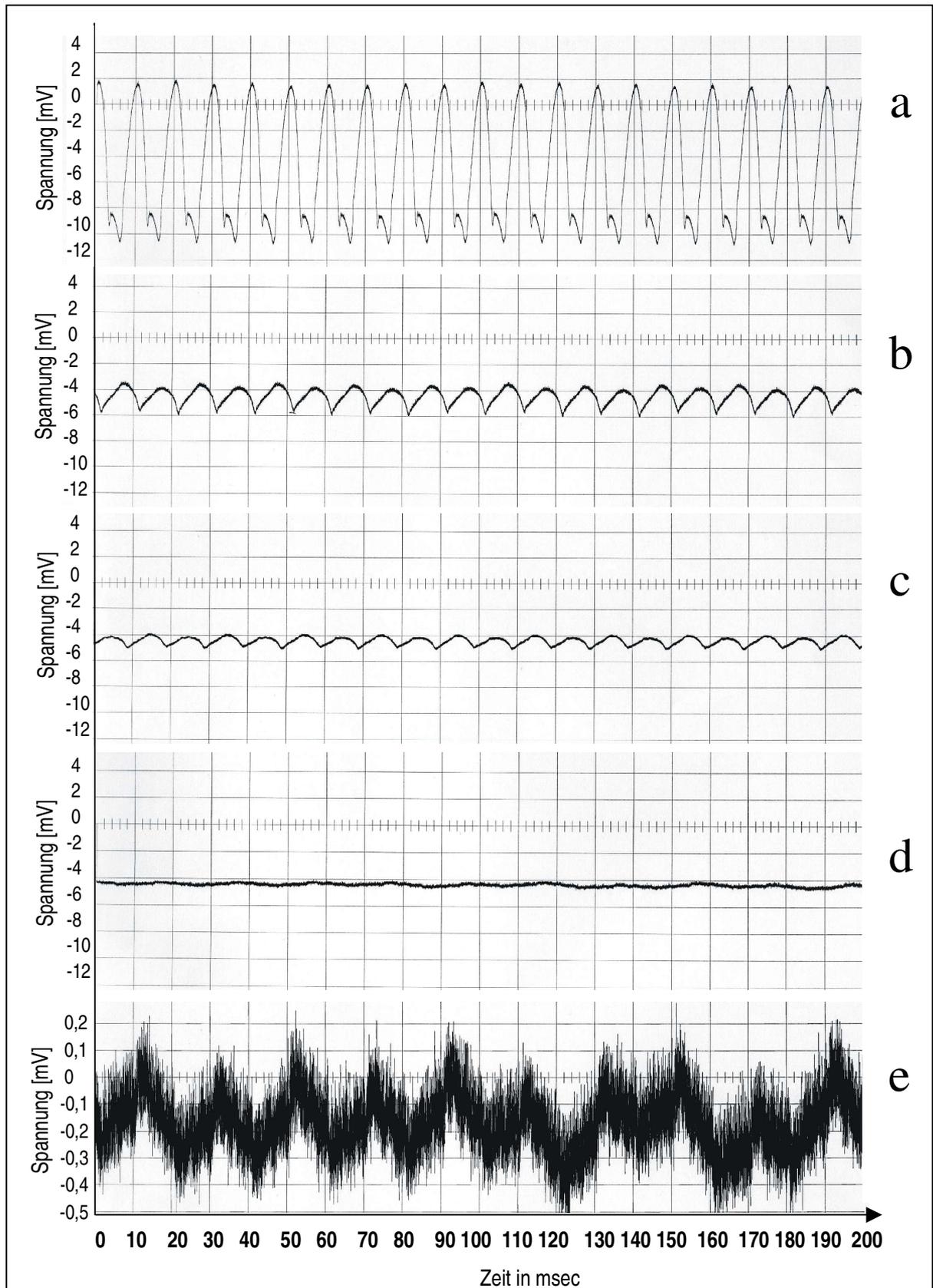
- a:** 100:50 Vergrößerungsfaktor 0,5
- b:** 85:50 Vergrößerungsfaktor 0,58
- c:** 50:50 Vergrößerungsfaktor 1
- d:** 50:85 Vergrößerungsfaktor 1,7



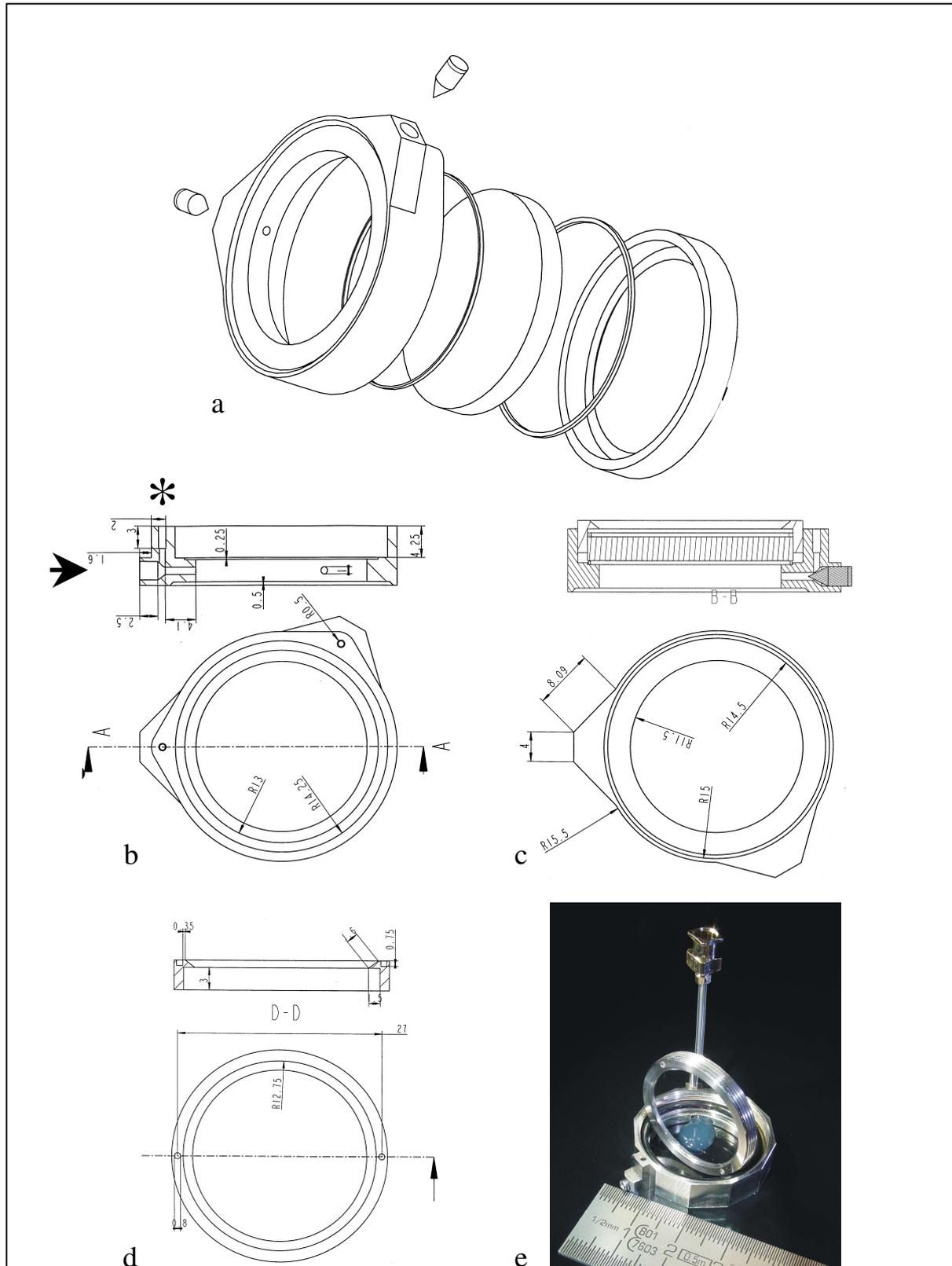
**Abb. 19:** Versuchsaufbau Lichtoutputschwankungen der Beleuchtungseinheit

1: Spannungsquelle 2: Phototransistor 3: Vorwiderstand  $1k\Omega$

4: Oszilloskop 5: AD-Wandler

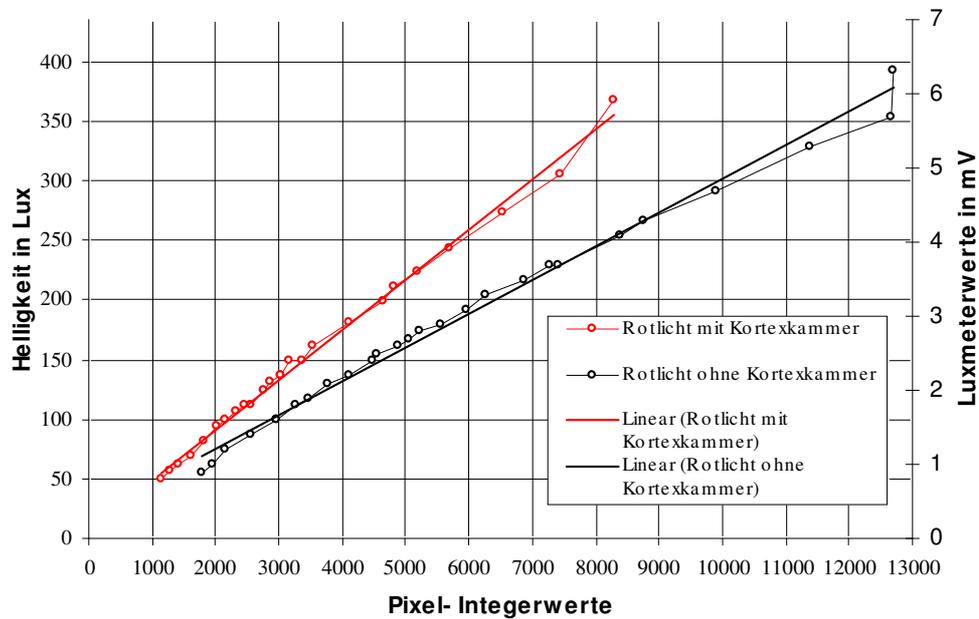


**Abb.20:** Outputschwankungen in der Leuchtdichte **a:**  
 Raumlicht direkt **b:** Raumlicht und Oriell indirekt als Reflexion einer Diffusorfolie **c:** Raumlicht  
 allein als Reflexion einer Diffusorfolie **d:** Oriell allein im Arbeitsabstand von 60mm als Reflexion  
 einer Diffusorfolie Auflösung: 2mV/Div. **e:** wie d, aber Auflösung:0,1mV/Div

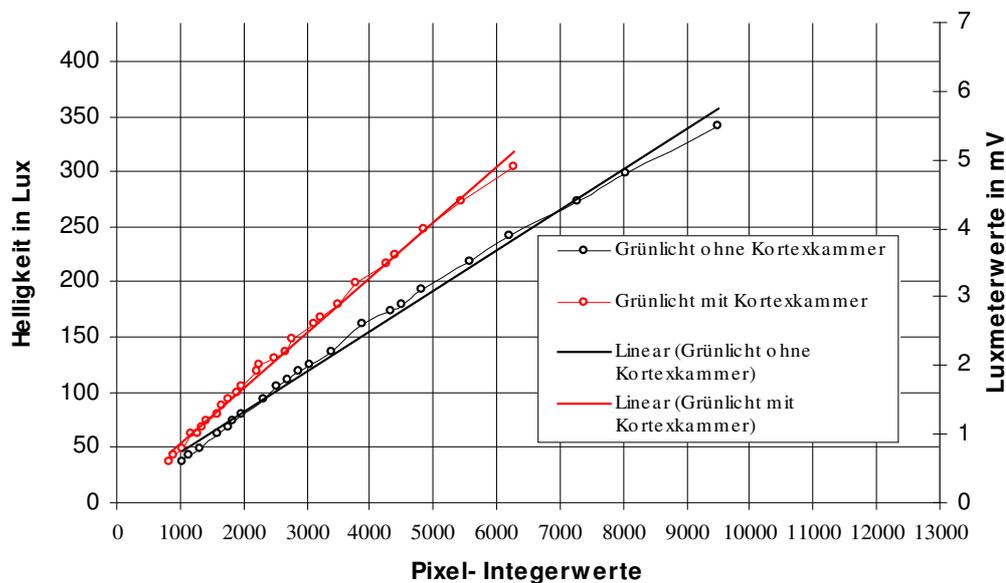


**Abb. 22:** **a:** Übersicht. Von links nach rechts: Kammerchassis mit zwei Nadelventilstiften und Innengewinde, innerer Dichtungsring, Glasplatte, äußerer Dichtungsring, Fixierring mit Außengewinde. **b:** Kammer im Querschnitt mit Befüllkanal (Asterisk) und Nadelventillöffnung (Pfeil) **c:** Kammerquerschnitt mit Chassis, Fixierring mit Außengewinde, Glasplatte, Dichtungsringe, Nadelventil. **d:** Fixierring in zwei Ebenen **e:** fertige Kammer mit Silikon im Endzustand

**a** Helligkeit in Lux und mV Luxmeteroutput, aufgetragen gegen Pixelintegerwerte der area of interest x1:89, y1:72, x2:263, y2:255. Rotlicht, Diffusorfolie, Maske mit 26mm Ausschnitt bzw. Kammer, Aufnahmeabstand ca. 62mm, Raumlicht aus.

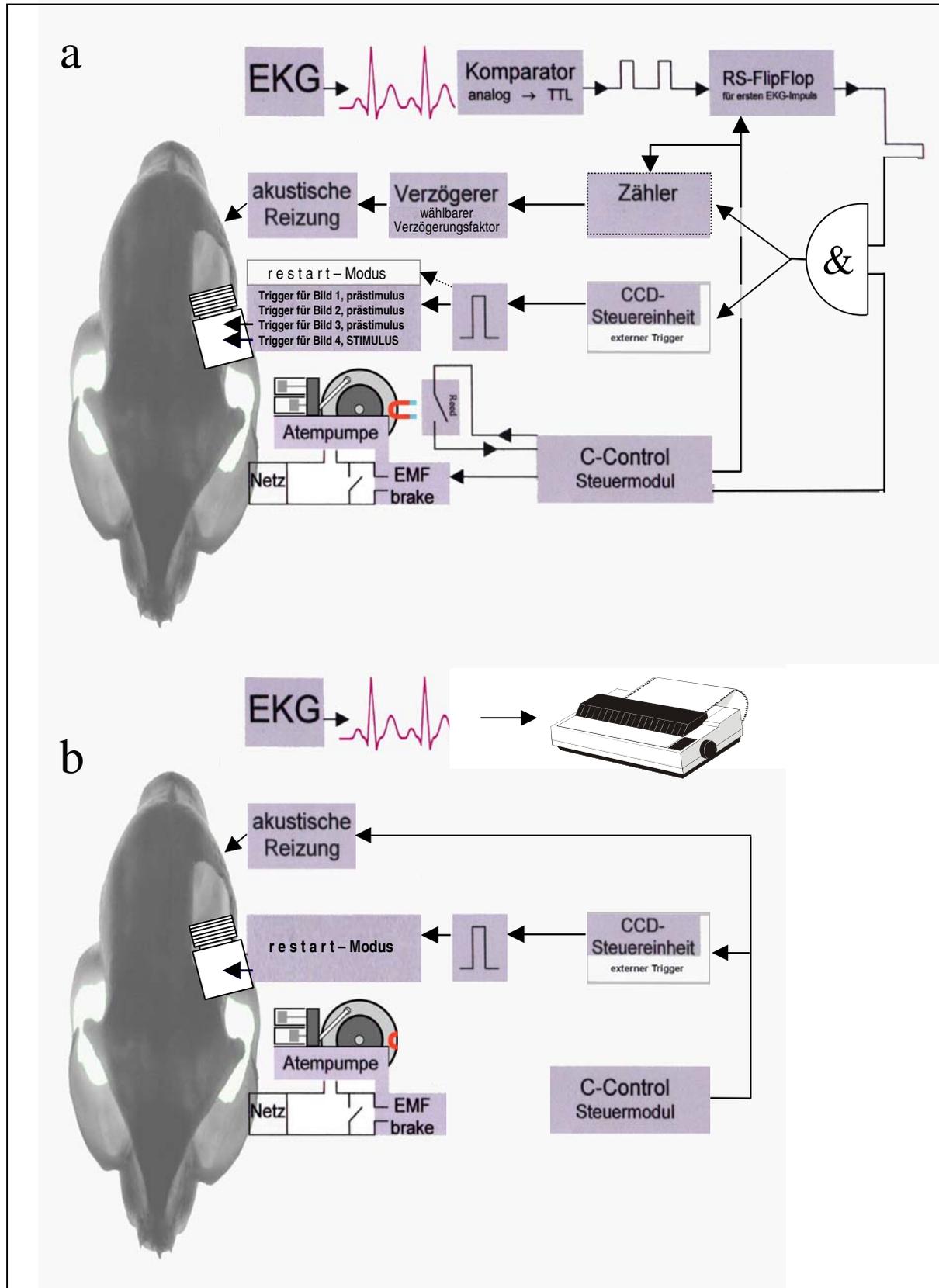


**b** Helligkeit in Lux und mV Luxmeteroutput, aufgetragen gegen Pixelintegerwerte der region of interest x1:89, y1:72, x2:263, y2:255. Grünlicht, Diffusorfolie, Maske mit 26mm Ausschnitt bzw. Kammer, Aufnahmeabstand ca. 62mm, Raumlicht aus.



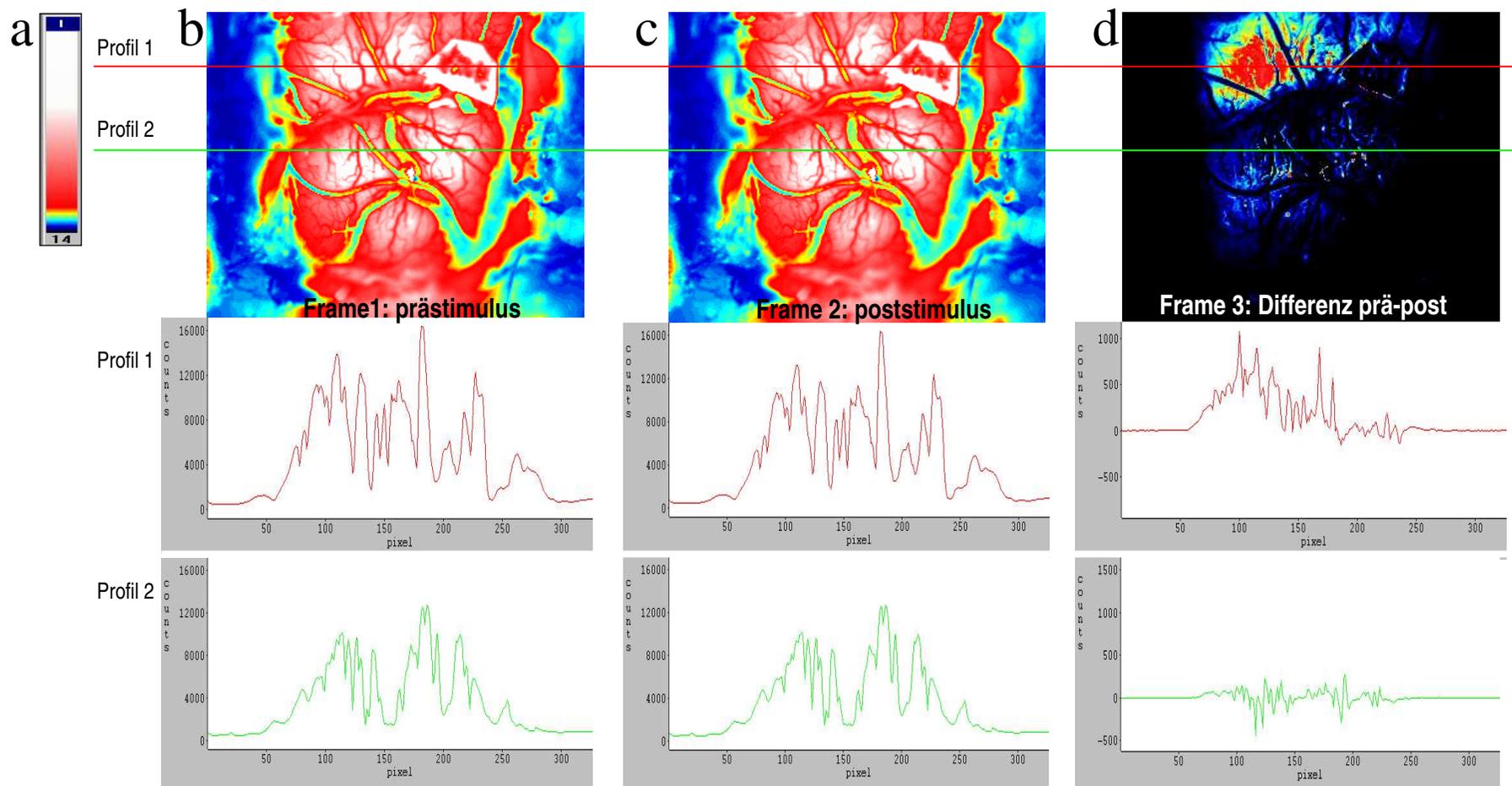
**Abb. 23:** Leuchtdichteverlust durch Kortexkammer

**a:** rotes Licht    **b:** grünes Licht



**Abb.24:** Schemata der verschiedenen Aufbauten

**a:** Schema der Aufbauten für Versuche 1 und 2. Gestrichelte Linien markieren Änderungen bei Versuch 2 (restart-Modus und Zähler). **b:** Aufbau für die Versuche 3 und 4. Hier wurde auf Atem- und EKG-Triggerung verzichtet, EKG-Aufzeichnung über Schreiber. Details im Text

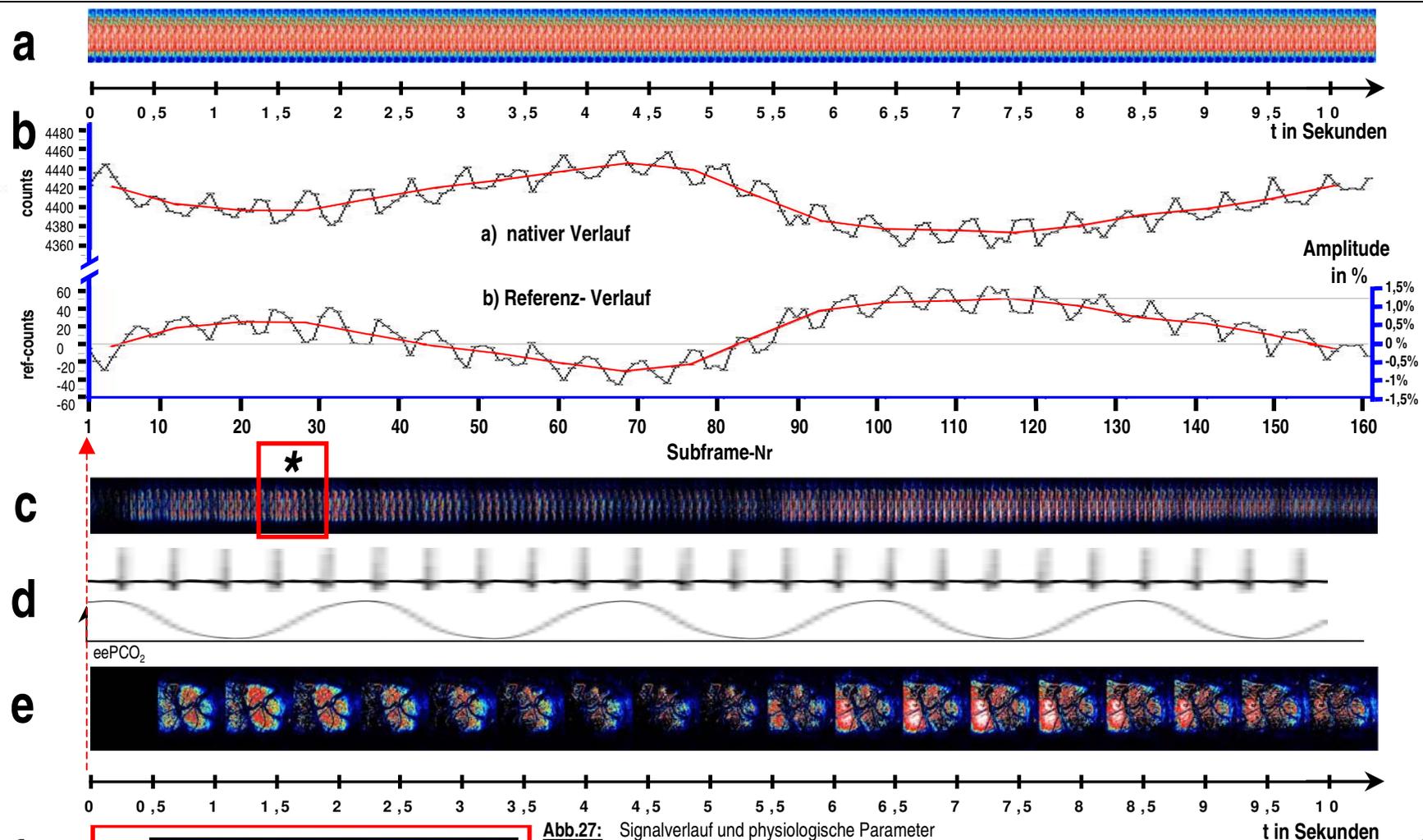


**Abb. 25:** Beispielrechnung in Falschfarbendarstellung

gewählte Falschfarbtabelle. Der Wert für den Farbton am unteren Ende des Anzeigefeldes beträgt 0, der Wert für das obere Ende 255. Je nach gewählter Auflösung wird für jeden count (bei Auflösung 256), für jeden 2. Count (bei 512), alle 16 counts (bei 4000), alle 64 counts (bei 16k) oder alle 256 counts (bei 32k) eine neue Stufe in der Falschfarbendarstellung erreicht. **b:** Prästimulusaufnahme und **c:** Poststimulusaufnahme mit korrespondierenden Intensitätsprofilen (unten). Intensitätsunterschiede sind mit dem Auge nicht auflösbar. **d:** errechnete Differenz mit korrespondierenden Intensitätsprofilen

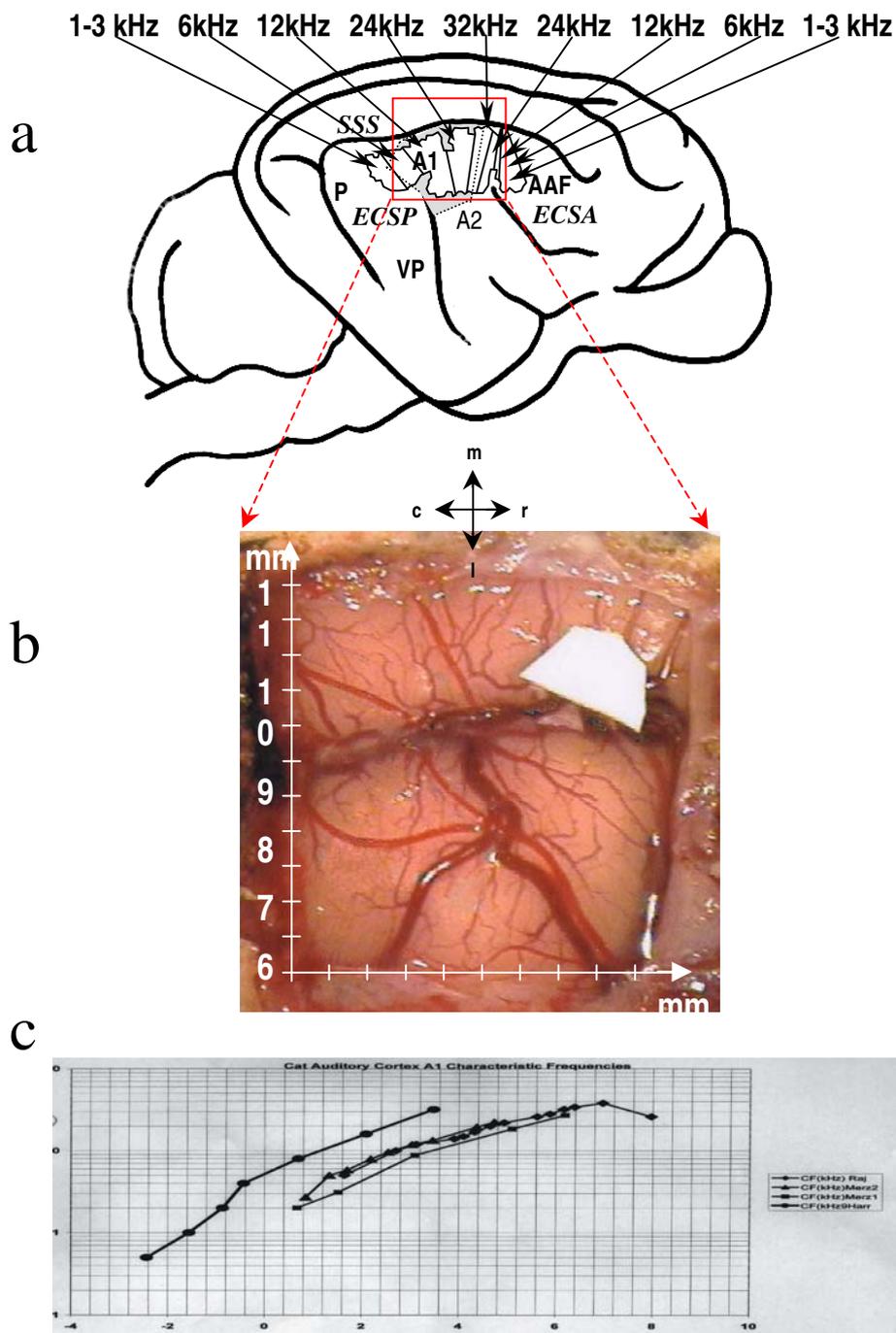
**a:**





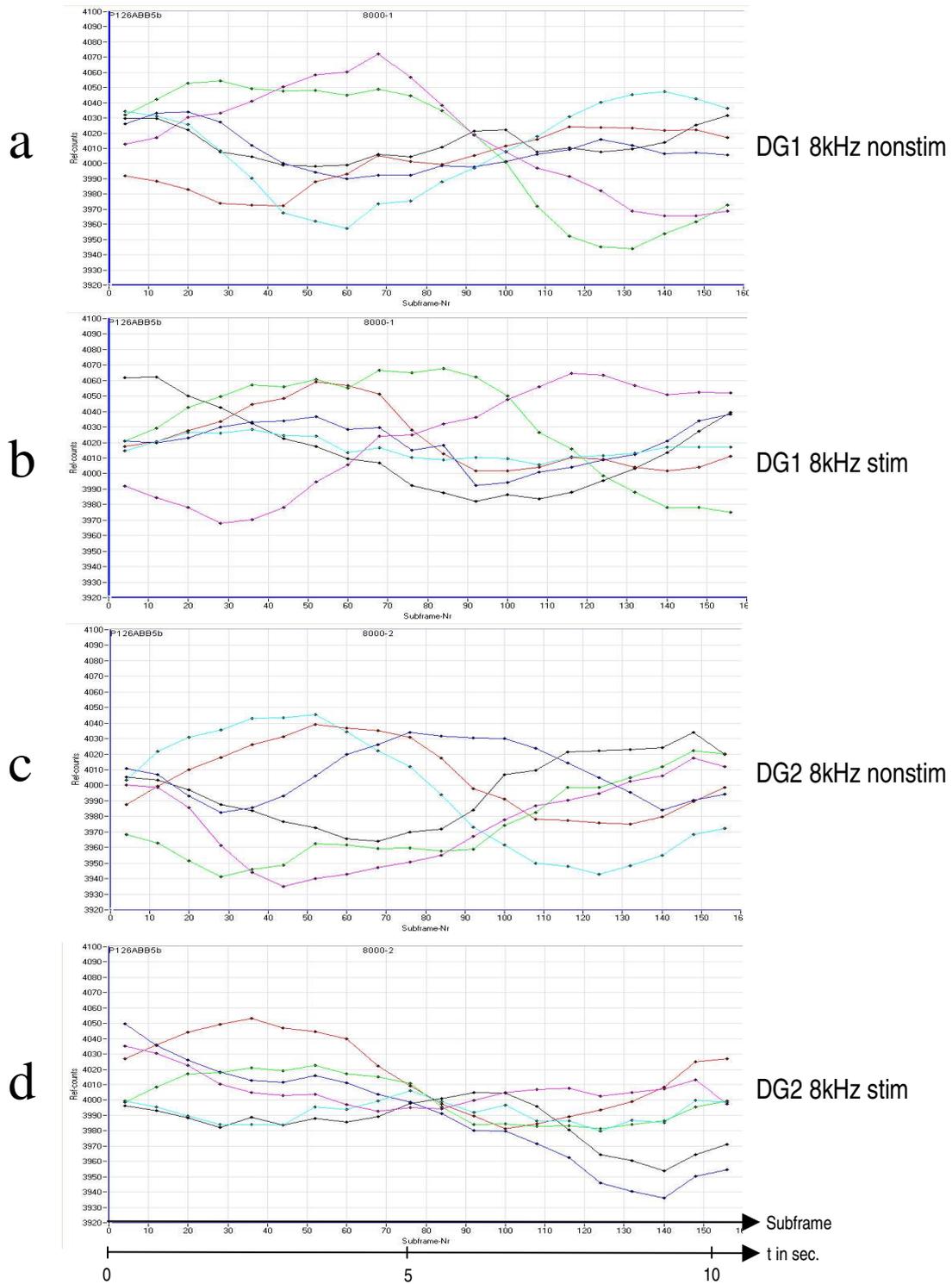
**Abb.27:** Signalverlauf und physiologische Parameter

**a:** nativer Summenframe mit Zeitachse **b:** Zeitverlauf der Avrg-Countwerte, gemittelt über den gesamten freiliegenden Cortex **a:** aus Rohdaten entnommene avrg-Werte **b:** gegenüber einer Prästimulus-Referenz verrechnete Werte. Links eine Skala mit absoluten Pixelwerten in counts, rechts eine %-Skala. Schwarze Kurve: Einzelbildwerte, rote Kurve: aus 8 EB. aufsummierter Durchschnitt **c:** gegen Prästimulus-Referenz verrechneter Summenframe mit EKG-Artefakten (Asterisk), frühem und spätem Peak bei 1,5 bzw 8sec. **d:** korrespondierende Aufzeichnung von EKG und expiratorischem CO<sub>2</sub> **e:** der aufsummierte Summenframe ohne EKG-Artefakte **f:** Ausschnitt aus 3 (Asterisk): EKG-Artefakt mit korrespondierendem QRS-Komplex



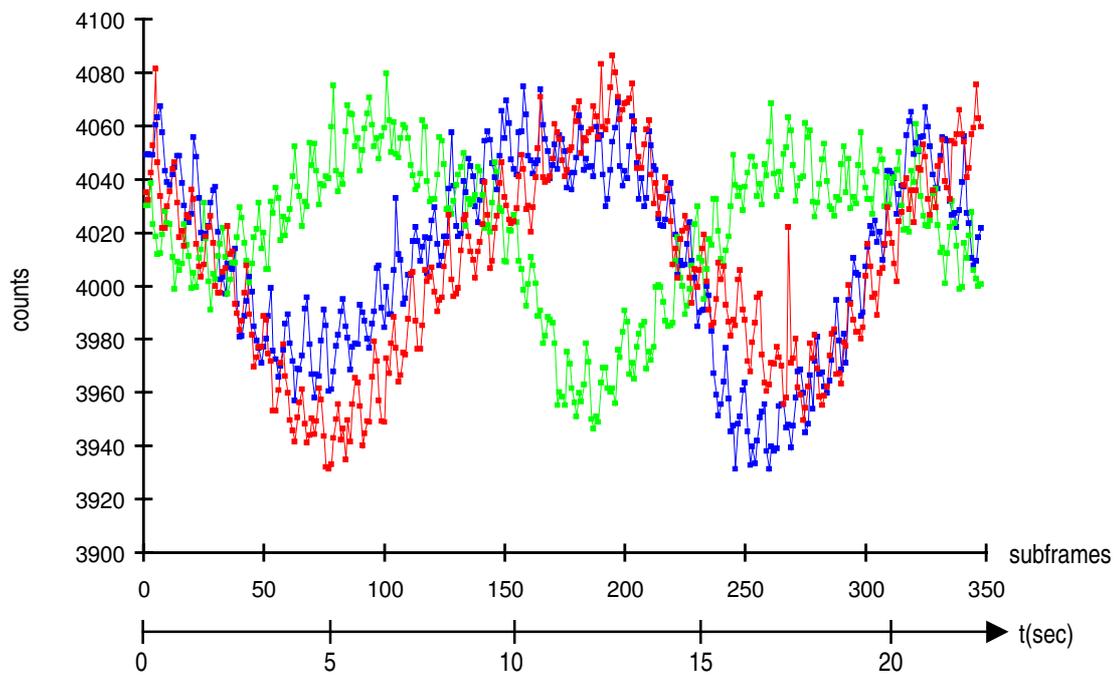
**Abb.28:** Katzenshirn, Ausschnitt und Felder

**a:** Seitenansicht Katzenshirn nach Reinoso-Suarez 1961. Roter Rahmen: Aufnahme­feld der Camera. SSS: suprasylvischer Sulcus, ECSA: Sulcus ectosylvius anterior, ECSP: Sulcus ectosylvius posterior. A1: primärer auditorischer Kortex, A2: sekundärer auditorischer Kortex, AAF: anteriores auditorisches Feld, P: posteriores auditorisches Feld, VP: ventroposteriores auditorisches Feld. CF-Bänder sind angedeutet. Gestrichelte Linie bei CF 32kHz: Übergang von A1 zu AAF. A1 und AAF- Karten modifiziert nach Imaizumi, Schreiner et al. 2004. Näheres siehe Text. **b:** Camerabbildung des Areales mit Skalierung in mm. Weißer Fleck: Patch zur Versorgung einer aus dem Aufnahme­feld geklappten, transduralen Venenschlinge. **c:** Tonotopie nach Harrison, Rajan, Merzenich



**Abb. 29:** native Kurvenverläufe

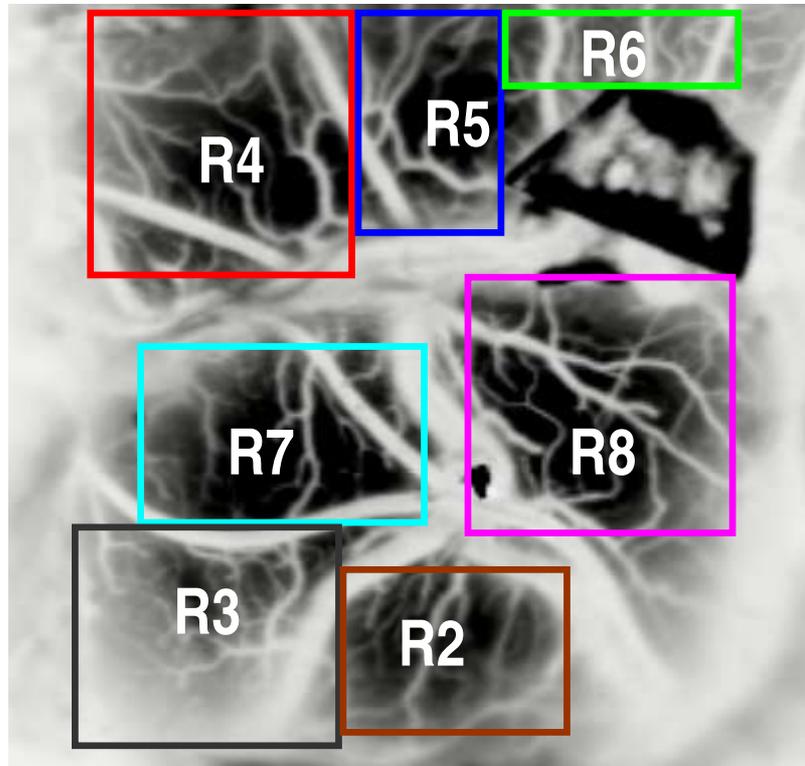
Die Abbildung zeigt sechs Durchläufe mit gleicher Reizsituation pro Graph. **a:** Durchgang1, nonstimulus, aufgezeichnet nach abgeschlossener 8kHz- Stimulation (vgl. Abb.25) **b:** Durchgang1, 8kHz Stimulation **c:** Durchgang2, nonstimulus, aufgezeichnet nach abgeschlossener 8kHz Stimulation **d:** Durchgang 2, 8kHz-Stimulation



**Abb.30:** Langsame Wellen

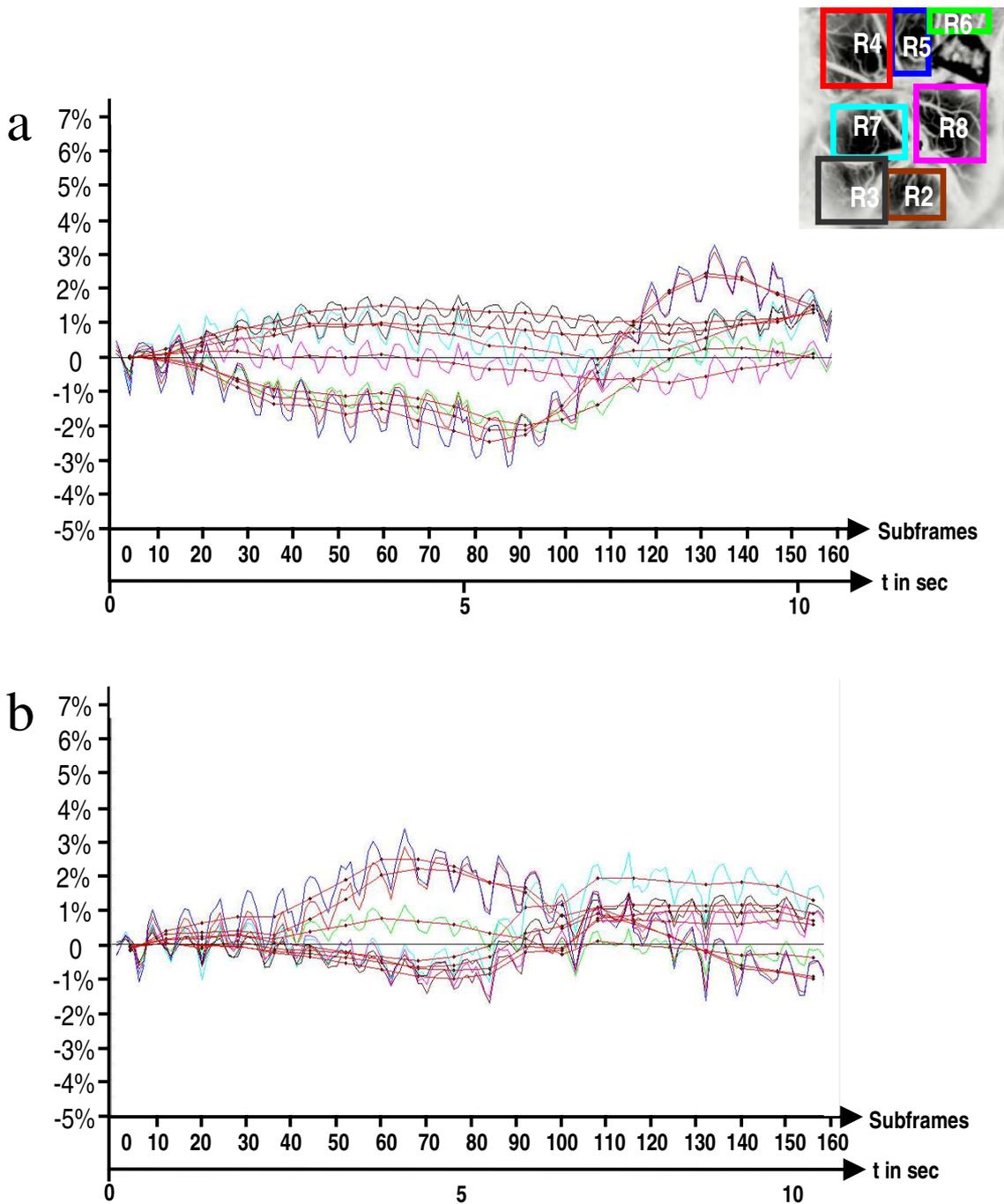
Drei ausgewählte avrg.-Verläufe über die gesamte Aufnahmezeit von 22,75 sec. Deutlich erkennbar sind Schwankungen der über den gesamten freigelegten Kortex gemittelten Durchschnittshelligkeit. Diese Schwankungen treten mit einer Frequenz von rund 0,1 Hz auf.

Dargestellt sind die Durchgänge 8000-1-8/10/12 in blau/grün/rot .

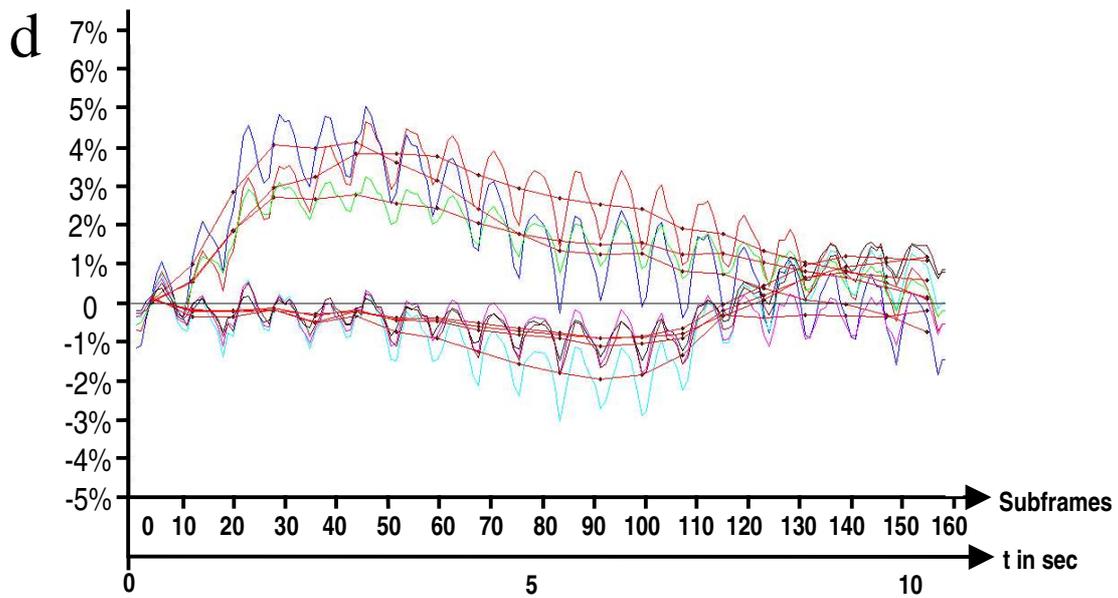
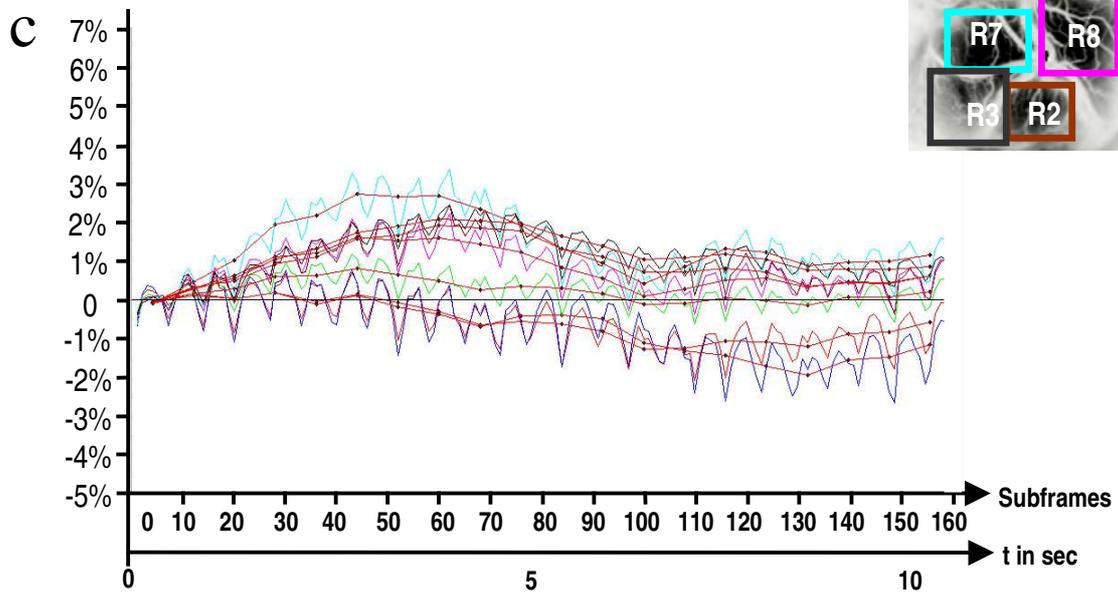


**Abb.31:** ROIs Wk048c

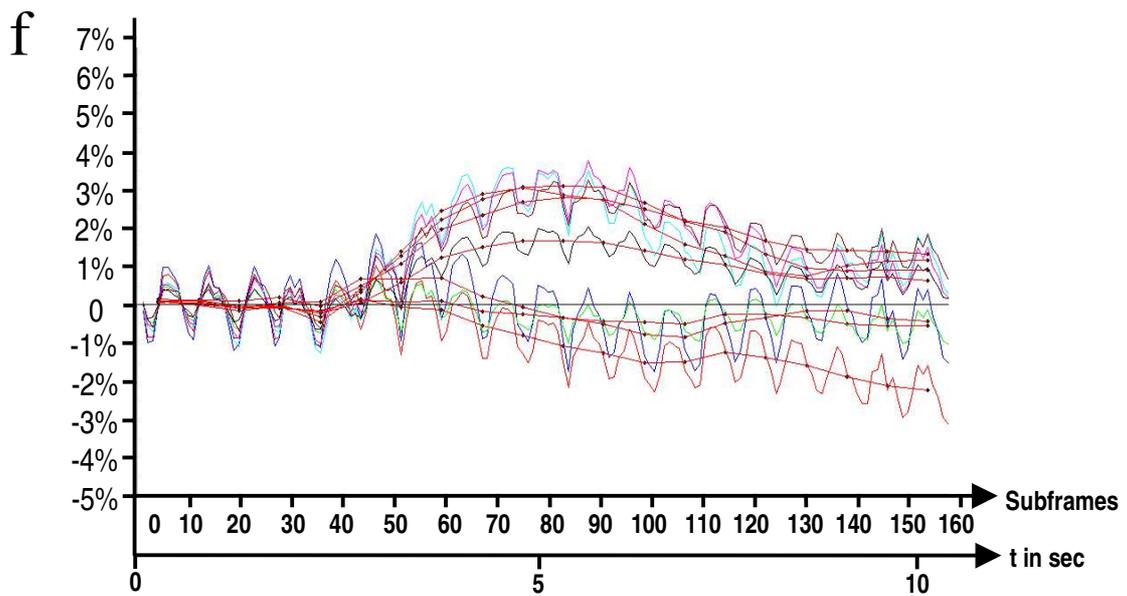
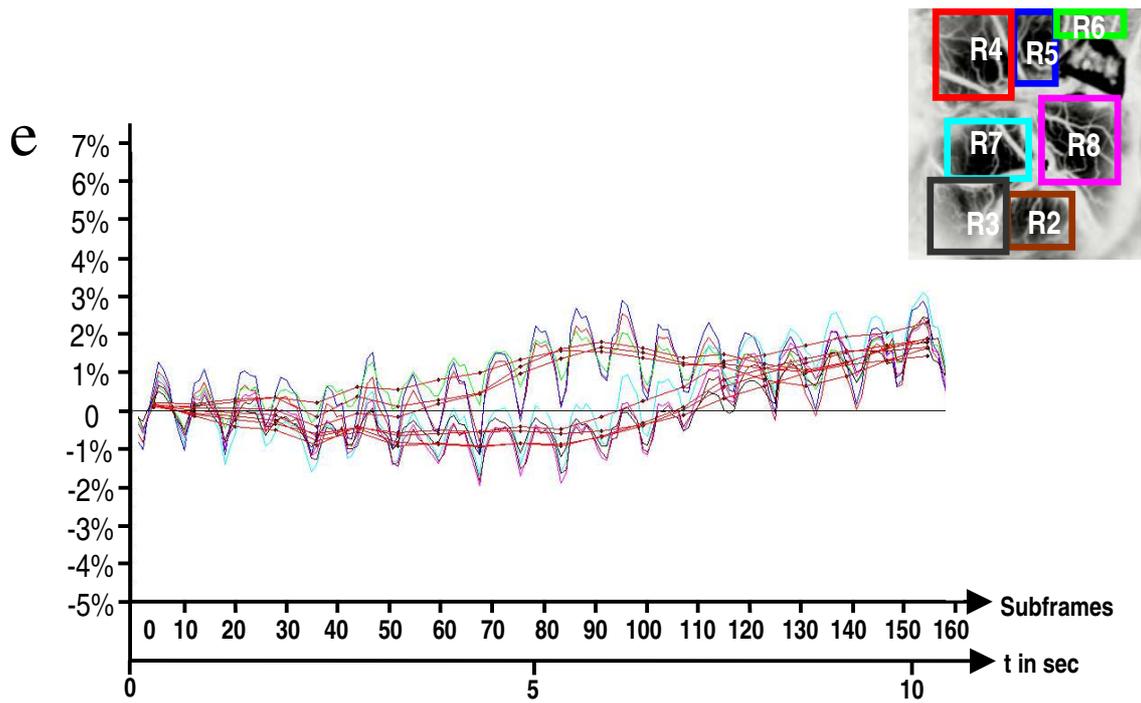
Über den freien Kortexarealen wurden ROIs gebildet, deren Helligkeitsverläufe einzeln dargestellt werden konnten.



**Abb.32 a,b:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
**a:** 4kHz, DG1, Ausführung11    **b:** 4kHz, DG1, Ausführung 12

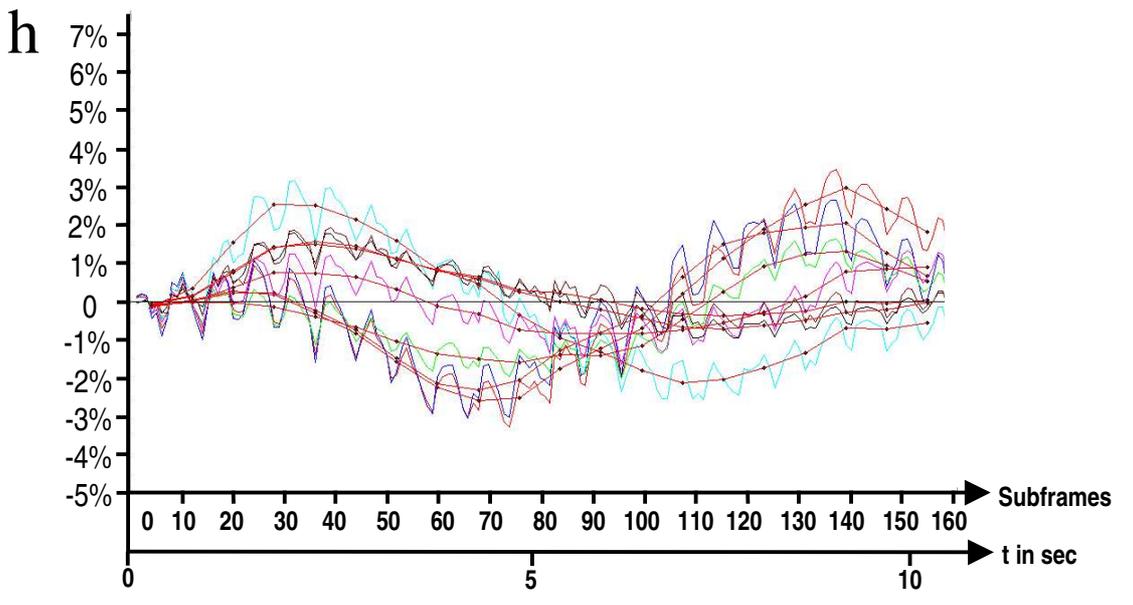
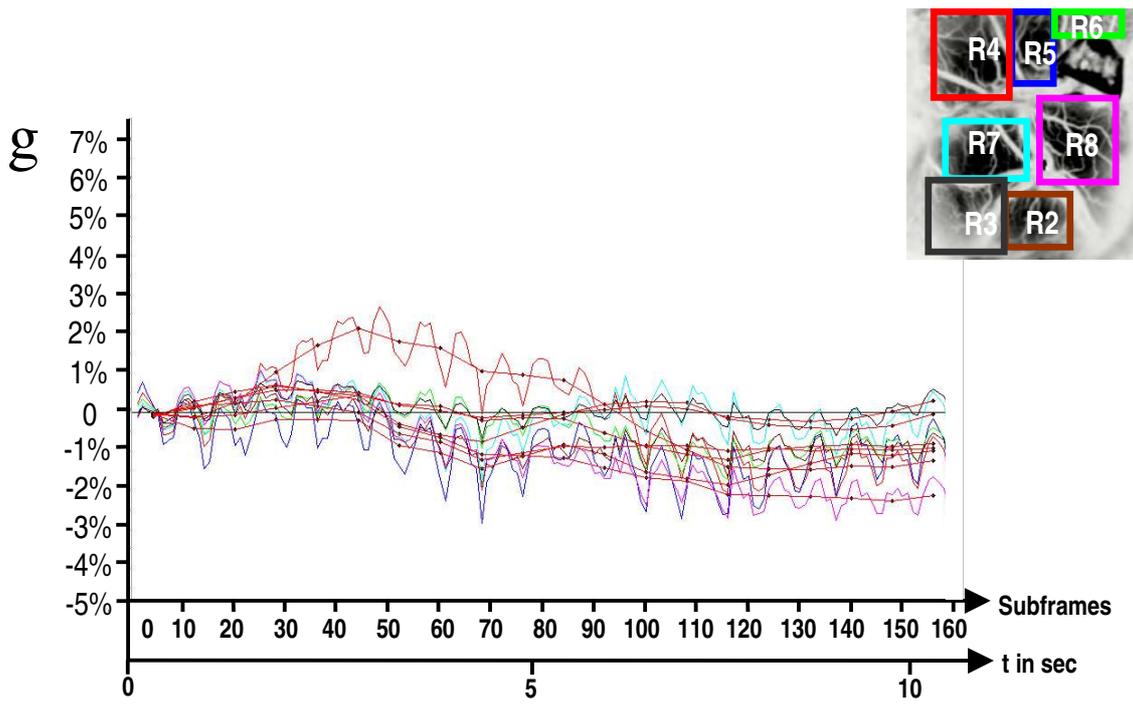


**Abb.32 c,d:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
**c:** 4kHz, DG2, Ausführung12    **d:** 4kHz, DG3, Ausführung 10

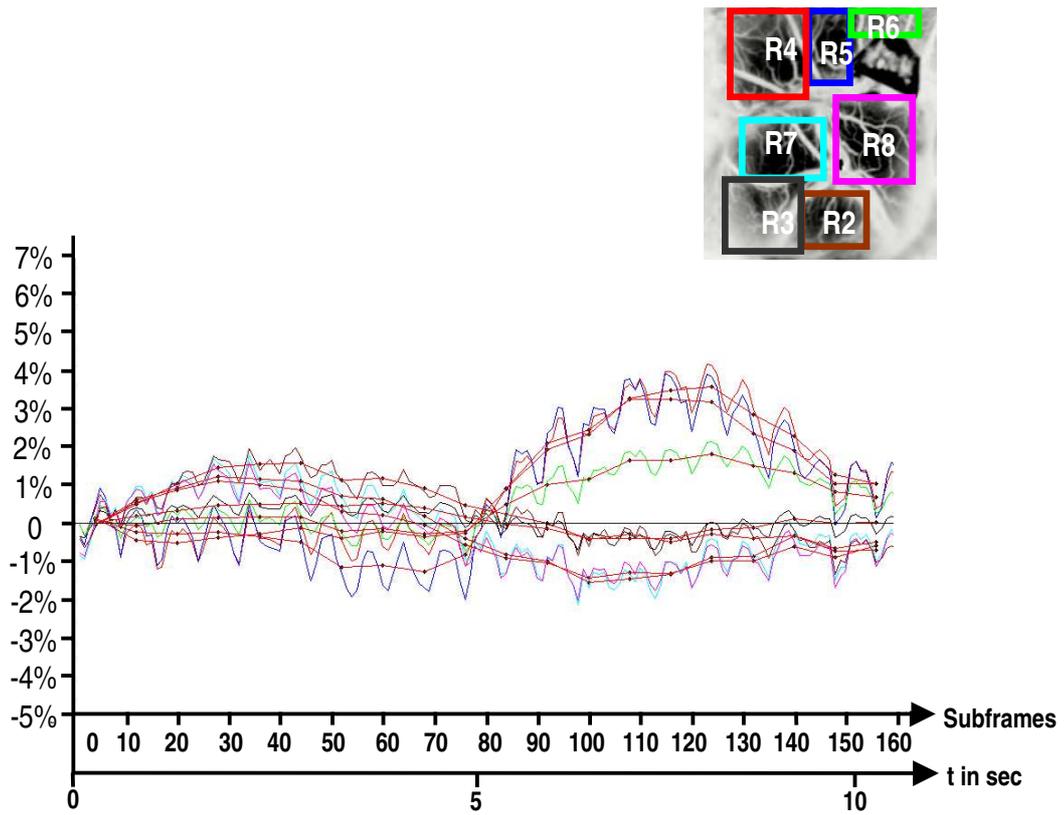


**Abb.32 e,f:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
 4kHz, DG3, Ausführung 11    **f:** 4kHz, DG3, Ausführung 12

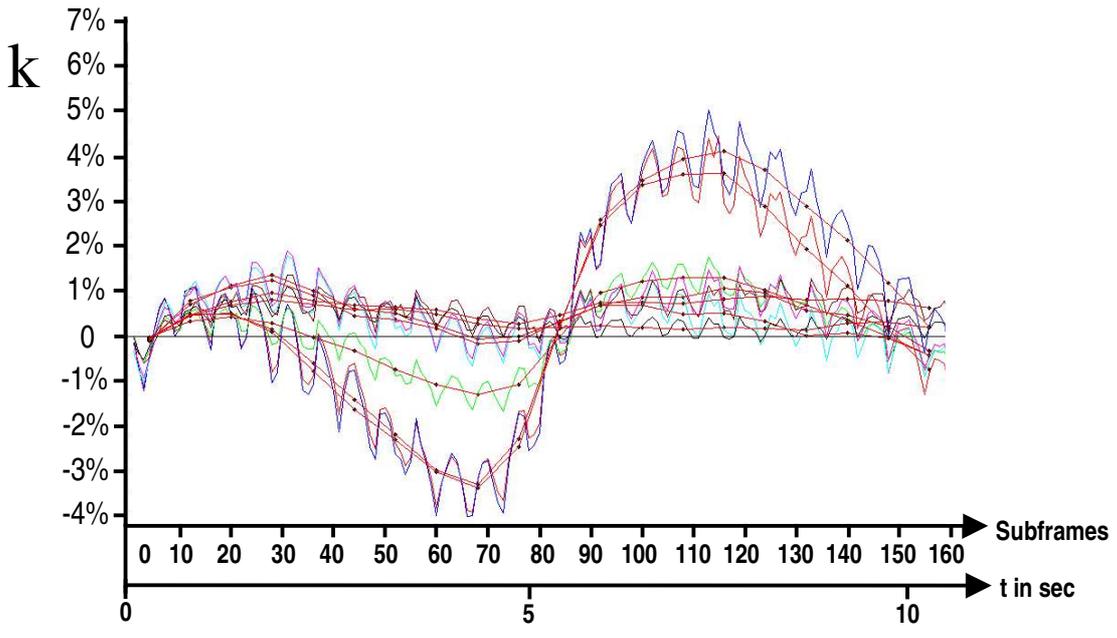
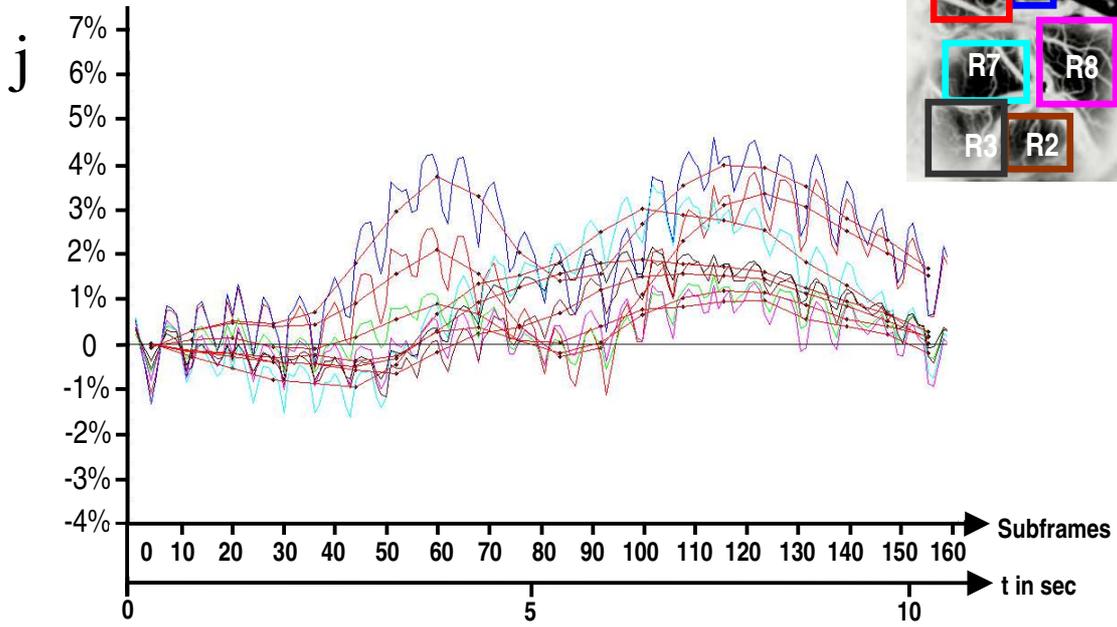
**e:**



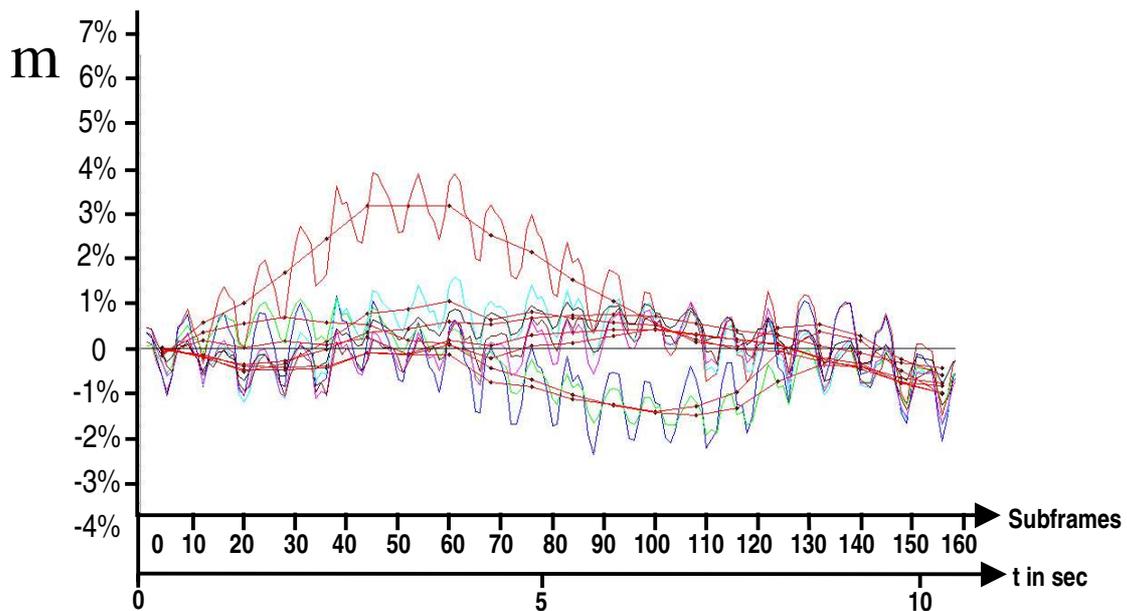
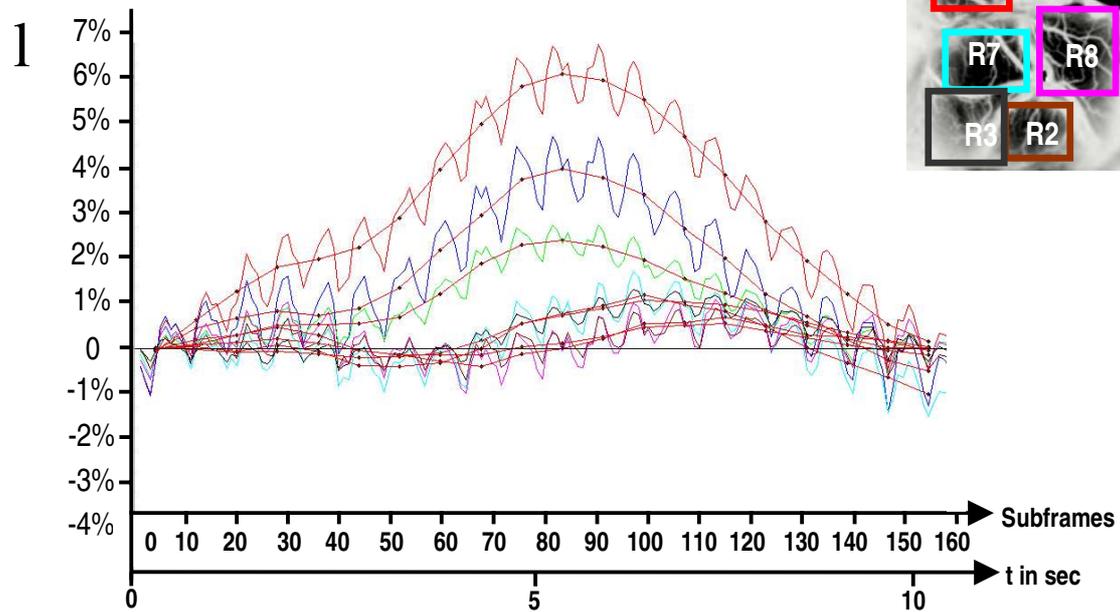
**Abb.32 g,h:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
**g:** 8kHz, DG1, Ausführung4 **h:** 8kHz, DG2, Ausführung 6



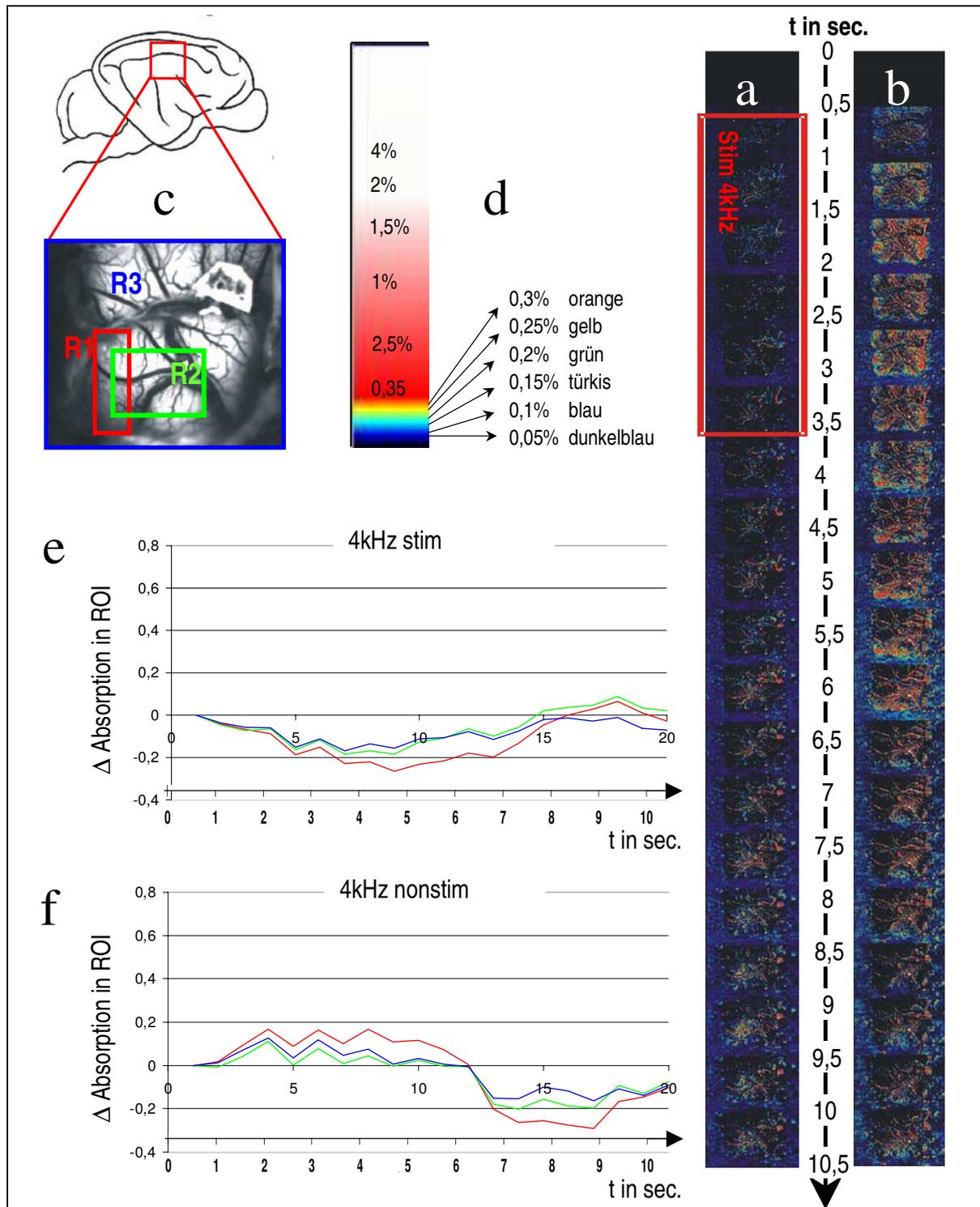
**Abb.32 i:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
8kHz, DG2, Ausführung6



**Abb.32 j,k:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
 16kHz, DG1, Ausführung10 **k:** 16kHz, DG1, Ausführung 12



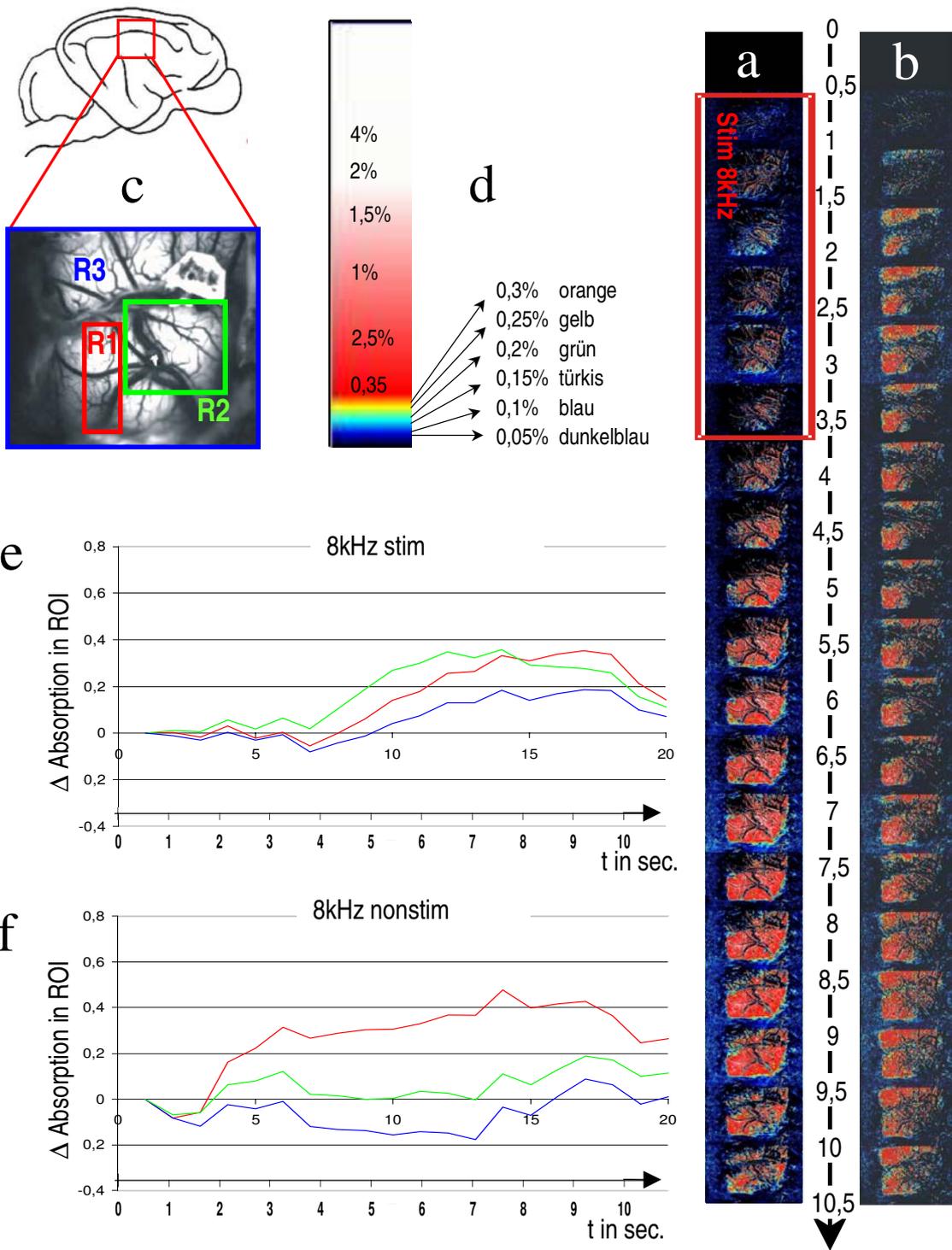
**Abb.32 l,m:** Absorptionsverläufe in kleinen Feldern  
 16kHz, DG2, Ausführung9 **m:** 16kHz, DG2, Ausführung 12



**Abb.33a**

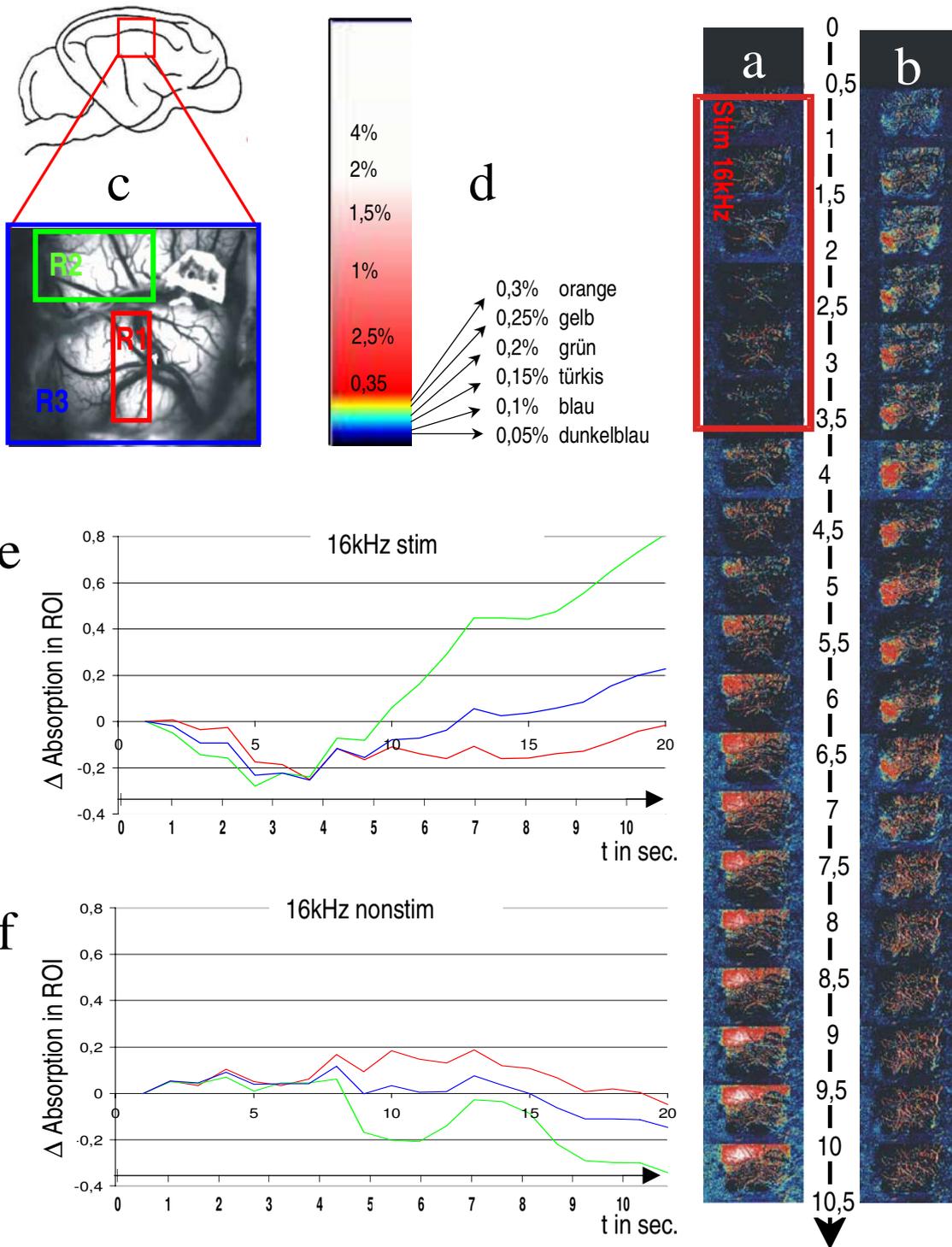
4kHz Stimulation, Resultat der Mittelung über 18 Durchgänge

**a:** Mittelungsergebnis für Stimulussituation bei 4kHz, roter Rahmen: Stimuluszeitraum **b:** korrespondierender Nonstimulustreifen, zwischen den Streifen: Zeitachse **c:** Übersicht der Ableitregion am Hirn und Darstellung der ausgewerteten ROIs R1(rot): nach Literatur (Abb.28) Lokalisation der CF, R2(grün): Areal der maximalen Absorptionsunterschiede und R3(blau) gesamter Kortex **d:** Falschfarbskala **e/f:** grafische Darstellung der Absorptionsverläufe der ausgewählten ROIs



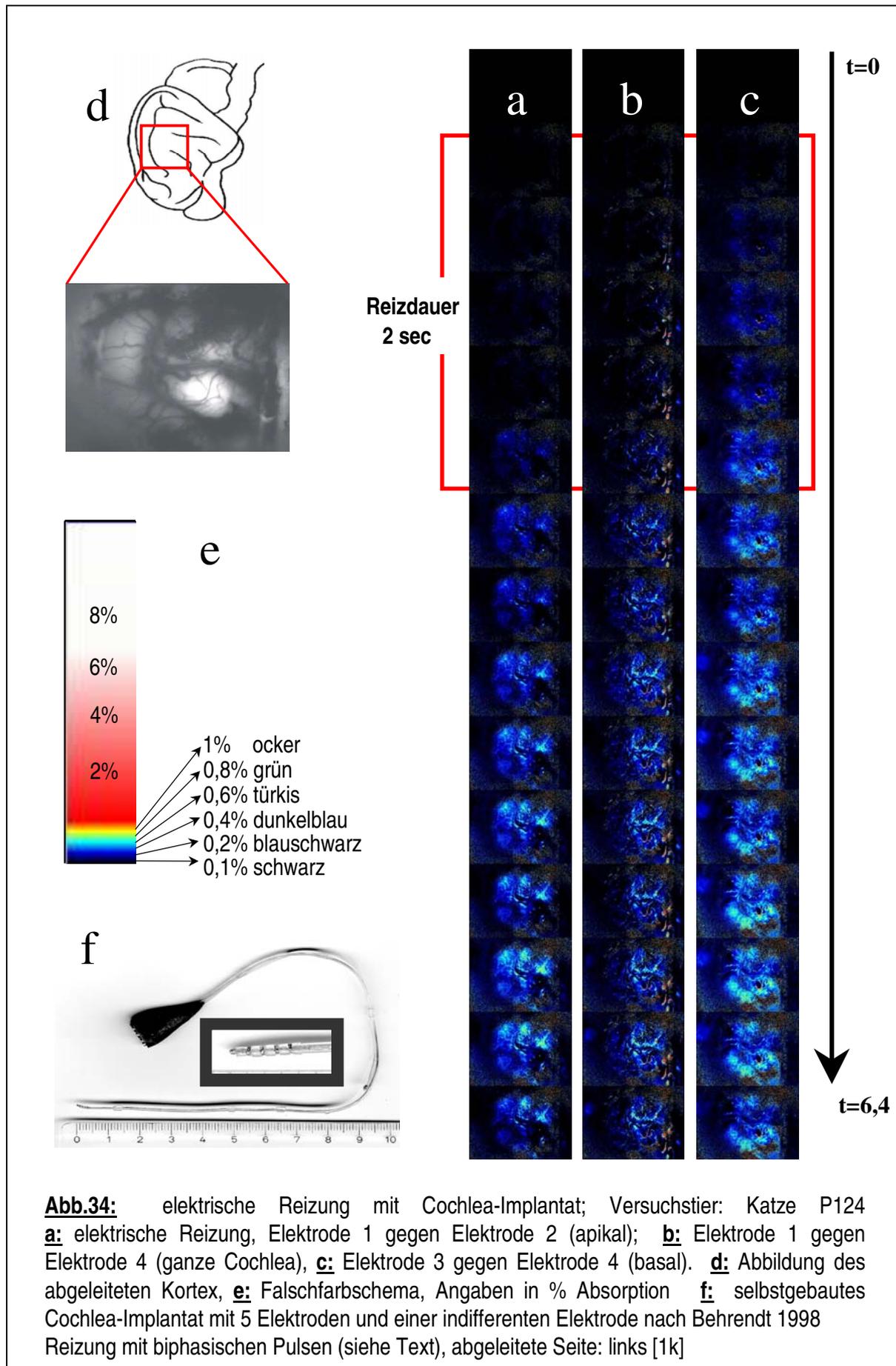
**Abb.33b** 8kHz Stimulation, Resultat der Mittelung über 18 Durchgänge  
 Mittelungsergebnis für Stimulusituation bei 8kHz, roter Rahmen: Stimuluszeitraum  
 korrespondierender Nonstimulusstreifen, zwischen den Streifen: Zeitachse **c**: Übersicht  
 Falschfarbskala **e/f**: grafische Darstellung der ausgewählten ROIs

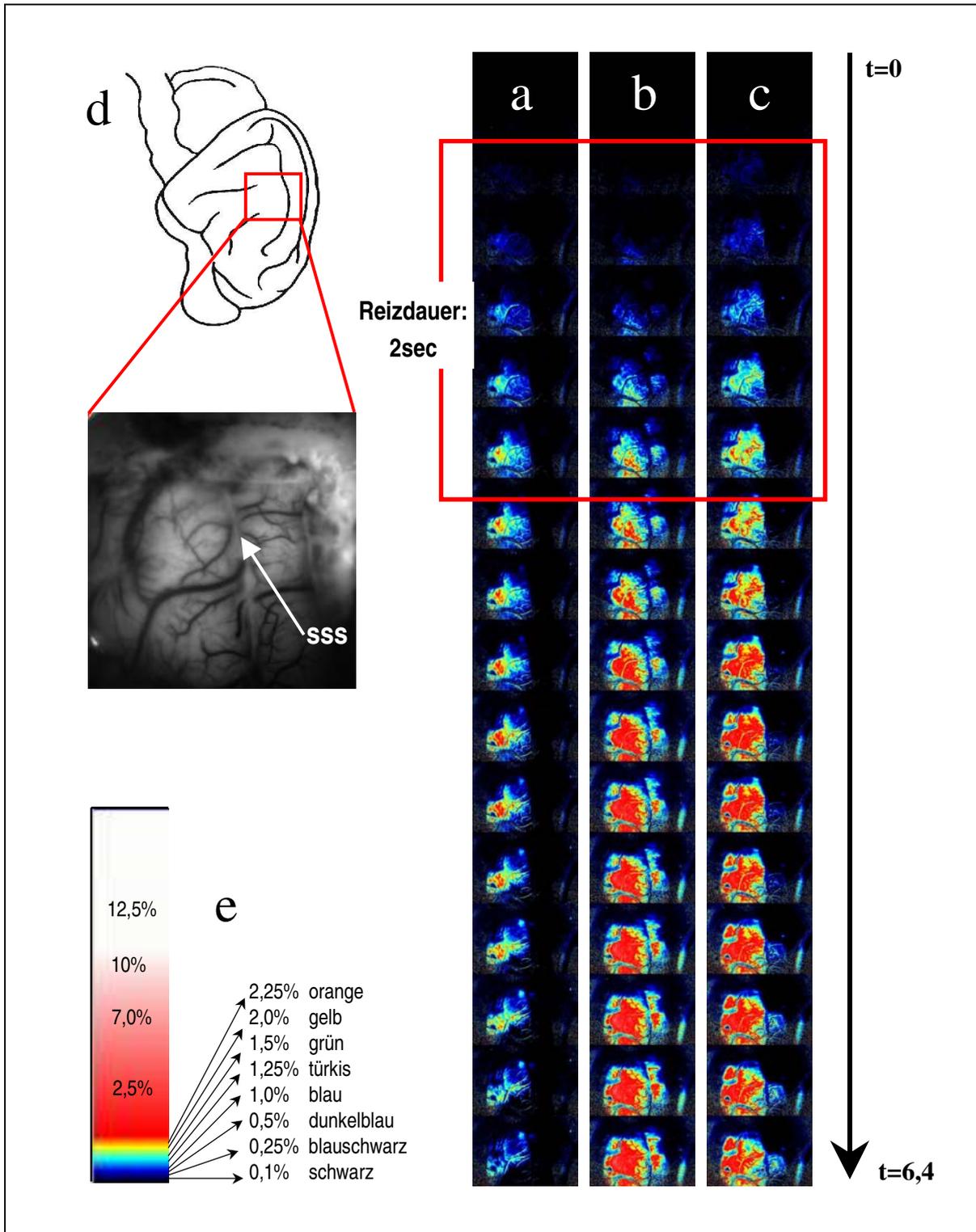
**a:**  
**b:**  
**d:**



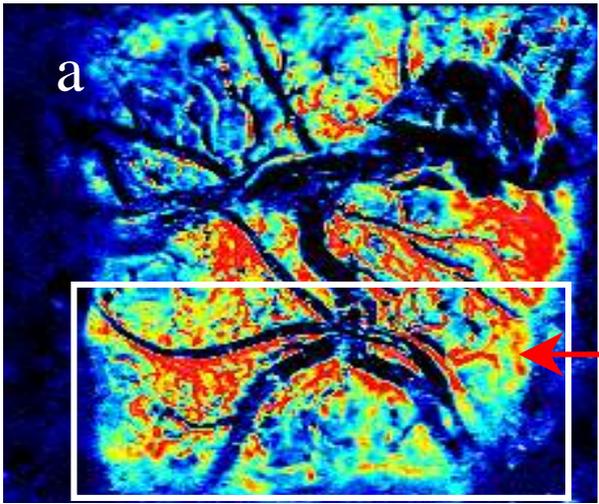
**Abb.33c** 16kHz Stimulation, Resultat der Mittelung über 18 Durchgänge  
**a:** Mittelungsergebnis für Stimulussituation bei 16kHz, roter Rahmen: Stimuluszeitraum  
 korrespondierender Nonstimulusstreifen, zwischen den Streifen: Zeitachse **c:** Übersicht  
 Falschfarbskala **e/f:** grafische Darstellung der ausgewählten ROIs

**b:**  
**d:**





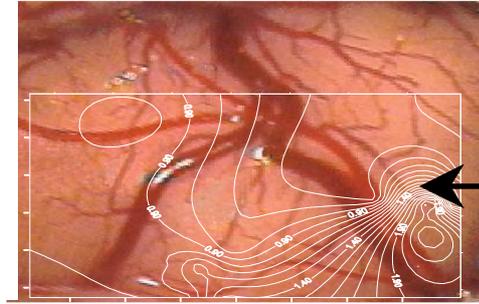
**Abb.35:** akustische Reizung mit geschlossenem akustischem System (näheres s. Text)  
 Versuchstier: Katze P125, abgeleitete Seite: rechts  
**a:** Reizung mit 1 kHz **b:** Reizung mit 4kHz, **c:** Reizung mit 16kHz. **d:** Abbildung des abgeleiteten Kortex, **e:** Falschfarbschema, Angaben in % Absorption [2k]



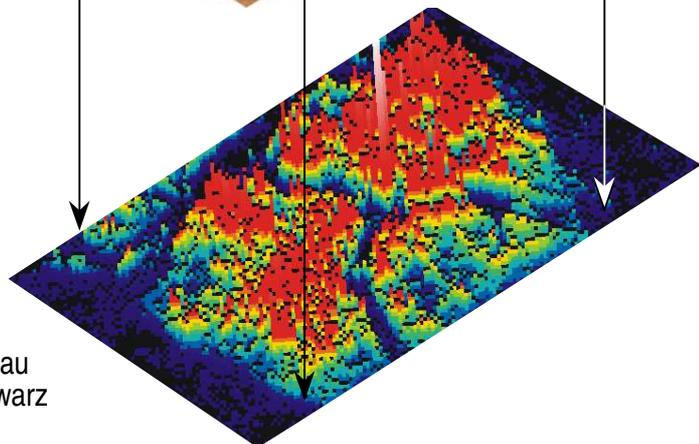
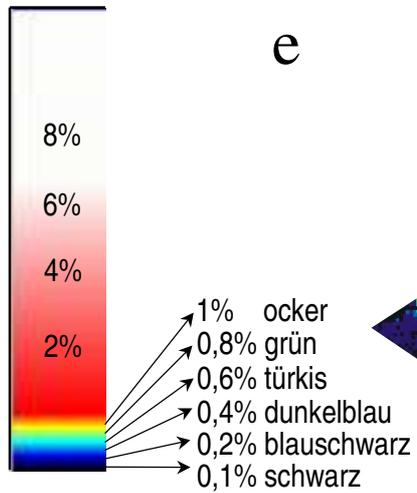
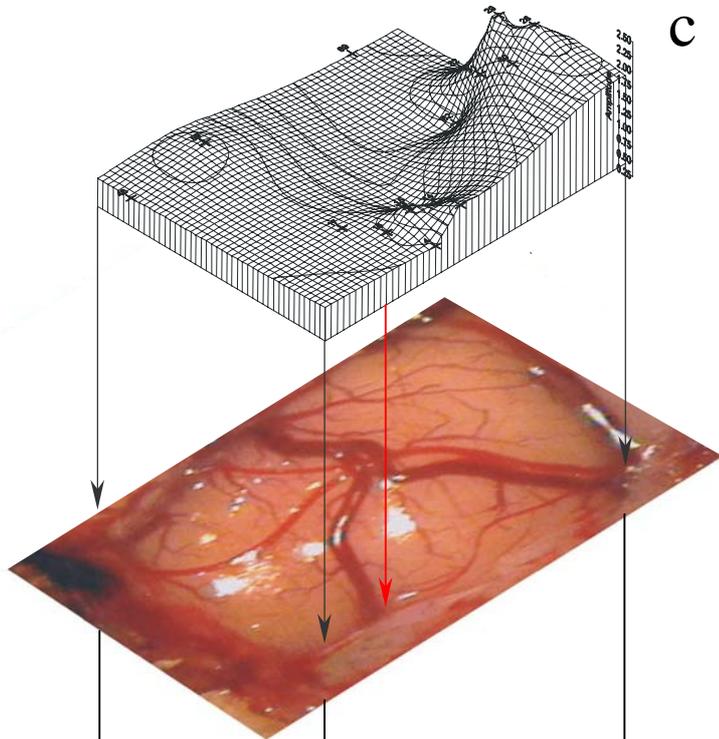
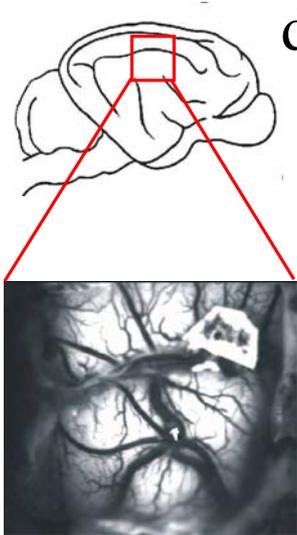
-1000 0 1000 2000 3000 4000 5000

Distanzen  
in  $\mu\text{m}$

8000  
7000  
6000  
5000  
4000  
3000  
2000  
1000  
0



-1000 0 1000 2000 3000 4000 5000



**Abb.37**

Vergleich Elektrophysiologie und ORIS. Versuchstier: P126

**a:**optical-imaging-Darstellung des Frames am Signalmaximum bei 8kHz Reizung. Asterisk: Referenzpunkt, Pfeil: Position des elektrophysiologischen Signalmaximums. **b:** Isopotentiallinien aus elektrophysiologisch abgeleiteten evozierten Potentialen über dem abgeleiteten Kortexareal. Roter Pfeil: maximale Amplituden. **c:**Vergleich in dreidimensionaler Darstellung. Oben: Resultate der elektrophysiologischen Oberflächenableitungen mit Maximalamplituden bis 2mV. Mitte: abgeleitetes Kortexareal. Unten: 3D-Darstellung der optisch abgeleiteten Antworten. **d:**Schematische Darstellung des Ableitortes. **e:** das genutzte Falschfarbschema. Angaben in % Absorption gegenüber Prästimulusmittel.