

**Dipl.-Biologin
Elena Kammerer**

Weberstraße 4
Magdeburg 39112

☎ (0176) 64 27 95 28

✉ Elena.Kammerer@ifn-magdeburg.de

Titel der Dissertation:

Untersuchungen zu den neurophysiologischen Grundlagen der funktionellen Kernspintomographie (fMRI)

[Examinations about the neurophysiological basis of functional MRI]

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Versuchsaufbaues, mit dessen Hilfe Aufschluß über die Beziehung zwischen direkt und indirekt gemessener neuronaler Aktivität gewonnen werden kann. Da die inzwischen häufig verwendete funktionelle Kernspintomographie (fMRT) lediglich Veränderungen der regionalen Hämodynamik zeigt, die einer veränderten lokalen neuronalen Aktivität folgen, kann man aus den daraus resultierenden bildgebenden Signalen nicht immer zuverlässige Rückschlüsse über die tatsächlich zugrundeliegende neuronale Aktivität ziehen. Eine gleichzeitige Messung von bildgebenden Signalen und der neuronalen Aktivität einer ausgewählten Region sollte das Verhältnis beider eingehender untersuchen. Dazu wurde ein unmittelbarer Hippokampuseingang, der Tractus perforans, mit einer genau definierten elektrischen Stimulation aktiviert. Die auf diese Weise in der Area dentata des Hippokampus hervorgerufene neuronale Aktivität wurde per extrazellulärer Ableitung gemessenen, ebenso wie die durch die neuronale Aktivitätsänderung hervorgerufene Veränderung der Hämodynamik, d.h., die Veränderung der Blutsauerstoff-Konzentration (BOLD-Signal).

Nach der Ermittlung der technischen Erfordernisse und der passenden Stimulationsprotokolle wurde überprüft, welche Möglichkeiten die neue Technik bietet, inwiefern sich neuronale und bildgebende Signale korrelieren lassen, und welche Wirkung die angewendeten Stimulationsprotokolle auf den Hippokampus (Area dentata) haben.

Die beschriebene Technik erwies sich als geeignet, mittels einer gezielten Aktivierung des hauptsächlich glutamatergen Eingangs signifikante BOLD-Aktivierungen im Hippokampus zu erzeugen. Nieder- und hochfrequente Stimulationsprotokolle waren dabei unterschiedlich effektiv. Hochfrequente "burst"-Protokolle (50 - 200 Hz) erzeugten stets signifikante BOLD-Antworten. Bei niederfrequenter Stimulation (2.5 - 20 Hz) war das nicht immer der Fall. Hier zeigte sich allerdings eine Abhängigkeit zwischen Stimulationsfrequenz und der Wahrscheinlichkeit einer signifikanten Aktivierung. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz erhöhte bei Anwendung niedriger Stimulationsfrequenzen also auch die Wahrscheinlichkeit einer signifikanten Aktivierung. Die räumliche Ausdehnung einer BOLD-Aktivierung hing von zwei Parametern ab: der Stimulationsfrequenz und der Anzahl der übertragenen Stimuli. Das heißt, das spezifische Muster einer Stimulationssequenz spielte eine wesentliche Rolle beim Zustandekommen der beobachteten BOLD- Aktivierungen.

Dennoch wurde eine Dissoziation zwischen elektrophysiologisch gemessener neuronaler Aktivität und den resultierenden BOLD-Signalen deutlich. Summenaktionspotentiale, bzw. postsynaptische Aktivität, konnten weder das Zustandekommen noch die Abwesenheit signifikanter BOLD-Aktivierung erklären. Es ist anzunehmen, dass eine Untersuchung der synaptischen Aktivität (EPSPs) zu dem selben Ergebnis führen würde, da es sich bei dem extrazellulär gemessene Feldpotential lediglich um ein integriertes Signal handelt, das

nur die Gesamtsumme exzitatorischer und inhibitorischer Aktivität zusammenfasst, aber keine Auskunft über den genauen Umfang der beteiligten Komponenten geben kann. Die Ableitung neuronaler Aktivität ist also, zumindest im Hippokampus, kritisch zu sehen, da die innige Verschränkung von Exzitation und Inhibition in dieser Region eine Bestimmung der absoluten neuronalen Aktivität verhindert. Lediglich die Latenz der Summenaktionspotential-Maxima kann als potentieller Indikator der Inhibition in Betracht gezogen werden. Dennoch ist die Verbindung von fMRI und Elektrostimulation zu einer kombinierten Technik praktikabel und könnte zur gezielten Aktivierung anderer Transmittersysteme verwendet werden: dem cholinergen Eingang vom medialen Septum, dem serotonergen von den Raphekernen, oder dem noradrenergen vom Locus coeruleus.

Die beträchtlich erhöhten Latenzen der Summenaktionspotentiale während der Stimulation wurden als Hinweis darauf gewertet, dass Inhibition eine bedeutende Rolle bei der Produktion von BOLD-Signalen spielen. Da die Latenzen besonders stark während der Stimulation mit Frequenzen zunahm, die signifikante BOLD-Signale erzeugten, war die Annahme naheliegend, dass eine erhöhte inhibitorische Aktivität dafür verantwortlich sein könnte.

Es wurde außerdem untersucht, ob Sequenzen von Stimuluspulsen in der Lage sind, Kurzzeit-Plastizität (STP) hervorzurufen, und ob diese in Verbindung mit den erzeugten BOLD-Aktivierungen gebracht werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren ambivalent. Kurzzeit-Plastizität konnte zwar während der Stimulation häufig beobachtet, aber nicht eindeutig mit dem Zustandekommen signifikanter BOLD-Signale in Beziehung gebracht werden. Auch in diesem Fall verhindert die Tatsache, dass die extrazellulär gemessenen Feldpotentiale ein integriertes Signal darstellen, eine entgeltige Aussage.

Neben Mechanismen der Kurzzeit-Plastizität wurden auch Vorgänge, die länger anhaltende Plastizität hervorrufen können für das Zustandekommen signifikanter BOLD-Signale in Erwägung gezogen. Deshalb wurde in zusätzlichen Kontrollexperimenten untersucht, inwiefern vier der typischen Stimulationsprotokolle neuronale Plastizität beeinflussen konnten.

In einer weiteren Reihe von Kontrollexperimenten wurde die Wirkung der gleichen Protokolle auf nicht narkotisierte Tiere überprüft, um den Einfluß der Isofluran-Narkose auf die elektrophysiologischen Signale zu bestimmen.

In beide Experimentalreihen riefen Stimulationsprotokolle, die auch signifikante BOLD-Antworten erzeugten, eine langanhaltende Depression von Populationsspiques in der Area dentata hervor. In nicht narkotisierten Tieren konnte sich diese Depression im Verlauf von vier Stunden nach Stimulation in eine Potentierung entwickeln.

Ein Vergleich von narkotisierten und nicht narkotisierten Tieren zeigte, dass Isofluran

- 1) die Latenz von Summenaktionspotentialen verlängerte, ohne jedoch das Muster der Stimulusantworten zu verändern,
- 2) sich störend auf die Zuverlässigkeit der elektrophysiologischen Signal auswirkte, wenn die Anästhesiedauer zwei Stunden überschreitet. Die Narkosedauer sollte demnach in fMRI-Experimenten zwei Stunden nicht übersteigen.

In nicht narkotisierten Tieren hatten Frequenzen, die auch signifikante BOLD-Signale erzeugten, einen weiteren Effekt. Obwohl es sich bei den verwendeten Stimulationsprotokollen um künstliche Stimuli handelt, waren sie doch imstande, in den Tieren deutliche Verhaltensänderungen hervorzurufen. Möglicherweise ähneln die gewählten Stimulationsprotokolle natürlichen Stimuli ausreichend, um als Träger einer sinnvollen Information akzeptiert zu werden und eine Umschaltung in einen anderen Oszillationsmodus zu bewirken, der

wiederum in dem beobachteten exploratorischen Verhalten resultiert.

Eine überraschende Beobachtung wurde bezüglich der BOLD- Baselines gemacht. In Experimenten in denen mit 10, 100 and 200 Hz stimuliert wurde, verschob sich häufig die im dorsalen Hippokampus gemessene BOLD-Baseline nach dem ersten Stimulationsblock. Es wird vermutet, dass die Absenkung dieser Baseline auf eine Abnahme der neuronalen Gesamtaktivität in diesem Gebiet zurückzuführen ist. Eine Depression elektrophysiologischer Aktivität konnte jedenfalls in Form 1) einer erhöhter Inhibition bzw. Verlängerung der Populationsspike-Latenzen, sowie 2) einer Feuerdepression nach Beendigung der Stimulation (in den Kontrollexperimenten) beobachtet werden.

Offenbar konnte die latent vorhandene Depression die Zunahme der Populationsspike-Amplituden während der Stimulation nicht verhindern, was mit Sicherheit darauf zurückzuführen ist, dass sich während der Stimulation mehrere teilweise entgegengesetzte Prozesse überlagern. Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung wäre, dass inmitten einer generellen Depression eine kleine Gruppe aktiver Neuronen eine signifikante BOLD-Aktivierung erzeugt. Demnach wäre es denkbar, dass die Quantität aktivierter Neuronen eine eher untergeordnete Rolle bei der BOLD- Signalentstehung spielt, und dass dabei der Qualität der Prozesse in einer kleinen Gruppe von Neuronen oder Synapsen eine größere Bedeutung zukommt.

Title of Dissertation:

Untersuchungen zu den neurophysiologischen Grundlagen der funktionellen Kernspintomographie (fMRI)

[Examinations about the neurophysiological basis of functional MRI]

Abstract

The thesis aimed to examine the correlation between hemodynamic changes and variation of the neuronal activity in the rat brain. For that an experimental setup was established that allows concurrently to stimulate the direct, mainly glutamatergic hippocampus input, the perforant pathway, and to register the neuronal responses in the dentate gyrus, as well as the blood oxygenation level dependent (BOLD) signal intensity changes in the same region. After the identification of the technical requirements and effective stimulation protocols the potential of the combined technique was explored. Correlations between neuronal and hemodynamic changes were examined, and checked which effects the applied stimulation protocols exert on the dentate gyrus.

High frequency burst protocols (50 - 200 Hz) definitely produced significant BOLD signals, while probability of BOLD signal production increased with frequency for low frequency protocols (2.5 - 20 Hz). The spatial extent of BOLD activations depended on the stimulation pattern, that is of both, stimulation frequency and stimulus number.

During the fMRI experiments a dissociation between measured neuronal activity and the resulting BOLD signal was observed. Spiking, i.e., postsynaptic activity, could not explain significant BOLD signals or their absence. It is expected, that an evaluation of the synaptic activity (EPSP) would yield the same result. Recording of electrophysiological activity in the hippocampus is critical, because of the tightly interwoven inhibitory and excitatory signaling that allows no estimation of the absolute overall neural activity. Of all neuronal parameters only latency was found to be of use as a probable indicator of inhibition.

Nevertheless, the concurrent fMRI + electrostimulation method is feasible and could also be used for a targeted activation of other transmitter systems connected to the hippocampus and an examination of their influence on BOLD signal production, e.g., cholinergic inputs from the medial septum, serotonergic from the raphe nuclei, or the noradrenergic from the Locus coeruleus. That inhibition might play a substantial role in BOLD signal production could be concluded from considerably increased population spike latencies during stimulation. Latency increased particularly during the use of stimulation frequencies evoking significant BOLD signals and led to the assumption, that inhibitory activity may be responsible for that.

It was further examined if trains of stimulus pulses could produce short term plasticity (STP) and this STP might explain concurrent BOLD signals. The results were ambivalent. STP could indeed be observed regularly, but not clearly be correlated to significant BOLD signal production. Apart from STP, longer lasting plasticity processes were taken into account to play a role in BOLD signal production. For that control experiments for four stimulation frequencies were conducted paralleling the fMRI experiments. A further likewise set of control experiments done on unanaesthetized animals examined the influence of Isoflurane anaesthetization on electrophysiological signals.

Electrostimulation protocols capable to evoke significant BOLD responses in fMRI experiments, produced a longlasting depression in anaesthetized and unanaesthetized controls. Only in the last this depression could develop into a potentiation during four hours following stimulation. Comparison of anaesthetized and unanaesthetized animals showed further that Isoflurane: 1) delayed the population spike latency, but did not change the general response pattern to stimulus pulses, 2) had a destabilizing effect on electrophysiological signal fidelity when used for longer than two hours. It can be learned from this, that fMRI experiments should be kept within a time interval of two hours.

In unanaesthetized animals frequencies potentially producing significant BOLD responses were also capable to trigger behavioural changes. Although electrostimulation is assumed only to provide an artificial stimulus, animals responded to it like to a natural impulse. Probably the artificial stimulus resembled a natural activation close enough to be accepted as a carrier of information switching brain oscillation from one to another state, and resulting in the observed exploratory behaviour.

Another surprising observation was a shift of BOLD signal baseline after the first stimulation block in experiments applying 10, 100 and 200 Hz that could be observed in the dorsal hippocampus. The shift might be related to an decrease of general neural activity in the region triggered by the specific stimulation. Electrophysiological signal depression appeared as 1) increased inhibitory drive displayed as increasing population spike latency during stimulation 2) spiking depression following stimulation (control experiments).

However, the underlying depression could not prevent an increase of population spike amplitudes during stimulation, showing by that several concurrent overlying processes during ongoing stimulation. The interesting point in this observation is that within a general depression of neural activity probably only a small group of active neurons might have produced the significant BOLD response. So, it could be that the quantity of active neurons plays a minor role in BOLD signal production, but the quality of processes in a subset of neurons/synapses is crucial, even if the number of those neurons is comparatively low.