

2 Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Die Kindlingexperimente wurden an etwa 12 Wochen alten Ratten *Rattus norvegicus* des Stammes Wistar (Züchter: Harlan Winkelmann) durchgeführt. Die Versuchstiere der Alkoholentzugsexperimente gehörten hingegen dem Stamm Lister-hooded (Züchter: Harlan Winkelmann) an und waren 12-16 Wochen alt.

Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum (Ausnahme: Alkoholentzugsexperimente) und wurden bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ$ Celsius sowie einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

2.2 Kindling

Vier Gruppen von Wistarratten (6 Wochen alt, 180 - 210 g) wurden für die folgenden *in-vitro*-Experimente genutzt: nicht implantierte Kontrollen (n = 29), implantierte, nicht gekindelte Kontrollen (n = 20) und zwei gekindelte Gruppen (n = 23). Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-65% relative Luftfeuchtigkeit, 12h/12h alternierender Tag-Nacht-Zyklus, Futter und Wasser *ad libitum*) eine Woche lang vor Versuchsbeginn gehalten.

Die Ratten wurden mit einem Ketamin (87 mg/kg) / Rompun (13mg/kg)-Gemisch narkotisiert. Bipolare Edelstahlelektroden wurden in den basolateralen Kern der linken Amygdala (BLA) (AP -2,3; L 5,0; H 8,5) implantiert. Für die *in-vitro*-Experimente wurden nur Tiere verwendet für welche der histologische Nachweis ergab, daß die Elektroden in allen gekindelten und nicht-gekündelten Ratten in der BLA lokalisiert waren. Nach einer post-operativen Periode von 7-10 Tagen wurde die erste Gruppe (K7 (n = 19)) einmal täglich (5 mal die Woche) durch die implantierte Elektrode elektrisch stimuliert (Impulsdauer: 0,1 ms; 60 Hz für 1 s; Reizintensität: 300-450 μA).

Die Intensität der genutzten Stimulation wurde mit Hilfe des Status 1 der Racine-Skala festgelegt, d.h. wenn die Ratte bei Reizung das erste Mal mit dem rechten Auge blinkerte. Diese verhaltensabhängige Stromintensität wurde konstant über die gesamte Zeit der täglichen Stimulationen eingehalten bis siebenmal der Status 5 erreicht wurde. Die zweite Gruppe (K15 (n = 4 Ratten)) wurde zweimal täglich bis zum Erreichen von 15 Status-5-Anfällen stimuliert. Die Verhaltensänderungen während des Kindlings wurden mit Hilfe der Skala von Racine klassifiziert (Racine et al., 1972). Im Mittel wurden 10 ± 1 (K7, n = 19) und 16 ± 2 (K15, n = 4) Stimulationen benötigt, um erstmalig einen Status-5-Anfall auszulösen, wobei die Kindlingprozedur, die zweimal täglich verabreicht wurde, einen langsameren Verlauf zeigte, welches mit Daten anderer Autoren übereinstimmt (Tuunanen et al., 1997; Eskazan et al., 2002). Es konnte eine mittlere Anfallsdauer von $52,0 \pm 4,3$ s für die K7- und $53,0 \pm 13,3$ s für die K15-Gruppe ermittelt werden. Das mittlere Alter am Tage des *in-vitro*-Experimentes war zwischen den vier Gruppen naive nicht implantiert, implantiert-nicht gekindelt, K7 und K15 nicht signifikant verschieden (naive = 82 ± 4 Tage (n = 29); implantiert = 81 ± 4 Tage (n = 20); K7 = 85 ± 3 Tage (n = 19); K15 = 78 ± 4 Tage (n = 4)). Die Körpermasse der implantierten und gekindelten Tiere wurde dreimal pro Woche nach Kindlingelektrodenimplantation bestimmt. Am Tag des *in-vitro*-Experimentes wurden dann folgende mittlere Körpermassen ermittelt: naive = 358 ± 10 g (n = 29), implantiert = 376 ± 10 g (n = 20), K7 = 413 ± 8 g (n = 19), K15 = 461 ± 7 g (n = 4). Der Vergleich zwischen implantierten und Kindlingtieren (K7: p = 0,0205; K15: p = 0,0022) sowie der Kindlingtiere untereinander (p = 0,0075) ergab einen signifikanten Unterschied in Übereinstimmung mit Literaturbefunden, daß die Kindlingprozedur das Nahrungsverhalten beeinflusst (Adamec et al., 2004). Alle Experimente wurden entsprechend den Bestimmungen des European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (89/609/EEC) sowie nach Genehmigung durch das Berliner Ethikkomitee (G0291/01) durchgeführt.

2.3 Pilocarpin

Die Wistarratten (4 Wochen alt, 132 ± 3 g, Zucht: Harlan Winkelmann) erhielten 30 min vor der Pilocarpininjektion 1 mg/kg (*subcutan*) Methylscopolamin, da Pilocarpin eine starke cholinerge Wirkung hat. Dieser cholinerge Antagonist kann aufgrund seiner quartären Ammoniumgruppe nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, so daß nur die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilocarpins aufgehoben werden.

Wenige Minuten nach der Pilocarpininjektion (330 mg/kg; i.p.) sind die Tiere zunächst hyperaktiv und kurze Zeit später ist fokale Krampfaktivität wie Kauen und stereotypes Kopfnicken zu beobachten. Generalisierte Krampfaktivität, die in einen Status epilepticus übergingen, trat 37 ± 6 min nach der Pilocarpininjektion bei den Tieren auf. Dieser Wert entsprach der Literatur (20-60 min, in 40-100% der Tiere) (Turski et al., 1983). Der induzierte Status epilepticus kann 5 bis 24 h anhalten. Zur Senkung der Mortalität wurde der Status epilepticus 80 min nach der ersten generalisierten Krampfaktivität durch eine Phenobarbitalinjektion (50 mg/kg i.p.) abgebrochen. An den Status epilepticus schließt sich über einige Tage eine Phase an, in der das Allgemeinbefinden der Tiere hochgradig gestört ist und intensive Betreuung notwendig war. Die Substitution von Flüssigkeit und Verabreichung von leichtverdaulicher Nahrung ist üblich, um die Überlebensrate zu erhöhen.

Nach einer durchschnittlichen Latenzphase von etwa 14 Tagen (zwischen 3 und 50 Tagen) entwickeln annähernd alle Tiere, die den Status epilepticus überleben, spontane Anfälle (Mello and Covolan, 1996). Die Mehrzahl der Ratten zeigen dabei zunächst fokale Anfälle, die mit der Zeit an Schwere zunehmen und schließlich sekundär generalisieren. Tritt einmal ein sekundär generalisierter Anfall auf, sind auch die folgenden Anfälle meist durch diesen Anfallstyp bestimmt (Cavalheiro et al., 1991). Die Anfallsfrequenz weist starke Unterschiede auf und reicht von mehreren Anfällen täglich bis zu einigen wenigen Anfällen im Monat.

Am Tag des *in-vitro*-Experimentes lag die Pilocarpininjektion mindestens 2 Monate zurück und alle Tiere zeigten spontane Anfälle.

2.4 Alkoholentzug

Für diese Untersuchungen wurden männliche Lister-hooded Ratten aus dem Labor für experimentelle Psychologie (University of Sussex, UK) verwendet. Ihre Körpermasse betrug 200 – 240 g, bevor die Verhaltensexperimente in England begannen. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen (19 - 21°C, $50 \pm 10\%$ relative Luftfeuchtigkeit, 12h/12h alternierender Tag-Nacht-Zyklus) gehalten. Die Ratten hatten *ad libitum* Zugang zum Wasser und Futter mit Ausnahme der Zeiten mit Alkoholgabe. Uns standen nach den Verhaltensexperimenten in England drei Tiergruppen zur Verfügung. Die erste Gruppe (wiederholter Alkoholentzug – *repeated withdrawal* (RWD)) wurde in England mit einer speziellen, alkoholhaltenden Diät über 7-10 Tage ernährt (*Dyets*,

Bethlehem, PA), dann nach 3 Tagen mit normalem Futter die Alkoholernährung wieder für 7-10 Tage wiederholt. Insgesamt erhielten diese Ratten mit Pausen von drei Tagen dreimal diese spezielle Alkoholdiät. Die zweite Gruppe wurde mit Alkohol 14 Tage ohne zwischenzeitlichen Alkoholentzug gefüttert (einmaliger Alkoholentzug - *single withdrawal* (SWD)). Die dritte Gruppe wurde mit der äquivalenten Menge der Kontroll-Diät gefüttert (Kontrolle: CON). Solche Behandlungen bedeuten eine tägliche Alkoholaufnahme von etwa 17g/kg und ein Blutalkoholspiegel von 100mg/dl (Ripley et al., 2003). Zwei Wochen nach dem letzten Entzug wurden je 6 Tiere pro Gruppe nach Berlin überführt und nach einer Eingewöhnungsperiode von mindestens einer Woche elektrophysiologisch untersucht. Sie erhielten hier in Berlin nur noch standardisierte Pellets und Wasser. Die Tiere hatten dann vor den *in-vitro*-Experimenten eine Körpermasse von 481 ± 17 g (n = 6) Kontrolle, 491 ± 7 g (n = 6) SWD und 502 ± 14 g (n = 6) RWD.

2.5 EEG

Die Ratten wurden mit einem Ketamin (87 mg/kg) / Rompun (13 mg/kg)-Gemisch narkotisiert. Bipolare Edelstahl Elektroden wurden in den basolateralen Kern der linken Amygdala (BLA) (AP -2,3; L 5,0; H 8,5) und den Hippocampus (AP -3,6; L 2,4; H 3,0) implantiert. Nach einer post-operativen Periode von 7-10 Tagen wurde das EEG über die beiden bipolaren Elektroden in der erste Gruppe (K7) (s. Kapitel 2.2 Kindling) vor, während und nach der Kindlingprozedur abgeleitet. Das EEG Signal wurde mit einem Differential-AC-Verstärker (AM Systems, M1700, Abtastrate: 200 Hz, high-pass-Filter: 100 Hz, low-pass-Filter: 1Hz, Verstärkung 1000) abgeleitet und über ein CED 1401 mit Hilfe der Software Spike 2.4 aufgezeichnet.

2.6 Narkose und Präparation

Am Tag des *in-vitro*-Experimentes wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert, dekapitiert und das Gehirn zügig freipräpariert. Dann wurde das Präparat in auf 4°C gekühlte, carbogengesättigte artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)-Bad (95% O₂, 5% CO₂, pH-Wert: 7,4) überführt und für einige Minuten darin aufbewahrt.

Es wurde auf eine kurze, atraumatische Präparationstechnik geachtet. Anschließend wurde das Gehirn auf eine gekühlte Petrischale gelegt und die beiden Hemisphären mit

einer Rasierklinge in der Medianlinie geteilt sowie Reste des *Cerebellums* und der *Dura mater* entfernt. Jede Hemisphäre wurde mit einem Zyanoacrylat-Kleber (Patex) auf der Halterung des Vibroslicers befestigt, und die Kammer mit gekühlter, sauerstoffgesättigter ACSF-Lösung (Zusammensetzung: 124 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,6 mM CaCl₂; 1,8 mM MgSO₄; 1,25 mM NaH₂PO₄; 10 mM Glukose und 26 mM NaHCO₃) aufgefüllt. Mit Hilfe des Vibroslicers wurden 400 µm-dicke, horizontale Hirnschnitte des lateralen Kerns der Amygdala in Verbindung mit dem Hippocampus, der basalen, medialen und zentralen Amygdala, dem entorhinalen sowie perirhinalen Kortex und der externen Kapsel gewonnen (von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1998b). Die Hirnschnitte wurden auf ein dreilagiges Linsenpapier (Kodak) in die gut mit ACSF perfundierte und temperierte (Flußrate 1,5 ml/min, 35 ± 1° Celsius) sowie begaste (95% O₂, 5% CO₂) Interfacemeßkammer überführt. Nach einer ca. dreistündigen Ruhephase wurde mit dem elektrophysiologischen Experiment begonnen.

2.7 Elektrophysiologische Messungen exzitatorischer postsynaptischer Potentiale in horizontalen Hirnschnitten

2.7.1 Elektroden

2.7.1.1 Stimulationselektrode

Zur Herstellung der Reizelektroden wurde ein ca. 0,5 cm langer Platindraht (Durchmesser 50 µm) mit einem ca. 5 cm langen Silberdraht verlötet. Jeweils einer dieser so vorbereiteten Drähte wurde in einen Kanal einer doppelumigen Glaskapillare (Thetaglas) eingeführt, so daß der Platindraht aus der Spitze herausragte. Um einen Kurzschluß zwischen den Drähten zu vermeiden, wurden die beiden Platindrähte in der Spitze parallel und mit einem Abstand von 400 bis 600 µm zueinander mit erhitztem Schellack fixiert und das Kapillarglasende der Reizelektrode mit Siegelwachs verschlossen. Die Reizelektroden besaßen einen Widerstand von 5 KΩ.

2.7.1.2 Extrazelluläre Ableitelektrode

Die Mikroelektroden für die extrazelluläre Ableitung wurden aus Borsilikatglaskapillaren (GB 120 F-10, Firma: Science Products GmbH, D-Hofheim) mit einem Durchmesser von 1,2 mm mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes (Sutter Instruments, USA) bei 545°C gezogen. Sie besaßen einen Widerstand von 10 - 15 MΩ und wurden mit ACSF-Lösung befüllt. Durch kontrolliertes Abbrechen der Elektroden Spitze wurde der Widerstand auf 1 MΩ vor der Meßserie gesenkt.

2.7.1.3 Intrazelluläre Ableitelektrode

Da die Länge und Festigkeit (Vibrationseigenschaft) der intrazellulären Mikroelektroden Spitze von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Zellpenetration ist und diese durch die Zusammensetzung der Borsilikatglaskapillare bestimmt werden, wurden hier WPI- Borsilikatglaskapillaren (1B 120F-4, d = 1,2 mm, World Precision Instruments, USA-Sarasota, Florida) zum Ziehen der Mikroelektroden genutzt. Sie wurden mit zweimal gefilterter 2 M Kaliumazetat-Lösung gefüllt und hatten einen Widerstand von $96 \pm 2 \text{ M}\Omega$ (n = 66).

2.7.2 Ableitungen von Feld- und synaptischen Potentialen

Die Ableitelektrode wurde in einer Halterung am Mikromanipulator befestigt und an den Verstärker durch die Einführung eines chlorierten Silberdrahts in das Lumen der Kapillare angekoppelt. Die Ableitelektrode wurde in den lateralen Kern der Amygdala unter Sicht eines Stereomikroskopes plaziert (s. Abb. 2.1). Die Reizelektroden wurden entweder in der lateralen Amygdala (Wistarratten) oder in der externen Kapsel (Lister-hooded) positioniert. Da die Mikromanipulatoren der Stimulations- und der Ableitelektrode eine Ausrichtung im Millimeterbereich ermöglichen, war eine annähernd gleichbleibende Platzierung der Elektroden in den verschiedenen Hirnschnitten möglich und die Gewinnung von vergleichbaren Daten war somit gegeben.

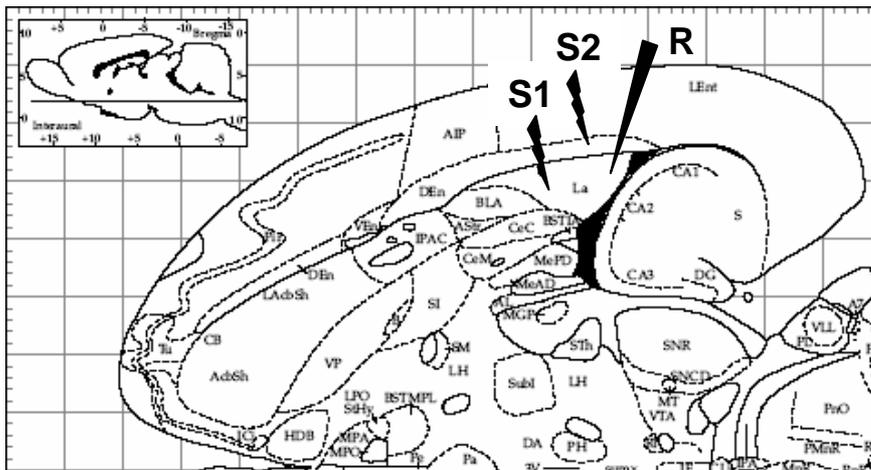


Abbildung 2.1: Schema der Elektrodenpositionierung

Horizontales Hirnschnittpräparat mit genauer Plazierung der Ableit- (R) und Stimulationselektrode (S) in der lateralen Amygdala (La), S1-intranukleär, S2- externe Kapsel (Paxinos and Watson, 1986)

2.7.2.1 Extrazelluläre Ableitung

Wie in Abbildung 2.2 gezeigt, war die Stimulationselektrode (S) über Klemmen an den Isostimulator (Reizeinheit) angeschlossen und erzeugte Reizstärken von 1,0 bis maximal 10,0 V (200 – 2000 μ A). Die verschiedenen Reizparadigmen (Hochfrequenzreiz, Thetapulsreiz und Paired-Pulse-Paradigma, s. Kapitel 2.7.3) wurden mittels eines Signal-Online-Skript-Programms über das Micro-CED 1401 gesteuert. Die abgeleiteten Signale wurden über einen Vor- (1 : 10) und einen Nachverstärker vergrößert, auf einem Oszillographen dargestellt und über den Analog-Digital-Wandler Micro-CED an einen Windows 98-fähigen Computer weitergeleitet. Die Datenaufzeichnung erfolgte über die Software Signal[®] der Firma Cambridge Electronic Design. In der schematischen Zeichnung Abb.2.2. wird der extrazelluläre Versuchsaufbau erläutert.

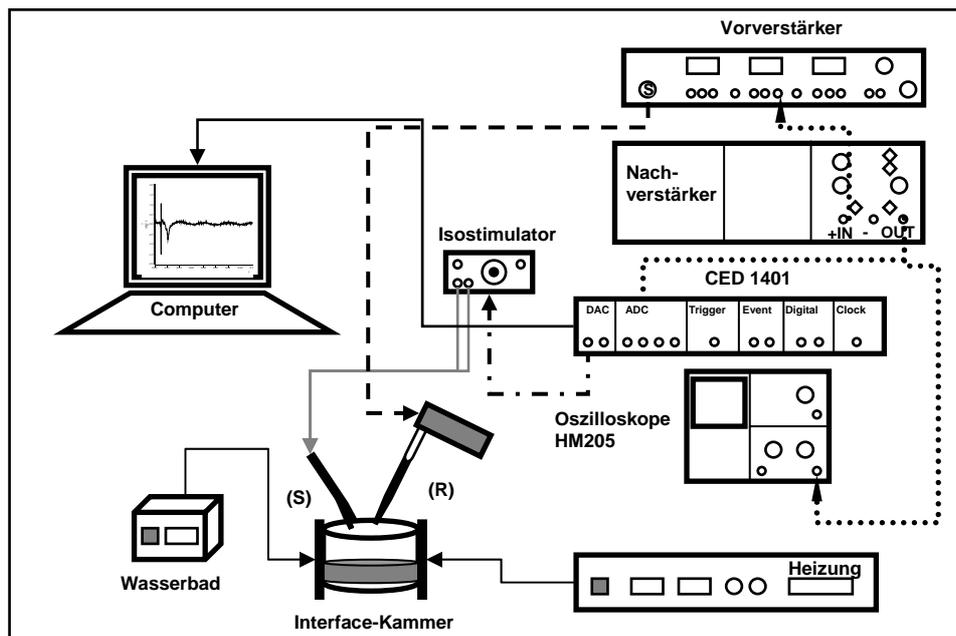


Abbildung 2.2: Messplatzanordnung für extrazelluläre Messungen

(S) Stimulations- und (R) Recording-/Ableitelektrode, Die unterschiedliche Pfeilmarkierung dient der besseren Übersichtlichkeit.

2.7.2.2 Intrazelluläre Ableitung

Beim intrazellulären Meßverfahren mußte darauf geachtet werden, daß die Ableitelektrode absolut senkrecht zum Schnitt positioniert wurde.

Ein SEC-05LX npi-Verstärker wurde zur Spannungsaufzeichnung und Strominjektion genutzt. Die Bridge-Balance (Brückenabgleich) wurde kontinuierlich beobachtet und kontrolliert. Das Ausgangssignal wurde mit 10 Hz gefiltert. Der Verstärker war verbunden mit dem Oszilloskop HM205 und durch ein Micro-CED 1401 an einen Window-98-Computer zur Datensammlung und Auswertung (Software: Signal 2.13) angeschlossen. In der schematischen Abbildung 2.3 wird die exakte intrazelluläre Meßplatzverschaltung gezeigt.

Die Bestimmung der Zelleigenschaften wurde mit Hilfe eines speziellen Rechteckpulsparadigmas und Akkommodationsparadigmas durchgeführt (s. Kap. 2.7.3.5 „Zellcharakterisierung“). Die Erzeugung des synaptischen Potentials (SP) erfolgte über die intranukleäre Positionierung der bipolaren PtAg-Stimulationselektrode in der lateralen Amygdala. Es wurden synaptische Potentiale durch aktivierte intranukleäre Afferenzen im LA bei Reizintensitäten zwischen 1,0 und 5,0 V aufgezeichnet.

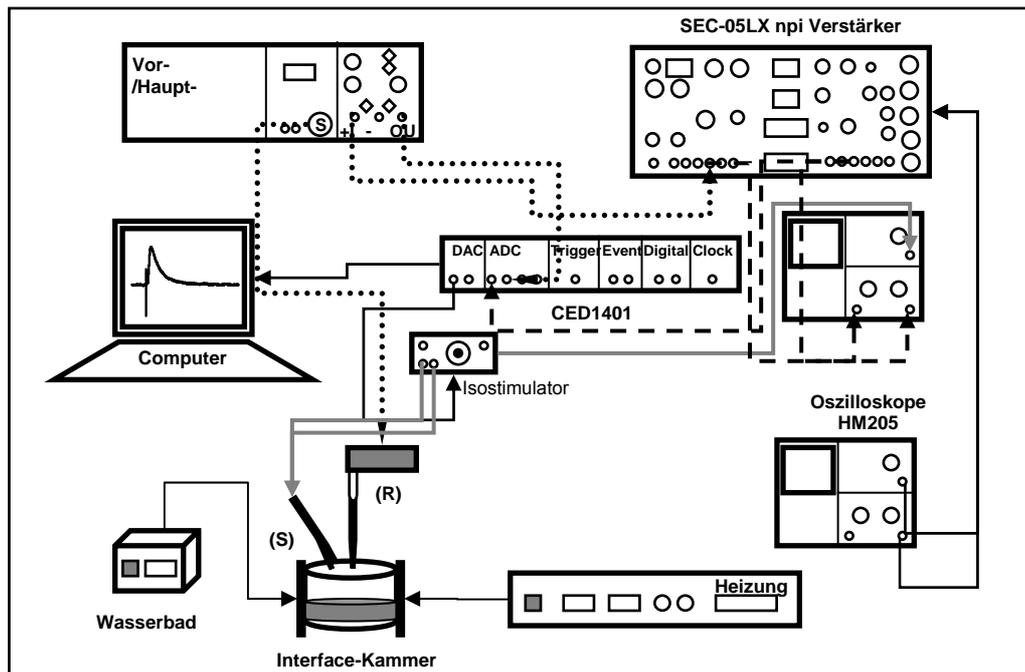


Abbildung 2.3: Messplatzanordnung für intrazelluläre Messungen

(S) Stimulations- und (R) Recording-/Ableitelektrode; Die unterschiedliche Pfeilmarkierung dient der besseren Übersichtlichkeit.

2.7.3 Reizparadigmen für Feld- und synaptische Potentiale

2.7.3.1 Die Input/Outputkurve (Eingangs-/Ausgangskurve)

Nachdem sich ein Feldpotential (FP) bzw. synaptisches Potential (SP) mittels Oszillograph und Signal-Software bei intranukleärer Reizung in Wistarratten und Reizung der externen Kapsel bei Lister-hooded Ratten darstellen ließ, wurde eine Input/Outputkurve (Eingangs-/ Ausgangskurve; I/O-Kurve) zur Charakterisierung der synaptischen Erregbarkeit aufgenommen. Dabei wurde ein definierter Reiz (Input) zwischen 1,0 und maximal 10,0 Volt (200 – 2000 μ A), 6-mal alle zehn Sekunden gegeben und die Amplitude (Output) dieser sechs Werte über eine Minute gemittelt.

Die Spannung wurde so lange erhöht, bis die maximale Feldpotential- bzw. synaptische Potentialamplitude erreicht wurde, d.h. bei einer weiteren Erhöhung der Reizstärke keine weitere Zunahme der Amplitude mehr zu beobachten war. Um eine ausreichende Depolarisation der Neurone zu erzielen, wurde, ausgehend von der nichtlaminierten Struktur des lateralen Kerns der Amygdala und der noch weitgehend unverstandenen Anordnung der Zellen, eine Reizstärke gewählt, die 50% der maximalen Stimulusintensität

entsprach. Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit, den Magnesiumblock am NMDA Rezeptor zu beseitigen und eine LTP zu induzieren. In laminierten Strukturen wie der CA1-Region des Hippocampus reichen aufgrund der synchronen Aktivierung der CA1-Neurone in der Regel schon 30% der Maximalintensität aus, um lang anhaltende Veränderungen der synaptischen Transmission im Sinne einer LTP zu induzieren.

2.7.3.2 Das Paired-Pulse-Paradigma (Doppelreizung)

Bei den Paired-Pulse-Messungen handelte es sich um die Kopplung von zwei Stimuli mit unterschiedlichem Reizabstand (extrazellulär: 10, 20, ..., 100, 200, 500 Millisekunden, intrazellulär: 40, 50, 80, 100, 200, 500 ms) mit deren Hilfe die präsynaptischen Einflüsse, d.h. die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit charakterisiert wird. Je 6 dieser Doppelreize wurden im Abstand von 10 Sekunden gegeben und über eine Minute gemittelt, bevor das Reizintervall erhöht wurde. Zur Auswertung dieser Messungen wurde für jedes Reizintervall die gemittelte Potentialamplitude des zweiten durch die des ersten Reizes dividiert. Der ermittelte Wert wurde als Säulendiagramm graphisch dargestellt. Werte > 1 werden als Paired-Pulse-Fazilitierung (PPF) und Werte < 1 als Paired-Pulse-Depression oder –Inhibition (PPD) bezeichnet.

2.7.3.3 Einwaschen eines Pharmakons

Alle 10 Sekunden wurde ein Reiz mit einer Dauer von 0,1 Millisekunden und einer definierten Reizstärke (50 % des maximalen I/O-Kurven-Wertes) gegeben. Jeweils 6 Reizantworten wurden über eine Minute gemittelt. Die FP-Amplitudenänderungen durch das Einwaschen des Pharmakons wurden 40 Minuten beobachtet.

Wenn sich unter dem Einwaschen Veränderungen der Baseline ergaben, ließ sich daraus ableiten, ob die basale synaptische Transmission durch das Pharmakon hemmend oder erregend beeinflusst wurde. Im Unterschied dazu werden bei Erstellung der Input/Outputkurve steigende Reizintensitäten benutzt, wobei bei hohen Reizstärken auch mehr Neurone aktiviert werden, unter anderem auch GABAerge Interneurone, welche zur Amplitudensenkung beitragen können. Außerdem ist die Schwelle für die Registrierung eines Feldpotentials in Abhängigkeit von Reizposition, dem Zustand des Schnittes und dem Abstand der bipolaren Reizelektroden unterschiedlich. Daher war in der Regel eine

größere Stichprobenanzahl für die signifikante Differenz zweier Input/Outputkurven gegenüber dem Einwascheffekt notwendig.

2.7.3.4 Die LTP/LTD-Paradigmen

Zum Auslösen der Langzeitpotenzierung (LTP) wurde ein starker Hochfrequenzstimulus (HFS) verwendet. Der HFS stellte eine Impulsserie von 100 Reizen im Abstand von 10 Millisekunden dar, die nach einem Intervall von 30 Sekunden wiederholt wurde (2x100 Hz). Eine Messung wurde als Langzeitpotenzierung gewertet, wenn eine Vergrößerung der FP-Amplitude um mindestens 20% zum Baseline-Wert über einen Zeitraum von 20 Minuten (Watanabe et al., 1995) erreicht wurde. Frühestens eine Stunde nach LTP-Induktion wurde der Versuch beendet und ein neues Feldpotential in einem anderen Hirnschnitt gesucht.

Zum Auslösen der Langzeitdepression (LTD) wurden zwei niederfrequente Reizungen verwendet. Erstens der schwache Thetapulsstimulus (TPS) der aus 1200 Reizen bestand, die im Abstand von 12,5 Millisekunde (8 Hz) über einen Zeitraum von 150 Sekunden gegeben wurde, und zweitens die 15 minütige Niederfrequenzreizung (LFS), die aus 900 Reizen (1 Hz) bestand.

2.7.3.5 Zellcharakterisierung

Mit Hilfe eines speziellen Rechteckpulsparadigmas (0,1 nA -Schritte, von -0,9 bis +0,9 nA, Pulslänge 200ms, 1Hz), welches über das Micro-CED online gesteuert wird, wurden die wichtigsten Zellparameter, wie das Ruhemembranpotential (RMP), der Zellwiderstand (R(I)), die Membranzeitkonstante Tau (τ) sowie das Schwellenpotential für Aktionspotentiale (AP), die AP-Größe und die mittlere AP-Latenz ermittelt.

Im Anschluß daran wurde durch das Akkommodationsparadigma (0,05 nA Schritte, +0,05 bis +0,9 nA, Pulslänge 1000ms, 2 Hz) der Zelltyp bestimmt.

2.7.4 Versuchsabläufe für Feld- und synaptische Potentiale

Die extra- und intrazellulären Versuchsabläufe, welche in dieser Studie genutzt wurden, um die Frage des Einflusses von Kindling und Alkoholentzug sowie den Einfluß der Reizelektrodenposition auf die synaptische Plastizität zu klären, werden im Detail in Abbildung 2.4 bzw. 2.5 vorgestellt.

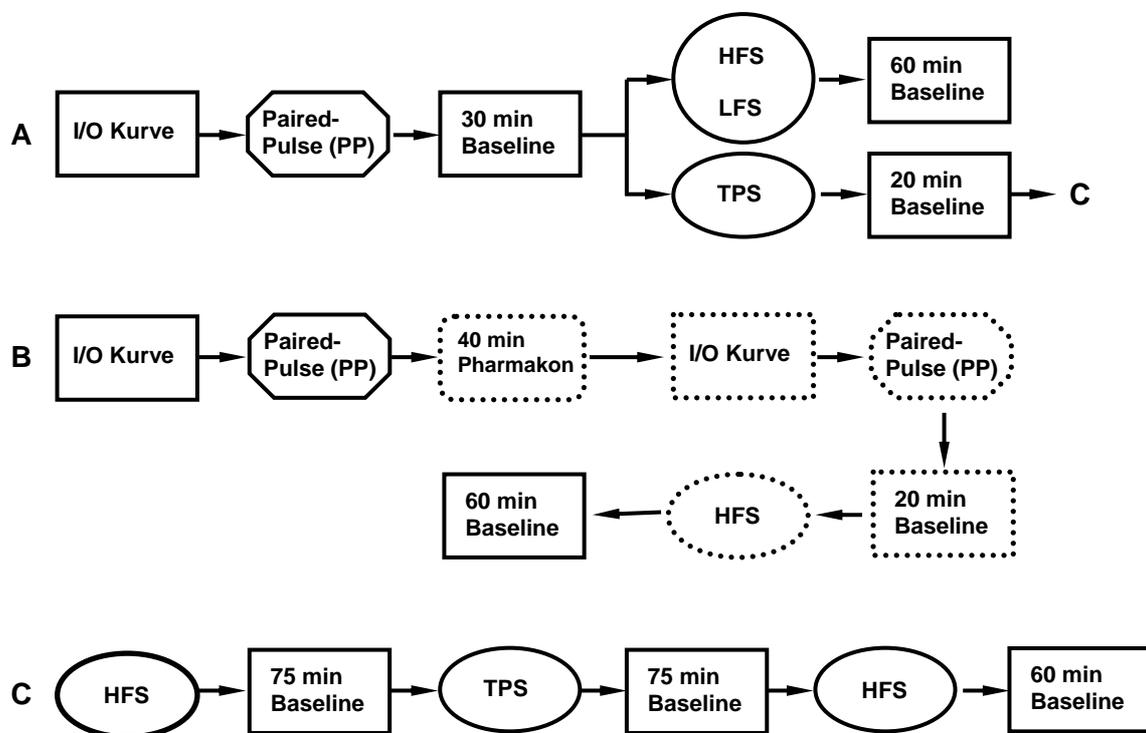


Abbildung 2.4: Versuchsabläufe extrazellulärer Messungen

Die Flussdiagramme sollen die experimentellen Abläufe, welche in dieser Arbeit genutzt wurden, verdeutlichen. **(A)** Protokoll A – normale Plastizitätsexperimente. **(B)** Protokoll B – Plastizitätsexperimente unter Pharmakon (gepunktet). **(C)** Protokoll C – LTD-Reversalprotokoll. Die detaillierte Paradigmenbeschreibung zu den einzelnen Schritten ist im vorhergehenden Kapitel 2.7.3 zu finden. HFS: 2x100 Hz, LFS: 900x1 Hz, TPS: 1200x8 Hz

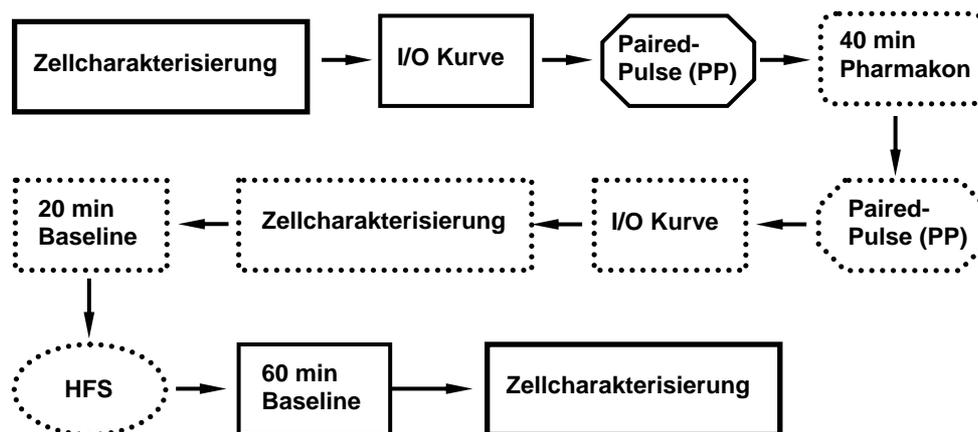


Abbildung 2.5: Versuchsablauf intrazellulärer Messungen

Flussdiagramm des Versuchsablaufes bei intrazellulären Experimenten zur Untersuchung der synaptischen Plastizität bei intranukleären Reizung des lateralen Kerns der Amygdala. Die gepunkteten Kästchen zeigen die Paradigmen, die unter Pharmakon durchgeführt wurden. Die detaillierte Paradigmenbeschreibung zu den einzelnen Schritten ist in Kapitel 2.7.3 zu finden. HFS: 2x100Hz

2.7.4.1 Plastizität im LA – Einfluß von Kindling, Alkoholentzug und Reizelektrodenposition- Protokoll A

Die Frage des Einflusses von Alkoholentzug und Kindling sowie den Einfluß der Reizelektrodenposition auf die synaptische Plastizität sollte mit Hilfe des Versuchsablaufprotokoll A (Abb. 2.4) geklärt werden. Hierzu war es zuerst nötig, die folgenden drei Gruppen zu bilden, die ihrerseits auch noch einmal eine Untergliederung erfahren:

- (1) Kindling in Wistarratten: (a) nicht implantierte (b) implantierte, (c) K7- und (d) K15- Tiere (intranukleäre Reizung, Ableitung LA)
- (2) Alkoholentzug bei Lister-hooded Ratten: (a) Kontrollen, (b) einmalig (SWD) und (c) mehrmalig (RWD) (Reizung der externen Kapsel, Ableitung LA)
- (3) (a) Wistarratten – intranukleäre Reizung, (b) Lister-hooded Ratten – Reizung der externen Kapsel

2.7.4.2 Pharmakologische Beeinflussung der Plastizität im LA –

Protokoll B

In weiteren Meßreihen wurden nur in den Tiergruppen des Kindlingexperimentes extra- und intrazellulär ein GABA_A-Rezeptorantagonist bzw. ein Kainat-GluR5 Glutamatagonist (siehe Kapitel 2.7.5. „Pharmaka“) eingewaschen, um deren Einfluß auf die synaptische Transmission/Erregbarkeit, die Langzeitpotenzierung und Paired-Pulse-Fazilitierung der einzelnen Versuchsguppen bei intranukleärer Reizung der lateralen Amygdala zu analysieren. In dieser Versuchsreihe wurde das Protokoll B verwendet, d.h. es erfolgte zunächst die Bestimmung der maximalen Reizstärke und des Doppelreizverhaltens vor dem Einwaschen einer Substanz. Nach 40 Minuten Pharmakon-Einwaschung wurde der pharmakologische Einfluß auf die Input/Output-Kurve und die Paired-Pulse-Fazilitierung bestimmt und mit den Kontrollmessungen am Beginn des Experimentes verglichen. Anschließend wurde für weitere 15-20 Minuten die basale synaptische Aktivität aufgezeichnet (Baseline), der LTP-Stimulus (HFS) gegeben und die Veränderungen des Potentials für eine Stunde beobachtet. Gleich nach der LTP-Induktion wurde mit dem Auswaschen des Pharmakons durch Umhängen der Interface-Kammer-Zuläufe in ACSF begonnen.

2.7.4.3 LTD und Reversal - Protokoll C

Diese Untersuchung wurde nur an der Kindlinggruppe (nicht implantiert, implantiert, K7) und auf extrazellulärer Ebene durchgeführt. Auch hier wurde zuerst die maximale Reizstärke (I/O-Kurve) und die Paired-Pulse-Fazilitierung (PPF) der Feldpotentialamplituden bei intranukleärer Reizung bestimmt. Danach erfolgte zur Gewinnung von Feldpotentialamplituden-Referenzwerten (Baseline) ein ca. 30-minütige Aufzeichnung. Dieser Baseline-Wert wurde dann ins Verhältnis zur veränderten Amplitude nach Gabe des spezifischen Stimulus gesetzt. In dieser experimentellen Gruppe wurde nach dem Protokoll A + C (Abb. 2.4) vorgegangen. Dieser Versuchsablauf dauerte insgesamt 4,5 h.

2.7.4.4 Intrazelluläre Messungen - Einfluß von Kindling auf die Zellparameter und die synaptische Plastizität des LA

Um die Frage des Einflusses von 7 Status-5-Anfällen auf die synaptische Plastizität zellspezifisch zu klären, wurden die Hirnschnitte von implantierten und 7 x Status-5-gekindelten Tieren intrazellulär unter Einwaschen von bestimmten Substanzen untersucht.

Es wurde bei allen Versuchen zu jeder Fragestellung in jeder Gruppe in gleicher Weise nach dem Flußdiagramm Abbildung 2.5 vorgegangen.

2.7.5 Substanzen

Etwa 15 Minuten vor Meßbeginn wurden die Substanzen (1 ml, Eppendorf-Gefäße) aus dem Tiefkühlfach (-18° C) entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Substanzen mit einer Eppendorf-Pipette (Volumen: 1 Milliliter) in den Meßzylinder mit einem entsprechenden Volumen an ACSF-Lösung (z.B. 100 ml) überführt und bei 35° Celsius mit Carbogen gesättigt.

Mit Beginn der Datenaufzeichnung wurden die Perfusionsschläuche aus dem ACSF-Bad genommen und in das Gefäß mit dem Pharmakon überführt. Bei einer Flußgeschwindigkeit von 1,5 ml/min dauerte es etwa 10 Minuten bis die Substanzen die Meßkammern erreichten. Mit Gabe des Hochfrequenzstimulus erfolgte die Rückverlagerung des Perfusionsschlauches in die pharmakonfreie ACSF-Lösung. Wegen des Volumens in den Schläuchen wurden die Schnitte in den folgenden zehn Minuten noch mit Pharmaka durchflutet, bevor die Substanzen ausgewaschen wurden. Dieses Vorgehen war bei allen pharmakologischen Versuchsansätzen identisch.

2.7.5.1 SR95531

2-(3-carboxypropyl)-3-amino-6-(4-methoxyphenyl) pyridaziniumbromid (SR9553, $C_{15}H_{18}BrN_3O_3$, Sigma-Aldrich) ist ein spezifischer GABA_A-Rezeptorantagonist (Pyridazinyl-GABA Derivat), der sich nicht auf die GABA-Transaminase- oder Glutamat-decarboxylase- Aktivität auswirkt (Heulme et al., 1986). Er hat ein Molekulargewicht von 368,23 und wurde in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Diese Konzentration wurde, ohne Aufnahme einer Dosis-Wirkungskurve aus der Literatur übernommen und

blockiert 25 % der GABA_A-Rezeptoren (Jones et al., 1998). SR95531 wurde in Aqua destillata gelöst. In einigen Versuchen wurde auch eine Konzentration von 200 nM getestet, welche aber zu epileptischen Entladungen führte und deshalb nicht weiter verwendet wurde.

2.7.5.2 ATPA

Bei ATPA [(RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-tert-butylisoxazol-4-yl)propansäure], C₁₀H₁₆N₂O₄, handelt es sich um einen Agonisten an der GluR5-Einheit des Kainatrezeptors (K_i = 4,3 ± 1,1 nM) mit einem Molekulargewicht von 246,27. ATPA hat nur einen geringen Einfluß auf AMPA (K_i = 6000-14000 nM) und keine Wirkung auf GluR6. Es hat sich allerdings gezeigt, daß ATPA eine schwache agonistische Aktivität bei GluR6/KA2-Heteromeren hat (Quelle: <http://www.bris.ac.uk>, K_i: Wert [³H]-Bindung).

Die Konzentration von 2 µM wurde aufgrund der Dosiswirkungskurve (Clarke et al., 1997) und der häufigen Verwendung in vergleichbaren Studien gewählt (Li et al., 2001; Clarke and Collingridge, 2002; Braga et al., 2003; Rogawski et al., 2003). Die vom Hersteller (Sigma-Aldrich) gelieferte Grundsubstanz wurde in Aqua destillata gelöst.

2.8 Datenauswertung

Durch Herrn Dr. Siegmund wurden Signal-Scriptfiles für die Auswertung der extrazellulär ermittelten Feldpotentialamplituden, der intrazellulär ermittelten synaptischen Potentialamplituden sowie für die intrazelluläre Zellcharakterisierung zur Verfügung gestellt. Für die gemessenen Feldpotentiale und synaptischen Potentiale wurde die tangentielle Amplitude (mV) und der Anstieg (Slope) bestimmt. Bei der Ermittlung der Slope-Rohdaten wurden die ersten und letzten 20% des abfallenden Schenkels verworfen, da in der Regel nur der mittlere Teil einen gleichmäßigen Anstieg hatte und eine Gerade repräsentierte. Die Signal-Scriptfiles ermöglichten eine off- und online Datenermittlung.

Die Ergebnisse der Amplitudenberechnung glichen den Werten bei Verwendung des Slopes. Jedoch zeigte sich sehr schnell, daß die Feldpotentiale bei intraamygdalärer Reizung teilweise sehr klein (wenig Meßpunkte) und sehr „verrauscht“ sein können, so daß die Slope-Werte z.T. sehr starken Schwankungen (zwischen 100 und 700%) unterworfen waren, was die Auswertung teilweise unmöglich machte. Dieses Problem ist

typisch für extrazelluläre Messungen in der Amygdala und daher wird in den meisten Studien, welche Feldpotentiale in der Amygdala darstellen die Amplitude zur Messwertbestimmung herangezogen. Ein Hintergrund für diese Unterschiede im Slope ist wahrscheinlich, daß in Abhängigkeit von der Lokalisation der Reizelektroden in der lateralen Amygdala aufgrund der nichtlamellierten Architektur ihrer Neurone entweder fEPSPs oder Population-Spikes registriert werden können, die sich amplitudenmäßig im Unterschied zur CA1 Region des Hippocampus aber nicht wesentlich unterscheiden.

Daher wird auch in dieser Arbeit für die Potenzierung bzw. Depotenzierung, Paired-Pulse-Fazilitierung, Input/Outputkurve und Pharmakologie die Berechnung der Feldpotential- bzw. synaptischen Potentialamplitude bevorzugt.

Die gewonnenen Rohdaten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel weiterverarbeitet. Berechnet wurde die Paired-Pulse-Ratio sowie die prozentuale Änderung der Feldpotential- (FP)/synaptischen Potential- (SP) Amplitude durch Pharmaka oder LTP/LTD-Induktion.

2.9 Statistik

Grafiken, Mittelwert, Standardfehler und die statistischen Tests wurden anschließend mit dem Programm GraphPad Prism 4 ermittelt bzw. durchgeführt.

Den statistischen Berechnungen zur Wirkung der Pharmaka bzw. der Induktionsparadigmen liegen die FP/SP-Amplituden der letzten zehn Minuten vor Gabe der Substanz bzw. des Tetanus und vor Ende des Experimentes zu Grunde. Für die Analyse wurde der zweifaktorielle parameterfreie Mann-Whitney-Test ausgewählt. Als signifikante Änderung wurde $p < 0,05$ festgelegt. Alle Daten sind durch Mittelwert \pm Standardfehler mit Angabe der Größe der Stichprobe (n) repräsentiert.