

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Alle Experimente dieser Studie wurden an insgesamt 114 ausgewachsenen, weiblichen Wistar-Ratten aller Zyklusphasen im Alter zwischen 90 und 120 Tagen durchgeführt, da eine Reihe von Studien belegt, dass insbesondere weibliche Ratten dieser Altersgruppe besonders empfindlich sind für NMDA-Rezeptor Antagonismus (Fix et al., 1993; Farber et al., 1995; Corso et al., 1997; Horvath et al., 1997).

Die Tiere wurden von „Charles River Laboratories“ in Sulzfeld, Deutschland, gezüchtet. Etwa eine Woche vor den Experimenten wurden die Tiere in die Zentrale Versuchstierhaltung der Charité überführt. Hier wurden sie unter standardisierten Bedingungen, in 12-stündigem Lichtregime, bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Ein Teil der Tiere erhielt eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit MK-801 (siehe Kapitel 3.7), eine Vergleichsgruppe erhielt eine i.p.-Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung. Es wurden vier Behandlungszeiträume festgelegt und die Tiere dementsprechend nach sechs oder 24 Stunden, bzw. nach sieben Tagen oder vier Wochen den Experimenten zugeführt. Sowohl die Behandlung als auch die Tötung der Tiere ist von der zuständigen Behörde genehmigt worden. Die Genehmigungsnummer lautet G153/02.

3.2. Präparation und Anfertigung der Gehirnschnitte

Alle Tiere wurden in tiefer Äthernarkose enthauptet. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut dorsomedial zerteilt und vom Schädeldach gelöst. Die am Schläfenbein ansetzende Masseterenmuskulatur wurde durchtrennt und die Okzipitalplatte samt Teilen des Kleinhirns mit dem Skalpell abgesetzt. Die so geschaffene caudale Schädelöffnung erlaubte es, nachdem mit Hilfe einer scharfen Knochenzange durch laterale Einschnitte die Schädelkarnotte gelockert wurde, diese nach rostral wegzuklappen ohne kortikale Strukturen zu verletzen. Von diesem Moment an wurde das Präparat durch eine Btröpfelungsvorrichtung schon während der Präparation mit gekühlter, oxygenierter, artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, siehe Kapitel 3.4) abgekühlt und mit Nährstoffen versorgt, um eine maximale Schonung des Gewebes zu gewährleisten. Mit einer Duraschere wurde die Dura Mater eröffnet und zur Seite hin abgezogen. Das Riechhirn wurde in coronarer Schnitfführung abgesetzt. Das übrige Gehirn wurde dann mit einem gebogenen Spatel an der rostralen Schnittfläche ansetzend vorsichtig aus der Schädelgrube gehoben und auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier gelegt. Zusammen mit diesem Papierstreifen wurde das Präparat in ein mit eisgekühlter, oxygenierter ACSF gefülltes Gefäß getaucht. Darin wurde das Gehirn bei 4°C für ca. 90 sek. gekühlt, um Stoffwechselforgänge zu verlangsamen und eine Gewebekonsistenz zu erhalten, die die folgenden Arbeitsschritte erleichterte. Das Gehirn wurde nach dieser kurzen Abkühlung auf eine gekühlte Arbeitsfläche gelegt und, wie zuvor erwähnt, weiterhin mit ACSF betröpfelt. Das Präparat wurde nun auf die Hirnbasis gelegt und die Hemisphären mit einer Rasierklinge durch einen medianen Sagittalschnitt vollständig voneinander getrennt. Beide Hemisphären wurden mit einem feinen Haarpinsel vorsichtig auf die Medianfläche gekippt. Die verbliebenen Kleinhirnanteile wurden entfernt und mit einem zum Sulcus parasylvius medialis parallelen Transversalschnitt wurde der parietale Anteil der Hemisphäre abgetrennt. Mit der so entstandenen Fläche wurden die Hemisphären mit Hilfe von Filterpapierstreifen, die gefaltet und wie eine Pinzette benutzt wurden, in die Schneidekammer überführt und auf einen mit Cyanacrylatklebstoff (z.B. UHU-Sekundenkleber[®]) bedeckten Präparierblock geklebt. Die Schneidekammer wurde nun mit gekühlter, oxygenierter ACSF gefüllt. Mit einem Vibratom von Campden Instruments (Sibley, UK) wurden in horizontaler Schnitfführung Hirnschnittpräparate mit einer Stärke von 400 µm angefertigt. Diese Hirnschnittpräparate enthielten ab einer Schnitttiefe von etwa 2500 µm Hippokampus, entorhinalen Kortex, perirhinalen Kortex und die angrenzenden Anteile des temporalen Kortex. Aus jeder Hemisphäre konnten so etwa 4 - 5 für die spätere Messung geeignete Schnitte gewonnen

werden, die mit einem Haarpinsel und einem kleinen, leicht gebogenen Spatel in die Messkammer transferiert wurden. In der Messkammer wurde mit einem Miniskalpell zwischen CA1-Region und Subikulum ein spitzes Dreieck, dessen Spitze bis an die sichtbaren weißen Fasern (Boulton et al., 1992) heranreichte, entfernt. Auch die CA3-Region und Teile des Gyrus dentatus wurden entfernt. Während der Equilibrierungsphase bis zum Beginn der Messung durften die Schnitte abgedeckt in der Messkammer für eine Stunde ruhen. Von der Dekapitation der Tiere bis zum Beginn der Messungen vergingen ca. 90 min..

3.3. Messkammer

Die Interface-Messkammer (Abb. 3) bestand aus Plexiglas und war durch Magnete auf der Metallarbeitsplatte eines erschütterungsgedämpften Tisches fixiert.

Die beiden als Perfusionskammern bezeichneten 25 x 55 mm großen Vertiefungen im Deckel der in hauseigenen Werkstätten hergestellten Interface-Meßkammer dienten sowohl als Mess- als auch als Aufbewahrungskammer. In jeder der beiden von einander getrennten Kammern fanden 4 - 5 Gehirnschnittpräparate Platz. Sie ruhten in der Mitte der Kammern auf doppellagigem Linsenreinigungspapier der Firma KODAK (Stuttgart, Deutschland), das eine große Diffusionsfläche für die zwischen den Papierfasern entlang laufende ACSF bot. Auf 36°C erwärmte, oxygenierte ACSF wurde mit einer Rollenpumpe der Firma Abimed mit 1,8 ml/min. in Polyethylenschläuchen durch eine feine Öffnung in den hinteren Teil der Kammer gepumpt. Die ACSF durchtränkte das Linsenreinigungspapier und verteilte sich so gleichmäßig in der Kammer, bis es im vorderen Bereich der Messkammer passiv abfloss. Feingeflochtene Schnüre aus Kustfaser wurden so verlegt, dass sie durch ihre Dochtwirkung für einen gleichmäßigen Abfluss sorgten.

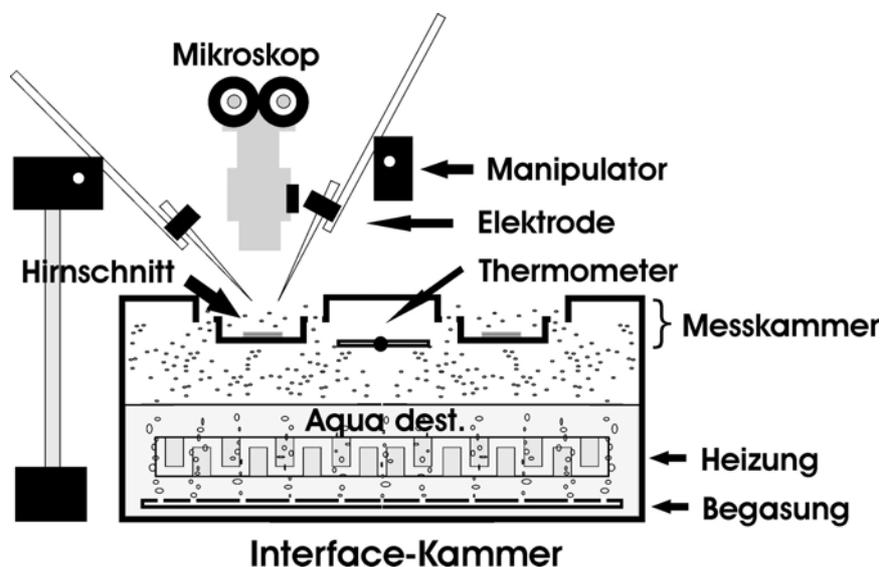


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interface-Messkammer

Die Interface-Kammer ist etwa bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser (aqua dest.) gefüllt. Im unteren Teil befindet sich eine Heizspiral und ein Kunststoffschlauch, durch dessen Öffnungen Carbogas austreten kann. Im oberen Bereich der Kammer liegen die eigentlichen Messkammern, in denen sich die Hirnschnittpräparate befinden. Über dem Schnitt ist ein binokulares Mikroskop, mit dessen Hilfe die in den Manipulatoren eingespannten Elektroden platziert werden können.

Da die Messungen unter Interface-Bedingungen stattfanden, wurde der hierfür benötigte hohe Sauerstoffpartialdruck durch Besprudeln des im unteren, beheizten Teil des Kammergehäuses eingefüllten, destillierten Wassers mit Carbogas aus 95% O₂ und 5 % CO₂ aufrechterhalten. Das erwärmte, wasserdampfgesättigte Gas wurde dann über Schlitze

in die Perfusionskammer über die Oberfläche der Gehirnschnitte geleitet. Die Temperatur in der Perfusionskammer wurde auf ca. 34°C gehalten, indem mittels Thermostat sichergestellt wurde, dass sowohl das eingeleitete Gasmisch als auch die ACSF die gewünschte Temperatur besaßen. Der gesamte Aufbau war von einem Faraday-Käfig umgeben, um „noise“-Artefakte der zahlreichen umgebenden 50-Hz-Stromnetzkabel zu reduzieren. In der so konstruierten Kammer können die Stoffwechselvorgänge der Gehirnschnittpräparate aufrechterhalten werden und die Schnitte blieben erfahrungsgemäß etwa 8 - 10 Stunden lang vital.

3.3.1. Allgemeines zur Arbeit mit der „Interface“-Perfusionskammer

Wichtig für die Vitalität der Hirnschnittpräparate ist es, dass Temperatur, Ernährung, Luftzusammensetzung und Luftfeuchtigkeit auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Auch für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist auf genaue Dokumentation und Einhaltung dieser Faktoren zu achten. Es ist wichtig, dass sowohl das Flüssigkeitsniveau der ACSF in der Messkammer als auch das Niveau des destillierten Wassers im unteren Teil der Perfusionskammer gleichbleibend sind. Das Flüssigkeitsniveau in der Messkammer wird durch die Fließgeschwindigkeit der ACSF bestimmt. Diese wird durch die Pumpgeschwindigkeit der Rollenpumpe geregelt, die durch feine Schläuche die ACSF aus den Vorratsbehältern in die Messkammer pumpt. Die pro Zeiteinheit beförderte Flüssigkeitsmenge sollte von Zeit zu Zeit kontrolliert werden, da Materialermüdung, v.a. der Schläuche, die Pumpleistung verändern können. Auch auf eine gleichmäßige Begasung und bestmögliche Abdeckung der Messkammern ist zu achten, um den Sauerstoffpartialdruck und auch die Lufttemperatur und -feuchtigkeit in der direkten Umgebung der Hirnschnitte konstant zu halten. Da die Temperatur auch innerhalb der Messkammer unterschiedlich ist, sollte man immer an derselben Stelle in der Kammer messen und die Temperatur an dieser Stelle auch regelmäßig überprüfen.

Nach jedem Versuchstag ist die Kammer gründlich mit Aqua dest. zu reinigen. Alle vier bis sechs Wochen ist eine Spülung mit 3 % Wasserstoffperoxyd angebracht, wobei darauf zu achten ist, die Kammer danach noch einige Male gründlich mit Aqua dest. zu spülen.

3.4. Perfusionslösung

Als Nährmedium während der Präparation, der Equilibrierungs- und auch der Experimentierphase diene artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid, ACSF), die in folgender Zusammensetzung (in mM) weitestgehend dem Liquor der Ratte entspricht: 129 NaCl, 21 NaHCO₃, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.6 CaCl₂, 1.8 MgSO₄, und 10 Glucose. Die Osmolarität wurde in einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) kontrolliert und betrug 300 ± 10 mOsmol/kg. Die Perfusionslösung wurde durch Begasung mit Carbogen aus 95% O₂ und 5 % CO₂ gesättigt. Unter Begasung betrug der pH-Wert aufgrund des Bicarbonat-Phosphat-Puffers 7,4 ± 0,5.

3.5. Elektroden

3.5.1. Reizelektroden

Zur Reizgenerierung wurden für diese Arbeit bipolare Reizelektroden selbst gefertigt. Eine Glaskapillare aus Borosilikatglas mit eingezogener Trennwand - ein sogenanntes Thetaglas, mit einem ovalen Durchmesser von 2 x 2,5 mm und einer Wandstärke von 0,2 mm der Firma Science Products aus Hofheim - wurde an einem vertikalen Elektrodenziehgerät (aus hauseigenen Werkstätten) mit definierter Zugkraft und Geschwindigkeit ausgezogen. Die Doppelspitze der Kapillare wurde auf einen Durchmesser von ca. 0,1 mm zurückgebrochen. In die Kapillarlumina wurden mit 0,2 mm starken Silberdrähten verlötete 0,05 mm starke Platindrähte eingeführt. Die Platindrähte wurden durch die Kapillarspitze geführt und so mit durch Hitze verflüssigtem Schellack verschweißt, dass sie parallel zueinander auf ca. 0,1

mm Abstand fixiert waren. Zuletzt wurden die Silberdrähte auf ca. 1 - 2 mm gekürzt und das Ende des Thetaglases mit Dentalwachs verschlossen.

3.5.2. Referenzelektroden

Die Referenzelektroden sind fest in die Interfacekammer eingebaut. Sie bestehen aus unter großem Druck zu Pellets gepresstem Silber und Silberchlorid im Verhältnis 30:70 und sind über einen Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden.

3.5.3. Extrazelluläre Messelektroden

Für die Feldpotentialaufzeichnung wurden 2 - 5 M Ω messende Mikroelektroden verwendet. Wie bei der Herstellung der Reizelektroden wurde eine Glaskapillare mit dem bereits erwähnten Chicago Puller auf eine Spitze von etwa 1 μ m ausgezogen. Zur Verwendung kamen Borosilikatkapillaren der Firma Science Products aus Hofheim mit 1,5 mm Durchmesser und einer Wandstärke von 0,25 mm, die zwecks Vereinfachung des Füllens mit einem Filament versehen waren. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Kapillarspitzen auf einen Durchmesser von ca. 3 μ m mechanisch zurückgebrochen. Nachdem die Kapillaren bis zur Hälfte mit 145 mM NaCl-Lösung gefüllt waren, wurden die Spitzen auf eventuell vorhandene Luftblasen überprüft und diese bei Bedarf durch Erwärmen und leichtes Klopfen verdrängt. Zum Schluß wurde ein mit Silberchlorid imprägnierter Silberdraht so weit in die Kapillare eingeführt, dass er die NaCl-Lösung sicher erreicht und mit Dentalwachs befestigt.

3.6. Elektrophysiologische Messungen

3.6.1. Extrazelluläre Feldpotentialmessung

Die Hirnschnittpräparate wurden nach der Präparation in eine Interface-Messkammer überführt. Hier wurde (wie in Abb. 4 dargestellt) mit einem Miniskalpelle unter der Lupe zwischen Area CA1 und Subikulum ein spitzes Dreieck entfernt, dessen Spitze bis an die sichtbaren weißen Fasern (Boulton et al., 1992) heranreichte. Das Gewebestück wurde entfernt, um eine rückläufige Erregung der SC-Fasern zu verhindern. Auch die CA3-Region und Teile des Gyrus dentatus wurden entfernt, um eine Erregungsweiterleitung über die trisynaptische Schleife zu unterbinden. Während der Equilibrierungsphase bis zum Beginn der Messung durften die Schnitte abgedeckt für eine Stunde ruhen.

Nach der Equilibrierungsphase wurden mit Hilfe eines motorbetriebenen, ferngesteuerten Mikromanipulators (WSE, Bad Waldsee, BRD) unter mikroskopischer Sichtkontrolle (Mikroskop - Carl Zeiss, Jena, BRD) die Ableitelektroden ca. 100 μ m tief in der Pyramidenzellschicht des Hirnschnittes positioniert (Abb. 4). Um von einer konstanten Zellanzahl, die zu den aufgezeichneten Signalen beitragen, ausgehen zu können, verblieb jede Elektrode an ihrem ursprünglichen Ort und ihre Position wurde im Laufe der Messung nicht verändert. Die extrazelluläre Messung ermöglichte es elektrische Potentialänderungen zu messen, die auf Grund transmembranaler Ionenströme entstehen. Diese Potentialänderung wurde auf die NaCl-Lösung im Inneren der Messelektrode und über den Chloriddraht auf einen Vorverstärker (hauseigene Werkstätten) übertragen. Eine Impedanzwandlung ermöglichte die Registrierbarkeit des Signals, das durch den Vorverstärker 10-fach verstärkt, durch einen Lowpass-Filter von Störfrequenzen über 3 KHz befreit und nochmals 100-fach nachverstärkt wurde. Auf einem Oszilloskop (HAMEG, Mainhausen, BRD) wurden die Signale zur sofortigen Kontrolle dargestellt und nach Umwandlung des analogen Signals in ein digitales auf Festplatte für die spätere Auswertung gespeichert.

Um eine Reizantwort hervorzurufen, wurden die Afferenzen zur Area CA1 mit bipolaren Reizelektroden gereizt. Diese Afferenzen bestehen aus den SC-Projektionen, die die Verbindung zur Area CA1 darstellen, und der dCl-Projektion, welche eine direkte Verbindung zum entorhinalen Kortex darstellt (siehe 2.3.4.). Mit extrazellulären Feldpotentialmessungen

ist es nicht möglich, transmembranale Ströme einer einzelnen aktivierten Zelle aufzuzeichnen. Jedoch kommt es durch die Aktivierung einer Vielzahl von Zellen, zu denen die gereizten Afferenzen projizieren, zu einer Summation der Einzelzellantworten. Dieses Summenpotential (population spike, PS) ist stark genug, um registriert zu werden.

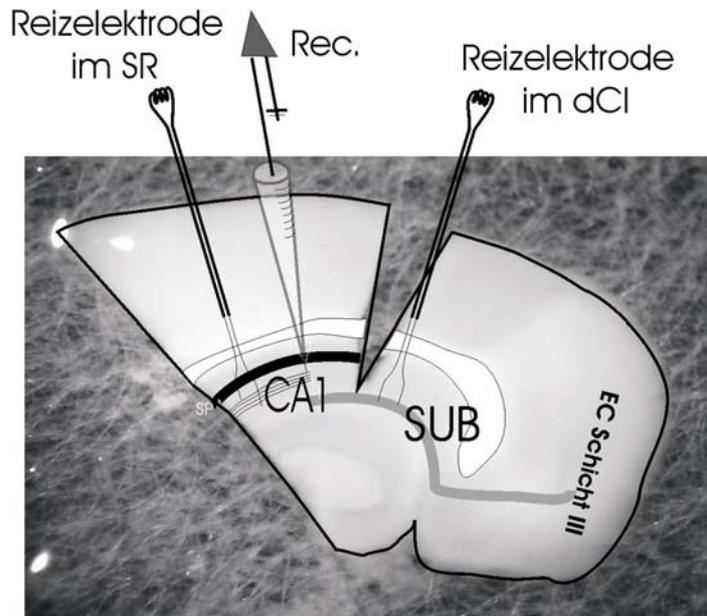


Abbildung 4: Elektrodenpositionierung.

Bearbeitete Fotografie eines der verwendeten Hirnschnittpräparate nach Abtrennung von Area CA3 und eines dreieckigen Gewebestücks zwischen CA1 und Subikulum (SUB), überblendet mit der schematischen Darstellung der zur Reizung eingesetzten Reizelektroden in Stratum radiatum (SR) bzw. in der direkten kortikalen Projektion zur Area CA1 (dCl) und der Messelektrode (Rec.) im Stratum pyramidale (SP).

Wie die Messelektrode wurde auch die Reizelektrode in einen Manipulator eingespannt und unter mikroskopischer Kontrolle positioniert. Auch sie durfte im Laufe des Experiments nicht mehr in ihrer Position verändert werden. Angeschlossen war die Reizelektrode an einen Reizstromgenerator, der über den PC gesteuert wurde. Die Reizintensität wurde direkt am Reizgenerator (hauseigene Werkstätten) so eingestellt, dass die Reizimpulse lediglich 30-50 % der maximal möglichen Reizantwort lieferten. Das war daran erkennbar, dass mit zunehmender Reizintensität die Amplitude der Reizantwort zunahm, bis ein Maximalpunkt erreicht war, von dem aus die Reizantwort entweder nicht mehr größer wurde oder aber sich in ihrer charakteristischen Form veränderte. Dies war meist bei ca. 30 V der Fall. 50 % der maximalen Reizantwort wurden meist bei ca. 5 V für SC-Reizung und 12 V für dCl-Reizungen erzielt. Wurde eine Messung mit einer bestimmten Reizintensität begonnen, so wurde diese Einstellung am Reizstromgenerator nicht mehr verändert, um die Langzeitveränderungen auf eine stets gleiche Reizintensität unverfälscht beobachten zu können. Falls zwischenzeitlich mit einer anderen Reizintensität stimuliert werden sollte, wurde der Reizgenerator ausgetauscht. Im Weiteren wird von homosynaptischen Effekten gesprochen werden, wenn sowohl das Reizparadigma zur Induktion von LTP/LTD als auch der zur Potentialaufzeichnung notwendige Reiz über die selbe Synapse verschaltet sind. Von heterosynaptischen Effekten wird die Rede sein, wenn unterschiedliche Synapsen betroffen sind (Abb. 5).

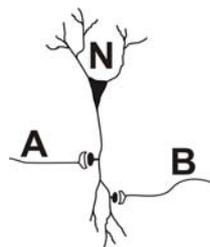


Abbildung 5: Begriffserklärung für „homo- und heterosynaptisch“:

Homsynaptisch: Das zur Induktion von LTD/LTP eingesetzte Reizparadigma *und* der Einzelreiz zur Aufzeichnung der Feldpotentiale erreichen *beide* das Soma des Neurons (N) beispielsweise über die Afferenz B.

Heterosynaptisch: Das Reizparadigma kommt z.B. über Afferenz B aber der Einzelreiz kommt über eine *andere* Afferenz z.B. Afferenz A

3.6.2. Reizparadigma für hochfrequente Stimulation (HFS)

Zur Induktion von LTP ist eine Reihe verschiedener Tetanus-Frequenzen und -Arten einsetzbar. Tetanus-Frequenzen zur Auslösung von LTP reichen von 0,2 bis 400 Hz (Alger et al., 1978). Meist werden 100 bis 200 Einzelimpulse eingesetzt. Bei Stimulationsfrequenzen unter 50 Hz kann es zu einer vorübergehenden heterosynaptischen Depression kommen (Douglas, 1977; McNaughton et al., 1978), da niederfrequente Reize besser in der Lage sind, gleichzeitig mit den Projektionsfasern inhibitorische Interneurone zu aktivieren. Im höheren Frequenzbereich, zwischen 100 und 400 Hz, wurde eine solche heterosynaptische Depression bisher nur selten beobachtet (Buzsaki et al., 1983; Buzsaki, 1986; Suzuki und Smith, 1987). Oftmals wird der Tetanus als Paket von 8 bis 10 Einzelreizen einer 200 Hz-Stimulation gegeben, das in Abständen von wenigen Sekunden bis zu Minuten wiederholt wird. Diese Stimulationsart (sog. high frequency stimulation, HFS) erzeugt zuverlässig LTP und umgeht die Gefahr von sogenannten Afterdischarges, Nachentladungen, die bei längeren Stimulationen beobachtet werden und ergibt deshalb eine physiologischere Stimulationsart als höherfrequente Reize.

Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit ein Reizparadigma gewählt, das aus einem 100 ms dauernden Tetanus von 200 Hz besteht, der alle 2 s 10 mal wiederholt wurde. Ein weiterer Grund für das eingesetzte Reizparadigma ist die gute Vergleichbarkeit mit synchronisierten Netzwerkoszillationsfrequenzen, wie sie unter physiologischen Bedingungen in Area CA1 beobachtet werden (Ylinen et al., 1995). Hierbei verursachen synchronisierte Depolarisationen in den SC eine sogenannte „sharp wave“ (SW), die synaptisch auf die apikalen Dendriten von CA1-Pyramidenzellen und -Interneuronen übertragen wird. SWs werden im Assoziations- und Kommissuralfaser-Netzwerk der CA3-Neurone generiert und propagieren ipsilateral über die SC in nachgeschaltete Regionen wie Area CA1 und das Subikulum, sowie kontralateral in die CA3-Region der benachbarten Großhirnhemisphäre (Behrens et al., 2005). Neurophysiologisch stellen diese SWs kurze, rekurrente Feldpotentialtransienten einer Amplitude von 1 - 3 mV dar (Buzsaki et al., 1992). Interessanterweise sind solchen SWs oft synchronisierte 200 Hz-Hochfrequenznetzwerkoszillationen aufgelagert. Gemeinsam werden solche Ereignisse als Sharp-Wave-Ripple-Komplexe (SPW-R) bezeichnet.

Transsynaptisch propagierte SPW-Rs versetzen das neuronale CA1-Netzwerk aus Pyramidenzellen und Interneuronen in einen Zustand synchronisierter Hochfrequenzoszillationen um 200 Hz. Somit ist das hier eingesetzte Reizparadigma wiederholter, kurzer 200 Hz-Tetani ein elektrisches Mimikry des physiologischen „in vivo“-Erregungsmusters, besonders in Phasen von Belohnung oder Nicht-REM-Schlaf (Ylinen et al., 1995).

3.6.3. Reizparadigma für niederfrequente Stimulation

Zur LTD-Induktion gibt es verschiedene Induktionsarten. Die am häufigsten gebrauchte, ist die niederfrequente Stimulation (low frequency stimulation, LFS) mit 1 Impuls pro sec über einen Zeitraum von 10 bis 15 min. Das hier verwendete Reizparadigma bestand aus 900 Einzelimpulsen, die mit einer Frequenz von 1 Hz über 15 min verabfolgt wurden. Es zeigte sich, dass diese Stimulationsart in der Lage ist, sowohl bei jugendlichen als auch bei erwachsenen Ratten, in in-vitro und in in-vivo Experimenten eine langanhaltende, inputspezifische LTD auszulösen (Heynen et al., 1996).

3.7. Eingesetzte Pharmaka

Die zur akuten Badapplikation verwendeten Substanzen wurden wie in der Produktinformation des jeweiligen Herstellers beschrieben aus Trockensubstanzen zu Stammlösungen verarbeitet. Sie wurden meist 30 min. vor Beginn der Experimente auf die gewünschte Konzentration in der Perfusionslösung verdünnt. Aus ökonomischen Gründen wurden einige Substanzen nach Durchfließen der Perfusionskammer für die Dauer eines

Experimentes wiederverwendet. Die verwendeten Substanzen wurden von Tocris Bioscience (Missouri, USA) hergestelt. In nachfolgender Tabelle sind die angewendeten Wirkstoffe und ihre Konzentration aufgeföhrt:

MK-801	50 μM	Badapplikation
MK-801	5 mg/kg Körpergew.	Systemische Gabe
CGP 5845	1 μM	Badapplikation
(S)-4-CPG	0,5 mM	Badapplikation
Bicucullin	20 μM	Badapplikation
UBP 296	1 μM	Badapplikation
Gabazin	200 nM	Badapplikation

Tabelle 1: Eingesetzte Wirkstoffe und ihre Konzentrationen.

3.7.1. MK-801

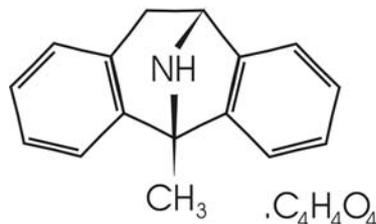


Abbildung 6: Strukturformel von MK-801

MK-801: (+)-5-Methyl-10,11-Dihydro-5H-Dibenzo[a,d]Cyclohepten-5,10-Imin-Maleat ist auch unter dem Namen Dizocilpin bekannt und ist ein liquorgängiger NMDA-Rezeptor-Antagonist. Durch selektive, nicht-kompetitive Blockade des NMDA-Rezeptors durch hochaffine Bindung an die PCP-Bindungsstelle, die im Rezeptorkanal in Nachbarschaft der Bindungsstelle für Magnesiumionen liegt, unterbindet MK-801 den Kalziumstrom in die Zelle. Da es nur am offenen Kanal bindet, bedarf es einer physiologischen Aktivierung des NMDA-Rezeptorkomplexes (Huettner und Bean, 1988). Die MK-801-Bindung wird durch physiologische Agonisten, Koagonisten oder Modulatoren, wie NMDA, Glycin, Spermin oder Spermidin verstärkt (Wong et al., 1986). MK-801 besitzt eine um ein Vielfaches stärkere Wirkung auf die NMDA-Rezeptoren als die mit ihm verwandten Substanzen PCP und dem „dissoziatives Anaesthetikum“ Ketamin. Seine Halbwertszeit beträgt ca. zwei Stunden (Sakurai et al., 1991; Subramaniam und McGonigle, 1991). Das Rattenhirn besitzt die höchste Dichte von MK-801 Bindungsstellen im Hippokampus (Birse et al., 1993).

MK-801 wurde als Antikonvulsivum mit anxiolytischen und zentral sympatomimetischen Eigenschaften beschrieben (Wong et al., 1986). In MK-801 wurden ursprünglich große Hoffnungen gesetzt, da man sich von einer NMDA-Rezeptoren-Blockade eine neuroprotektive Wirkung erwartete (Tremblay et al., 2000). Dennoch kam MK-801 auf Grund seiner psychotomimetischen Nebenwirkungen nicht zum klinischen Einsatz (siehe 2.2.3.2.).

Basierend auf laborinternen Erfahrungen, wurde MK-801 zur Badapplikation in einer Konzentration von 50 μM in normaler ACSF verwendet.

MK-801 wurde auch zur Behandlung einiger Versuchstiere eingesetzt. Hierzu wurde die Substanz kurz vor Verabreichung in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass keinem Tier mehr als 1,0 ml Injektionslösung verabreicht werden musste, um die gewünschte Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht zu erreichen. Die Dosis von 5 mg/kg wurde gewählt, da in Kooperation mit einem Histologen, parallel zu den elektrophysiologischen Befunden, Histologische Studien betrieben werden sollten, die bei dieser Konzentration am erfolgversprechensten erschienen (Olney und Farber 1995).

3.7.2. CGP 55845

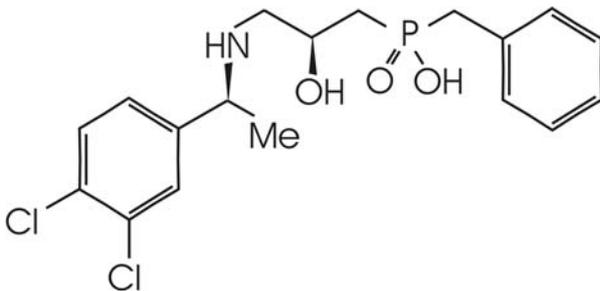


Abbildung 7: Strukturformel von CGP 55845

CGP 55845: (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino]-2-Hydroxypropyl]-(Phenyl-Methyl)Phosphorsäure ist ein sehr wirksamer, selektiver Antagonist prä- und postsynaptischer GABA_B-Rezeptoren in der Area CA1 des Hippokampus der Ratte (Davies et al., 1993). Seine Wirksamkeit übertrifft die vieler anderer GABA_B-Rezeptor-Antagonisten (Pozza et al., 1999). In dieser Studie wurde er zur Badapplikation in einer Konzentration von 1 μM in normaler ACSF verwendet (Lapointe et al., 2004).

3.7.3. (S)-4-CGP

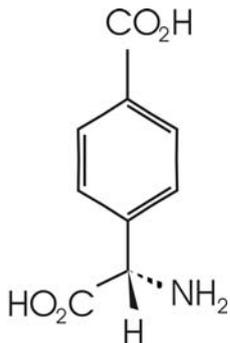


Abbildung 8: Strukturformel von 4-CPG

(S)-4-CGP: (S)-4-Carboxyphenylglycine ist ein kompetitiver Antagonist der Gruppe I metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR) und besitzt eine weitaus höhere Spezifität für mGlu1a / 1a als für mGlu5a / 5b-Rezeptoren. Seine Wirkung auf metabotrope Glutamat Rezeptoren der Gruppe II ist gering (Davies et al., 1995).

(S)-4-CGP wurde basierend auf Laborinternen Erfahrungen in einer Konzentration von 0,5 mM gebraucht, um die Bedeutung von mGluR an der Entstehung der dCI vermittelten Plastizität in Area CA1 zu studieren.

3.7.4. Gabazin

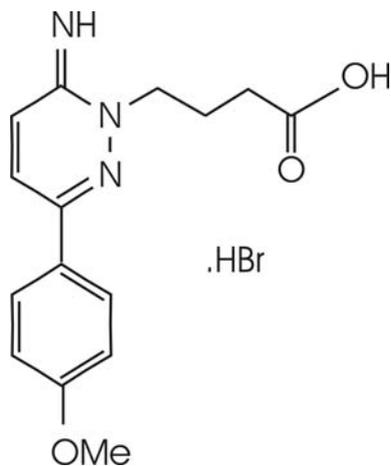


Abbildung 9: Strukturformel von Gabazin

Gabazin: (SR95531) Hydrobromid, ist ein hochaffiner, kompetitiver Blocker der GABA_A-vermittelten Signaltransduktion. In niedrigen Konzentrationen (ca. 200 nM) unterdrückt es die phasische GABA-Ausschüttung. In hohen Konzentrationen (ca 10 µM) unterbindet es sowohl phasische Quantenauslösung als auch die tonische GABA vermittelte Inhibition (Stell und Mody, 2002). Gabazin wurde in einer Konzentration von 300 nM angewendet, um die Bedeutung der phasischen GABA-Ausschüttung zu studieren.

3.7.5. Bicucullin

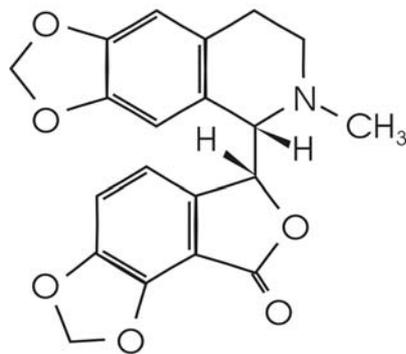


Abbildung 10: Strukturformel von Bicucullin

Bicucullin: [R-(R*,S*)]-5-(6,8-Dihydro-8-Oxofuro[3,4-e]-1,3-Benzodioxol-6-yl)-5,6,7,8-Tetrahydro-6,6-Dimethyl-1,3-Dioxolo[4,5-g]isoquindinium-Bromid ist ein GABA_A Rezeptor Antagonist mit der Fähigkeit Ca²⁺-gesteuerte Kaliumkanäle zu blockieren (Khawaled et al. 1999).

Bicucullin unterdrückt sowohl präsynaptische, AP-gesteuerte, phasische als auch die im Hintergrund ablaufende tonische GABA_A-vermittelte Inhibition. Bicucullin ist von Bedeutung für heterosynaptische Plastizität im dCI (Remondes und Schuman, 2002). Homosynaptische LTP im dCI wird durch Bicucullin hingegen nicht beeinflusst (Remondes und Schuman, 2003), jedoch wird der schnelle, GABA_A-vermittelte Anteil des nach homosynaptischer Reizung sichtbaren inhibitorischen postsynaptischen Potentials durch Bicucullin unterdrückt (Empson und Heinemann, 1995).

Bicucullin wurde in einer Konzentration von 20 µM verwendet (Remondes und Schuman, 2002), um die Bedeutung der GABA_A-vermittelten Komponenten der dCI-induzierten Plastizität in Area CA1 zu studieren.

3.7.6. UBP 296

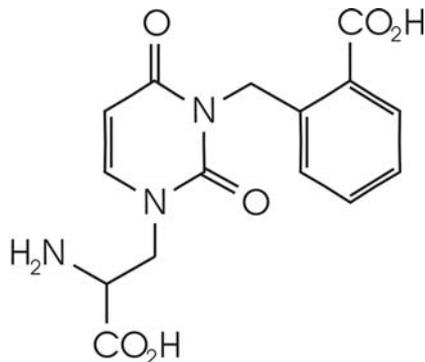


Abbildung 11: Strukturformel von UBP 296

UBP 296: (RS)-1-(2-Amino-2-Carboxyethyl)-3-(2-Carboxybenzyl)Pyrimidin-2,4-Dion ist ein starker, selektiver Antagonist der Kainat-Rezeptoren mit GLUK5-Untereinheit, der an den NMDA- und Gruppe I mGlu-Rezeptoren wenig bzw. gar keine Wirkung entfaltet. Durch Bindung an die GLUK5-Untereinheit, unterbindet UBP 296 den Glutamat-vermittelten Ca^{2+} -Strom ins Zellinnere (More et al. 2004). Um die Bedeutung der Kainat-Rezeptoren für Plastizität in Area CA1 zu studieren, wurde UBP 296 in einer Konzentration von $1 \mu M$ eingesetzt. Diese Konzentration wurde gewählt, da sich in Vorversuchen zeigte, dass bereits diese geringe Konzentration einen Einfluß auf die Plastizität im dCI hat.

3.8. Datenerfassung und -analyse

3.8.1. Datenerhebung

Zur Auswertung der Signale wurden die mit der WinTIDA 3,0 Software (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) mit 10.000 Datenpunkten pro sec aufgezeichneten Rohdaten zunächst in Signal 2.12 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Großbritannien) umgewandelt. Ein von Herrn Dr. Herbert Sigmund auf dieser Software geschriebenes Programm diente dazu, die Feldpotentialamplituden und in einigen Fällen auch die Anstiegssteilheit zu ermitteln. Für die durch Reizung des dCI ausgelösten Reizantworten wurde die Amplitude zwischen Nulllinie und Scheitel gemessen. Für die durch Schaffer-Kollateralen-Reizung evozierten Signale wurde die Amplitude des Summenaktionspotentials berechnet, die sich aus dem Mittel des ersten und zweiten positiven Scheitels bezogen auf den maximalen negativen Scheitel ergibt, wie es in Abbildung 12 genauer dargestellt wird.

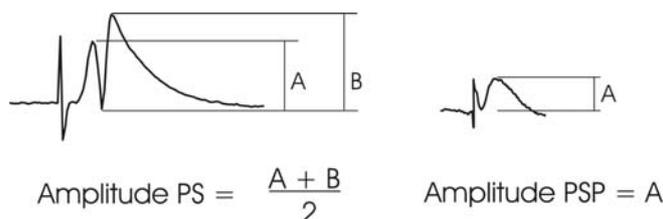


Abbildung 12: Analyse der Feldpotentiale

Exemplarische Darstellung der Feldpotentialantwort nach Reizung des Stratum radiatum (links) und nach Reizung der direkten kortikalen Projektion (rechts). Die Auswertung der Amplituden von Populationsspike (PS) und postsynaptischem Potential (PSP) wurden eingezeichnet.

Die Nulllinie definiert sich über das arithmetische Mittel der Datenpunkte, die vor Einsetzen des Simulationsreizes während eines Zeitraums von 20 ms ermittelt wurden. Der Aufzeichnungszeitraum wurde auf 20 ms festgelegt, um das möglicherweise als Artefakt

über der Aufzeichnung liegende 50-Hz-Netzbrummen der Stromversorgung herauszurechnen.

3.8.2. Dateninterpretation und Statistik

Die Rohdaten wurden mittels Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) in eine Form gebracht, die es erlaubte, sie direkt in die Statistiksoftware SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA) einzulesen. Ein von Frau Dr. Giesela Arndt geschriebenes Programm ermöglichte es, diese Daten aufzubereiten und statistisch auszuwerten.

Auf Grund der grossen interindividuellen Streuung der Amplitudenwerte wurden die vor der hoch- bzw. niederfrequenten Stimulation erhobenen Werte für jeden Slice gleich 100 % gesetzt und die bei den nachfolgenden Messungen erhobenen Werte in Prozent des jeweiligen Ausgangswertes ausgedrückt.

Für alle Gruppen, sowohl für die Gruppen der MK-801 behandelten Tiere, die sich in der Überlebenszeit nach MK-801-Gabe unterscheiden, als auch für die Gruppen der unbehandelten Tiere, die sich durch die dem ACSF zugesetzten Rezeptorenblocker (Badapplikation) unterscheiden, ist die Stichprobenbasis (N) immer der einzelne Gehirnschnitt. Als Auswahlkriterium dafür, welcher Gehirnschnitt eine optimale, repräsentative Messung ermöglicht hatte, diente der Variationskoeffizient der Baselinewerte. Somit wurde sichergestellt, dass nur lang anhaltend stabile Messungen in die Analyse einbezogen wurden. Da in dieser Studie eine Aussage über Langzeitveränderungen, ausgelöst durch hoch- bzw. niederfrequente Stimulation, getroffen werden sollte, wurden in die statistische Auswertung die gesamte 15-minütige Baselineperiode sowie die letzte zehn Minuten der plastischen Phase einbezogen. Zur Berechnung des Signifikanzniveaus zwischen Baseline und plastischer Phase wurden durch einen T-Test für ungepaarte Stichproben die Mittelwerte verglichen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Post-Hoc-Test nach Scheffé untersucht. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gesetzt. Es wurden 95 % Konfidenzintervalle berechnet.

3.8.3. Präsentation der Daten

Zur Darstellung der Daten wurde das arithmetische Mittel errechnet und als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Glättung der Verlaufskurven wurden gleitende Mittelwerte von jeweils drei aufeinanderfolgenden Messwerten dargestellt. Bilder und Grafiken wurden mit der Software CorelDraw 12.0 (Corel Co.; Ottawa, Kanada) erstellt.

