

Kombination von BOLD-fMRT und optischer Calcium-Messung zur Untersuchung des Einflusses der Anästhesie auf funktionelle Hirnaktivität

Timo van Alst¹*, Lydia Wachsmuth¹, Franziska Albers¹, Nathalie Just¹, Cornelius Faber¹

¹ Institut für klinische Radiologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

* t.v.alst@uni-muenster

Abstract: In basic neuroscience research, rodent models are commonly used for fMRI. We investigated BOLD, neuronal responses in optical calcium recordings, and baseline perfusion in a rat model under different anesthetic conditions using constant stimulus. We observed that different anesthetic conditions impaired the results extensively. Particularly hypercapnia caused a smaller BOLD response through extended basic perfusion. The effect of high doses of inhalation anesthetics on BOLD was limited, whereas a big effect on neuronal responses was detectable.

Zusammenfassung: In der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung ist die Nutzung von Nagern als Modell im fMRT weitverbreitet. Wir untersuchten in einem nativen Ratten-Modell BOLD, die neuronale Antwort in optischen Calcium-Messungen und die Perfusion unter verschiedenen Anästhesiebedingungen bei jeweils gleichbleibendem Stimulus. Dabei zeigte sich, dass die Anästhesiebedingungen die Ergebnisse solcher Messungen erheblich beeinflussen können. Insbesondere Hyperkapnie verursachte eine geringere BOLD-Amplitude durch eine erhöhte Basisperfusion. Der Effekt hoher Dosen Inhalationsanästhetika auf BOLD war begrenzt, wohingegen ein großer Effekt auf die direkten neuronalen Antworten festgestellt wurde.

Motivation

BOLD-fMRT an Kleintieren ist gerade in der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung eine Technik mit weiter Verbreitung. In aller Regel erfolgen die Messungen am narkotisierten Tier. Dabei wird angenommen, dass BOLD ein Parameter für neuronale Aktivität ist – tatsächlich wird jedoch nicht die direkte neuronale Aktivität gemessen, sondern Veränderungen in der zerebralen Hämodynamik. Von diesen Veränderungen der Hämodynamik wird dann auf neuronale Aktivität rückgeschlossen. In den Prozess der Übersetzung neuronaler Aktivität in

Veränderungen der Hämodynamik spielen viele Faktoren mit hinein, insbesondere zerebrales Blutvolumen (CBV), zerebraler Blutfluss (CBF) und zerebrale Sauerstoffextraktion (CMRO₂). Ungeachtet jahrzehntelanger Forschung bleibt der genaue Zusammenhang unklar (1–3). Eine direktere Messung neuronaler Aktivität kann mittels optischer Calcium-Messung erreicht werden. BOLD-Messungen in Kombination mit simultaner Aufnahme des Calciumsignals wurden bereits erfolgreich in der Ratte durchgeführt (4,5).

Um Studien am narkotisierten Tier erfolgreich durchführen und analysieren zu können ist es von großem Wert zu wissen, welche der gemessenen Effekte von der Anästhesie herrühren und auf welche Weise sie die Ergebnisse verfälschen können.

Diese Arbeit untersucht, inwiefern Parameter wie Anästhesietiefe und die Einhaltung physiologischer Bedingungen BOLD und die zugrundeliegende neuronale Aktivität beeinflussen.

Material und Methoden

Um dem komplexen Zustandekommen des BOLD-Signals gerecht zu werden, verwendeten wir einen multimodalen Ansatz, bestehend aus BOLD-fMRT mit simultanen Calcium-Messungen und nicht-invasiven Perfusionsmessungen mittels Arterial Spin Labelling (ASL). In einer ersten Gruppe wurden insgesamt 24 spontanatmende Tiere mittels fMRT untersucht, wovon bei 7 Tieren simultan Calcium-Messungen durchgeführt wurden. Bei 6 Tieren wurden Perfusionsmessungen mittels ASL durchgeführt. In der zweiten Gruppe wurden beatmete Tiere untersucht. Bei 7 Tieren führten wir fMRT-Messungen durch, davon wurde bei 4 Tieren gleichzeitig optisch das Calcium-Signal ausgelesen. Auch hier wurden 6 Ratten für Perfusionsmessungen verwandt.

BOLD-fMRT

Für die BOLD-fMRT-Messungen wurden Ratten nach Anästhesieeinleitung mit Isofluran

auf einer Tierliege fixiert. Sie erhielten eine Mischung von 80% Raumluft und 20% Sauerstoff. Elektroden wurden subkutan in einer Vorderpfote platziert und an einen elektrischen Stimulator angeschlossen. Die Tiere wurden dann zu einem 9.4 T-Kleintier-MRT verbracht und eine 20 mm-Oberflächenspule wurde auf der Schädelseite angebracht, die kontralateral zu den implantierten Elektroden lag. Eine subkutane Medetomininjektion (0.05 mg/kg initial, 0.04 mg/kg/h als Erhaltungsdosis) wurde gestartet und Isofluran wurde binnen 10 min ausgeschlichen. Nach 40 min erfolgten die fMRT-Aufnahmen. Die Vorderpfote wurde elektrisch stimuliert (Blockparadigma: 5 s Stimulation mittels Stromstößen [1 mA bei einer Frequenz von 9 oder 3 Hz]). Das BOLD-fMRT erfolgte mittels single-shot GE-EPI für 600 s (TR = 1 s, TE = 18 ms).

Die Aufnahmen erfolgten 10 min nach stufenweiser Erhöhung und später Erniedrigung der Dosis des in die Atemluft hinzugesetzten Isoflurans (0,0%; 0,2%; 0,4%; 0,7%; 1,0%; 1,25%; 1,5%). BOLD fMRT wurde für jede Isoflurankonzentration wiederholt.

Bei Experimenten am beatmeten Tier wurde vor Beginn der Messungen endotracheal intubiert und der Tubus an ein MRT-kompatibles Beatmungsgerät angeschlossen. Der expiratorische Schenkel des Beatmungsventils wurde an einen CO₂-Analyzer angeschlossen. Dabei wurden Respirationsrate und Atemzugvolumen so adjustiert, dass sich ein expiratorischer CO₂-Gehalt von 3 % ergab. Wir untersuchten hier vier Isoflurankonzentrationen (0,0%; 0,2%; 0,7%; 1,5%) und weiterhin 0,0% Isofluran + 5% CO₂ sowie 1,5% Isofluran + 5% CO₂.

Die Analyse erfolgte mit SPM 8 und Matlab. Ein ROI von 3x3 Voxel wurde im Zentrum des aktivierten Clusters im primären somatosensorischen Kortex der Vorderpfote (primary somatosensory Cortex of the forelimb – S1FI) definiert und der Zeitverlauf der BOLD-Antwort gemittelt und extrahiert.

Calcium-Messungen

Für die Calcium-Messungen nutzten wir genetisch kodierte Calcium-Schalter (GCaMP6f). Dies ist ein Protein, dessen Fluoreszenz sich ändert, wenn daran Calcium bindet. Da bei jedem Aktionspotential Calcium in ein Neuron einströmt, lässt sich damit die neuronale Aktivität durch ein neuronales Populationssignal auslesen.

Ratten wurden mittels Isofluran narkotisiert, zusätzlich wurde eine Lokalanästhesie mittels Lidocain und Analgesie mittels Buprenorphin durchgeführt.

Die Tiere wurden in einem sterotaktischen Rahmen fixiert und eine Kraniotomie mittels Bohrer vorgenommen. Adeno-assoziierte Viren (AAVs), die für GCaMP6f kodieren, wurden langsam in S1FI eingespritzt. Anschließend wurde die Kapillare zurückgezogen und die Einstichwunde wieder vernäht. Die eigentlichen Messungen wurden nach frühestens vier Wochen durchgeführt, damit ausreichend Zeit für die Expression von GCaMP6f vorhanden war.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere wieder narkotisiert und eine neue Kraniotomie vorgenommen. Eine Glasfaser (200 µm Durchmesser) wurde über S1FL implantiert und mit einem Laser (Wellenlänge 488 nm) verbunden. Durch diese Faser wurde GCaMP6f angeregt, gleichzeitig wurde durch die gleiche Faser das Fluoreszenzlicht detektiert.

Das Ca²⁺-Signal wurde dabei als Änderung der Fluoreszenz relativ zur Basisfluoreszenz ($\Delta f/f$) aufgetragen (Fig 1 a,b). Die Primärantworten wurden jeweils gemittelt (mind. 10 Stimulationsperioden) und die Amplituden der Primärantworten ermittelt.

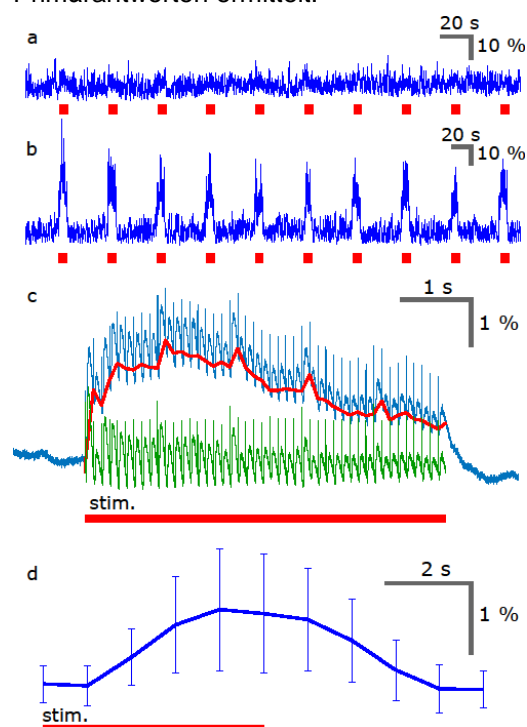


Fig. 1: Einzelne Calciumspuren (a,b) werden gemittelt (c, blauer Graph) und die Baseline-Elevation (c, roter Graph) subtrahiert (c, grüner Graph). Zum Vergleich der gemittelte BOLD-Zeitverlauf (d) mit Standardabweichungen.

Perfusionsmessungen

Um die Basisperfusion zu messen wurde ein FAIR-RARE-Protokoll (TR = 18s, TR = 25,55ms, Schichtdicke 1,2 mm) verwendet. Hierbei verwendeten wir keine Stimulation. In

das ROI wurde der bilaterale Cortex auf Höhe von S1F1 miteinbezogen. Daraus resultierte ein ROI von 175 ± 2 Voxel. Single-Slice-Akquisitionen wurden für 19 unterschiedliche TR/TI-Zeiten durchgeführt. Voxel mit Werten über 400 ml/100g/min wurden als Blutgefäße betrachtet und von der Analyse ausgeschlossen, genauso wie Voxel mit Werten von unter 30ml/100g/min. Die absoluten Perfusionswerte wurden für jedes Tier normiert. Referenzpunkt war dabei die Perfusion unter purer Medetomidinsedation ohne Beimengung von CO₂.

Nach dem Durchführen der Experimente wurden die Tiere transkardial perfundiert und das Hirn wurde zur histologischen Validierung der Expression von GCaMP mikroskopiert.

Die statistische Analyse erfolgt durch SPSS mittels Tukey-Test.

Ergebnisse

fMRT

In spontanatmenden Tieren unterdrückte die Beimengung von Isofluran zur Einatemluft das BOLD-Signal. Selbst 0,2% Isofluran reduzierte die BOLD-Amplitude hochsignifikant ($p < 0.001$). Demgegenüber konnte Isofluran in beatmeten Tieren die durchschnittliche Amplitude zwar ebenfalls reduzieren, jedoch nicht signifikant. Sogar bei 1.5% Isofluran detektierten wir im beatmeten Tier robustes BOLD. Erst CO₂, das der Einatemluft zugesetzt wurde, unterdrückte das BOLD gemeinsam mit Isofluran (Fig. 2; $p < 0.001$).

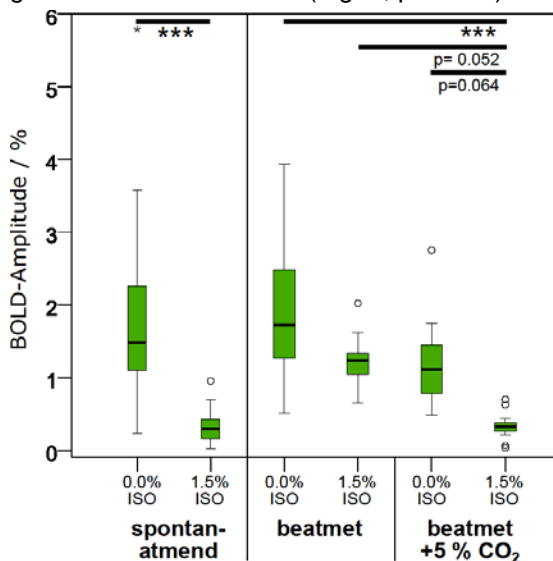


Fig. 2: Auswahl von BOLD-Amplituden in Abhängigkeit von inspiratorischer Isofluran- und CO₂-Gabe.

Perfusionsmessungen

Bei spontanatmenden Tieren konnten hohe Dosen Isofluran (1,0% und 1,5%) die Perfusion signifikant erhöhen. Da mit höheren Isoflurandosen die Tiere atemdepressiv werden (gemessen an der Respirationsrate - RR), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Tiere gleichzeitig CO₂ anreichern. Tatsächlich war die RR ein weitaus besserer Prädiktor für die Perfusion als die Isoflurankonzentration. Sogar kleine RR-Verminderungen riefen eine signifikante Mehrperfusion hervor. Wir vermuteten deshalb einen relevanten Effekt von Hypoventilation und Hyperkapnie. Die Messungen, die in beatmeten Tieren durchgeführt wurden, bestätigten unsere Vermutung. Selbst 1,5 % Isofluran konnten die Perfusion nicht signifikant steigern ($p=0,577$), wengleich die durchschnittliche Perfusion um 30% erhöht wurde. Wurde zu purer Medetomidinsedation 5% CO₂ in die Einatemluft beigemischt, erhöhte sich die Perfusion signifikant um 57 % ($p=0,039$) gegenüber purer Medetomidinsedation, die Kombination von Isofluran und CO₂ erhöhte die Perfusion um 66% ($p=0,008$) (Fig. 3).

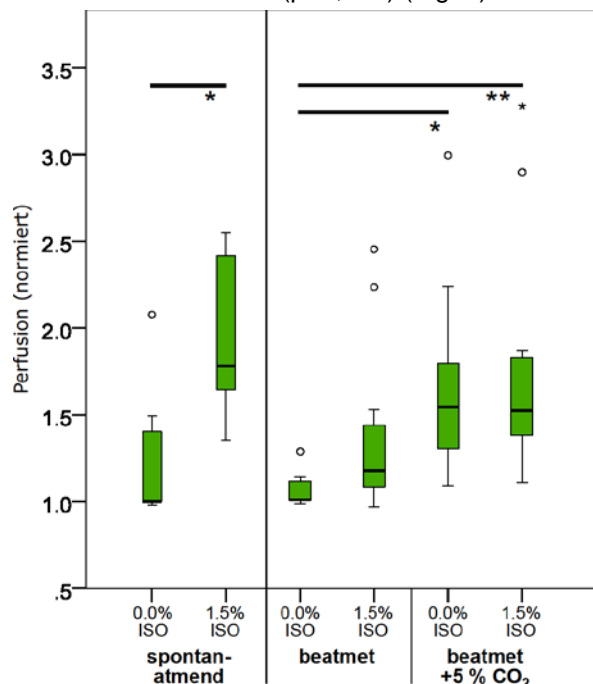


Fig. 3: Auswahl von Perfusionsmessungen in Abhängigkeit von inspiratorischer Isofluran- und CO₂-Gabe.

Calcium-Messungen

Bei den simultanen BOLD-/Calciummessungen wurde eine Stimulation von 9 Hz angewandt. Im BOLD kann mit einem TR von 1 s und aufgrund der langsamen Kinetik der hämodynamischen Antwort nur ein Zeitverlauf über den gesamten Stimulationsblock ermittelt werden (Fig 1d).

Im Gegensatz dazu hat das Calcium-Signal eine zeitliche Auflösung von 2000 Hz. Wir verwendeten GCaMP6f, ein Calciumindikator mit einer sehr schnellen Kinetik. Es war deshalb möglich, auch die Primärantwort auf einzelne Pulse aufzulösen. Bei einem Interstimulus-Abstand von 110 ms ist die Zeitspanne jedoch zu kurz, um das Ausgangsniveau der Fluoreszenz zu erreichen (6). Es kommt somit zur Superposition von Calcium-Strömen. Um die Antwort auf einen Puls zu analysieren, wurden die Fluoreszenzniveaus unmittelbar vor jedem Puls linear interpoliert und diese Erhöhung der Basis-Fluoreszenz (Fig. 1c – roter Graph) vom Calcium-Signal (Fig. 1c – blauer Graph) subtrahiert. So war es möglich, die Amplitude der einzelnen neuronalen Antworten zu berechnen (Fig. 1c – grüner Graph). Bei der höheren Stimulationsfrequenz von 9 Hz adaptieren diese Primärantworten jedoch schneller als bei 3 Hz. Für die Amplitude der neuronalen Antworten wurde deshalb primär die 3 Hz-Stimulation betrachtet (Fig. 4).

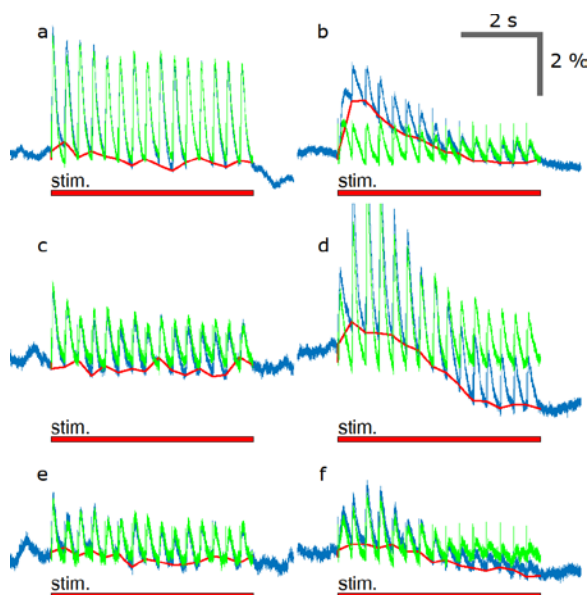


Fig. 4: Gemittelte Calciumspuren (3 Hz Stimulation) bei spontanatmenden Tieren (a,b), beatmeten Tieren (c,d) und beatmeten Tieren, die zusätzlich 5% CO₂ atmeten (e,f). Bei a,c,e erhielten die Ratten nur Medetomidin, bei b,d,f Medetomidin + 1,5% Isofluran. Blau gezeichnet ist die einfache Mittelung der Spur, rot die interpolierte Elevation der Fluoreszenz, grün die Primärantworten mit subtrahierter Fluoreszenz-Elevation.

Die durchschnittliche Amplitude der neuronalen Antworten/Primärantworten nahm im spontanatmenden Tier mit zunehmender Isoflurankonzentration signifikant ab. 0,4% Isofluran reduzierten die Amplitude um 30 % ($p=0,031$), 1,5 % um 54 % ($p < 0,001$).

Ein gegenteiliger Trend wurde bei beatmeten Tieren beobachtet. 0,7% Isofluran beeinflusste die Amplitude nicht signifikant, doch 1,5% vergrößerte die Amplitude um 66% ($p=0,025$). Wenn jedoch 5% CO₂ zu den 1,5% Isofluran zugegeben wurde, verkleinerte sich die Amplitude wieder um 53 % ($p=0,001$).

Die gleichen Trends, aber oftmals durch die rasche Adaptation nicht signifikant, wurden für die 9 Hz-Stimulation beobachtet.

Um zu analysieren, ob die verschiedenen Anästhesiekonditionen einen Einfluss auf Kinetik und Adaptation haben, wurden die Amplitudenhöhen auf die jeweils höchste Amplitude in einem Zeitverlauf normiert. Bei purer Medetomidinsedation hatten im beatmeten Tier die ersten Primärantworten stets die höchste Amplitude (Median = 1, Durchschnitt = 1 ± 0). Je mehr Isofluran zugefügt wurde, desto später traten die Primärantworten mit den höchsten Amplituden auf. Bei 0,7% oder 1,5 % Isofluran gab es keinen einzigen Fall, in der die höchste Primärantwort auf den ersten Stimulationspuls folgte – sie traten eher auf den zweiten (bei 0,7% Isofluran; $p=0,001$) oder dritten Puls (bei 1,5 % Isofluran; $p= 0,004$) folgend auf. CO₂ hatten keinen detektierbaren Einfluss auf diese Veränderung der Kinetik. Gleiche Ergebnisse ergaben die Messung im spontanatmenden Tier.

Diskussion

Medetomidin und Isofluran wirken über verschiedene pharmakologische Bahnen. Medetomidin ist ein alpha-2-Adrenorezeptor-Agonist und ein Sedativum. Über alpha-2-Rezeptoren werden u.a. Vigilanz und Erregung im Stammhirn reguliert, auch sind vasokonstriktive Effekte bekannt (7). Alpha-2-Agonisten haben deshalb Effekte wie Analgesie und Sedation. Im Gegensatz dazu wirkt ein volatiles Anästhetikum wie Isofluran sehr viel unspezifischer und verschiedene pharmakologische Wirkpunkte sind bekannt; Ionenkanäle wie GABAA, 5-HT₂, NMDA, AMPA und nikotinerge Acetylcholinrezeptoren werden diskutiert (8). Nachgewiesenermaßen weitet Isofluran die zerebralen Gefäße (9), was mit unseren Ergebnissen gut vereinbar ist. Auch eine Hyperkapnie, d.h. unphysiologisch erhöhtes CO₂ führt zu einem erhöhten zerebralen Blutfluss (10,11). Spontanatmende Tiere wurden bei zunehmender Anästhesietiefe zunehmend atemdepressiver und reicherten dementsprechend CO₂ an.

In der vorliegenden Studie war der Effekt des CO₂ auf BOLD und Basisperfusion deutlich

stärker ausgeprägt, als der des Isoflurans. Auch bei hohen Dosen an Inhalationsanästhetikum detektierten wir robustes BOLD, solange das CO₂ in einem physiologischen Rahmen blieb.

Die Abnahme der BOLD-Amplitude ist vor allem ein Effekt der erhöhten Basisperfusion. Gleichzeitig konnten wir in den Calcium-Messungen einen direkten Einfluss des Anästhetikums auf die direkte neuronale Komponente messen – bei hohen Dosen an Isofluran traten die maximalen Amplituden der Primärantworten deutlich später auf als ohne Isofluran. CO₂ konnte diese Kinetik auf neuronaler Ebene nicht verändern. Die vergrößerten Amplituden bei Isofluranbeimengung im beatmeten Tier führen wir auf einen synchronisierten Calciumeinstrom bei verminderter Spontanaktivität zurück.

Zusammenfassung

Solange auf ein stabiles CO₂ geachtet wird, kann selbst bei hohen Dosen an Inhalationsanästhetikum noch ein robustes BOLD detektiert werden. Kommt es jedoch bei spontanatmenden Tieren durch eine vertiefte Atemdepression zu einer Anreicherung von CO₂, erhöht sich die zerebrale Perfusion signifikant und die BOLD-Amplitude nimmt ab. Doch auch wenn bei hohen Dosen beigemengten Inhalationsanästhetikum das BOLD robust bleibt, so hat es doch einen signifikanten Einfluss auf das Geschehen auf neuronaler Ebene – zu sehen an Amplitude und Kinetik des Calciumeinstroms.

Die Kombination optischer Calcium-Messungen mit BOLD-fMRT ist aufwendig und technisch schwierig. Die Verbindung beider Techniken eröffnet jedoch vielfältige Möglichkeiten, Neurophysiologie und -pathologie sowohl kortex- und hirnweit durch BOLD, als auch lokal auf Zellpopulationsebene durch Calcium-Messungen zu untersuchen.

Referenzen

1. Ekstrom A. How and when the fMRI BOLD signal relates to underlying neural activity: The danger in dissociation. *Brain Res Rev* [Internet]. 2010;62(2):233–244. eng doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.004.
2. Heeger DJ, Ress D. What does fMRI tell us about neuronal activity? *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2002;3(2):142–151. eng doi: 10.1038/nrn730.
3. Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* [Internet].

- 2001;412(6843):150–157. eng doi: 10.1038/35084005.
4. Schmid F, Wachsmuth L, Schwalm M, Prouvot P-H, Jubal ER, Fois C, Pramanik G, Zimmer C, Faber C, Stroh A. Assessing sensory versus optogenetic network activation by combining (o)fMRI with optical Ca²⁺ recordings. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2015. ENG doi: 10.1177/0271678X15619428.
5. Schulz K, Sydekum E, Krueppel R, Engelbrecht CJ, Schlegel F, Schroter A, Rudin M, Helmchen F. Simultaneous BOLD fMRI and fiber-optic calcium recording in rat neocortex. *Nat Methods* [Internet]. 2012;9(6):597–602. eng doi: 10.1038/nmeth.2013.
6. Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* [Internet]. 2013;499(7458):295–300. eng doi: 10.1038/nature12354.
7. Sinclair MD. A review of the physiological effects of α 2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J*. 2003;44(11):885–897. eng.
8. Krasowski MD, Harrison NL. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1999;55(10):1278–1303. eng doi: 10.1007/s000180050371.
9. Iida H, Ohata H, Iida M, Watanabe Y, Dohi S. Isoflurane and Sevoflurane Induce Vasodilation of Cerebral Vessels via ATP-sensitive K⁺Channel Activation. *Anesthesiology*. 1998;89:954–960.
10. Jones M, Berwick J, Hewson-Stoate N, Gias C, Mayhew J. The effect of hypercapnia on the neural and hemodynamic responses to somatosensory stimulation. *Neuroimage* [Internet]. 2005;27(3):609–623. eng doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.04.036.
11. Leoni RF, Paiva FF, Henning EC, Nascimento GC, Tannus A, Araujo DB de, Silva AC. Magnetic resonance imaging quantification of regional cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity to carbon dioxide in normotensive and hypertensive rats. *Neuroimage* [Internet]. 2011;58(1):75–81. eng doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.06.030.