



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Zur Wirkung von ϵ -Aminocapronsäure auf die synaptische
Übertragung in der murinen basolateralen Amygdala –
Elektrophysiologische Untersuchungen
im vitalen Hirnschnittpräparat**

Konrad Stephan Jakob Straub

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Haseneder
2. Prof. Dr. Dr. Thomas R. Tölle

Die Dissertation wurde am 24.10.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Der Krampfanfall als mögliche Nebenwirkung der medikamentösen Therapie von Blutungen	1
1.2 Antifibrinolyse	1
1.2.1 Aprotinin.....	3
1.2.2 Lysinanaloga.....	4
1.3 Neurologische Nebenwirkungen der antifibrinolytischen Therapie	7
1.4 Signaltransmission im Gehirn	8
1.4.1 Glutamaterge Rezeptoren.....	10
1.4.2 GABAerge Rezeptoren	12
1.4.3 Glycin-Rezeptoren	15
1.5 Aufbau und Funktion der Amygdala	16
1.6 Die Amygdala als Modellregion der Krampfanfallforschung	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Präparation der Hirnschnitte	19
2.2 Elektrophysiologische Messungen mit der Patch-Clamp-Technik	20
2.2.1 Patch-Clamp-Versuchsaufbau	20
2.2.2 Ganzzelleableitung und Stimulation.....	24
2.2.3 Postsynaptische Ströme	30
2.2.4 Pharmakologische Isolation spezifischer Rezeptor-vermittelter Ströme	33
2.2.5 Paired-Pulse Facilitation und Paired-Pulse Depression.....	35
2.2.6 Miniatur-EPSCs	36
2.2.7 Strom-Spannungs-Kurven	36
2.2.8 Auswertung und Statistik	37

2.3	Voltage-sensitive Dye Imaging (VSDI)	37
2.3.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Di-4-ANEPPS	38
2.3.2	Präparation und Färbung der Hirnschnitte für VSDI-Messungen	40
2.3.3	Messaufbau	40
2.3.4	Durchführung der VSDI-Messungen	42
2.3.5	Kompensation artifizierlicher Inhibition bei VSDI-Messungen.....	42
2.3.6	Auswertung und Statistik	42
3	Ergebnisse	45
3.1	EACA hemmt die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala....	45
3.2	EACA führt unter Teilantagonisierung von GABA _A -Rezeptoren zu einer Inhibition der Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala	46
3.3	EACA hat keinen Effekt auf die biophysikalischen Membraneigenschaften	48
3.4	EACA hemmt die synaptische Transmission von Summenströmen	49
3.5	EACA führt zu einer GABA _A -Rezeptor-unabhängigen Inhibition der synaptischen Übertragung von Summenströmen	51
3.6	EACA hemmt durch den GABA _A -Rezeptor vermittelte Ströme über prä- und postsynaptische Mechanismen	52
3.7	EACA hemmt AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme über präsynaptische Mechanismen.....	56
3.8	EACA hemmt NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme über präsynaptische Mechanismen.....	58
3.9	EACA bewirkt bei Summenströmen eine Paired-Pulse Facilitation	61
3.10	EACA hemmt die spontane GABA- und Glutamat-Vesikelfreisetzung	62
4	Diskussion.....	65
4.1	Die Wirkung von EACA auf die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala	65
4.2	Die Wirkung von EACA auf durch den GABA _A -Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme	66
4.3	Kein Hinweis auf eine Hemmung glutamaterger Rezeptoren	66

4.4	Hinweis auf präsynaptische Hemmung der Vesikelfreisetzung	67
4.5	Relevanz der gewählten Konzentrationen	67
4.6	Vereinbarkeit mit der aktuellen Studienlage	69
4.6.1	Vasospasmen bei Subarachnoidalblutungen nach EACA-Gabe	69
4.6.2	Krampfanfälle nach EACA-Gabe	70
4.7	Limitationen und Ausblick.....	73
5	Zusammenfassung.....	74
	Literaturverzeichnis	75
	Anhang	A
	Abkürzungsverzeichnis	A
	Verwendete Substanzen	D
	Danksagung	G

Erläuterung zum Genus personenbezogener Substantive

Zur besseren Lesbarkeit des Textes wurde bei der Nennung von Personengruppen das generische Maskulinum verwendet. Dieses bezieht sich auf *alle* Menschen der jeweiligen Personengruppe unabhängig von ihrer Geschlechtsidentität.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Primärstruktur der Serinprotease Aprotinin	3
Abbildung 2: Die Aminosäure L-Lysin.....	4
Abbildung 3: Plasminogenaktivierung und Wirkmechanismus der Lysinanaloga	5
Abbildung 4: ϵ -Aminocaprinsäure (EACA).....	6
Abbildung 5: Tranexamsäure (TXA)	7
Abbildung 6: para-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA)	7
Abbildung 7: Die Aminosäure L-Glutamat	10
Abbildung 8: AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure).....	10
Abbildung 9: N-Methyl-D-Aspartat (NMDA; (2R)-2-(Methylamino)butandisäure).....	11
Abbildung 10: Kainsäure (2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenyl-pyrrolidin)	12
Abbildung 11: γ -Aminobuttersäure (GABA)	13
Abbildung 12: Die Anordnung der Untereinheiten des GABA _A -Rezeptors.....	14
Abbildung 13: Die Aminosäure Glycin	15
Abbildung 14: Die Lage der Amygdalakerne im murinen Koronarhirnschnitt.....	16
Abbildung 15: Das Infrarot-Videomikroskop im Patch-Clamp-Messstand	21
Abbildung 16: Aufbau des Infrarot-Videomikroskops	22
Abbildung 17: Infrarot-Mikroskopiebild nach Etablierung einer Ganzzelleableitung ...	25
Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer Ganzzelleableitung	26
Abbildung 19: Darstellung von Spannung und Strom des Testpulses	28
Abbildung 20: Elektrische Stimulation	29
Abbildung 21: Photolytische Stimulation.....	30
Abbildung 22: Beispielhafte Messspur bei elektrisch evozierten Strömen.....	32
Abbildung 23: Beispielhafte Messspur bei photolytisch evozierten Strömen	33
Abbildung 24: Der Fluoreszenzfarbstoff Di-4-ANEPPS	38
Abbildung 25: Absorptions- und Emissionsverhalten von Di-4-ANEPPS.....	39
Abbildung 26: VSDI-Mikroskopie	41
Abbildung 27: Beispielhafte Messspur eines VSDI-FDS	43
Abbildung 28: Der Effekt von ϵ -Aminocaprinsäure auf die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala	45
Abbildung 29: Der Effekt von ϵ -Aminocaprinsäure auf die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala unter GABA _A -Teilantagonisierung	47

Abbildung 30: Der Effekt von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf die biophysikalischen Membraneigenschaften	48
Abbildung 31: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme	49
Abbildung 32: Die Wirkung von 3 mM ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme	50
Abbildung 33: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme unter Blockade der GABA _A -Rezeptoren	51
Abbildung 34: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den GABA _A -Rezeptor vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme.....	53
Abbildung 35: Die Wirkung von 3 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den GABA _A -Rezeptor vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme.....	55
Abbildung 36: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf AMPA-Rezeptor-vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme	57
Abbildung 37: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den NMDA-Rezeptor vermittelte elektrisch evozierte postsynaptische Ströme.....	59
Abbildung 38: Die Wirkung von 3 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den NMDA-Rezeptor vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme.....	60
Abbildung 39: Die Wirkung von 1 mM EACA auf die Paired-Pulse Ratio	61
Abbildung 40: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den GABA _A -Rezeptor vermittelten Miniatur-postsynaptischen Ströme	63
Abbildung 41: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den AMPA-Rezeptor vermittelten Miniatur-postsynaptischen Ströme	64

1 Einleitung

1.1 Der Krampfanfall als mögliche Nebenwirkung der medikamentösen Therapie von Blutungen

Ein potenziell lebensgefährlicher Notfall ist die akute Blutungssituation, welche in der Regel umgehendes Handeln erfordert. Auf der einen Seite stehen die Substitution des verlorenen Blutvolumens mit Infusionslösungen und funktionellen Blutbestandteilen sowie die Gabe von Vasopressoren zur Aufrechterhaltung der Kardiozirkulation. Demgegenüber ist meist eine interdisziplinäre kausale Therapie der Blutung durch chirurgische oder interventionelle Blutstillung notwendig. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei manchen Indikationen durch eine Therapie mit Medikamenten der Klasse der Antifibrinolytika Mittel zur Verfügung stehen, welche in verschiedenen Situationen erwiesenermaßen das Ausmaß der Blutung reduzieren können.

Bei jeder Medikamentengabe sollte jedoch stets sorgfältig abgewogen werden, ob der Nutzen das Risiko eines möglichen Schadens überwiegt. In den letzten 15 Jahren kam es aufgrund von beschriebenen Nebenwirkungen zu einem Paradigmenwechsel bei der Auswahl der eingesetzten Antifibrinolytika. Bei den aktuell weltweit vorrangig eingesetzten Präparaten ist eine erhöhte Inzidenz von Krampfanfällen als unerwünschte Arzneimittelwirkung beschrieben. Deren genaue Ätiologie war lange Zeit unklar, neuere Erkenntnisse weisen auf direkte Effekte der Antifibrinolytika auf die synaptische Übertragung im Gehirn hin.

1.2 Antifibrinolyse

Es gibt viele Möglichkeiten, Blutungen durch iatrogene Maßnahmen zu stillen. Trotz Einsatz von Hämostyptika, Ligaturen, Elektrokaatern oder Druckverbänden ist ein funktionierendes körpereigenes Gerinnungssystem bei Blutungssituationen jedoch unverzichtbar. Dessen Aufgabe ist es durch Gewebeschäden eröffnete Gefäße durch Thromben abzudichten. Diese sind gallertartige Pfropfen, die aus zellulären Blutbestandteilen und Proteinen bestehen. Zusammengehalten werden sie aus im Rahmen der Hämostase aktivierten Thrombozyten und vernetzten Fibrinketten

(Chapin und Hajjar, 2015). Der Fibrinbildung geht eine komplexe Aktivierungskaskade voraus, welche im Idealfall eine der Situation angemessene Gerinnungsreaktion auslöst. Der Organismus hat jedoch auch die Möglichkeit, geschaffene Thromben wieder abzubauen, sei es im Rahmen von Umbauprozessen der Wundheilung oder um Gefäßverschlüsse bei überschießender Hämostase zu verhindern. Dies geschieht durch die Fibrinolyse, der enzymatischen Spaltung der Fibrinpolymere.

Das wichtigste Enzym dabei ist Plasmin, welches wiederum aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen aktiviert wird. Diese Aktivierung wird physiologischerweise durch zwei verschiedene Serinproteasen katalysiert, t-PA (tissue-type plasminogen activator) und u-PA (urokinase-type plasminogen activator). Erstere wird von den Endothelzellen der Blutgefäße synthetisiert und freigesetzt, wohingegen u-PA hauptsächlich extravasal zu wirken scheint (Chapin und Hajjar, 2015).

Plasmin selbst ist ebenfalls eine Serinprotease, die Fibrinpolymere in gerinnungstechnisch inaktive und hemmende Bruchstücke teilt. Auch die Fibrinolyse ist ein regulierter Prozess, der bei zu schwacher oder zu starker Ausprägung deletäre Folgen haben kann. Um eine zu starke Fibrinolyse zu verhindern, werden Plasmin und t-PA durch weitere, im Blutkreislauf im Überschuss vorhandene Serinproteasen deaktiviert (Travis und Salvesen, 1983).

Im Rahmen von akuten Blutungssituationen kann es zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie, einer durch Entzündungsprozesse ausgelösten Hyperfibrinolyse kommen. Dies führt über einen durch den Körper nicht kompensierbaren Verbrauch von Gerinnungsfaktoren mitunter zu einem vermehrten Blutverlust (Hunt, 2014). Traumata und die Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine scheinen das Risiko für eine Hyperfibrinolyse stark zu erhöhen (Edmunds, 2010; Hess et al., 2008). Dem kann in einem solchen Falle durch die Gabe von Antifibrinolytika entgegengewirkt werden. Diese Arzneimittelgruppe teilt sich in Lysinanaloga und Aprotinin auf, welche sich grundlegend in Struktur und Funktionsweise unterscheiden. Beiden ist jedoch gemein, dass der Abbau von Blutgerinnseln gehemmt wird und dadurch der traumatisch oder operativ bedingte Blutverlust verringert werden kann.

1.2.1 Aprotinin

Das einzige in relevantem Umfang zur Antifibrinolyse *in vivo* eingesetzte Protein aus der Gruppe der Serinproteaseinhibitoren ist Aprotinin (Abbildung 1), ein aus 58 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einer molaren Masse von 6511,51 g/mol. Das auch als BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) bekannte Protein ist in der Lage diverse Serinproteasen zu hemmen. Es wird in verschiedenen Geweben des Hausrindes produziert und schützt diese vor Autodigestion.

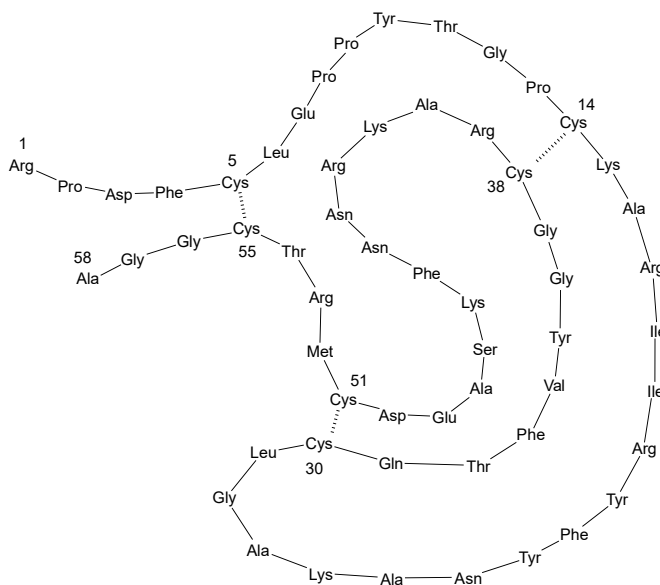


Abbildung 1: Die Primärstruktur der Serinprotease Aprotinin

Die Abbildung zeigt die Primärstruktur und somit die Aminosäureabfolge und Quervernetzung via Disulfidbrückenbindungen. Die Zahlen kennzeichnen die Aminosäureposition beginnend am N-Terminus des Moleküls. Abkürzungen der Aminosäuren wie folgt: Ala \triangleq Alanin; Arg \triangleq Arginin; Asn \triangleq Asparagin; Asp \triangleq Asparaginsäure; Cys \triangleq Cystein; Gln \triangleq Glutamin; Glu \triangleq Glutaminsäure; Gly \triangleq Glycin; Ile \triangleq Isoleucin; Leu \triangleq Leucin; Lys \triangleq Lysin; Met \triangleq Methionin; Phe \triangleq Phenylalanin; Pro \triangleq Prolin; Ser \triangleq Serin; Thr \triangleq Threonin; Tyr \triangleq Tyrosin; Val \triangleq Valin.

Das beim Menschen eingesetzte Aprotinin wird aus Lungengewebe des Hausrindes gewonnen (Westaby, 1993). Als Serinproteaseinhibitor hemmt es nebst Plasmin auch Kallikrein, Trypsin und Chymotrypsin, indem das aktive Zentrum der jeweiligen Protease kompetitiv gehemmt wird. Initial wurde es zur Therapie der akuten Pankreatitis beim Menschen eingesetzt, einer Erkrankung, bei welcher die Bauchspeicheldrüse durch frühzeitig aktivierte pankreatische Proteasen zerstört wird (McCutcheon, 1963). Anfang der 1960er Jahre wurde die plasminhemmende Wirkung beschrieben (Schmutzler und Beck, 1962). Der genaue antifibrinolytische Wirkmechanismus von Aprotinin ist nicht komplett geklärt, jedoch scheint gesichert,

dass Aprotinin gelöstes Plasmin hemmt, ohne mit an Fibrin gebundenem Plasmin zu interagieren (Mahdy und Webster, 2004).

Lange Zeit galt Aprotinin als bewährtes Standardmedikament bei blutverlustreichen Operationen. Die Sicherheit des Medikaments wurde in den 1990er Jahren im Rahmen der BSE-Epizootie diskutiert (Hübner et al., 1996). Vom Markt genommen wurde es jedoch erst 2007, nachdem im Vorfeld ein erhöhtes Risiko für postoperatives Nierenversagen nachgewiesen wurde (Mangano et al., 2006). Im Jahr 2008 konnte eine erhöhte Mortalität gegenüber Lysinanaloga festgestellt werden (Fergusson et al., 2008). Die folgenden Jahre wurde Aprotinin nur in Ausnahmefällen bei strengen Indikationsstellungen eingesetzt. Fünf Jahre später wurde es von der europäischen Arzneimittel-Agentur EMA nach kritischer Hinterfragung der Studien unter speziellen Auflagen wieder zur Verwendung in Ausnahmefällen zugelassen (Nibler und Boudeau, 2016).

1.2.2 Lysinanaloga

1.2.2.1 Allgemeine Struktur und Pharmakodynamik

Die heutzutage in der Antifibrinolyse vorherrschend eingesetzte Gruppe der Lysinanaloga hemmt die Fibrinolyse zu einem früheren Zeitpunkt. Diese Medikamente sind als simple ϵ -Aminocarbonsäuren deutlich kleinere Moleküle als Aprotinin mit molaren Massen von 131 bis 157 g/mol. Wie bei der essenziellen körpereigenen Aminosäure Lysin (Abbildung 2) tragen diese Arzneimittel am α -Kohlenstoffatom eine Carboxylgruppe und am ϵ -Kohlenstoffatom eine Aminogruppe, wodurch sich auch die Wirkweise dieser Substanzen erklärt.

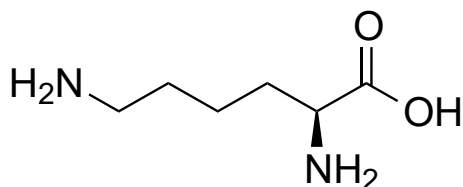


Abbildung 2: Die Aminosäure L-Lysin

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe, die α -Aminogruppe und die ϵ -Aminogruppe.

Plasminogen bindet physiologischerweise zunächst an den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator; t-PA) und mittels seiner

Lysinbindestelle an einen der exponierten Lysinreste des Fibrins, t-PA an α -C-Domänen des Fibrins (Tsurupa und Medved, 2001). Im Anschluss aktiviert t-PA Plasminogen zu Plasmin, welches die Fibrinkette spaltet. Die Lysinanaloga sind durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum Lysin in der Lage, diese Lysinbindestelle des Plasminogens kompetitiv zu besetzen (Midura-Nowaczek et al., 2013). Dadurch wird die Aktivierung von Plasminogen und somit der Abbau von Fibrinketten gehemmt (Abbildung 3).

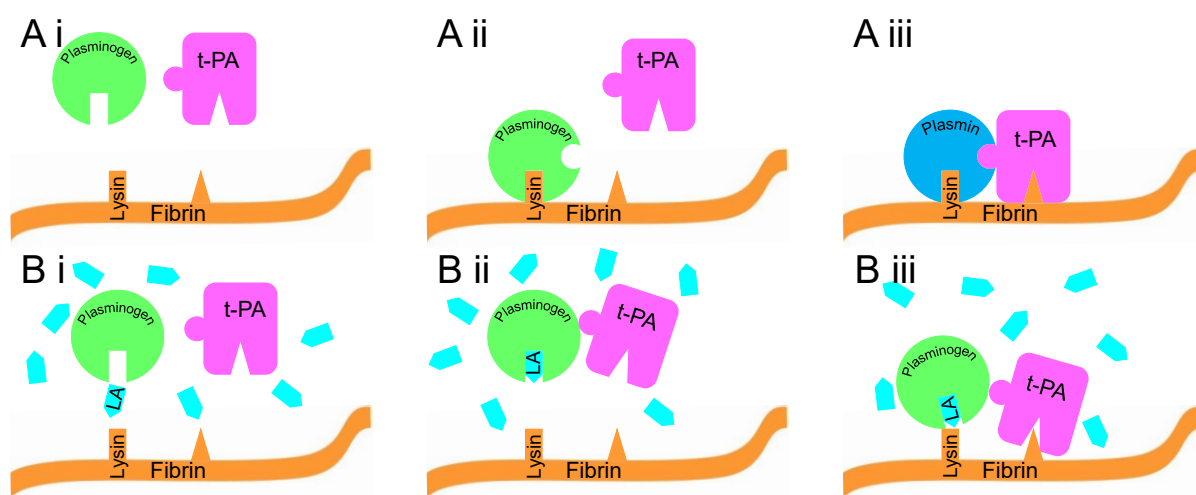


Abbildung 3: Plasminogenaktivierung und Wirkmechanismus der Lysinanaloga

A Physiologische Plasminogenaktivierung: **A i** Dargestellt ist eine Fibrinkette, darüber Plasminogen und der gewebespezifische Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator; t-PA). **A ii** Durch die Bindung des Plasminogens an den Lysinrest einer Fibrinkette öffnet sich die t-PA-Bindestelle des Plasminogens. **A iii** Dadurch kann t-PA das Plasminogen zu Plasmin aktivieren, während es selbst an α -C-Domänen des Fibrins bindet. **B Wirkmechanismus der Lysinanaloga:** **B i** Lysinanaloga (LA) sind vor der Bindung von Plasminogen an den Lysinrest des Fibrins präsent. **B ii** Ein LA-Molekül besetzt die Lysinbindestelle des Plasminogens. **B iii** Wegen der blockierten Lysinbindestelle kann das Plasminogen nicht an Fibrin binden. Aufgrund der geschlossenen Konfiguration kann es nicht durch t-PA aktiviert werden. Abbildung nach „Prevention and treatment of major blood loss“ (Mannucci und Levi, 2007) und „The X-ray Crystal Structure of Full-Length Human Plasminogen“ (Law et al., 2012).

1.2.2.2 ϵ -Aminocapronsäure

Die ϵ -Aminocapronsäure (ϵ -aminocaproic acid; EACA; Abbildung 4) ist schon lange Gegenstand biochemischer Forschung. Als einfachste ϵ -Aminosäure hat sie die größte strukturelle Ähnlichkeit zum Lysin. Eine der ersten Erwähnungen in einer wissenschaftlichen Abhandlung erfolgte durch den Ernährungswissenschaftler Karl Thomas (Thomas und Goerne, 1914). Circa ein halbes Jahrhundert später wurde die

plasminhemmende Wirkung von ϵ -Aminocaprinsäure erstmals beschrieben (Alkjaersig, Fletcher und Sherry, 1959). Kurz darauf wurde die Verwendung von EACA als antifibrinolytisches Arzneimittel patentiert und später als Epsikapron von der Firma Kabi Pharmaceuticals Ltd. vermarktet.

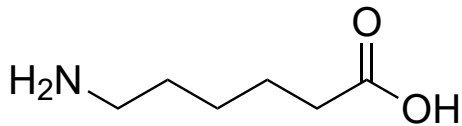


Abbildung 4: ϵ -Aminocaprinsäure (EACA)

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe und die ϵ -Aminogruppe.

Schon früh wurde erkannt, dass ϵ -Aminocaprinsäure das Potential besitzt, den Blutverlust bei Operationen zu reduzieren. Insbesondere bei größeren, blutverlustreichen Eingriffen wie radikalen Prostatektomien, Bypass-Grafts oder dem Einsatz von Gelenkendoprothesen konnte gezeigt werden, dass EACA die Operationszeit verkürzen, den Blutverlust verringern und die Anzahl an verabreichten Erythrozytenkonzentraten reduzieren kann (Hsu et al., 2016; Li und Wang, 2019; Sack et al., 1962).

Des Weiteren kam das Medikament bei hyperfibrinolytischen Gerinnungsstörungen zum Einsatz. In den 1960er und 1970er Jahren wurde das Medikament auch in Deutschland zur Therapie der Dysmenorrhoe verwendet. Die US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel (food and drug administration; FDA) gestattet den perioperativen Gebrauch von ϵ -Aminocaprinsäure.

1.2.2.3 Tranexamsäure

Das momentan in Deutschland vorrangig eingesetzte Antifibrinolytikum ist *trans*-4-(Aminomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure ((T)AMC(H)A), besser bekannt unter dem Freinamen Tranexamsäure (TXA; Abbildung 5). In den 1960er Jahren wurde Tranexamsäure als potenter Hemmer des Plasminogens beschrieben (Okamoto und Okamoto, 1962). Die antifibrinolytische Potenz wird als sieben- bis zehnfach höher als die der ϵ -Aminocaprinsäure beschrieben (Nilsson, 1980). Der Einsatz von Lysinanaloga ist um ein Vielfaches günstiger als der des aufwendig zu isolierenden Aprotinin. Fergusson beschreibt die Kosten für eine perioperative Antifibrinolyse bei

einem vierstündigen kardiochirurgischen Eingriff mit Aprotinin mit 1400 \$, wohingegen er den Einsatz von Tranexamsäure mit 4 \$ und somit nur einem Bruchteil des Betrags beziffert (Fergusson et al., 2008).

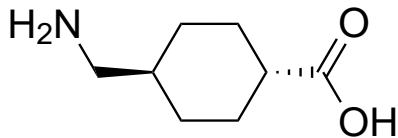


Abbildung 5: Tranexamsäure (TXA)

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe, der Cyclohexanring und die Aminogruppe

1.2.2.4 *para*-Aminomethylbenzoesäure

Die strukturverwandte *para*-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA; Abbildung 6) wurde in Deutschland bei strenger Indikationsstellung in der Darreichungsform einer Filmtablette zur Dauereinnahme beispielsweise bei Blutererkrankungen oder bekannter Hyperfibrinolyse eingesetzt.

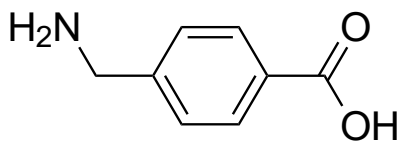


Abbildung 6: *para*-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA)

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe, der Benzolring und die Aminogruppe

1.3 Neurologische Nebenwirkungen der antifibrinolytischen Therapie

Schon über 40 Jahre lang stehen Lysinanaloga im Verdacht, Auslöser neurologischer Komplikationen zu sein (Yamaura et al., 1980). Insbesondere die Inzidenz postoperativer Krampfanfälle schien besonders bei mit Tranexamsäure behandelten Patienten deutlich erhöht. Dieser Zusammenhang gewann im Jahre 2007 sprunghaft an Aktualität, da spätestens seit dem zeitweiligen Aussetzen der Zulassung für Aprotinin nach der BART-Studie (Fergusson et al., 2008) Lysinanaloga bis heute vorrangig zu Antifibrinolyse eingesetzt werden. Perioperative Krampfanfälle nach hochdosierter Gabe von Tranexamsäure treten im Schnitt knapp fünf Stunden

nach dem Eingriff auf (Murkin et al., 2010), vermutlich weil intravenöse und inhalative Anästhetika zur Narkoseaufrechterhaltung in aller Regel eine GABA_A-Rezeptor-agonistische dämpfende Wirkung haben (Brohan und Goudra, 2017). Diese beugt zerebralen Krampfgeschehnissen während der Narkose vor. Beim Ausschleichen der perioperativen Sedierung geht diese protektive, die Krampfschwelle hebende Wirkung nach Metabolisierung, Exkretion oder Umverteilung des Hypnotikums gemäß der spezifischen Pharmakokinetik jedoch verloren, während im Liquor weiterhin relevante TXA-Spiegel vorliegen (Lecker et al., 2016).

Diese Häufung postoperativer Krampfanfälle bei mit Lysinanaloga behandelten Patienten wirft die Frage nach der Ätiologie dieses Phänomens auf. Prinzipiell treten Krampfanfälle mitunter als Resultat einer Dysbalance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer neuronaler Aktivität auf (Staley, 2015), wobei entweder der Zustand der Hyperexzitation oder der der Disinhibition vorliegt. Dies kann zum Beispiel durch Wirkungen auf Rezeptoren und Kanäle, Beeinflussung der Freisetzung von Vesikeln oder Änderung der biomechanischen Membraneigenschaften geschehen.

1.4 Signaltransmission im Gehirn

Da der Mensch eine der Maus sehr ähnliche Hirnphysiologie besitzt, lässt sich das murine Hirn besonders auf molekularer Ebene als gutes Surrogat für experimentelle, auf den Menschen projizierte Studien nutzen. So sind die murinen Rezeptoren für Neurotransmitter und deren Interaktionen mit diversen Pharmaka mit ihren humanen Gegenstücken gut vergleichbar (Jegla et al., 2009). Aus diesem Grund werden in der Epilepsieforschung sowohl in vivo (Loscher, 2017) als auch in vitro (Witsch et al., 2015) Mausmodelle verwendet.

Im Nervensystem werden Signale zwischen Zellen nicht nur über Hormone, sondern auch über direkte Zellkontakte übertragen. Diese sogenannten Synapsen ermöglichen kurze Übertragungslatenzen von wenigen Sekundenbruchteilen. Nur dadurch können Organismen auf schnell veränderliche Umstände adäquat reagieren.

Synapsen lassen sich in elektrische und chemische Synapsen unterteilen. Elektrische Synapsen ermöglichen einen direkten Ionenstrom zwischen zwei Nervenzellen. Dazu verbinden sich je zwei hexamere Tunnelproteine benachbarter

Zellen. Durch die entstandenen Poren (gap junctions) können Ionen und kleine Moleküle von einer Zelle in die andere fließen. Dadurch werden präsynaptische Potentialänderungen schneller übergeleitet als bei chemischen Synapsen (Bennett, 1997). Elektrische Synapsen sind essenziell für Synchronisationen von Signalen, wie zum Beispiel in glatter Muskulatur oder Herzmuskelzellen. Chemische Synapsen hingegen funktionieren über Botenstoffe, die in der Regel von einer der beiden korrespondierenden Zellen ausgeschüttet werden. Deswegen kann die chemische Synapse im Vergleich zur elektrischen eher als unidirektional beschrieben werden. Die in der präsynaptischen Terminale befindlichen, mit Neurotransmittern gefüllten Vesikel können bei der Ankunft eines depolarisierenden Signals nach einem präsynaptischen Calciumioneneinstrom freigesetzt werden (Llinas, Steinberg und Walton, 1981). Dadurch entleert sich der Inhalt in den 30–50 nm breiten synaptischen Spalt zwischen den Zellmembranen. Die Botenstoffe können nach Diffusion zur postsynaptischen Membran mit dort befindlichen Rezeptoren interagieren. Diese nehmen auf verschiedene Weise Einfluss auf die postsynaptische Zelle. Rezeptoren für Neurotransmitter lassen sich allerdings auch an der Präsynapse finden, welche beispielsweise im Zuge eines Feedback-Mechanismus im Sinne einer Eigenhemmung die Antwort auf nachfolgende Reize unterdrücken können (Schlicker und Feuerstein, 2017).

Neurotransmitterrezeptoren lassen sich in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilen. Erstere initiieren nach Ligandenbindung eine Reizweiterleitung über second-messenger-Proteine, welche sich im Zytosol frei bewegen und dort zu ihrer Effektorstruktur diffundieren. Ionotrope Rezeptoren hingegen wirken sich nach Bindung des Liganden auf den Offenzustand eines für spezifische Ionen durchlässigen Kanals in der Zellmembran aus. Dadurch kann es auf postsynaptischer Seite direkt zu einer Änderung des Membranpotentials kommen, weswegen ionotrope Rezeptoren in der Regel eine schnellere Antwort vermitteln können als metabotrope Rezeptoren. Die übertragene Information ist also stark abhängig vom präsynaptisch freigesetzten Neurotransmitter und den empfangenden postsynaptischen Rezeptorarten.

1.4.1 Glutamaterge Rezeptoren

Rezeptoren, deren physiologischer Ligand die proteinogene Aminosäure Glutamat (Abbildung 7) ist, werden als glutamaterge Rezeptoren bezeichnet. Im zentralen Nervensystem ist Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Die einzelnen Rezeptoren lassen sich anhand ihres Ansprechens auf verschiedene unphysiologische Liganden spezifizieren.

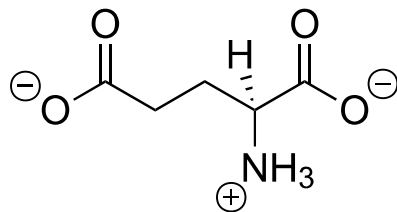


Abbildung 7: Die Aminosäure L-Glutamat

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe, die α -Aminogruppe und die γ -Carboxygruppe

1.4.1.1 AMPA-Rezeptor

Der AMPA-Rezeptor (AMPA-R) ist der zahlenmäßig häufigste exzitatorische Rezeptor im menschlichen Gehirn (Bowie, 2012). Das physiologische Substrat ist das als auch Neurotransmitter fungierende Aminosäureanion Glutamat, somit ist er der Gruppe der glutamatergen Rezeptoren zuzuordnen. In den 1980er Jahren konnte er mithilfe des spezifischen, nicht physiologischen Substrates α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA; Abbildung 8) gegenüber den ebenfalls glutamatergen Kainat-Rezeptoren abgegrenzt werden (Honore, 1989). Jeder AMPAR setzt sich aus vier einzelnen Untereinheiten zusammen, dabei kommen vier Varianten dieser Untereinheit zum Einsatz, welche als GluA1, GluA2, GluA3 und GluA4 bezeichnet werden. Oft ist ein solcher Rezeptor heterotetramer, besteht also aus zwei symmetrischen Dimeren mit denselben Untereinheiten.

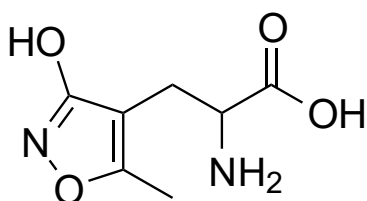


Abbildung 8: AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure)

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe, die α -Aminogruppe, der Isoxazolring mit Methyl- und Hydroxygruppe.

Der AMPA-Rezeptor ist ein ionotroper Glutamatrezeptor, wobei jede Untereinheit ihre eigene Glutamat-Bindestelle besitzt. Zur Öffnung des zentral zwischen den Untereinheiten liegenden Kanals sind mindestens zwei gebundene Glutamatmoleküle nötig. Abhängig von der Untereinheitenzusammensetzung permeieren neben Natrium- und Kalium- auch Calciumionen den Rezeptor. Als häufigste Rezeptorart im zentralen Nervensystem zeigt sich der AMPA-Rezeptor dort auch für den Großteil der vermittelten postsynaptischen exzitatorischen Ströme verantwortlich (Scheefhals und MacGillavry, 2018). In Stromkurvenaufzeichnungen von Depolarisationsantworten ist der frühe Depolarisationsaufstrich maßgeblich AMPA-Rezeptor-vermittelt (Barnes-Davies und Forsythe, 1995).

1.4.1.2 NMDA-Rezeptor

Ähnlich wie AMPA ist *N*-Methyl-D-Asparaginsäure (Abbildung 9) ein spezifisches Substrat für einen anderen ionotropen Glutamatrezeptor, der deshalb auch als NMDA-Rezeptor (NMDAR) bezeichnet wird. Der NMDAR ist ebenfalls tetramer aufgebaut, in der Regel aus zwei Dimeren, die aus jeweils einer GluN1- und einer GluN2-Untereinheit bestehen (Salussolia et al., 2011). Während die GluN2-Untereinheiten eine extrazelluläre Glutamat-Bindestelle besitzen, weisen die GluN1-Untereinheiten jedoch eine extrazelluläre Glycin-Bindestelle auf (Furukawa et al., 2005). Nach Bindung von Glycin und Glutamat ist der Rezeptor für Natrium-, Kalium- und Calciumionen permeabel. Allerdings ist die Konduktivität auch vom Membranpotential der Zelle abhängig, da Magnesiumionen den Kanal unter Ruhepotentialbedingungen blockieren. Erst nach vorheriger Depolarisation der Zellmembran – beispielsweise durch AMPA-Rezeptor-vermittelten Kationeneinstrom – verlassen die Magnesiumionen das Kanallumen und ermöglichen den Ionenfluss durch den Rezeptor (Furukawa et al., 2005).

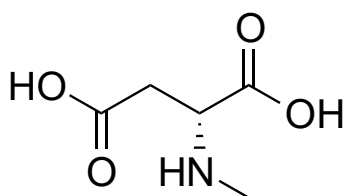


Abbildung 9: *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA; (2*R*)-2-(Methylamino)butandisäure)

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe, die α -Methylaminogruppe und die β -Carboxygruppe

Der NMDA-Rezeptor und seine Beteiligung an Lernprozessen ist seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung, ebenso die Möglichkeit der Einflussnahme auf das Bewusstsein durch Einsatz von auf den NMDAR wirkenden Medikamenten und Drogen. Ein weiteres Forschungsfeld ist die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen durch medikamentöse Blockade des NMDA-Rezeptors (Kornhuber et al., 1989). Diese scheint die Exzitotoxizität durch überaktivierte NMDAR zu reduzieren und damit das Voranschreiten jener Krankheiten zu verlangsamen (Cacabelos, Takeda und Winblad, 1999).

1.4.1.3 Kainat-Rezeptor

Der neben dem physiologischen Substrat Glutamat auch durch das Kainsäure-Anion (Abbildung 10) aktivierbare Kainat-Rezeptor ist im Offenzustand durchlässig für Natrium-, Kalium- und in geringerem Maße für Calciumionen. Auch er hat einen tetrameren Aufbau mit fünf Varianten von Untereinheiten. Er ist unter anderem an glutamatergen Präsynapsen zu finden, an welchen er einen modulierenden Einfluss auf die Ausschüttung von Glutamatvesikeln bewirkt (Negrete-Diaz et al., 2018) und zeigt ein weniger schnell ansprechendes Stromkurvenprofil. In jüngster Zeit wurde auch eine metabotrope Wirkung des Rezeptors über G-Protein-Kaskaden nachgewiesen (Lerma und Marques, 2013).

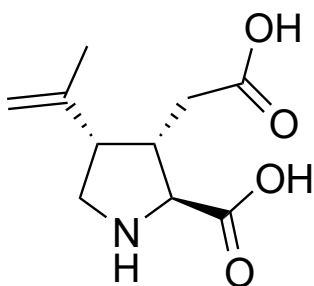


Abbildung 10: Kainsäure (2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenyl-pyrrolidin)

Dargestellt sind von links unten beginnend gegen den Uhrzeigersinn: Der zentrale Pyrrolidinring, die Carboxygruppe, die Carboxymethylgruppe, und die Isopropenylgruppe

1.4.2 GABAerge Rezeptoren

Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA; Abbildung 11) ist das biogene Amin der Aminosäure Glutamat, welche am α -C-Atom decarboxyliert wurde. Seine

Ausschüttung hat zumeist eine postsynaptische Hyperpolarisation zur Folge, was eine Hemmung der Signalausbreitung begünstigt.

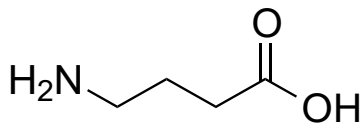


Abbildung 11: γ -Aminobuttersäure (GABA)

Dargestellt sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe und die γ -Aminogruppe

1.4.2.1 $GABA_A$ -Rezeptor

Der $GABA_A$ -Rezeptor ist ähnlich dem AMPA- oder dem NMDA-Rezeptor ein ligandengesteuerter Ionenkanal, im offenen Zustand ist dieser jedoch für Chloridionen permeabel. Es existieren 16 Untereinheitenvarianten in sieben Familien (Darlison, Pahal und Thode, 2005), ein Rezeptor setzt sich stets aus fünf Untereinheiten zusammen (Abbildung 12). Die häufigste Rezeptorkonfiguration besteht aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit (Farrar et al., 1999). Bei dieser Konfiguration liegen die beiden GABA-Bindestellen zwischen je einer α - und β -Untereinheit (Richter et al., 2012). Nach Bindung von GABA an diese Bindestellen führt dies zur Öffnung des Kanals für Chloridionen, was bei den meisten Neuronen unter physiologischen Ionenkonzentrationen einer Depolarisation entgegenwirkt. Dabei kommt es bei depolarisierten Zellen zu einem Chlorideinstrom und damit zu einer Repolarisation der Zellmembran. Bei hyperpolarisierten Zellmembranen kann es jedoch zu einem Chloridausstrom kommen, welcher der Hyperpolarisation entgegenwirkt (Herrling, 1984).

Der $GABA_A$ -Rezeptor ist die Zielstruktur vieler Hypnotika (Kim et al., 2020), welche durch eine gesteigerte Inhibition an der Postsynapse die cerebrale synaptische Übertragung generalisiert dämpfen. Der antikonvulsive Effekt dieser Hypnotika erklärt sich durch denselben Mechanismus.

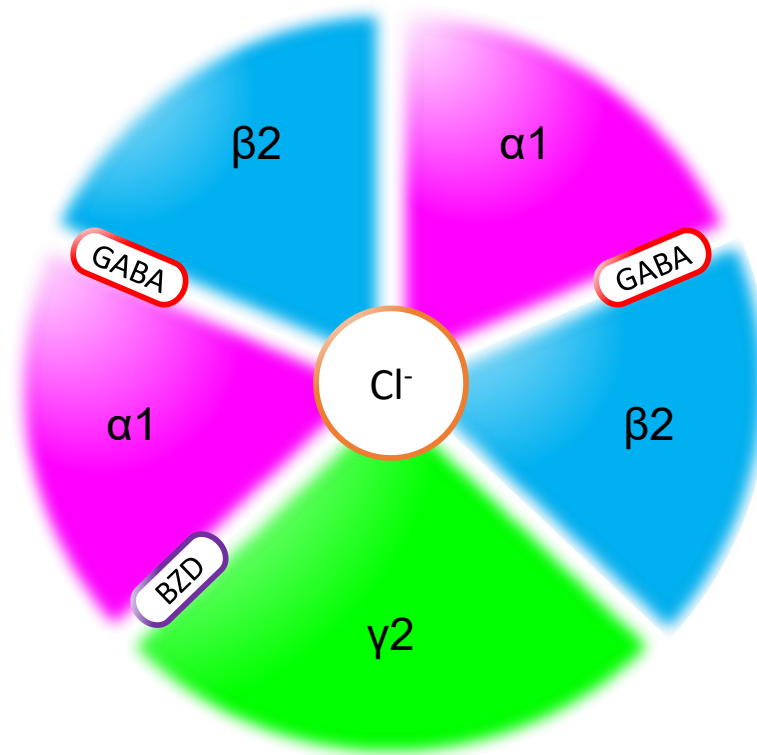


Abbildung 12: Die Anordnung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors

Abgebildet ist ein typischer GABA_A-Rezeptor in Orthogonalprojektion zur Zellmembran, bestehend aus zwei α1-, zwei β2- und einer γ2-Untereinheit. Die fünf Untereinheiten gruppieren sich um die zentrale Pore, die im Offenzustand für Chloridionen permeabel ist. Zwischen den α- und β-Untereinheiten befinden sich GABA-Bindestellen. Benzodiazepine entfalten ihre Wirkung zwischen einer α- und einer γ-Untereinheit.

1.4.2.2 GABA_B-Rezeptor

Im Gegensatz zum ionotropen GABA_A-Rezeptor ist der metabotrope GABA_B-Rezeptor ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher bei Neurotransmitterbindung Signalkaskaden via Second-Messenger-Proteine initiiert (Shaye et al., 2021). Der GABA_B-Rezeptor liegt als Heterodimer bestehend aus einer GABA_{B1a}- oder einer GABA_{B1b}-Untereinheit zusammen mit einer GABA_{B2}-Untereinheit vor. An der GABA_{B1}-Untereinheit findet sich die GABA-Bindungsstelle, wohingegen die GABA_{B2}-Untereinheit intrazellulär an ein G-Protein koppeln kann, charakteristischerweise an G_{i/o} (Evenseth, Gabrielsen und Sylte, 2020). Nach Bindung eines GABA-Moleküls an die GABA_{B1}-Untereinheit werden von G_{i/o} eine aktivierte Gα-Untereinheit und ein

beta-gamma-Komplex ($G_{\beta\gamma}$) freigesetzt, welche über weitere Moleküle wie Adenylylcyclasen die intrazelluläre Konzentration von second-messenger-Proteinen wie cAMP, cGMP, Diacylglycerine, IP3, Arachidonsäure, Natrium-, Kalium- oder Calciumionen beeinflussen (Svoboda et al., 2004). $G_{\beta\gamma}$ interagiert zudem direkt mit G-Protein-gekoppelten einwärtsgerichtenden Kaliumkanälen (G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels; GIRKs), wodurch es unter physiologischen Verhältnissen zu einem Kaliumausstrom und somit zur Hyperpolarisation der Zellmembran kommt. Dies wird bei Voltage-Clamp-Aufzeichnungen elektrisch evozierter postsynaptischer Ströme oft als zeitlich verzögerte Nachhyperpolarisierung sichtbar (Dutar und Nicoll, 1988).

1.4.3 Glycin-Rezeptoren

Der Glycin-Rezeptor (GlyR) ist Mitglied ein ligandengesteuerter Ionenkanal, der im adulten Gehirn wie der GABA_A-Rezeptor auch eine inhibitorische Funktion einnimmt. Er ist verwandt mit dem GABA_A-Rezeptor und ebenso wie dieser als Pentamer aufgebaut. Es sind vier primär ligandenbindende Untereinheiten (α_{1-4}) und eine β -Untereinheit bekannt (Lynch, 2004). Letztere verankert den Glycinrezeptor im Zellskelett über das im Zytoplasma vorliegende Protein Gephyrin. Ein typischer adulter GlyR besteht aus drei oder vier α_1 - und ein oder zwei β -Untereinheiten (Kuhse, Betz und Kirsch, 1995).

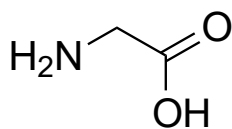


Abbildung 13: Die Aminosäure Glycin

Zu sehen sind von rechts nach links: Die α -Carboxygruppe und die α -Aminogruppe

Die als Neurotransmitter fungierende biogene Aminosäure Glycin (Abbildung 13) ist das physiologische Substrat des Glycin-Rezeptors. Nach Bindung an den Rezeptor erhöht sich dessen Permeabilität für Chloridionen, somit wirkt er im adulten Gehirn unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich inhibitorisch, da die Zellmembran durch den Einstrom der Chloridionen hyperpolarisiert wird.

1.5 Aufbau und Funktion der Amygdala

Die Amygdala ist ein paarig angelegtes Kerngebiet im Temporallappen des Großhirns. Sie erhielt ihren Namen wegen der Ähnlichkeit in Form und Größe zum eponymen Mandelkern (griech. ἀμυγδάλη). Sie ist Teil des limbischen Systems, welches lateral der beiden Thalami lokalisiert ist. Die Amygdala lässt sich als Ansammlung von verschiedenen kleineren Kerngebieten verstehen, welche sich in struktureller und funktioneller Beziehung stark voneinander unterscheiden; eine gröbere Einteilung ist jedoch möglich (Abbildung 14). Der dorsomediale Teil der Amygdala ist die zentromediale Kerngruppe, zwischen ihr und der Capsula externa findet sich die basolaterale Amygdala (BLA). Basal und somit an der Hirnrinde des Temporallappens liegend findet sich die kortikale Kerngruppe (Sah et al., 2003).

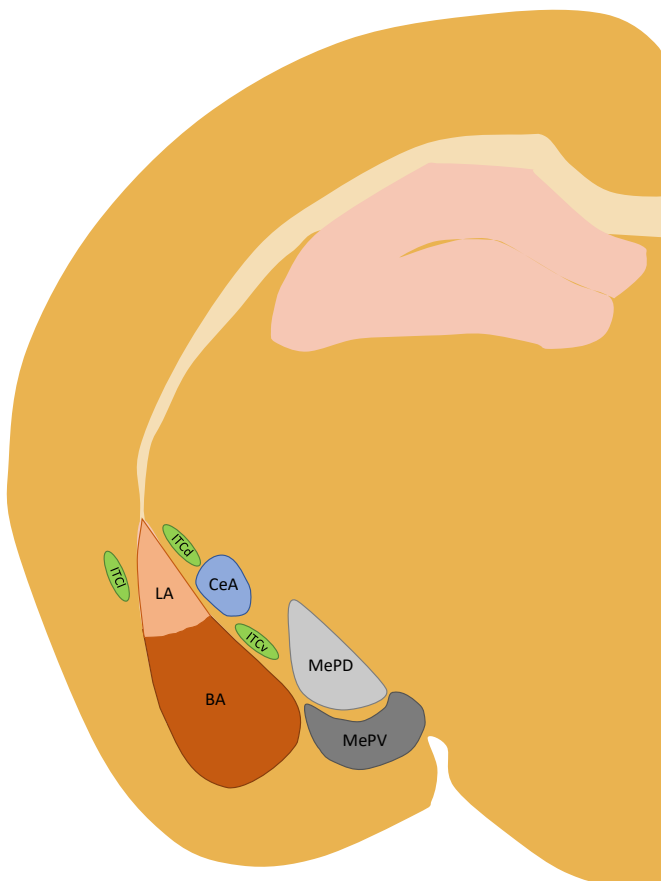


Abbildung 14: Die Lage der Amygdalakerne im murinen Koronarhirnschnitt

Schematische Darstellung eines Koronarhirnschnittes auf Höhe der Amygdala. Die basolaterale Amygdala ist unterteilt in basale und laterale Amygdala. **BA** basale Amygdala; **CeA** zentraler Kern der Amygdala; **ITCd/ITCI/ITCv** dorsale/laterale/ventrale interkalierte Zellen der Amygdala; **LA** laterale Amygdala; **MePD** posterodorsale mediale Amygdala; **MePV** posteroventrale mediale Amygdala. Abbildung nach "The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning" (Keifer et al., 2015) und "Functional Properties and Projections of Neurons in the Medial Amygdala" (Keshavarzi et al., 2014).

Der basolateralen Amygdala wird eine Rolle bei der affektiven Bewertung von Stimuli sowie dem assoziativen Lernen zugeschrieben. Sie erhält Afferenzen aus dem Hippocampus, dem Thalamus und dem Neocortex (Sah et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die BLA eine wichtige Funktion bei der Angstkonditionierung innehat, zuvor konditionierte Ratten mit zerstörter basolateraler Amygdala reagierten auf den einst angstausslösenden Reiz nicht mehr mit einer sonst typischen Schockstarre (Maren, Aharonov und Fanselow, 1996).

Die zentromediale Amygdala kann stark vereinfacht gesprochen als Effektorstruktur der durch die BLA verarbeiteten Signale verstanden werden. Sie projiziert in den Hypothalamus sowie in den Hirnstamm. Dort wird die Antwort des autonomen Nervensystems und das adäquate Verhalten auf den Stimulus eingeleitet (Sah et al., 2003). Durch direkte Stimulation des zentralen Nervenkerne kann deshalb eine Angstreaktion ohne vorherige Konditionierung ausgelöst werden (Iwata, Chida und LeDoux, 1987).

Die kortikale Kerngruppe ist ein entwicklungsgeschichtlich älterer Teil des Gehirns und erhält Afferenzen aus dem olfaktorischen Kortex. Es konnte gezeigt werden, dass die kortikale Amygdala angeborene Verhaltensmuster auf olfaktorische Reize vermittelt (Root et al., 2014). Zudem projiziert sie die olfaktorischen Stimuli weiter auf den medialen Amygdalakern, diese Vernetzung ist in Schafen nachweislich mitverantwortlich für die Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses (Noto et al., 2021).

1.6 Die Amygdala als Modellregion der Krampfanfallforschung

Seit dem Ende der 1960er Jahre bedient man sich in der Erforschung von Krampfanfällen des Kindling-Modells (von engl. „to kindle“, „anfachen“), bei welchem bei Versuchstieren Hirnregionen wiederholt schwach elektrisch stimuliert werden. Es zeigt sich, dass viele der so behandelten Tiere erst im Verlauf während der täglichen Stimulation zu Krampfanfällen neigten (Goddard, 1967). Mit dieser Technik lässt sich so ein artifizielles Krampfleiden im Tiermodell generieren, welches später nicht mehr notwendigerweise eines elektrischen Stimulus bedarf und auch spontan auftritt (McNamara et al., 1980).

Schon bei den initialen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Kindling der Amygdala ein besonderes Potential für die Entstehung generalisierter Krampfanfälle hat (Goddard, 1967). Auch sind die Kindlingmuster besonders in der Amygdala im Interspeziesvergleich sehr ähnlich. Dies konnte für Frösche, Mäuse, Ratten, Hasen, Hunde, Katzen, aber auch Rhesusaffen und Paviane gezeigt werden (McNamara et al., 1980).

Neben dem Kindling besteht auch die Möglichkeit der chemischen Überstimulation durch Substanzen, die an Neurotransmitterrezeptoren binden. Ein wichtiges Läsionswerkzeug dabei ist die Kainsäure, die als Agonist an Kainatrezeptoren stark exzitotoxisch wirkt. Das Intra-Amygdala-Kainat-Mikroinjektionsmodell (IAK) der Maus ist ein Modell der mesialen Temporallappenepilepsie (MTLE), bei welcher eine Kainsäureinjektion in die murine Amygdala ein der MTLE ähnliches Krampfleiden generiert (Mouri et al., 2008). Die Versuchstiere zeigen anschließend spontane Krampfanfälle, welche auch teilweise durch Antiepileptika behandelbar sind. Diese Tiermodelle werden bei der Entwicklung neuer antiepileptischer Therapien eingesetzt (West et al., 2021).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von ϵ -Aminocapronsäure auf die synaptische Transmission in der murinen Amygdala in vitro. Dabei soll zunächst der Effekt auf die generelle Exzitabilität als Maß für das epileptogene Potenzial bestimmt werden. Das Hauptaugenmerk liegt in der Aufschlüsselung der Interaktion mit für Krampfleiden relevanten Neurotransmitterrezeptoren. Darin könnte eine mögliche Erklärung für die geringere Inzidenz postoperativer Krampfanfälle bei EACA gegenüber TXA gefunden werden. In vorhergehenden Studien dieser Arbeitsgruppe konnte bereits der hemmende Einfluss von Tranexamsäure auf die GABA_A-Rezeptorvermittelte Transmission in Hippocampus und Amygdala der Maus gezeigt werden. Die aus der verminderten Hemmung resultierende Disinhibition ist ein Erklärungsansatz für die herabgesetzte Krampfschwelle, welche analog dazu bei EACA vorliegen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation der Hirnschnitte

Die zu den Messungen benötigten Mäusehirnschnittpräparate wurden aus männlichen Mäusen der Zuchtlinie C57BL/6 (Alter: 21 bis 42 Tage) gewonnen. Die Haltung der Mäuse am Max-Planck-Institut für Psychiatrie und am Klinikum rechts der Isar wurde genehmigt durch die Regierung von Oberbayern. Die Tötung der Mäuse erfolgte ausschließlich, um die Gehirne zu wissenschaftlichen Zwecken zu verwenden, nämlich zur Herstellung der Hirnschnittpräparate. Aus diesem Grund handelte es sich bei den Versuchen nicht um Tierversuche im Sinne des Tierschutzgesetzes (vgl. §7 Abs. 2 Satz 3 TierSchG 2006). Zur Entnahme des Gehirns wurden die Versuchstiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran narkotisiert. Nach Kontrolle der Narkosetiefe durch Ausbleiben des Aufrichtreflexes erfolgte die Dekapitation mittels einer Nagetierguillotine (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Zur weiteren Präparation wurde der Kopf in eiskalte, mit Carbogen-Gas (95% O₂ / 5% CO₂) gesättigte, zum Zwecke der Präparation modifizierte künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid; aCSF; Konzentrationen jeweils in mM: Calciumchlorid 0,5; D-(+)-Glucose 25; Kaliumchlorid 2,5; Magnesiumchlorid 6; Natriumbicarbonat 25; Natriumchlorid 125; Natriumdihydrogenphosphat 1,25; pH-Wert unter Sättigung mit Carbogengas: 7,35) überführt. Mittels eines in der Sagittalachse entlang der Sutura sagittalis geführten Schnittes konnten die beiden Hälften der Schädelkalotte jeweils nach lateral aufgebogen und das Gehirn in toto entnommen werden. Nach Abtrennung des Kleinhirns wurde das verbleibende Großhirn auf der Schnittfläche stehend mit einem Acrylpolymer-Gewebekleber (Histoacryl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf den Schneideteller des Vibratoms (Microm HM 650 V, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) geklebt. Anschließend wurden in der Koronarebene von rostral beginnend mit der Klinge des Vibratoms 350 µm dicke Hirnschnitte abgetragen. Die basolaterale Amygdala war in zwei bis drei dieser Schnitte enthalten. Diese wurden entlang der Sagittalachse geteilt und ergaben so vier bis sechs koronare Hemisphärenhirnschnittpräparate.

Diese wurden in einem mit regulärer aCSF (Konzentrationen jeweils in mM: Calciumchlorid 2; D-(+)-Glucose 25; Kaliumchlorid 2,5; Magnesiumchlorid 1; Natriumbicarbonat 25; Natriumchlorid 125; Natriumdihydrogenphosphat 1,25; pH-Wert bei Carbogen-Sättigung: 7,35) gefüllten, carbogenierten Aufbewahrungsgefäß inkubiert. Nach einer Erholungszeit von 30–45 Minuten im Wärmebad (Julabo ED Einhängethermostat, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland) bei 35 °C wurde das mit aCSF gefüllte Aufbewahrungsgefäß mit den Hirnschnitten bis zum Transfer in die Ableit- und Mikroskopierkammer bei Raumtemperatur (20–23 °C) unter stetiger Carbogenbegasung gelagert.

Die Präparation der Hirnschnitte für optische Messungen mittels des spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffs (Voltage-sensitive Dye Imaging; VSDI) wurden in einer Saccharose-basierten Variante der aCSF (Konzentrationen in mM: D-(+)-Glucose 25, Kaliumchlorid 2,5, Natriumbicarbonat 25, Natriumchlorid 87, Natriumdihydrogenphosphat 1,25, Saccharose 75; pH-Wert unter Sättigung mit Carbogengas: 7,4) durchgeführt.

2.2 Elektrophysiologische Messungen mit der Patch-Clamp-Technik

2.2.1 Patch-Clamp-Versuchsaufbau

Die Experimente wurden initial (2013–2014) in den Räumlichkeiten des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie und später (2015–2017) am Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

2.2.1.1 Patch-Clamp-Messstand

Die elektrophysiologischen Experimente dieses Dissertationsvorhabens erfolgten an einem Patch-Clamp-Messstand (Abbildung 15). Zum Schutz vor Erschütterungen war dieser durch pneumatisch geregelte Schwingungsisolatoren vom Gebäude entkoppelt. Durch einen darüber befindlichen faradayschen Käfig wurde der Aufbau gegen umgebende elektrische Felder abgeschirmt. Die Patch-Pipetten und Stimulationselektroden wurden mithilfe von elektrisch betriebenen

Mikromanipulatoren in die Messkammer eingebracht (Remote Control SM7, Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland). Alle innerhalb des Messstandes befindlichen Geräte und Bauteile wurden zur Minimierung von Störfeldern geerdet. Die zur Messung der transmembranösen Ströme und Spannungen verwendete Silber/Silberchlorid-Badelektrode wurde ebenfalls innerhalb der Messkammer in die aCSF-Badlösung platziert. Diese zirkulierte mithilfe einer außerhalb des Messstandes platzierten Rollenpumpe durch ein Teflon-Schlauchsystem und wurde in einem Reservoirgefäß mit Carbogengas gesättigt. Für die Messungen mit photolytisch freigesetzten Neurotransmittern konnte der Messstand abgedunkelt werden.

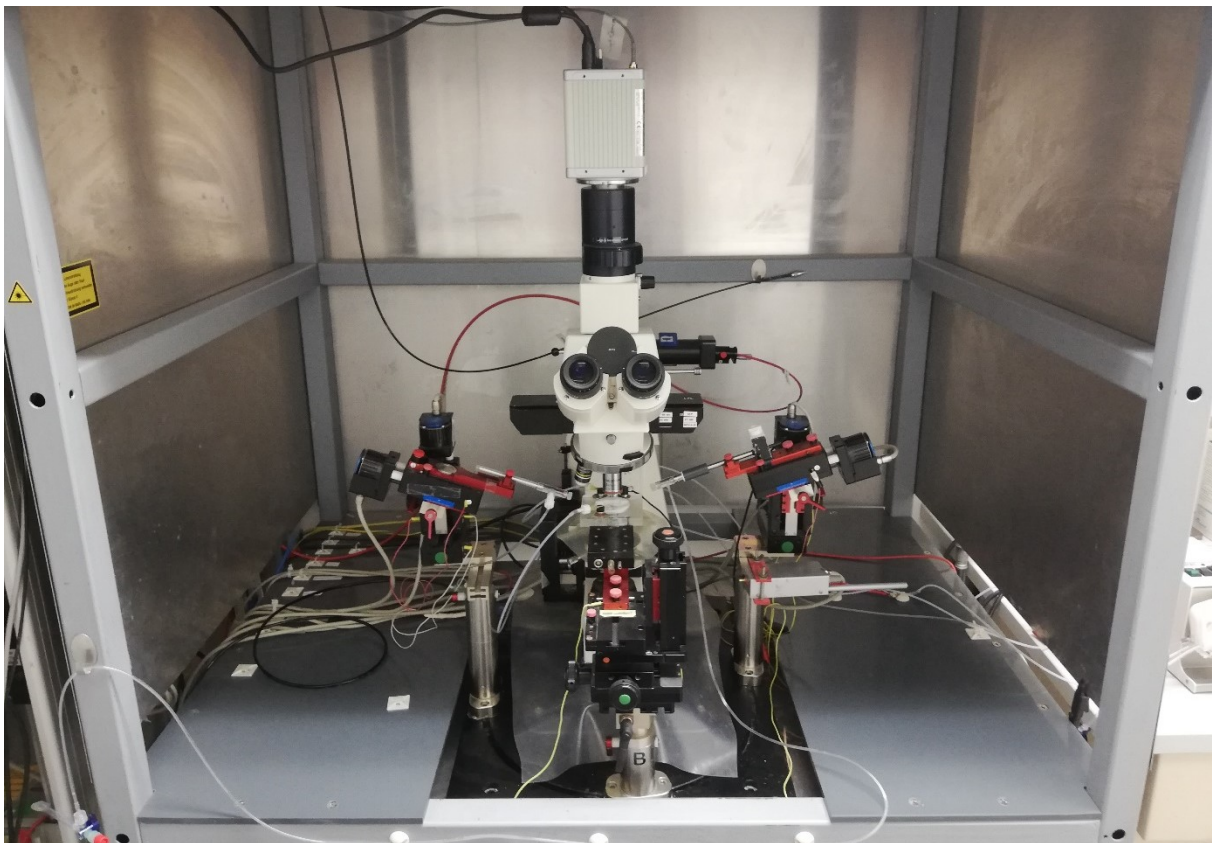


Abbildung 15: Das Infrarot-Videomikroskop im Patch-Clamp-Messstand

Abgebildet ist das auf dem pneumatisch schwingungsgedämpften Tisch montierte Infrarot-Videomikroskop. Seitlich sind links und rechts Mikromanipulatoren zu sehen, mit deren Hilfe Stimulationselektrode und Patchpipette auf dem in der Mikroskopierkammer befindlichen Hirnschnittpräparat platziert werden können. Das Schlauchsystem der aCSF-Zirkulation führt zu der an der rechten Bildseite außerhalb des Messstandes platzierten Rollenpumpe. Oben auf dem Mikroskop ist die CCD-Infrarotkamera montiert. Um den Messstand befindet sich der faradaysche Käfig, welcher auch an der dem Bediener zugewandten Seite verschließbar ist.

2.2.1.2 Infrarot-Videomikroskop

Die Visualisierung der in die Ableitkammer verbrachten Hirnschnitte erfolgte mittels eines Durchlichtmikroskops (Axioskop 50 FS, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Der Lichtstrahl der Lichtquelle wurde von unten durch eine Feld- und Kondensorblende sowie einen einschwenkbaren Infrarotfilter in die Kammer geführt (Abbildung 16). Es kamen zwei Objektive zum Einsatz: EC Plan-Neofluar 2,5x/0,075 $\infty/0$, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland und Lum Plan FI 60x/0,90 w $\infty/-$, Olympus AG, Tokio, Japan. Die Bildaufnahme erfolgte wechselweise über das Binokular des Mikroskops und die oben auf dem Mikroskop angebrachte CCD-Infrarotkamera (ORCA-Flash4.0 LT, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

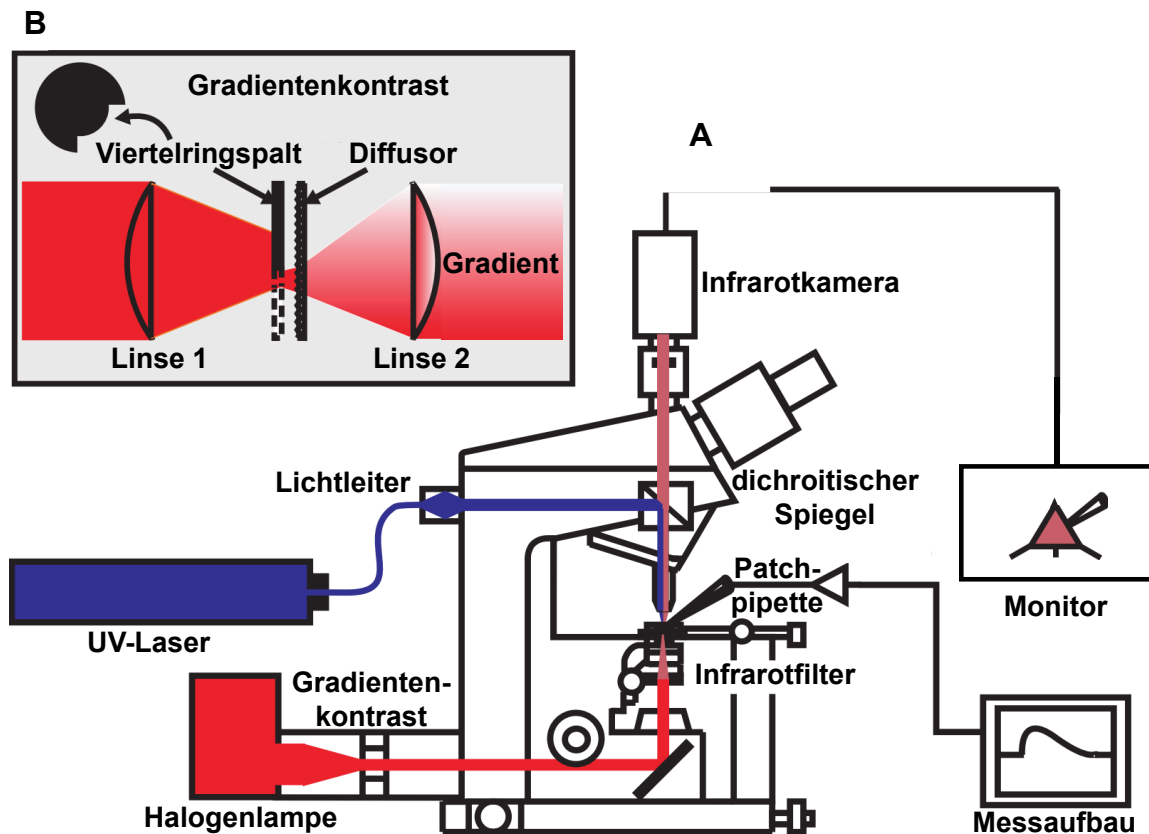


Abbildung 16: Aufbau des Infrarot-Videomikroskops

A Aufbau des Patch-Clamp-Mikroskops: Das Licht der Halogenlampe wird auf das im aCSF der Mikroskopierkammer liegende Hirnschnittpräparat fokussiert. Zur Betrachtung des Hirnschnittes durch die CCD-Infrarotkamera wird ein Infrarotfilter unter der Mikroskopierkammer in den Lichtweg eingeschwenkt. Die seitlich eingeschwenkte Patchpipette kann somit unter direkter optischer Kontrolle via Okular sowie unter indirekter Betrachtung via eines Kamerabildes auf einem Monitor über einen elektrisch gesteuerten Mikromanipulator präzise navigiert werden. Das durch die Patchpipette aufgenommene Signal wird zum Messaufbau weitergeleitet. Der für die Messungen photolytisch evozierter Ströme benutzte UV-Laser ist mit einem Lichtleiter am Mikroskop angeschlossen, der Laserstrahl wird mithilfe eines dichroitischen Spiegels retrograd in den Strahlengang eingebracht und erreicht den Hirnschnitt durch das Immersionsobjektiv.

B Zur weiteren Kontrasterhöhung wird ein Dodtscher Gradientenkontrast benutzt. Das Licht der Halogenlampe wird auf eine Viertelfeldblende gerichtet. Anschließend erzeugt ein Diffusor ein graduiertes Beleuchtungsfeld, welches durch eine weitere Linse kollimiert wird. Der Intensitätsunterschied entlang von Zellmembranen im Präparat verbessert den Kontrast im Lichtfeld dadurch, dass die Phasenmodulation in eine Amplitudendifferenz umgewandelt wird. Abbildung im Rahmen der Übersetzung aus dem Englischen verändert nach „Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices“ (Dodt et al., 2002).

Die Hirnschnittpräparate wurden zur Messung mittels einer großlumigen Glaspipette in die Mikroskopierkammer des jeweiligen Messstandes transferiert. Dort wurden sie durch einen mit Nylonfäden bespannten Platindrahtbügel („Grid“, Eigenanfertigung) am Kammerboden fixiert.

2.2.1.3 Pipetten

Die Messpipetten wurden mit einem Horizontalziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland) vor Ort selbst hergestellt. Dazu wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (100 mm Länge, 1,50 mm Außendurchmesser, 1,17 mm Innendurchmesser; Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland und Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) in einem zweistufigen Programm angefertigt und hitzepoliert. Durch Einstellung einzelner Parameter konnte sichergestellt werden, dass die Messpipetten einen Spitzendurchmesser von ca. 1 μm hatten und somit der Gleichstromwiderstand 4–7 M Ω betrug.

Die Pipetten wurden für die Messung von Glutamatrezeptor-vermittelten Strömen, Summenströmen und Strom-Spannungs-Kurven mit künstlicher Intrazellulärlösung (IZ) folgender Zusammensetzung befüllt, Konzentrationen jeweils in mM: Kaliumgluconat 130; D-(+)-Glucose 5; EGTA 0,5; HEPES 10; Magnesiumchlorid 2; Kalium-ATP 2; Natrium-GTP 0,3. Bei einem Teil der Experimente wurde 5 mM Lidocain-N-ethylchlorid zugesetzt, um Aktionspotentiale der gemessenen Zelle zu unterbinden. Der pH-Wert wurde mit 0,1 molarem KOH auf 7,3 titriert.

Da das Gleichgewichtspotential für Chloridionen, für welche der GABA_A-Kanal permeabel ist, nahe an der gewählten Klemmspannung von -70 mV liegt, wurde für die Aufzeichnung von GABA_A-Strömen eine Intrazellulärlösung mit hohem Chloridgehalt gewählt (Konzentrationen jeweils in mM: Cäsiummethansulfonat 100, Cäsiumchlorid 60, EGTA 0,2, HEPES 10, Kreatinphosphat 20, Lidocain 5,

Magnesiumchlorid 1; Gleichgewichtspotential für Chlorid ca. -20 mV; pH-Titration auf 7,3 mit 0,1 molarem KOH).

2.2.1.4 Patch-Clamp-Verstärker

Mit dem eingesetzten Patch-Clamp-Verstärker (SEC 10L, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) ist es möglich, mithilfe einer einzelnen Patchpipette die Spannung und die Ströme über die Zellmembran über die Zeit aufzuzeichnen. Im Current-Clamp-Modus wird dem Verstärker ein bestimmter Stromwert vorgegeben, den dieser über die Patchpipette in die Zelle leitet, die daraus resultierende Membranspannung wird parallel aufgezeichnet. Umgekehrt verhält es sich beim Voltage-Clamp-Modus, bei welchem ein Wert für das Membranpotential vorgegeben wird und der Verstärker den dazu nötigen Strom in die Zelle injiziert. Dabei alterniert das Gerät zwischen Spannungsmess- und Strominjektionsintervallen (dseVC; discontinuous single-electrode Voltage-Clamp). Hierbei liegt die Umschaltfrequenz in einer Größenordnung von mehreren zehntausend Hertz.

2.2.2 Ganzzelleitung und Stimulation

2.2.2.1 Etablierung der Ganzzelleitung

Die elektrophysiologischen Einzelzelleitungen erfolgten in der „Whole-Cell“-Konfiguration im Voltage- bzw. Current-Clamp-Modus des Patch-Clamp-Verstärkers. Um dies zu erreichen wurde die befüllte Pipette auf einen Pipettenhalter montiert, unter Druck gesetzt und in den Hirnschnitt eingebracht. Der permanente IZ-Ausstrom sorgte dafür, dass es nicht zu Anlagerungen von Hirngewebe an der Öffnung der Pipettenspitze kam. Beim Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran der jeweiligen Zielzelle wurde der Druck aus dem Pipetteninneren entlassen. Nach der Formung des Gigaseals („cell-attached mode“) wurde das Zellmembranstück zwischen Pipettenspitze und Zytosol durch einen kurzen Unterdruck innerhalb der Pipette eingerissen. Dadurch bildete sich durch die Pipettenspitze und über einen Silberchloriddraht im Inneren der Pipette eine leitende Verbindung ins Zellinnere aus, über welche Ströme und Spannungen über die Zellmembran gemessen wurden.

(„whole-cell mode“; Abbildung 17). Gleichzeitig können intrazellulär wirkende Pharmaka, sofern in der benutzten IZ enthalten, exklusiv in die abgeleitete Zelle eingebracht werden.

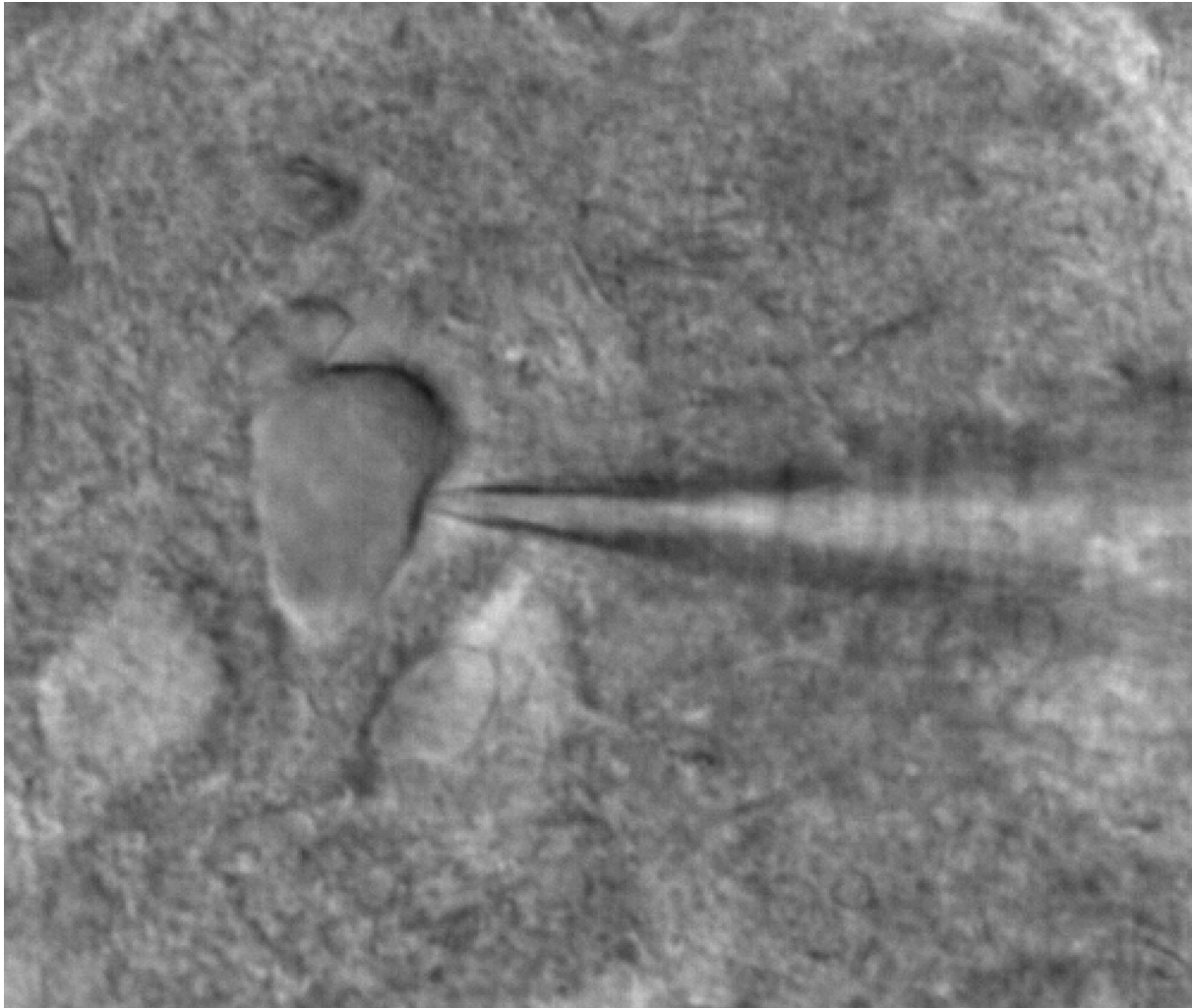


Abbildung 17: Infrarot-Mikroskopiebild nach Etablierung einer Ganzzellableitung

Aufnahme der CCD-Infrarotkamera durch das Olympus-Immersionsobjektiv. Im Akuthirnschnittpräparat sind in der Amygdala Zellen deutlich erkennbar, besonders prominent eine Pyramidenzelle mittig links im Bild. Rechts davon – in Projektion auf die Zelle – sieht man die Patch-Pipette, die mittels eines Giga-Seals an der Zelle haftet. Durch die Dodtsche Viertelfeldblende kommt es zu einem Phasenkontrast, welcher die Sichtbarkeit der dargestellten Strukturen verbessert.

2.2.2.2 Elektrophysiologie und Ableitparameter

Die Ganzzellableitung kann auch als elektrisches Schaltbild dargestellt werden, bei welchem die einzelnen Bestandteile der Konfiguration als elektrische Bauteile interpretiert werden (Abbildung 18).

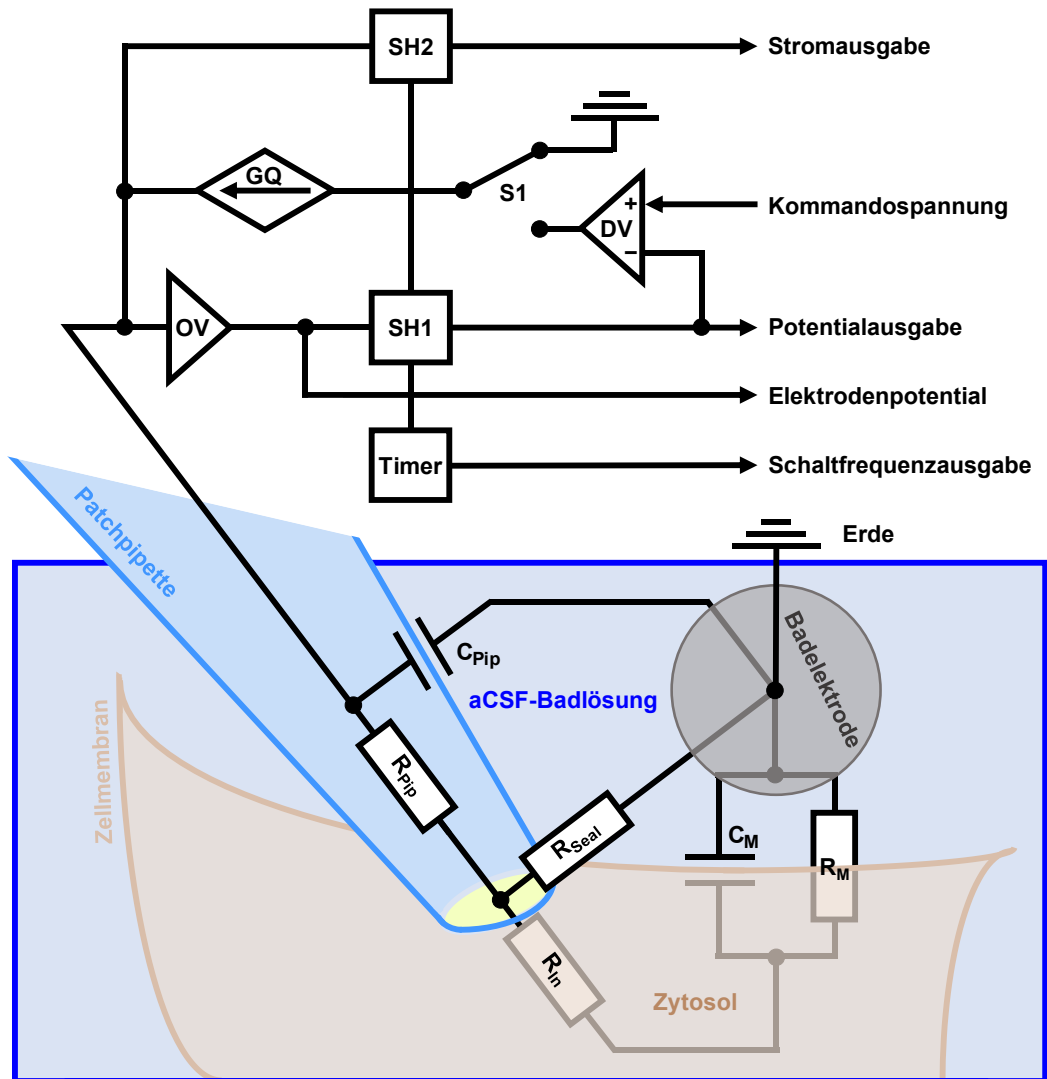


Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer Ganzzelleableitung

Wegen der Wirkung der gläsernen Pipettenwand als Isolator zwischen zwei leitenden Flüssigkeitsoberflächen ist diese somit als Kondensator C_{Pip} zu betrachten. Die leitende Verbindung in das Zellinnere wird durch die Widerstände R_{Pip} (bedingt durch das kleine Pipettenlumen und R_{in} (abhängig von der weiteren Stenosierung durch Zellstrukturen) beeinflusst, dazwischen existieren Leckströme durch R_{Seal} nach extrazellulär. Die Zellmembran an sich hat leitende (R_M) und kapazitive (C_M) Eigenschaften. Die Erdung der umgebenden Badlösung geschieht durch eine Ag/AgCl-Badelektrode. Das Spannungssignal wird nach jeder Injektion durch den Operationsverstärker OV verstärkt. Am Ende jedes Messintervalls fällt die an R_{Pip} anliegende Spannung auf vernachlässigbare Werte ab. In diesem Moment zeichnet die Sample-and-Hold-Schaltung SH1 das Membranpotential V_M auf, um sie zum einen auszugeben und zum anderen in einer Art Feedbackschleife in einen Differentialverstärker DV einzuspeisen. Zu Beginn des Strominjektionsintervalls springt der Schalter S1 auf den Differentialverstärker um und führt das aus dem Membranpotential und der vorgegebenen Kommandospannung errechnete Signal zur gesteuerten Stromquelle GQ, welche das Stromsignal für die Injektion ausgibt. Dieses wird gleichzeitig in einer weiteren Sample-and-Hold-Schaltung SH2 gegen Ende der Injektionsphase ausgelesen und der resultierende Wert ausgegeben.

So lässt sich die isolierende Pipettenwand zwischen zwei leitenden Lösungen als Kondensator mit der Kapazität C_{Pip} beschreiben, welcher durch Umladeprozesse

Strominjektionen behindert und daher bei jeder einzelnen durch Kalibrierung der Coarse Capacity Compensation (grobe Kapazitätskompensation) des Patch-Clamp-Verstärkers exakt ausgeglichen wird. Gleichzeitig wirkt die Flüssigkeitssäule im Inneren der Pipette für axial passierende Ströme durch sein geringes Lumen an der Spitze als starker Widerstand R_{Pip} . Auch dieser wird durch Justierung am Verstärker noch vor dem Zellkontakt kompensiert. Vom Inneren der Pipettenspitze aus gibt es noch zwei weitere Widerstände, welche allerdings veränderlich sind und großen Einfluss auf die Ableitqualität haben. Einerseits ist ein hoher Widerstand durch den Seal nach extrazellulär zur Verhinderung von störenden Leckströmen wichtig, andererseits sollte der Widerstand in Richtung Zellinneres möglichst gering sein. Durch Ablagerung von Membranfetzen und anderen organischen Strukturen an der Pipettenspitze kann die Konduktivität an dieser Stelle erheblich eingeschränkt sein. Dieser sogenannte Eingangswiderstand R_{In} bildet in Summe mit dem Pipettenwiderstand R_{Pip} den Serienwiderstand R_S . Die Zellmembran selbst lässt sich als RC-Glied verstehen, da sie zwar durch ihre Undurchlässigkeit und geringe Dicke als Isolator zwischen zwei leitenden Flüssigkeitsoberflächen kapazitive Eigenschaften hat, jedoch durch membranständige Ionenkanäle eine gewisse Leitfähigkeit für Ladungsträger aufweist. Weil die an der jeweiligen Komponente abfallende Spannung in Serienschaltungen proportional zu ihrem Gleichstromwiderstand ist, liegt demnach nur $\frac{R_M}{R_M+R_S}$ der durch die Pipette applizierte Spannung an der Zellmembran an.

Um die Stabilität der Ableitbedingungen zu überwachen, überprüft man sie mithilfe eines sogenannten Testpulses. Dabei wird die Zelle für 200 ms um 10 mV hyperpolarisiert und der resultierende Stromfluss aufgezeichnet (Abbildung 19). Der Stromfluss hat am Anfang der Hyperpolarisation seinen maximalen Wert I_{Max} , lässt im Laufe der fortschreitenden Aufladung der Zellmembran schnell nach und nähert sich I_{Offset} , einem von C_M unabhängigen Wert an. I_{Offset} entspricht der Summe der Ströme, welche über R_{Seal} und R_M zwischen intra- und extrazellulär fließen. Die Membrankapazität lässt sich somit wegen $C_M = \frac{\int I_{Max}}{U}$ aus I_{Max} errechnen.

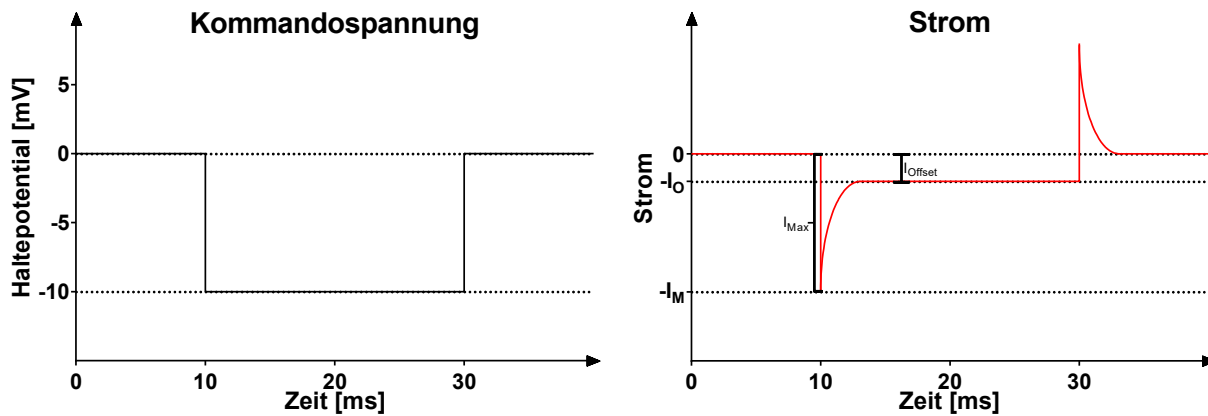


Abbildung 19: Darstellung von Spannung und Strom des Testpulses

Der Testpuls ist eine 20 ms dauernde rechteckförmige Hyperpolarisation um 10 mV. Noch vor dem Ansteuern der Zelle wird der Testpuls gegen die Zirkulationslösung appliziert und der resultierende Stromfluss gemessen. Anschließend wird die Kurve mithilfe der Kapazitäts- und Widerstandskompensation des Verstärkers genullt, sodass der Effekt von R_{Pip} und C_{Pip} für die weiteren Messungen vernachlässigt werden kann. Nach Etablierung der Ganzzelleableitung ist I_{offset} die Summe aus I_{seal} und I_M . Die initiale maximale Stromstärke I_{Max} ist über die Beziehung $I_{Max} = \frac{U_{rest}}{R_{In}}$ reziprok proportional zu der Größe von R_{In} und somit ein guter Indikator für die Ableitungsqualität der aufgezeichneten Stromkurven.

2.2.2.3 Elektrische Stimulation

Zur elektrischen Stimulation des vitalen Hirnschnitts konnten über eine bipolare konzentrische Stimulationselektrode aus Wolfram (Außendurchmesser 200 μm , Innendurchmesser 100 μm , SNEX-100X, Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) durch das Stimulationsgerät (isolated stimulator Type 2533, Devices Instruments, Welwyn Garden City, England) mit variabler Spannung (0–100 V) und Stimulationsdauer (0,05–1000 ms) Spannungspulse abgegeben werden.

Dazu wurde die Spitze der bipolaren Stimulationselektrode auf die Capsula externa dorsal der Amygdala gesetzt. Stimuliert wurde mit bis zu 45 Volt für eine Dauer von bis zu 0,2 ms. Dadurch wurden die dort zur Amygdala verlaufenden afferenten Fasern depolarisiert, welche das resultierende Aktionspotential in die auf die Zielzelle übertragenden präsynaptischen Endigungen fortleiten. In diesen führt ein durch die Depolarisation bewirkter Kalziumeinstrom zur Transmitterfreisetzung (Abbildung 20).

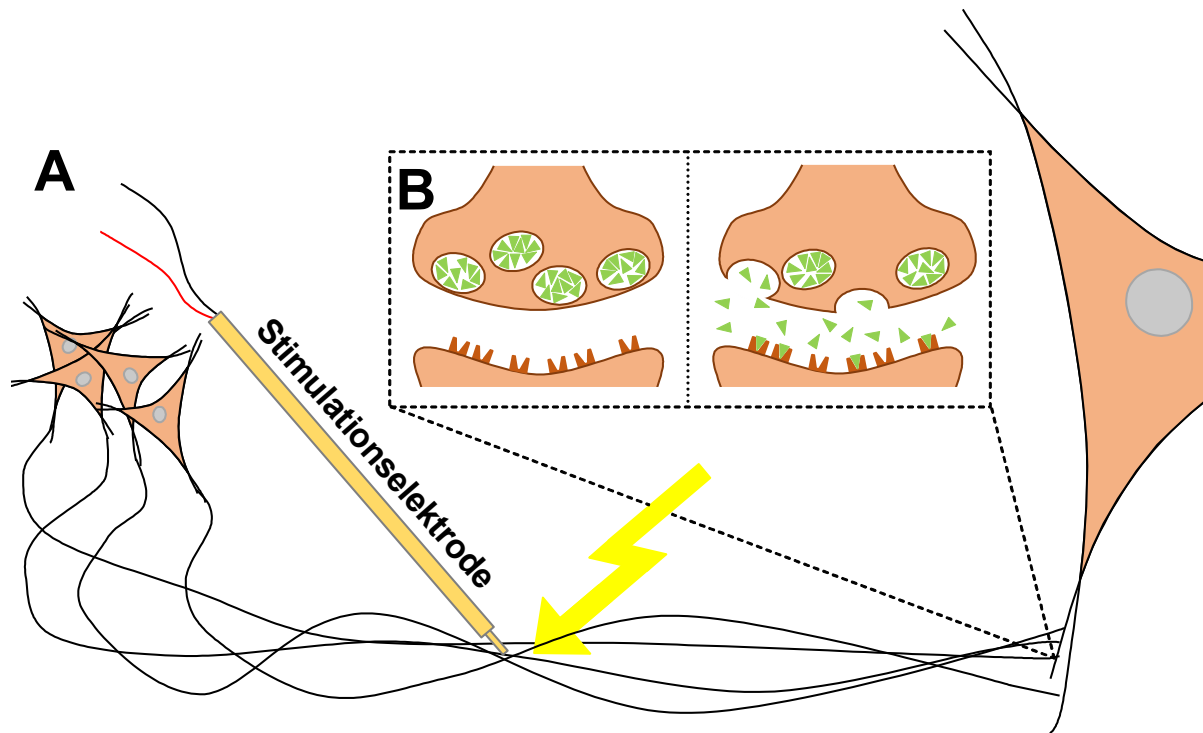


Abbildung 20: Elektrische Stimulation

A Mittels einer bipolaren Wolframelektrode werden zur Amygdala afferente Fasern in der Capsula externa stimuliert. Die Aktionspotentiale bewegen sich antegrad in Richtung der abgeleiteten Zelle. **B** Dort kommt das Aktionspotential an der präsynaptischen Endigung an und bewirkt durch einen Calciumioneneinstrom die Fusion von mit Neurotransmitter beladenen Vesikeln mit der Zellmembran. Die ausgeschütteten Neurotransmitter diffundieren zur postsynaptischen Membran und interagieren mit den von dieser präsentierten Rezeptoren.

2.2.2.4 Photolytische Stimulation

Zur photolytischen Stimulation wurde der zirkulierenden aCSF ein mittels einer speziellen Estergruppe inaktivierter Neurotransmitter beigefügt. Die eingesetzten Substanzen „caged GABA“ (O-CNB-Caged-GABA; gamma-Aminobutyric Acid, alpha-Carboxy-2-Nitrobenzyl Ester, Trifluoroacetic Acid Salt) und „caged Glutamate“ (MNI-caged-L-glutamate; 4-Methoxy-7-nitroindoliny-caged-L-glutamate) verhalten sich in veresterter Form neurophysiologisch inaktiv. Durch Spaltung der Esterbindung durch Licht im UV-Wellenlängenbereich zwischen 300 und 380 nm kommt es zur Abspaltung des jeweiligen Neurotransmitters, welcher am Ort der Freisetzung an postsynaptischen Rezeptoren binden kann (Abbildung 21). Dazu wurde durch einen dichroitischen Spiegel im Strahlengang ein Laserstrahl durch das Objektiv auf das Schnittpräparat gerichtet. Der Strahl der Wellenlänge 355 nm wurde von einem gepulsten UV-Laser erzeugt (Series 3500 UV Laser System, DPSS

Lasers Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) via Lichtleiter über eine Lasereinkopplung (Rapp OptoElectronic GmbH, Wedel, Deutschland) in das Mikroskop eingespeist. Die Laserpulse wurden alle 30 Sekunden für 10 ms auf den Schnitt abgegeben. Der Laserstrahl wurde auf die Dendriten der abgeleiteten Zelle gerichtet und die Laserintensität so eingestellt, dass eine Stromantwort mit einer Amplitude von ca. 50–250 pA abgeleitet werden konnte.

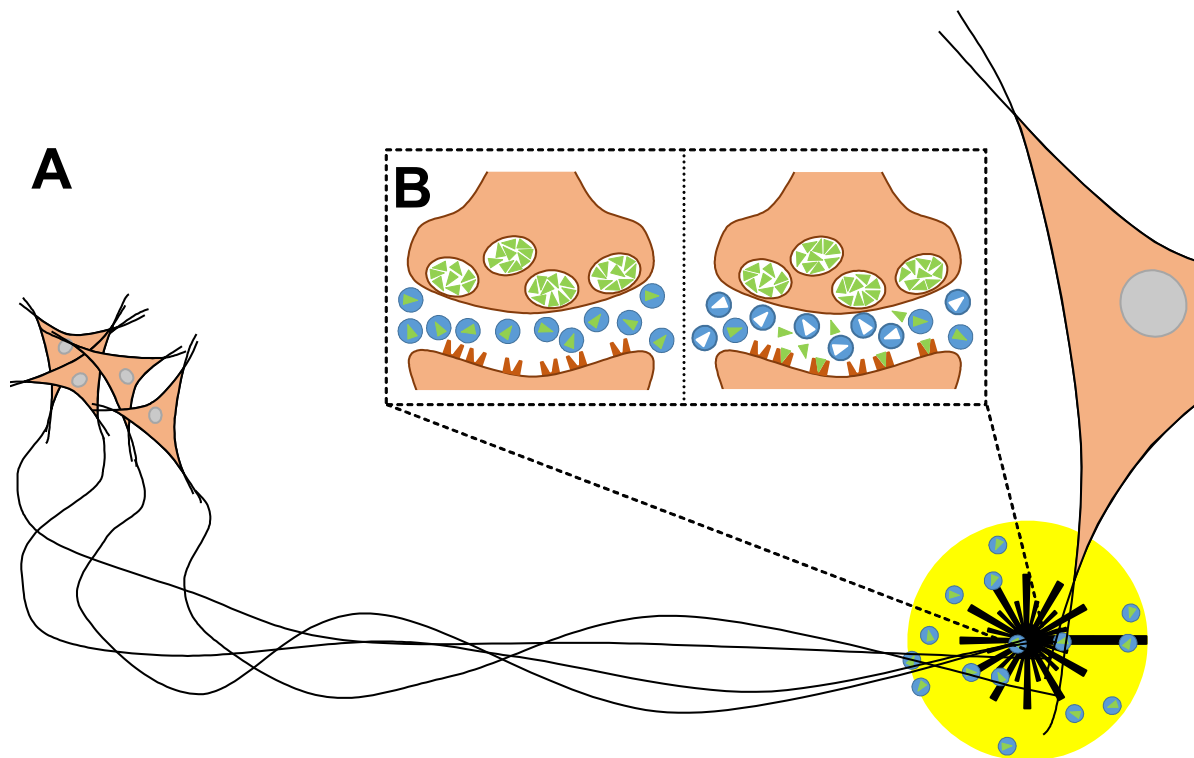


Abbildung 21: Photolytische Stimulation

A Neurotransmitter werden in veresterter Form der Zirkulationslösung beigegeben. In der Nähe der Zelle wird die Esterbindung durch einen kurzen Laserpuls der Wellenlänge 355 nm hydrolysiert. **B** Die so freigesetzten Neurotransmittermoleküle gelangen durch Diffusion an die postsynaptische Membran und interagieren dort mit den Rezeptoren.

2.2.3 Postsynaptische Ströme

Die durch Stimulation hervorgerufenen PSCs (post-synaptic currents) wurden im Voltage-Clamp-Mode des Patch-Clamp-Verstärkers abgeleitet. Dabei wird die Zelle auf einem eingestellten Membranpotential gehalten und der dazu benötigte Stromfluss vom Verstärker zur Zelle gemessen. Zu Beginn einer Stimulationsaufnahme wurde die Zelle vor jeder Stimulation durch einen Testpuls für 200 ms um 10 mV hyperpolarisiert, um anhand der resultierenden Kurve Aussagen

über die Stabilität der Membraneigenschaften und Qualität der Ableitungsverhältnisse treffen zu können. Im Anschluss erfolgte Stimulation der Zelle und Messung der postsynaptischen Ströme.

Im Falle eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials kommt es zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Um die Zelle weiterhin auf dem eingestellten Membranpotential zu halten, wird durch den Patch-Clamp-Verstärker ein negativer Strom durch die Pipette in die Zelle injiziert. Demnach sind exzitatorische postsynaptische Ströme (excitatory postsynaptic currents; EPSCs) bei Patch-Clamp-Aufnahmen im Voltage-Clamp-Mode als negative Ausschläge bei den Stromkurven zu sehen. Im Umkehrschluss erscheinen inhibitorische postsynaptische Ströme (inhibitory postsynaptic currents; IPSCs) als positive Ausschläge.

Wichtige Größen der Kinetik des PSCs sind das Ausgangsniveau, die Amplitude, die Steigung, die Deaktivierungszeitkonstante und der Ladungstransfer. Das Ausgangsniveau ist die Stromstärke vor und nach der Messung. Dieses wird zum Zwecke der Berechnung der weiteren Kinetikparameter von der Stromkurve subtrahiert, sodass ein konstantes Ausgangsniveau auf die x -Achse des Plots verschoben wird.

Die Amplitude beschreibt die Differenz zwischen dem maximalen Ausschlag der Stromkurve und dem Ausgangsniveau. Die Stimulationsintensität wurde so gewählt, dass die Amplitude der Kontrollmessung im Bereich um 100 pA lag.

Die Steigung ist das Gefälle der Stromkurve zwischen dem Ausgangsniveau und der Spitze des Ausschlags. Dazu wurde die lineare Steigung zwischen den Punkten, an denen die Kurve 20 % beziehungsweise 80 % des maximalen Ausschlags erreicht hat, mittels $\frac{\Delta y}{\Delta x}$ berechnet.

Nach der Spitze des Ausschlags kehrt der Graph in einer Art asymptotischer Kurve zum Ausgangsniveau zurück. Dieser Kurvenverlauf lässt sich computergestützt mit Exponentialfunktionen approximieren. Die Deaktivierungszeitkonstante (engl. „Decay“) bezeichnet die Zeit, nach der sich die berechnete Exponentialfunktion wieder auf 63 % und somit $\frac{1}{e}$ der Amplitudenhöhe an das Ausgangsniveau angenähert hat.

Der Ladungstransfer ist die durch die postsynaptischen Ströme durch die Membran transferierte Ladung. Da diese nach Nullen des Ausgangsniveaus äquivalent zur durch die Pipette injizierten Ladung ist, kann sie deswegen als Fläche zwischen der Kurve und dem Ausgangsniveau berechnet werden.

Bei den elektrisch evozierten postsynaptischen Strömen (eEPSCs) resultiert die elektrische Stimulation in einem Stimulationsartefakt, welches unmittelbar vor dem resultierenden postsynaptischen Strom zu sehen ist (Abbildung 22).

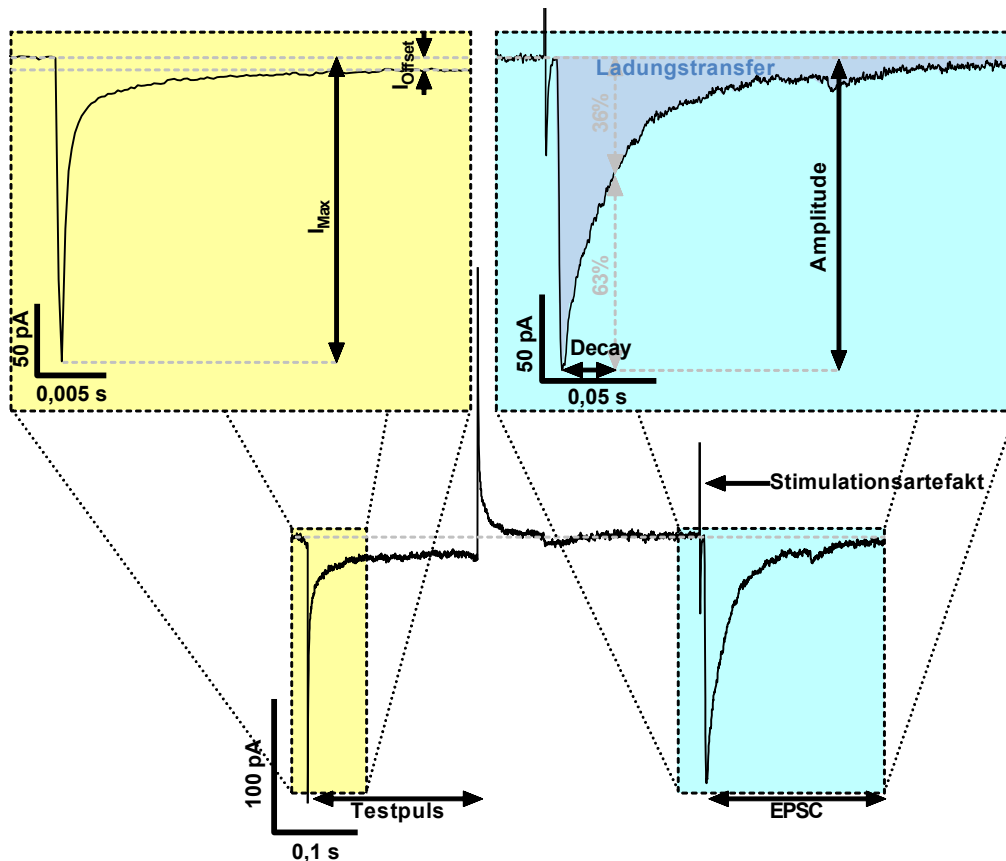


Abbildung 22: Beispielhafte Messspur bei elektrisch evozierten Strömen

Unten im Bild ist eine EPSC-Messspur zu sehen, zuerst erfolgte der Testpuls für 200 ms, im Anschluss daran die elektrische Stimulation. Links oben – vergrößert und umskaliert – der Beginn des Testpulses mit den eingezeichneten Stromstärken I_{max} und I_{offset} . Rechts oben ebenfalls vergrößert und umskaliert der Zeitraum der elektrischen Stimulation mit Stimulationsartefakt und EPSC. In blau zu sehen ist das der transferierten Ladung entsprechende negative Integral des EPSCs. Außerdem zu sehen die Deaktivierungszeitkonstante „Decay“ und die maximale Amplitude des postsynaptischen Stroms.

Bei photolytisch evozierten Strömen fehlt, wie in Abbildung 23 zu sehen, dieses Stimulationsartefakt. Zudem kommt es durch die – im Vergleich zur synaptischen Übertragung lokal ungezielten – photolytische Freisetzung zu einem längeren Intervall, in welchem Neurotransmitter zur Postsynapse diffundieren und an deren Rezeptoren binden. Dies führt zu einer breiteren Spitze des Ausschlags und längeren Deaktivierungszeitkonstante als bei der elektrischen Stimulation.

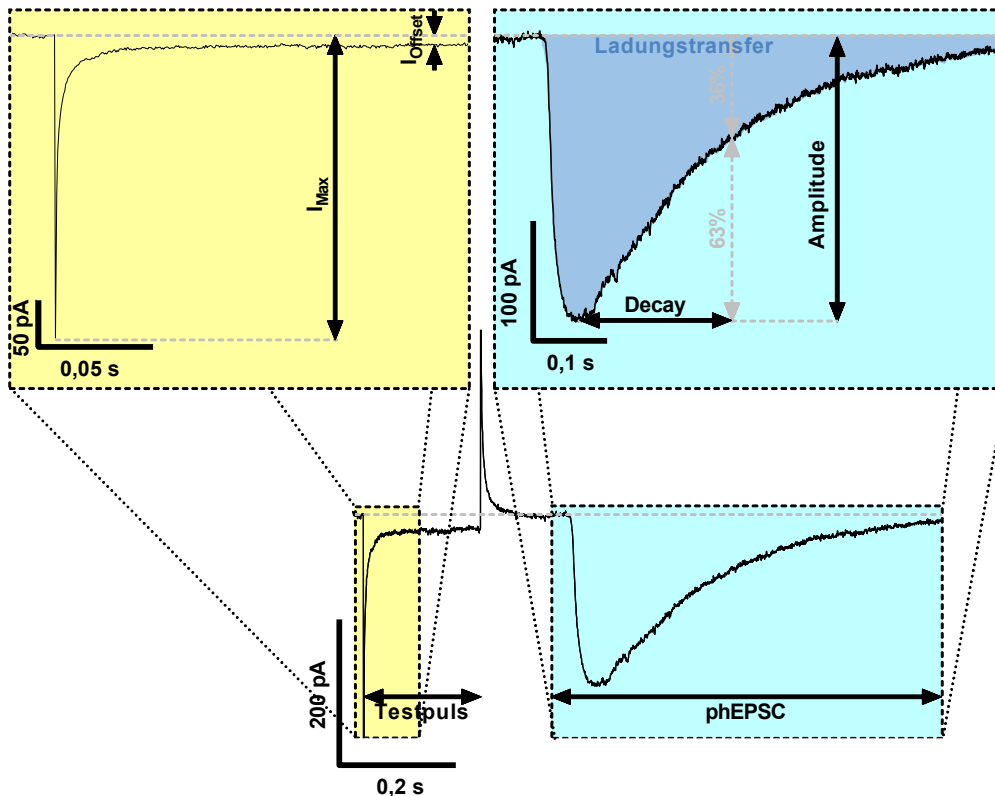


Abbildung 23: Beispielhafte Messspur bei photolytisch evozierten Strömen

Unten im Bild analog zu Abbildung 22 eine Messspur bei photolytischer Stimulation. Auch hier zunächst die Hyperpolarisation durch den Testpuls, anschließend der pC. Bei der photolytischen Stimulation entsteht kein Stimulationsartefakt. Oben im Bild Testpuls und photolytisch evozierter Strom mit den Kinetikparametern Ladungstransfer, Decay und Amplitude.

2.2.4 Pharmakologische Isolation spezifischer Rezeptor-vermittelter Ströme

Um die Wirkung von ϵ -Aminocaprinsäure auf die spezifischen ligandengebundenen Rezeptoren unterscheiden zu können, wurden je nach Fragestellung dem zirkulierenden Volumen verschiedene spezifische Rezeptorantagonisten hinzugegeben. Durch gezielte Auswahl konnten auf diese Weise postsynaptische Ströme aufgezeichnet werden, die hauptsächlich nur von einer Rezeptorart vermittelt wurden.

2.2.4.1 Summenströme

Zur Messung einer Stromantwort ohne Ausschaltung einzelner Rezeptorgruppen wurden die Summenstrommessungen ohne die Zugabe von Rezeptorantagonisten aufgenommen. Die dabei entstehende Aufnahme bildet eine Mischantwort von maßgeblich GABA_A-, GABA_B-, NMDA- und AMPA-Rezeptoren ab. Während der Messungen wurden die Zellen auf einem Membranpotential von -70 mV gehalten.

2.2.4.2 GABA_A Rezeptor-vermittelte Ströme

Zur Isolierung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme wurden NMDA-Rezeptoren mittels 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (AP5, $50 \mu\text{M}$), AMPA-Rezeptoren mittels 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX, $5 \mu\text{M}$) und GABA_B-Rezeptoren mittels CGP 35348 ($200 \mu\text{M}$) oder CGP 55845 ($5 \mu\text{M}$) inhibiert. Die spezifischen Antagonisten wurden der zirkulierenden aCSF beigefügt.

Für die Amygdala konnte gezeigt werden, dass Glycinrezeptor-vermittelte Ströme dort im Vergleich zu GABA_A-Rezeptor-vermittelten Strömen eine vernachlässigbare Rolle spielen (Ranft et al., 2004).

Während die Öffnung eines GABA_A-Kanals physiologischerweise einen Chlorideinstrom und damit eine Hyperpolarisation zur Folge hätte, sorgt die hohe intrazelluläre Chloridkonzentration unter diesen Messbedingungen für einen Chloridausstrom und führt somit in der Realität zu einem EPSC. Zur Erhöhung der Verständlichkeit der Messdaten wird jedoch in dieser Dissertationsschrift die Bezeichnung GABA_A-Rezeptor-vermittelte inhibitorische postsynaptische Ströme (inhibitory postsynaptic currents; GABA_A-IPSCs) beibehalten.

2.2.4.3 AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme

Zur Aufnahme von Ionenströmen durch AMPA-Rezeptoren wurden die Rezeptorantagonisten AP5 und CGP wie bereits beschrieben eingesetzt, zur Blockade von GABA_A-Rezeptoren kam (-)-Bicucullin-Methiodid (Bicucullin, $20 \mu\text{M}$) in der Zirkulationslösung zum Einsatz. Die AMPA-Rezeptor-vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (excitatory postsynaptic currents; AMPA-EPSCs) erfolgten bei einem Haltepotential von -70 mV.

2.2.4.4 NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme

Um ausschließlich Ströme durch den NMDA-Rezeptor messen zu können, wurden auch hier die entsprechenden spezifischen Antagonisten Bicucullin, CGP und NBQX verwendet. Um NMDA-EPSCs hervorzurufen, wurden die Zellen vor jeder Stimulation ausgehend von ihrem Haltepotential von -70 mV um 30 mV depolarisiert, um die rezeptoreigene Hemmung durch Magnesium aufzuheben.

2.2.5 Paired-Pulse Facilitation und Paired-Pulse Depression

Zwei kurz aufeinander folgende elektrische Stimulationen präsynaptischer Terminalen können zu einer Modulation der zweiten postsynaptischen Stromantwort führen. Je nach Synapse und Stimulationsintensität können zwei verschiedene Mechanismen dazu beitragen, dass die zweite postsynaptische Antwort sich von der ersten unterscheidet.

So kann es sein, dass das zweite Aktionspotential durch Erschöpfung des präsynaptischen Vesikelvorrats oder durch Inaktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu einer geringeren Ausschüttung von Neurotransmittern führt.

Jedoch ist es auch möglich, dass das zweite Aktionspotential die Präsynapse erreicht, bevor sich die präsynaptische Konzentration an Kalziumionen normalisiert hat. In diesem Falle kann es nach der zweiten Stimulation zu höheren intrazellulären Kalziumspiegeln kommen und dadurch eine stärkere Vesikelexozytose begünstigen (Stuart und Redman, 1991).

Je nachdem, welcher der konträr wirkenden Mechanismen überwiegt, ist der resultierende zweite PSC größer oder kleiner als der erste. Ist die postsynaptische Antwort des zweiten Aktionspotentials stärker ausgeprägt als die erste, entspricht das einer Paired-Pulse Facilitation (PPF), im Falle einer schwächeren zweiten Antwort spricht man von einer Paired-Pulse Depression (PPD). Es wurden pro Interstimulusintervall (ISI) jeweils vier Messungen durchgeführt und das resultierende Verhältnis zwischen der Amplitude der zweiten und ersten Stimulation (Paired-Pulse Ratio; PPR) aus diesen Messungen gemittelt. Die Interstimulusintervalle betragen 50 , 100 , 150 , 200 , 250 , 300 und 1000 ms.

2.2.6 Miniatur-EPSCs

An präsynaptischen Endigungen werden auch ohne artifizielle Stimulation spontan Neurotransmitter ausgeschüttet. So entstehen auch in Hirnschnitten spontane Aktionspotentiale, die bei ihrer Ankunft zu einer regulären Exozytose von Vesikeln führen. Diese bewirken bei Patch-Clamp-Aufnahmen je nach Transmitterart entweder spontan auftretende exzitatorische oder inhibitorische postsynaptische Ströme (spontaneous excitatory/inhibitory postsynaptic currents; sEPSCs/sIPSCs). Allerdings kommt es auch ohne ankommende Aktionspotentiale gelegentlich zur Membranfusion einzelner Vesikel, die nach Diffusion zur Postsynapse sogenannte miniaturisierte exzitatorische bzw. inhibitorische postsynaptische Ströme (miniature excitatory/inhibitory postsynaptic currents; mEPSCs/mIPSCs) auslösen. Um ausschließlich diese Ströme einzelner Vesikel messen zu können, wird die Fortleitung von Aktionspotentialen in den afferenten Fasern dadurch verhindert, dass zur Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle 1 μ M Tetrodotoxin zur Zirkulationslösung hinzugefügt wird. Auch mEPSCs und mIPSCs lassen sich nach Rezeptorart differenzieren. In dieser Arbeit wurde die spontane Freisetzung von Glutamatvesikeln mithilfe von pharmakologischer Isolation des AMPA-Rezeptors durch die beschriebenen Blockersubstanzen gemessen. In separaten Experimenten wurden die isoliert durch den GABA_A-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme spontaner GABA-Vesikelexozytosen gemessen, hierbei wurde neben den spezifischen Blockersubstanzen der anderen GABA_A-Messreihen wieder die bereits erwähnte artifizielle Intrazellulärlösung mit hoher Chloridkonzentration verwendet. Die Messungen der Miniatur-EPSCs/IPSCs wurden im Voltage-Clamp-Modus aufgenommen. Hierbei wurde der Stromfluss pro Messung 330 Sekunden lang vom Verstärker in die Zelle aufgenommen. Vor und nach diesen Messspuren wurde die Ableitqualität durch einen Testpuls überprüft. Während der Aufnahme wurden die Zellen jeweils bei einem Membranpotential von -70 mV gehalten.

2.2.7 Strom-Spannungs-Kurven

Im Zuge der Aufnahme einer Strom-Spannungs-Kurve wurde das Verhalten des Membranpotentials während und nach eines via Patchpipette applizierten 500 ms dauernden Rechteck-Strompulses verschiedener Stärke gemessen. Die Aufzeichnungen erfolgten im Bridge-Mode des Patch-Clamp-Verstärkers, welcher bei variabler Stromabgabe zur Zelle die resultierende Membranspannung detektierte.

Beginnend mit -90 pA wurden in Inkrementen von 10 pA aufsteigend insgesamt 23 Messpuren aufgezeichnet. Dabei kommt es mitunter bei den depolarisierenden Strominjektionen zu Aktionspotentialen, sofern eine intrazelluläre Lösung ohne Lidocain verwendet wird.

2.2.8 Auswertung und Statistik

Der Patch-Clamp-Verstärker war über ein Interface (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corp., Port Washington, USA) am Messrechner angeschlossen, die Steuerung und Aufzeichnung wurde mit dem Programm Pulse (HEKA Pulse v8.50, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) realisiert. Die mit Heka Pulse aufgenommenen Daten wurden mit IGOR Pro 5.04B (WaveMetrics, Inc., Portland, OR, USA) und dem Toolkit "Patcher's Power Tools" (Dr. Francisco Mendez und Frank Würriehausen, Max-Planck-Institut für biophysikalischen Chemie, Göttingen, Deutschland) mithilfe eigens entwickelter Makros ausgewertet. Hierbei wurden die Aufnahmen minütlich gemittelt und die daraus resultierenden Datenkurven automatisiert nach den Parametern maximale Amplitude, durchschnittliche Steigung, Deaktivierungszeitkonstante und Ladungsübertrag analysiert. Archivierung und weitere statistische Auswertung fand mit den Programmen Microsoft Excel 2016 (Microsoft Inc., Redmond, CA, USA) und GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) statt. Sofern nicht anders spezifiziert, wurden die Daten mit dem Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ auf Signifikanz überprüft. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Kombination mit dem Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt (standard error of the mean; SEM).

2.3 Voltage-sensitive Dye Imaging (VSDI)

Während die Patch-Clamp-Technik der Goldstandard für die Untersuchung und Quantifizierung der postsynaptischen Ströme und biophysikalischen Membraneigenschaften ist, lassen sich dabei Reizweiterleitungsprozesse nur schwer örtlich auflösen. Um den Effekt verschiedener Substanzen auf die Weiterleitung im Hirnschnittpräparat darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit mit dem spannungsabhängigen Farbstoff (voltage-sensitive dye) Di-4-ANEPPS gearbeitet.

Diese Farbstoffe sind in der Lage, sich in die Zellmembran einzulagern und fluoreszieren erst nach Bindung an die Membran. Als potentiometrische Farbstoffe verändern sie je nach der über der Zellmembran liegenden Potentialdifferenz ihr Fluoreszenzverhalten. So lässt sich die Erregungsausbreitung über die Änderung der Fluoreszenz räumlich und zeitlich darstellen.

2.3.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Di-4-ANEPPS

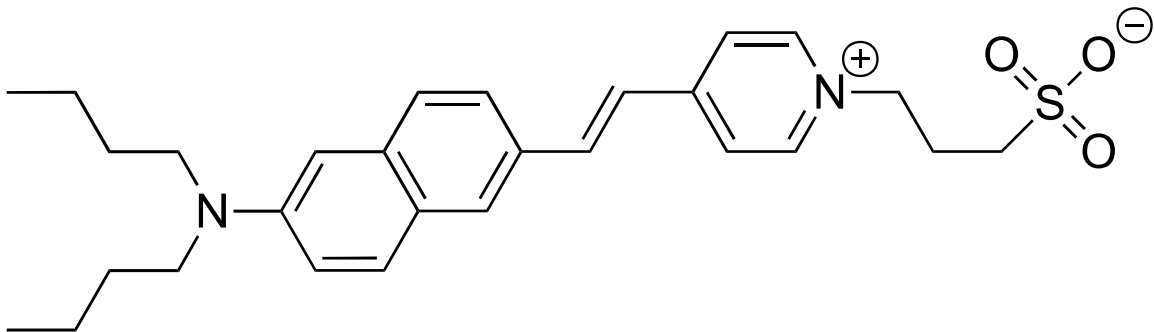


Abbildung 24: Der Fluoreszenzfarbstoff Di-4-ANEPPS

Der Farbstoff Di-4-ANEPPS, am 3-Sulfopropyl-Ende gut als Zwitterion zu erkennen.

Der eingesetzte spannungsabhängige Fluoreszenzfarbstoff 4-(2-(6-(Dibutylamino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)pyridiniumhydroxid (Di-4-ANEPPS) vermag als Zwitterion (Abbildung 24) an Phospholipidmembranen zu binden. Erst nach Bindung an die Membran hat er fluoreszierende Eigenschaften, dabei wird ankommendes Licht im Bereich um 480 nm absorbiert und im Bereich um 685 nm wieder emittiert. Abhängig von der Membranspannung verschiebt sich der Wellenlängenbereich des Absorptions- und Emissionsspektrums, was nach Ausfiltern eines Teils der Emissionskurve als Intensitätsänderung messbar wird (siehe Abbildung 25 **A** und **B**).

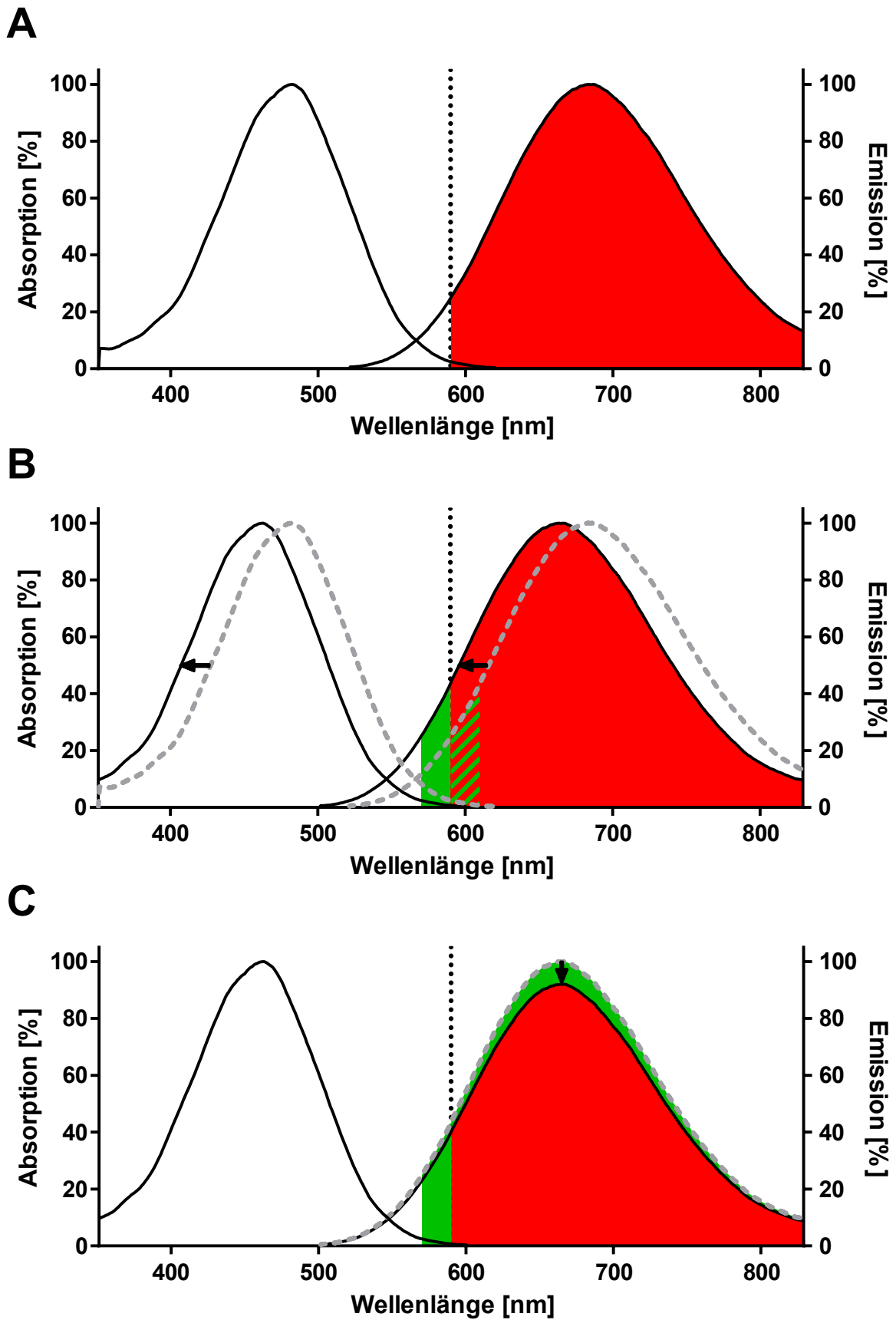


Abbildung 25: Absorptions- und Emissionsverhalten von Di-4-ANEPPS

A Dargestellt sind die Absorptions- (links) und Emissionskurve (rechts) von Di-4-ANEPPS nach Bindung an eine Phospholipidmembran. Durch Ausfiltern des links von der gestrichelten vertikalen Linie liegenden Bereichs mit

einem 590-nm-Langpassfilter wird nur der rot eingefärbte Bereich von der Kamera als emittiertes Signal aufgenommen, wobei die Fläche mit der detektierten Intensität korreliert. **B** Durch Depolarisation der neuronalen Zellmembran kommt es zu einer Verschiebung der Fluoreszenzspektren. Dadurch gelangt die vormals vom Sensor erfasste, grün schraffierte Fläche in einen ausgefilterten Wellenlängenbereich und trägt somit zu einer der grün eingefärbten Fläche entsprechenden Intensitätsabnahme bei. **C** Darüber hinaus führt die Depolarisation der Zellmembran zu einer direkten Reduktion der Emissionsintensität des eingelagerten Di-4-ANEPPS. Beide Effekte zusammen führen zu einer kombinierten, stärkeren Intensitätsreduktion (grün eingefärbt).

Zudem verringert sich bei zunehmender Depolarisation der Zellmembran die Intensität der Emission direkt, siehe Abbildung 25 **C** (Loew et al., 1992). Dadurch lassen sich durch Abbildung der Änderung der lokalen Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F$) Gebiete mit erhöhtem Anteil depolarisierter Zellmembranen detektieren. Durch eine hohe Bildwiederholfrequenz kann die zeitliche Ausbreitung solcher Exzitationswellen sichtbar gemacht werden.

2.3.2 Präparation und Färbung der Hirnschnitte für VSDI-Messungen

Die Präparation der Hirnschnitte erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei den Patch-Clamp-Versuchsreihen, nur wurde für Präparation und Inkubation eine andere, saccharosehaltige aCSF verwendet. Daraufhin wurden die Hirnschnitte in mit 7,5 μM Di-4-ANEPPS und Carbogengas versetzter aCSF gefärbt, anschließend ruhten sie erneut für weitere 30 Minuten im Wärmeband in carbogenierter Standard-aCSF.

2.3.3 Messaufbau

Für die VSDI-Aufnahmen wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (BX51WI, Olympus AG, Tokyo, Japan) in Verbindung mit einer CCD-Kamera (MiCAM02 HR, SciMedia Ltd., Costa Mesa, CA, USA) und einem Fluoreszenzobjektiv (XLFlour4X/340, Olympus AG, Tokyo, Japan) verwendet. Das Licht der Halogenlampe (MHAB-150W-100V, Moritex Corporation, Saitama, Japan) wurde zunächst durch einen optischen Bandpassfilter (480–550 nm) auf den anregenden Wellenlängenbereich reduziert und mithilfe eines dichroitischen Spiegels, welcher in diesem Spektrum größtenteils reflexiv wirkt, durch das Objektiv in die Versuchskammer geleitet. Das durch den Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht mit einer Wellenlänge von größtenteils über 600 nm gelangte auf demselben Weg zurück zum Strahlteiler, der in diesem

Spektralbereich hauptsächlich transmissive Eigenschaften hat. Ungewollt transmittiertes Anregungslicht wurde mittels eines 590-nm-Langpassfilters aus dem Strahlengang entfernt. Anschließend erreicht das Licht die Okularlinse, die es auf die CCD-Kamera fokussiert. Abbildung 26 stellt diesen Aufbau schematisch dar.

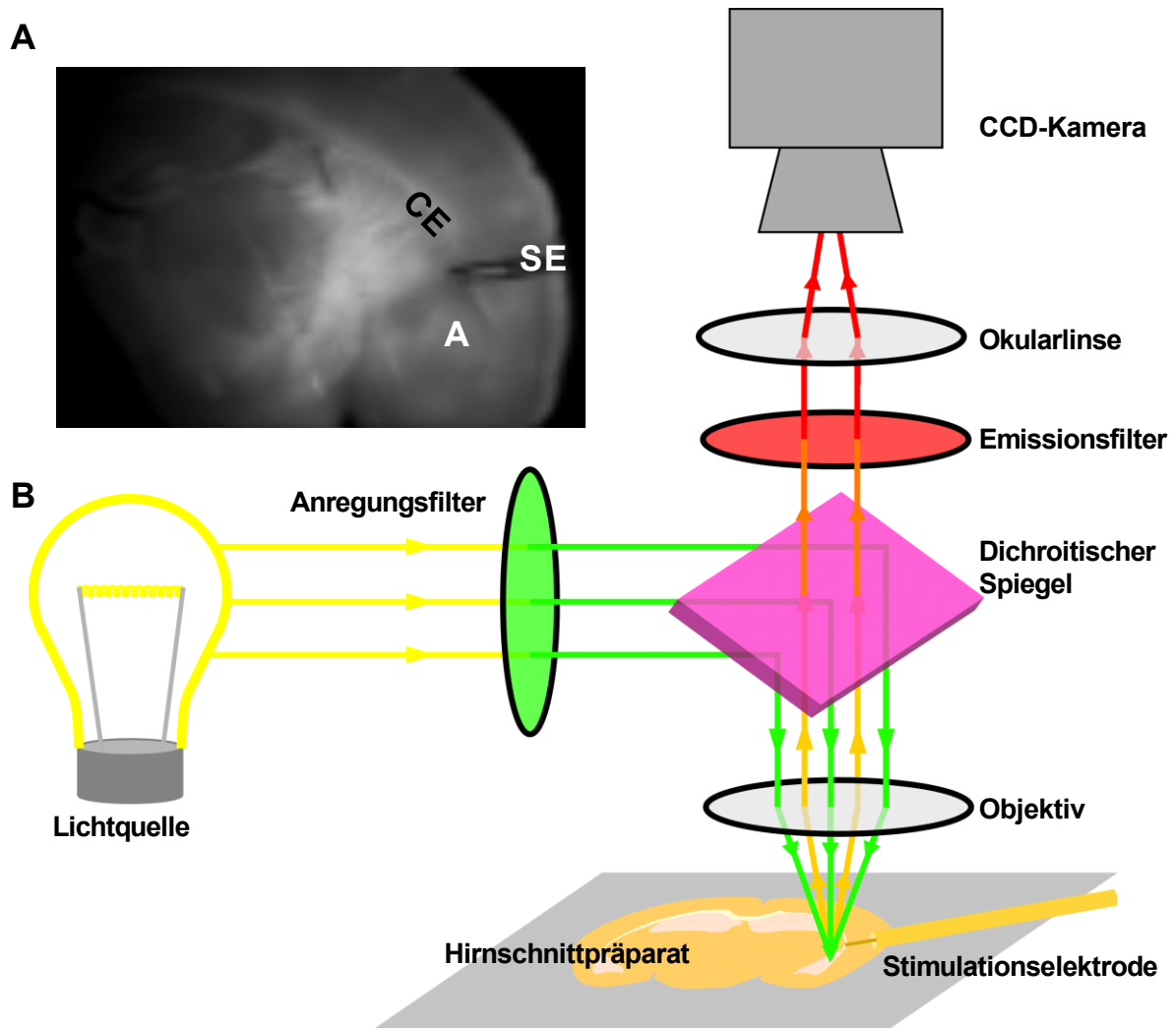


Abbildung 26: VSDI-Mikroskopie

A Bild eines coronaren Maushirnschnittes in der Messkammer des VSDI-Setups. Von rechts kommend ist die auf der Capsula externa (CE) platzierte bipolare Wolfram-Stimulationselektrode (SE) zu sehen. Direkt unterhalb ist die Amygdala (A) zu erkennen. **B** Schematischer Aufbau des VSDI-Messstandes: Das durch den 480–550-nm-Bandpassfilter transmittierte Licht der Halogenlampe trifft auf den dichroitischen Spiegel, von welchem es durch das Objektiv fokussiert auf den Hirnschnitt trifft. Das langwelligere, durch Di-4-ANEPPS modulierte Licht kann den Spiegel unabgelenkt durchdringen. Im Anschluss daran werden Frequenzen unter 590 nm durch den Emissionsfilter ausgelöscht, das verbleibende Licht wird von der Kamera aufgenommen.

2.3.4 Durchführung der VSDI-Messungen

Das gefärbte Hirnschnittpräparat wurde mit einem Grid am Boden der mit rezirkulierender aCSF durchflossenen Mikroskopierkammer fixiert. Die Flussrate des geschlossenen Systems betrug 5–8 ml/min. Eine bipolare Wolfram-Stimulationselektrode wurde auf der Capsula externa platziert. Alle 15 Sekunden wurde durch das Steuerungsprogramm (WinLTP 1.11b, WinLTP Ltd., Bristol, Vereinigtes Königreich) mit dem Stimulationsgerät (isolated stimulator Type 2533, Devices Instruments, Welwyn Garden City, England) ein Rechteckpuls abgegeben. Die Stimulationsdauer bewegte sich im Bereich von 100–200 μ s, die Spannung lag zwischen 3 V und 10 V. Während jeder elektrischen Stimulation wurde mithilfe der CCD-Kamera ein etwa 1,1 s langer Film aufgezeichnet.

2.3.5 Kompensation artifizieller Inhibition bei VSDI-Messungen

Eine Versuchsreihe der VSDI-Experimente wurde unter Teilantagonisierung der GABA_A-Rezeptoren mit 0,6 μ M Bicucullin in der Zirkulationslösung durchgeführt. Dies geschah, um zwei pro-inhibitorische Effekte der VSDI-Methode zu kompensieren. Zum einen werden im Rahmen der Hirnschnittpräparation lange, exzitatorische Fasern deutlich mehr geschädigt als kurze GABA-erge Interneurone, was zu einem Überwiegen der Inhibition im Präparat führt (Stepan et al., 2012). Zum anderen führt eine direkte Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch Di-4-ANEPPS zur Hemmung der Aktivität neuronaler Netzwerke (Mennerick et al., 2010). Die Anwendung von niedrigdosiertem Bicucullin verbesserte die Signalausbreitung und führte in keinem der Experimente zu epileptiformen Erregungszuständen im Hirnschnitt.

2.3.6 Auswertung und Statistik

Bei jeder Stimulation wurde ein Film von 512 Bildern der Größe 88 x 60 Pixel bei einer Bildwiederholungsrate von jeweils 454,5 Hz aufgenommen. Jedes Pixel bildete dabei ein 36,4 μ m x 40,0 μ m großes Gebiet auf dem Hirnschnitt ab. Jeweils acht im Abstand von jeweils 15 Sekunden aufgenommene Filme wurden zu einer repräsentativen Aufnahme zusammengemittelt.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu vor der Stimulation spiegelt die neuronale Aktivität wider. Aufnahme und initiale Verarbeitung der Daten geschah auf dem Messrechner mit dem Programm BrainVision 13.04.20 (Brain Vision LLC, Morrisville, USA). Um das Bildrauschen zu minimieren, wurde nach Mittelung von jeweils zwei Aufnahmen ein 3 x 3 Pixel großer räumlicher Filter mit einem drei Einzelbilder messenden zeitlichen Filter kombiniert.

Die schnelle, depolarisationsvermittelte Amplitude der Fluoreszenzintensität (fast depolarization-mediated VSDI signal, FDS) wird als Größe für die exzitatorische Exzitabilität interpretiert. Dabei wurde die basolaterale Amygdala als region of interest (ROI) festgelegt und nur Daten aus einem manuell selektierten 3 x 3 Pixel messendem Quadrat dieses Bereichs des Hirnschnittes berücksichtigt. Der Verlauf des FDS wurde wie bei der Analyse der Patch-Clamp-Messungen anhand der entsprechenden Kinetikparameter ausgewertet (Abbildung 27). Die weitere Verrechnung der Daten wurde mit Matlab (Matlab 2008b, The MathWorks, Inc., Natick, USA) realisiert. Dabei wurde der FDS-Verlauf jedes Experiments auf das Mittel der Kontrollmessungen normiert.

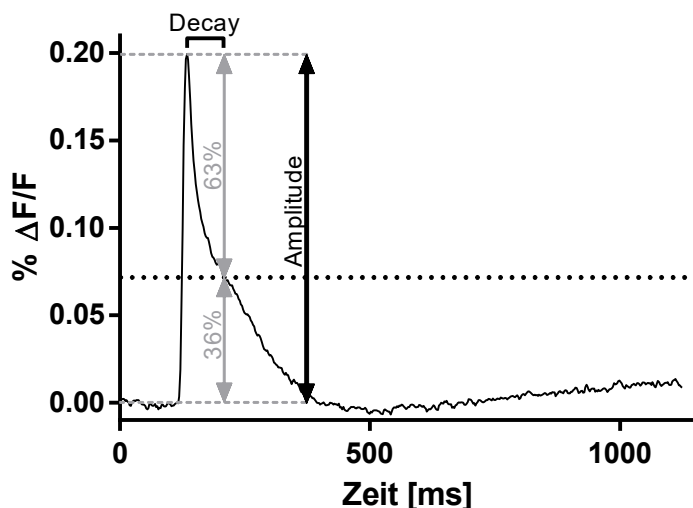


Abbildung 27: Beispielhafte Messspur eines VSDI-FDS

Abgebildet ist die Fluoreszenzänderung des FDS in % ($\% \Delta F/F$) in der basolateralen Amygdala. Nach elektrischer Stimulation afferenter Fasern kommt es in der region of interest (ROI) zu einem rapiden Anstieg der Fluoreszenz. Die Differenz der Fluoreszenz zwischen Baseline und dem höchsten Punkt der Kurve wird als Amplitude ausgewertet. Die Deaktivierungszeitkonstante (Decay) lässt sich berechnen, indem eine Exponentialfunktion an den Kurvenabschnitt nach dem maximalen Ausschlag approximiert wird. Die Dauer, bis diese Exponentialfunktion den $\frac{1}{e}$ -fachen Wert der Amplitude erreicht hat, ist die Deaktivierungszeitkonstante.

Die maximale Amplitude sowie die Deaktivierungszeitkonstante (Decay) wurden analog zur Auswertung der Patch-Clamp-Versuchsreihen analysiert. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 7.03, als Signifikanztest diente bei den VSDI-Messungen eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 EACA hemmt die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala

Um das nach Studienlage geringere epileptogene Potential von ϵ -Aminocapronsäure gegenüber Tranexamsäure zu untersuchen, wurden VSDI-Experimente durchgeführt, bei welchen das FDS in der basolateralen Amygdala nach elektrischer Stimulation der Capsula externa mittels einer bipolaren Elektrode ausgewertet wurde. Nach einer stabilen Kontrollmessung wurde der zirkulierenden aCSF 1 mM EACA hinzugefügt und die Messung wiederholt. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Amplitude der FDS auf im Mittel 80,3 % des Kontrollniveaus (Abbildung 28). Eine Erhöhung der EACA-Konzentration auf 3 mM bewirkte keine weitere signifikante Reduktion der FDS-Amplitude.

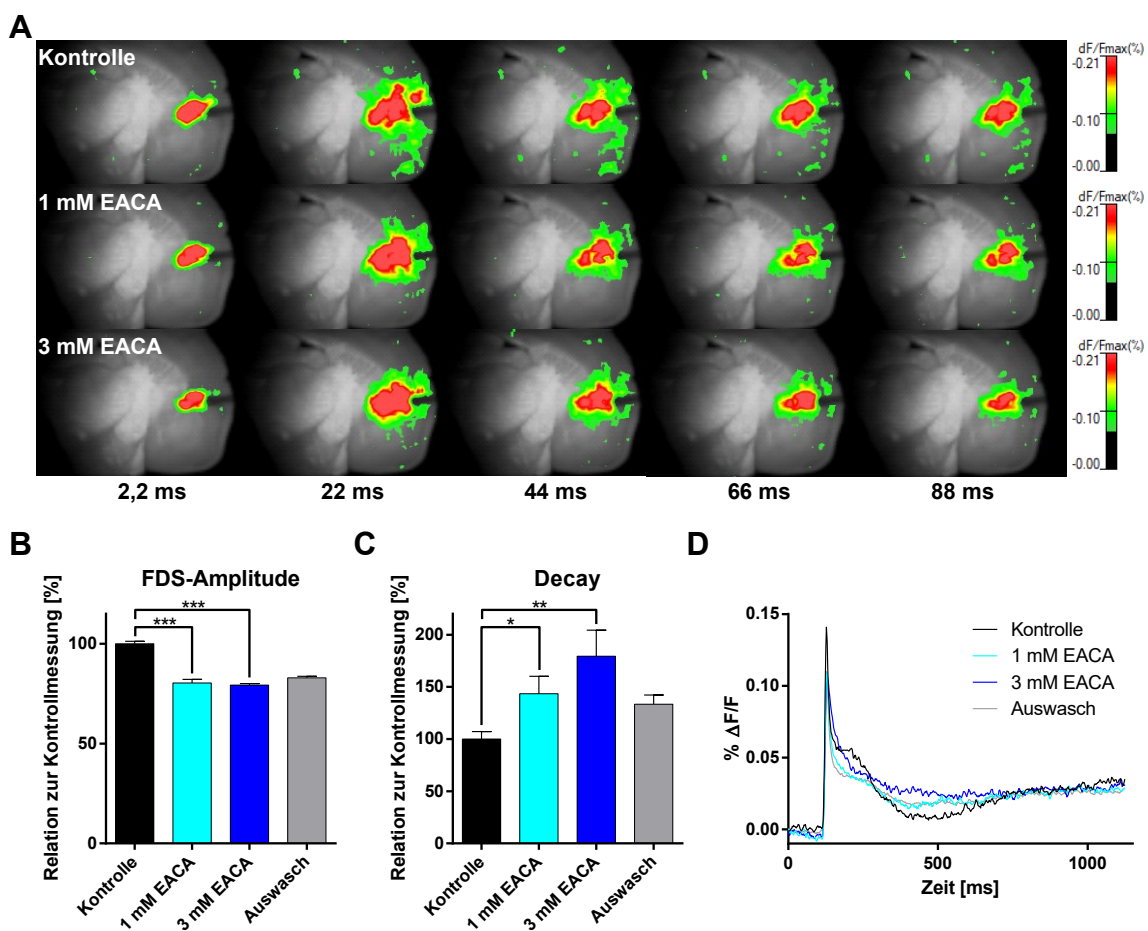


Abbildung 28: Der Effekt von ϵ -Aminocapronsäure auf die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala

In dieser VSDI-Messreihe wurde die Erregungsausbreitung durch die basolaterale Amygdala nach Stimulation der Capsula externa mittels einer bipolaren Wolframelektrode aufgezeichnet. Der zirkulierenden aCSF wurden keine spezifischen Rezeptorantagonisten zugesetzt. Die Messfilme wurden zu Beginn, nach Zusatz von 1 mM EACA, von 3 mM EACA und nach Auswaschen des Medikaments mit frischer aCSF aufgenommen. **A** Einzelbilder der resultierenden Filme eines repräsentativen Experiments. **B** Es zeigte sich unter 1 mM EACA eine Reduktion der Amplitude der FDS auf $80,3 \% \pm 1,8 \%$ ($n = 7$; $p < 0,001$) des Kontrollniveaus. Eine Erhöhung der EACA-Konzentration auf 3 mM resultierte in einer Amplitude von $79,3 \% \pm 0,8 \%$ ($n = 7$; $p < 0,001$) des Ausgangswertes. Zwischen den Amplituden der beiden Konzentrationen ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,888$). **C** Die Deaktivierungszeitkonstante des FDS verlängerte sich unter Einfluss von 1 mM EACA auf $156,2 \% \pm 23,5 \%$ ($n = 5$; $p = 0,049$) des Ausgangsniveaus. Nach Erhöhung der Medikamentenkonzentration auf 3 mM betrug der Decay $197,7 \% \pm 32,4 \%$ ($n = 5$; $p = 0,005$). Der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen war nicht signifikant ($p = 0,507$). **D** Der zeitliche Verlauf des FDS in der region of interest.

Die Deaktivierungszeitkonstante des FDS wurde durch 1 mM EACA auf 156,2 % des Ausgangsniveaus verlängert. Die Erhöhung der Medikamentenkonzentration auf 3 mM führte mit 197,7 % zu einer weiteren, jedoch gegenüber 1 mM EACA nicht signifikanten Ausdehnung der Deaktivierungszeit. Während der gesamten Versuchsreihe war keine generalisierte Erregungsausbreitung im Hirnschnittpräparat im Sinne eines epileptiformen Geschehens erkennbar.

3.2 EACA führt unter Teilantagonisierung von GABA_A-Rezeptoren zu einer Inhibition der Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala

Um die Wirkung von ϵ -Aminocapronsäure auf die Erregungsausbreitung möglichst unabhängig von der inhibitorischen Wirkung der Hirnschnittpräparation und der Di-4-ANEPPS-Färbung betrachten zu können, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die GABA_A-Rezeptoren im Hirnschnittpräparat zunächst durch die Zugabe einer geringen Dosis Bicucullin ($0,6 \mu\text{M}$) in das zirkulierende aCSF-Volumen zum Teil blockiert. Darunter kam es nach Zugabe von 1 mM EACA zu einer Reduktion der FDS-Amplitude auf 70,1 % des Ausgangsniveaus, eine Erhöhung der Konzentration auf 3 mM bewirkte keine weitere Veränderung (FDS-Amplitude 69,4 % des Ausgangsniveaus; Abbildung 29).

Auch in dieser Versuchsreihe führte ϵ -Aminocapronsäure zu einer Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstante des FDS: Bei einer Konzentration von 1 mM stieg sie auf 121,8 % des unter Kontrollbedingungen aufgenommenen Wertes. Eine Erhöhung auf 3 mM hatte keinen weiteren Einfluss auf den Decay. Die Wirkung von

0,6 μM Bicucullin führte weder allein noch nach Zugabe von EACA zur Ausbildung epileptoformer Reizweiterleitungszustände im Hirnschnittpräparat.

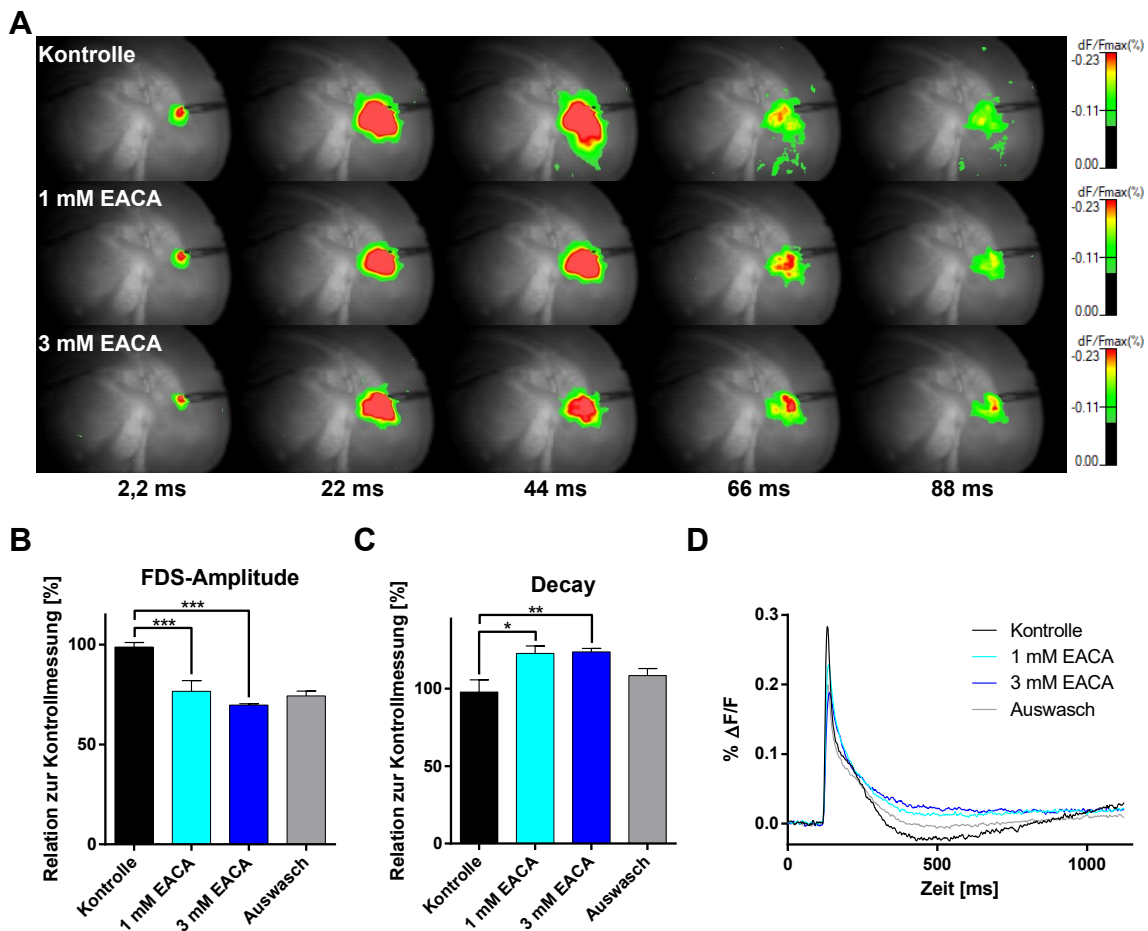


Abbildung 29: Der Effekt von ϵ -Aminocapronsäure auf die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala unter GABA_A -Teilantagonisierung

Der Ablauf dieser Messreihe erfolgte analog zu Abbildung 28, jedoch wurde vor der Kontrollmessung ein Teil der GABA_A -Rezeptoren mit 0,6 μM Bicucullin blockiert. **A** Einzelbilder der Messfilme unter Kontrollbedingungen, sowie unter 1 mM und 3 mM EACA. **B** Nach Zugabe von 1 mM EACA zeigte sich eine Reduktion der Signalstärke im Zielbereich auf 70,1 % \pm 0,4% ($n = 5$; $p < 0,001$). Eine Erhöhung der EACA-Konzentration auf 3 mM hatte keinen weiteren signifikanten Effekt auf die Signalintensität (69,4 % \pm 0,9%; $n = 5$; $p < 0,001$). **C** Der Decay des FDS verlängerte sich unter 1 mM EACA auf 121,8 % \pm 7,5% ($n = 4$; $p < 0,046$) des Ausgangsniveaus. Auch hier bewirkte eine Steigerung der Konzentration auf 3 mM keine weitere statistisch signifikante ($p = 0,734$) Veränderung der Deaktivierungszeitkonstante (124,8 % \pm 0,5%; $n = 4$; $p = 0,001$). **D** Der zeitliche Verlauf des FDS in der region of interest.

3.3 EACA hat keinen Effekt auf die biophysikalischen Membraneigenschaften

Als nächstes wurde untersucht, ob ϵ -Aminocapronsäure einen Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Pyramidenneurone innerhalb der basolateralen Amygdala hat. Dazu wurden Strom-Spannungs-Beziehungen (IV-Kurven) aufgenommen und das Ruhemembranpotential analysiert. Dies wurde vor und nach dem Zusatz sowie nach dem Auswaschen von EACA durchgeführt. Dabei konnten bei Ruhemembranpotential, Strom-Spannungs-Kurven und Aktionspotentialfrequenz bei Depolarisation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 30 A–D).

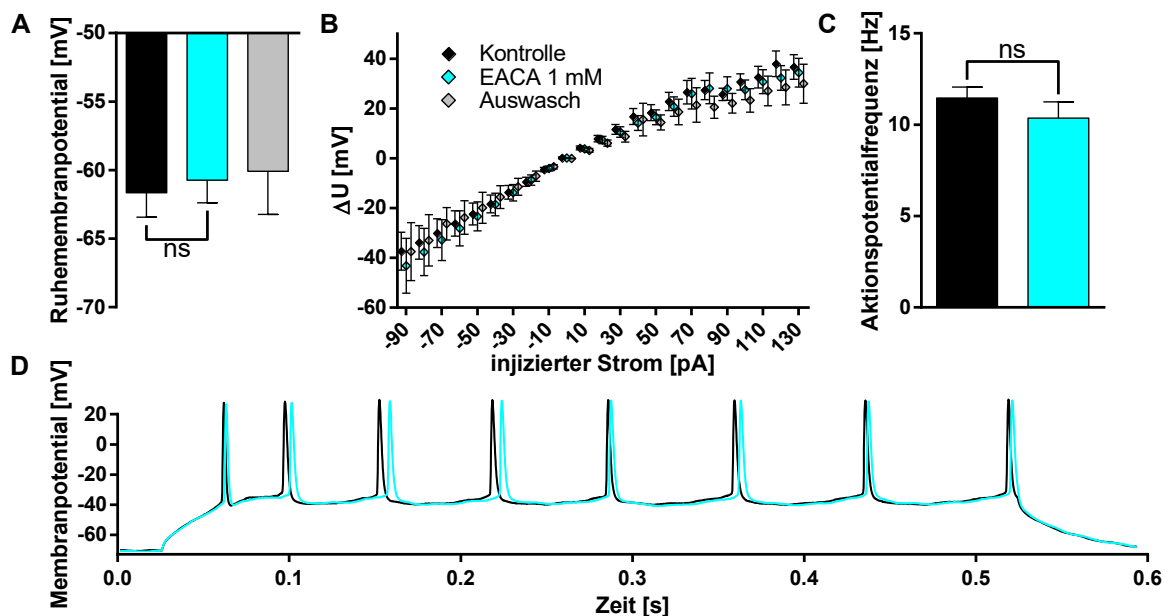


Abbildung 30: Der Effekt von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf die biophysikalischen Membraneigenschaften

Bei Neuronen in der basolateralen Amygdala wurde das Ruhemembranpotential jeweils bei Etablierung der Ganzzelleitung und 30 Minuten nach Applikation von 1 mM EACA gemessen. Zur Messung befand sich der Patch-Clamp-Verstärker im Bridgemode, die Intrazellulärlösung auf Kaliumgluconatbasis wurde verwendet. **A** Das Ruhemembranpotential unterschied sich unter EACA-Einfluss mit $-60,73 \pm 1,7$ mV ($n = 26$) nicht von den Kontrollbedingungen ($-61,7$ mV $\pm 1,8$ mV, $n = 26$; $p = 0,477$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). **B** Bei sonst gleichem Versuchsablauf Messung von Strom-Spannungs-Kurven im Current-Clamp-Modus. Dabei Injektion von 500 ms dauernden Strompulsen von -90 pA bis $+130$ pA in Inkrementen von 10 pA und mit Abständen von je 2 s unter Messung des resultierenden Membranpotentials. Zu sehen sind beispielhaft Messspuren unter Kontrollbedingungen sowie die aus 7 Experimenten ausgewerteten Strom-Spannungs-Beziehungen. Dabei wurde die resultierende Spannungsdifferenz zum Ruhemembranpotential gegen die injizierte Stromstärke geplottet. Zur besseren Lesbarkeit wurden die drei Gruppen horizontal leicht versetzt angeordnet. Es ergab sich für keine der Stromstärken ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($n=7$, $p_{\min} = 0,437$). **C** Die Frequenz der Aktionspotentiale bei Depolarisation mit 130 pA zeigte keine signifikante Änderung durch Zugabe von EACA in die Badlösung ($22,9$ Hz $\pm 0,61$ respektive $20,7$ Hz $\pm 0,89$; $n = 11$; $p = 0,297$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). **D** Abbildung einer typischen Messung der Aktionspotentialfrequenz vor und nach Applikation von 1 mM EACA.

3.4 EACA hemmt die synaptische Transmission von Summenströmen

In Patch-Clamp-Experimenten mit elektrischer Stimulation ohne der aCSF zugegebene spezifische Antagonisten wurde der Effekt von ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme untersucht. Diese sind als eine Art Mischantwort zu verstehen, da alle postsynaptischen Neurotransmitterrezeptoren an der Bildung der PSCs mitwirken. Hierzu wurden die afferenten Fasern in der Capsula externa mit einer dort platzierten bipolaren Wolframelektrode elektrisch stimuliert. Dabei wurde die Amplitude des exzitatorischen postsynaptischen Stroms durch Zugabe von EACA auf $45,3\% \pm 7,2\%$ des Kontrollniveaus reduziert (Abbildung 31 A–C).

Darüber hinaus verlängerte sich die Deaktivierungszeitkonstante, Steigung und Ladungstransfer sanken. Alle Effekte zeigten eine wenigstens partielle Reversibilität (Abbildung 31 B und C).

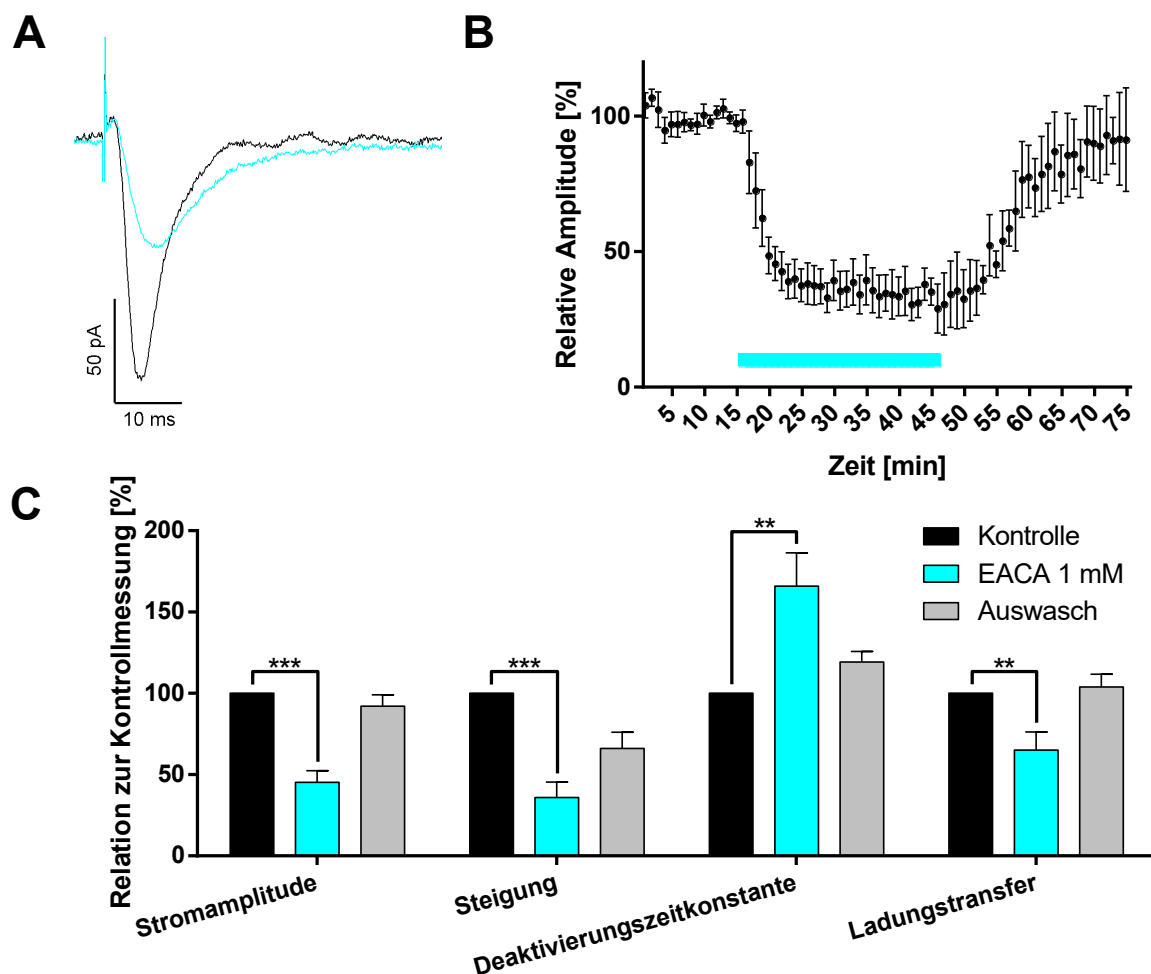


Abbildung 31: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme

In dieser Messreihe wurde reine aCSF ohne spezifische Antagonisten verwendet. Die elektrische Stimulation erfolgte durch eine bereits vorher auf der Capsula externa platzierte bipolare Stimulationselektrode. Nach über 15 Minuten stabilen Messbedingungen wurde 1 mM EACA in die Zirkulationslösung gegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde diese durch frische aCSF ausgewaschen. **A** Gemittelte Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch evozierten EPSCs, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Nicht bei allen in Hinblick auf die Kinetik ausgewerteten Experimenten wurde eine kontinuierliche Stimulation durchgeführt. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Amplitude der EPSCs reduzierte sich unter Einfluss von 1 mM EACA auf $45,3 \pm 7,2\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), die Steigung auf $35,9 \pm 9,6\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), die Deaktivierungszeitkonstante verlängerte sich auf $165,9 \pm 19,0\%$ ($n = 8$; $p = 0,004$), der Ladungstransfer sank auf $65,1 \pm 11,1\%$ ($n = 8$; $p = 0,007$).

Diese Effekte waren auch unter auf 3 mM gesteigerter Konzentration von EACA zu sehen, siehe Abbildung 32 **A–C**.

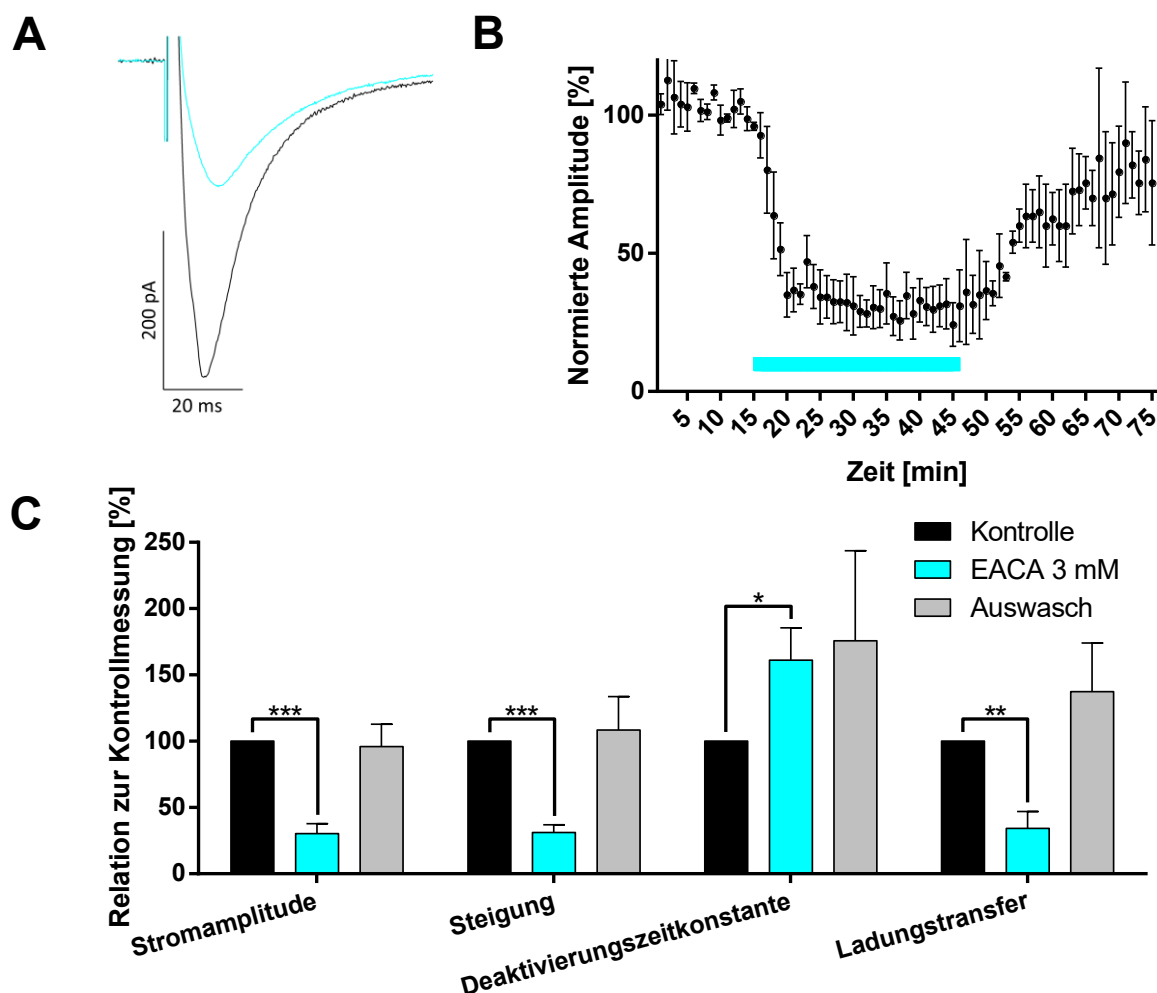


Abbildung 32: Die Wirkung von 3 mM ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme

Die Durchführung dieser Messreihe erfolgte analog zu der in Abbildung 31 beschriebenen, jedoch wurden 3 mM EACA anstelle von 1 mM appliziert. **A** Gemittelte Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch evozierten EPSCs, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Amplitude der EPSCs reduzierte sich unter

Einfluss von 3 mM EACA auf $30,4 \pm 7,4 \%$ ($n = 4$; $p < 0,001$), die Steigung auf $31,2 \pm 5,8 \%$ ($n = 4$; $p < 0,001$), die Deaktivierungszeitkonstante verlängerte sich auf $161,2 \pm 24,2 \%$ ($n = 4$; $p = 0,045$), der Ladungstransfer sank auf $34,3 \pm 12,7 \%$ ($n = 4$; $p = 0,002$).

3.5 EACA führt zu einer GABA_A-Rezeptor-unabhängigen Inhibition der synaptischen Übertragung von Summenströmen

Analog zu den VSDI-Versuchsreihen wurde auch bei den Summenströmen der Effekt von ϵ -Aminocapronsäure auf die PSCs bei mittels Bicucullin blockierten GABA_A-Rezeptoren untersucht. Der Effekt war vergleichbar mit der in Kapitel 3.4 durchgeführten Versuchsreihe. Einzig der unter Blockade der GABA_A-Rezeptoren fehlende verlängernde Effekt von EACA auf die Deaktivierungszeitkonstante fällt auf (siehe Abbildung 33).

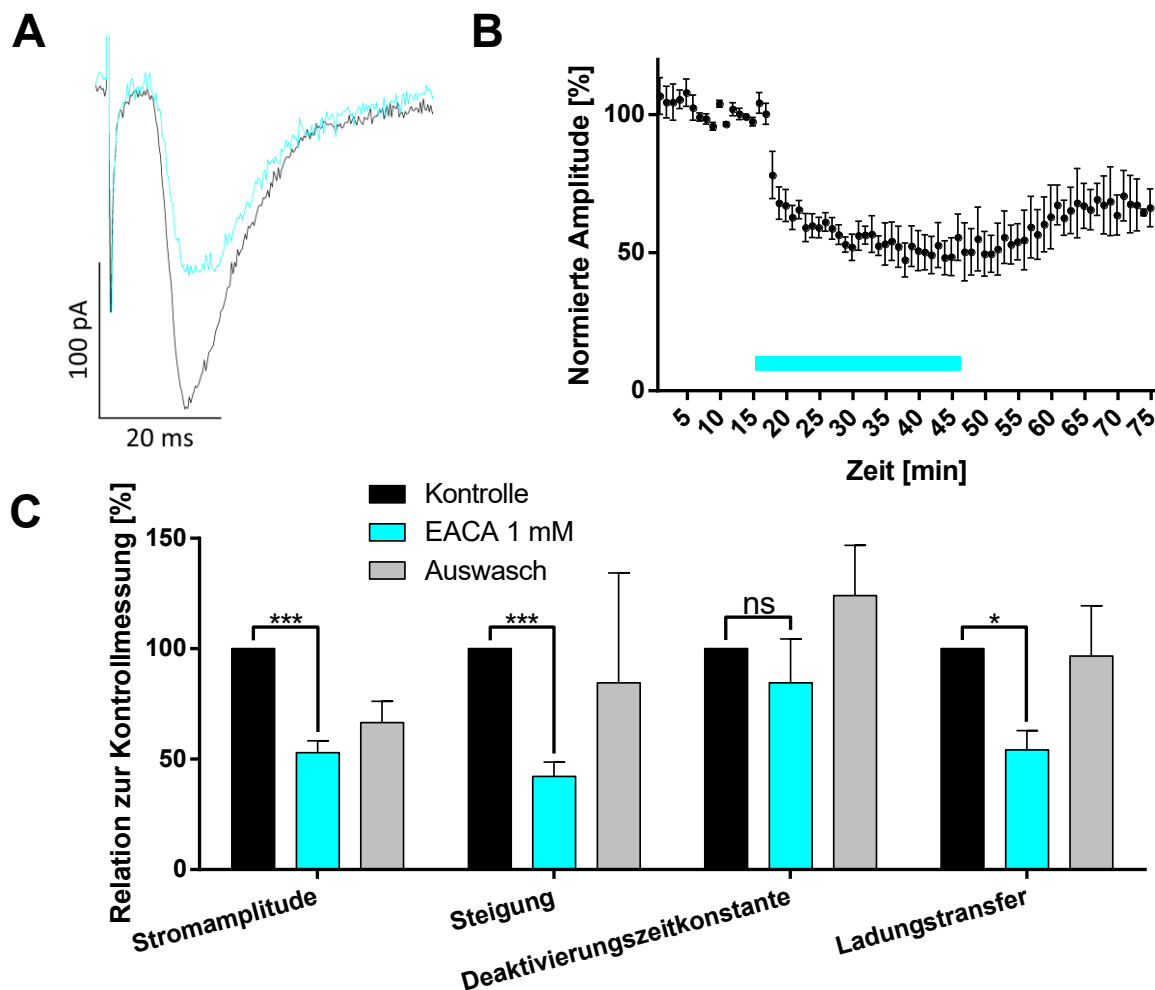


Abbildung 33: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf elektrisch evozierte Summenströme unter Blockade der GABA_A-Rezeptoren

Ablauf und Auswertung dieser Versuchsreihe waren analog zur Summenstrom-Versuchsreihe, nur enthielt die zirkulierende ACSF zur Blockade der GABA_A-Rezeptoren zusätzlich 20 μ M Bicucullin. **A** Gemittelte Stromkurven

eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch evozierten EPSCs, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Amplitude der EPSCs reduzierte sich unter Einfluss von 1 mM EACA auf $53,0 \pm 5,4$ % ($n = 8$; $p < 0,001$), die Steigung auf $42,2 \pm 6,6$ % ($n = 8$; $p < 0,001$), die Deaktivierungszeitkonstante verkürzte sich nicht signifikant auf $84,5 \pm 20,0$ % ($n = 8$; $p = 0,451$), der Ladungstransfer sank auf $54,2 \pm 8,7$ % ($n = 8$; $p < 0,001$).

3.6 EACA hemmt durch den GABA_A-Rezeptor vermittelte Ströme über prä- und postsynaptische Mechanismen

Zur Untersuchung der Wirkung von ϵ -Aminocapronsäure auf GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden Patch-Clamp-Experimente durchgeführt, bei welchen ein dosisabhängiger Effekt auf elektrisch evozierte inhibitorische Ströme durch den GABA_A-Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme durch die Zugabe von AP5, CGP und NBQX pharmakologisch isoliert, sodass lediglich die Leitfähigkeit des GABA_A-Rezeptors für die gemessene Stromantwort verantwortlich war.

Dabei zeigte sich unter 1 mM EACA die Reduktion der Stromamplitude auf 55,4 %, die Deaktivierungszeitkonstante verlängerte sich nicht signifikant, gleichzeitig war eine Abnahme von Ladungstransfer und Steigung zu beobachten (Abbildung 34).

Zeitgleich wurden Stromspuren aufgenommen, die durch Rezeptorinteraktionen von photolytisch freigesetztem GABA hervorgerufen wurden. Hierzu wurde der zirkulierenden aCSF 100 μ M caged GABA zugesetzt, welches mit einem gepulsten Festkörperlaser der Wellenlänge 355 nm in der Nähe der Zelle freigesetzt und somit biologisch aktiviert wurde. Beim Vergleich dieser photolytisch evozierten postsynaptischen Ströme unter 1 mM EACA und dem Kontrollniveau zeigte sich eine Reduktion der pC-Amplituden unter EACA auf 80,8 % und des Ladungstrfers auf 89,0 %.

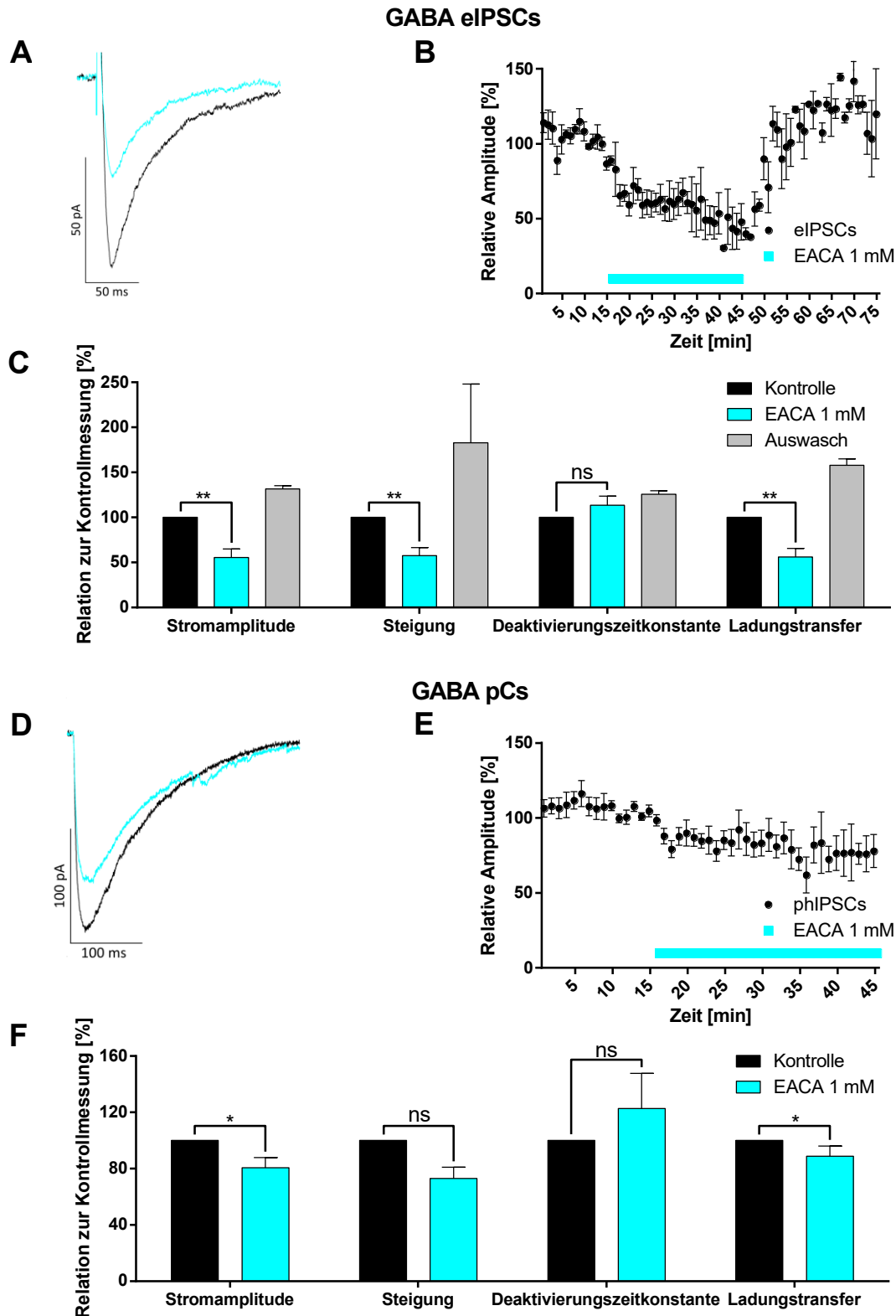


Abbildung 34: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den $GABA_A$ -Rezeptor vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme

In der abgebildeten Experimentreihe wurde zunächst aCSF mit den Blockersubstanzen AP5 (50 μ M), CGP (200 μ M) und NBQX (5 μ M) sowie O-CNB-Caged-GABA (100 μ M) versetzt. Die elektrische Stimulation erfolgte durch eine bereits vorher auf der Capsula externa platzierten bipolaren Stimulationselektrode. Die photolytische Stimulation erfolgte mittels des 355-nm-Lasers durch das Mikroskop. Nach Aufnahme einer über 15 Minuten

stabilen Stromantwort wurde 1 mM EACA in die Zirkulationslösung gegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde diese durch frische, ebenso mit den genannten Blocksubstanzen versehene aCSF ausgewaschen. Der Auswasch wurde ohne photolytische Stimulation durchgeführt. **A** Gemittelte Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch evozierten IPSCs, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der elektrisch evozierten IPSCs verringerte sich nach Zugabe von 1 mM EACA auf $55,4 \pm 9,8 \%$ ($n = 5$; $p = 0,002$), die Steigung auf $57,4 \pm 9,2 \%$ ($n = 5$; $p = 0,002$), der Ladungstransfer auf $55,9 \pm 9,6 \%$ ($n = 5$; $p = 0,002$). Die Deaktivierungszeitkonstante verlängerte sich nicht signifikant auf $113,7 \pm 9,9 \%$ ($n = 5$; $p = 0,202$). **D** Gemittelte, photolytisch evozierte Stromkurven eines repräsentativen Experiments. **E** Verlauf der Amplituden der photolytisch evozierten Ströme, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **F** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der photolytisch evozierten Ströme reduzierte sich unter Einfluss von 1 mM EACA auf $80,8 \pm 7,2 \%$ ($n = 4$; $p = 0,036$), die Steigung auf $73,0 \pm 8,1 \%$ ($n = 4$; $p = 0,015$). Sowohl die Deaktivierungszeitkonstante ($122,9 \pm 24,8 \%$; $n = 4$; $p = 0,392$) und der Ladungstransfer ($88,9 \pm 7,2 \%$; $n = 4$; $p = 0,174$) veränderten sich nicht signifikant gegenüber dem Ausgangswert.

Dieselbe Versuchsreihe wurde ebenfalls mit der höheren Medikamentenkonzentration von 3 mM EACA wiederholt. Dabei kam es zu einer verstärkten Reduktion der Amplituden der eIPSCs und pCs (Abbildung 35).

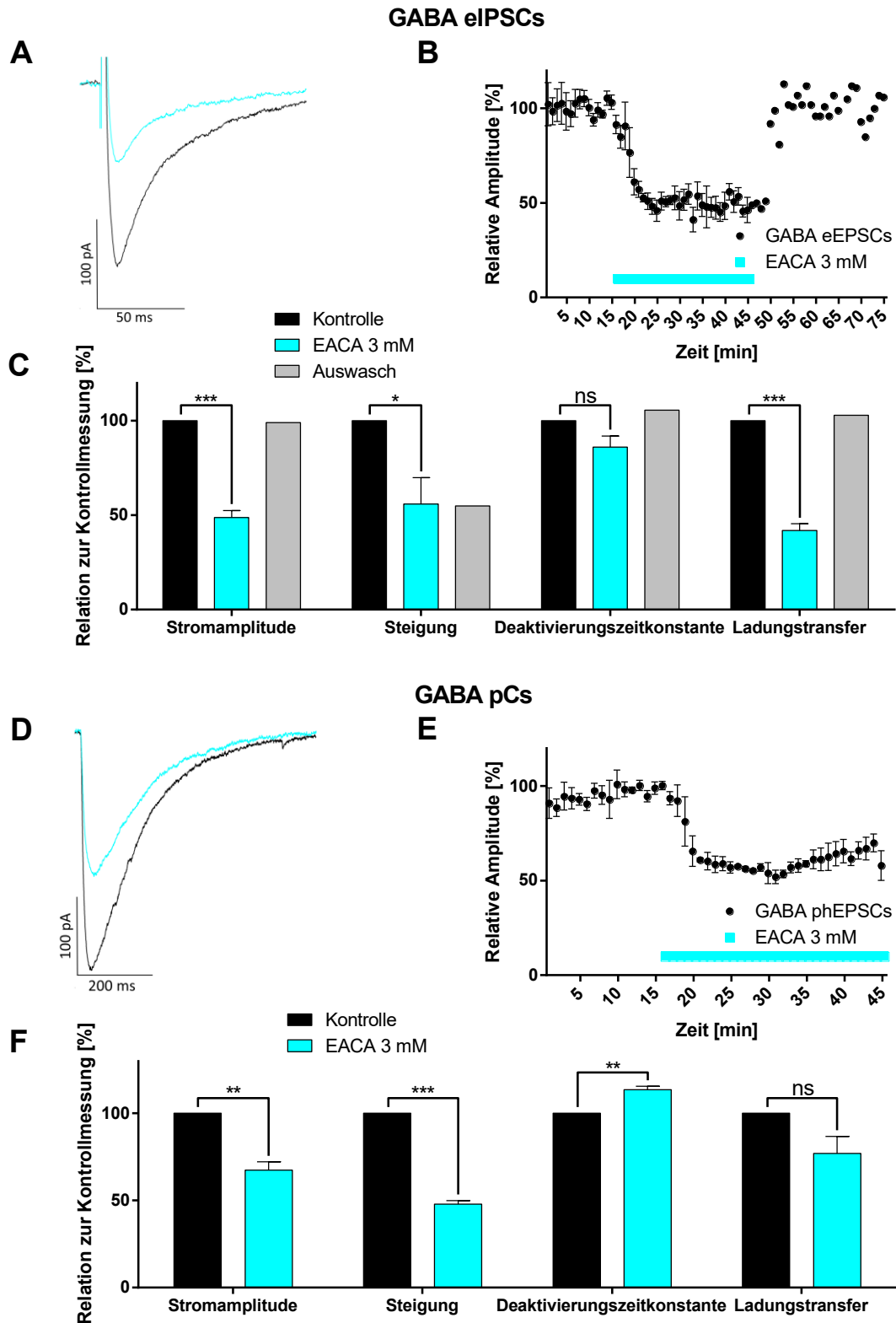


Abbildung 35: Die Wirkung von 3 mM ϵ -Aminocaprönsäure auf durch den $GABA_A$ -Rezeptor vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme

Die abgebildete Versuchsreihe wurde unter gleichen Bedingungen wie der in Abbildung 34 beschriebenen Messreihe durchgeführt, diesmal unter Zugabe von 3 mM EACA. **A** Gemittelte, elektrisch evozierte postsynaptische Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch evozierten IPSCs, jeweils normiert auf die letzten

5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der elektrisch evozierten IPSCs reduzierte sich unter Einfluss von 3 mM EACA auf $48,7 \pm 3,9 \%$ ($n = 4$; $p < 0,001$), die Steigung auf $55,9 \pm 14,1 \%$ ($n = 4$; $p = 0,020$) und der Ladungstransfer auf $41,9 \pm 3,6 \%$ ($n = 4$; $p < 0,001$). Die Deaktivierungszeitkonstante verkürzte sich nicht signifikant auf $86,2 \pm 5,8 \%$ ($n = 4$; $p = 0,054$). **D** Gemittelte, photolytisch evozierte postsynaptische Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **E** Verlauf der Amplituden der photolytisch evozierten Ströme, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **F** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der pCs verringerte sich nach Zugabe von 3 mM EACA auf $67,5 \pm 4,8 \%$ ($n = 3$; $p = 0,002$), die Steigung auf $47,9 \pm 1,9 \%$ ($n = 3$; $p < 0,001$), die Deaktivierungszeitkonstante verlängerte sich auf $113,6 \pm 1,9 \%$ ($n = 3$; $p = 0,002$). Der Ladungstransfer verminderte sich nicht signifikant auf $77,1 \pm 9,6 \%$ ($n = 3$; $p = 0,076$) des Ausgangswertes.

3.7 EACA hemmt AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme über präsynaptische Mechanismen

Im weiteren Verlauf wurden die Auswirkungen von ϵ -Aminocapronsäure auf durch den AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme untersucht. Dazu wurden AMPA-EPSCs durch Zugabe von AP5, Bicucullin und CGP pharmakologisch isoliert. Dabei stellte sich nach Perfusion mit 1 mM EACA in der zirkulierenden aCSF bei den elektrisch evozierten EPSCs eine Amplitudenreduktion auf $77,1 \pm 5,4 \%$ des Kontrollniveaus heraus, ebenso verringerte sich die Menge der durch die postsynaptische Membran geflossenen Ladung auf $88,1 \pm 6,9 \%$ (Abbildung 36).

Im Vergleich dazu zeigte dieselbe Konzentration von ϵ -Aminocapronsäure bei photolytisch evozierten Strömen keine signifikante Änderung der Amplitudenhöhe und nur eine geringfügige Änderung des Ladungstransfers ($113,8 \pm 4,5 \%$ des Ausgangsniveaus).

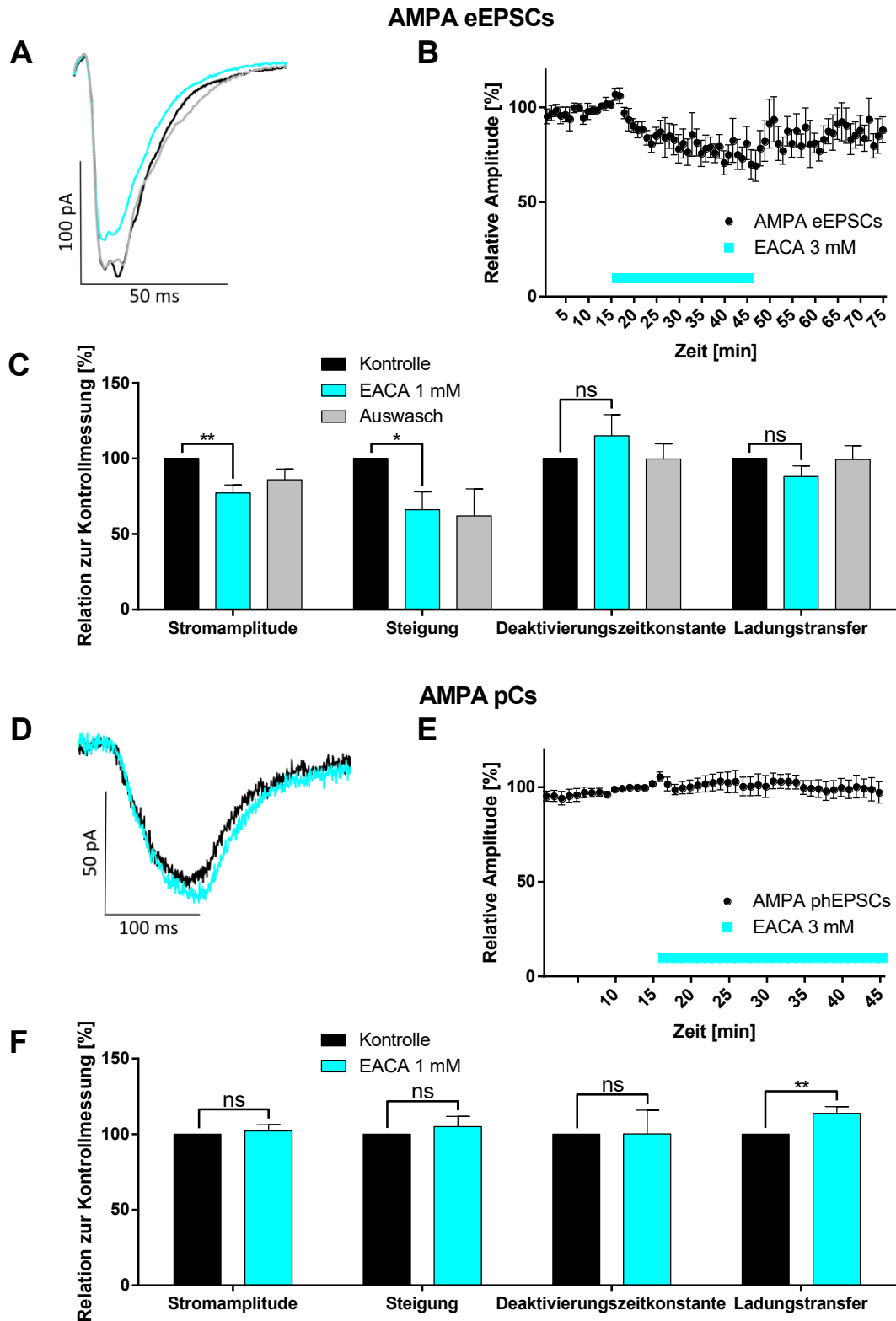


Abbildung 36: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf AMPA-Rezeptor-vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme

In der abgebildeten Experimentreihe wurde zunächst aCSF mit den Blockersubstanzen AP5 (50 μ M), Bicucullin (20 μ M) und CGP (200 μ M) sowie MNI-Caged-Glutamat (100 μ M) versetzt. Die elektrische und photolytische Stimulation sowie die Auswertung erfolgte analog zu den GABA_A-IPSC-Versuchsreihen. Nach Aufnahme einer

über 15 Minuten stabilen Stromantwort wurde 1 mM EACA in die Zirkulationslösung gegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde diese durch frische, ebenso mit den genannten Blocksubstanzen versehene aCSF ausgewaschen. Der Auswasch wurde ohne photolytische Stimulation durchgeführt. **A** Gemittelte, elektrisch evozierte postsynaptische Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch evozierten EPSCs, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der elektrisch evozierten EPSCs reduzierte sich unter Einfluss von 1 mM EACA auf $77,1 \pm 5,4$ % ($n = 6$; $p = 0,002$), die Steigung auf $66,1 \pm 11,9$ % ($n = 6$; $p = 0,017$). Auf die Deaktivierungszeitkonstante ($115,2 \pm 12,9$ %; $n = 6$; $p = 0,300$) und den Ladungstransfer ($88,1 \pm 6,9$ %; $n = 6$; $p = 0,116$) gab es keinen signifikanten Effekt. **D** Gemittelte, photolytisch evozierte postsynaptische Stromkurven eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 1 mM EACA. **E** Verlauf der Amplituden der photolytisch evozierten Ströme, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **F** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der pCs wurde durch die Zugabe von 1 mM EACA nicht signifikant beeinflusst ($102,2 \pm 4,1$ %; $n = 9$; $p = 0,605$), selbiges galt für die Steigung ($105,0 \pm 6,9$ %; $n = 9$; $p = 0,475$) und die Deaktivierungszeitkonstante ($100,2 \pm 15,9$ %; $n = 9$; $p = 0,989$). Der Ladungstransfer stieg auf $113,8 \pm 4,5$ % ($n = 9$; $p = 0,008$).

3.8 EACA hemmt NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme über präsynaptische Mechanismen

Als andere wichtige glutamaterge Komponente der synaptischen Übertragung in der Amygdala wurden isolierte NMDA-vermittelte Ströme aufgezeichnet. Dazu wurden die Rezeptorantagonisten Bicucullin, CGP und NBQX der zirkulierenden aCSF zugegeben. Vor jeder Stimulation wurden die Zellen um 40 mV vordepolarisiert, um die Anzahl der aktiven NMDA-Rezeptoren zu erhöhen. Unter 1 mM EACA in der zirkulierenden Badlösung verringerte sich die gemessene Stromamplitude auf $71,6 \pm 0,9$ % des Ausgangsniveaus, siehe Abbildung 37.

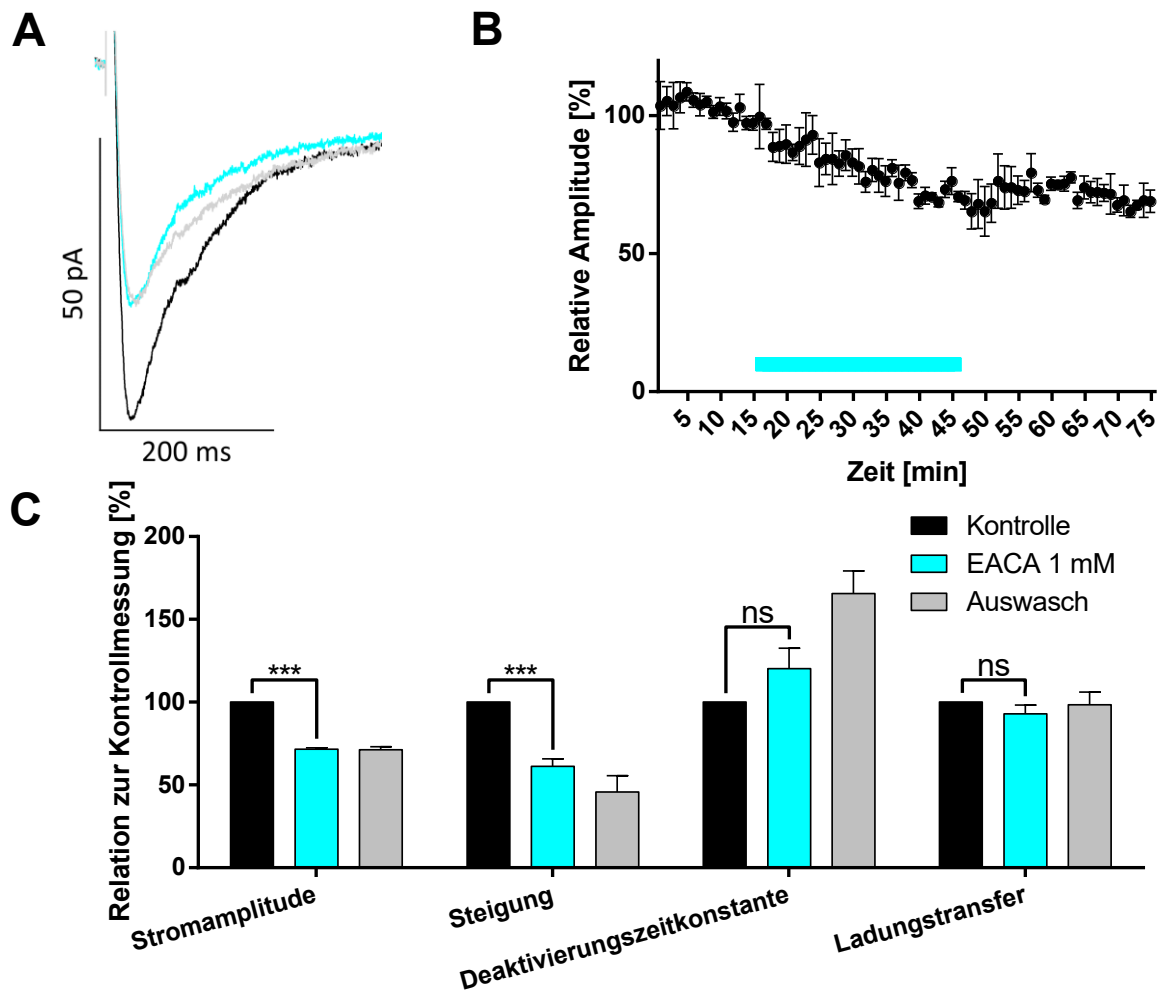


Abbildung 37: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den NMDA-Rezeptor vermittelte elektrisch evozierte postsynaptische Ströme

A gezeigt sind normierte Stromkurven eines repräsentativen Experiments, bei welchem aCSF mit den Blockersubstanzen Bicucullin (20 μ M), CGP (200 μ M) und NBQX (5 μ M) sowie MNI-Caged-Glutamat (100 μ M) versetzt wurde. Die elektrische und photolytische Stimulation sowie die Auswertung erfolgte auch hier analog zu den GABA_A-IPSC-Versuchsreihen. Nach Aufnahme einer über 15 Minuten stabilen Stromantwort wurde 1 mM EACA in die Zirkulationslösung gegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde diese durch frische, ebenso mit den genannten Blocksubstanzen versehene aCSF ausgewaschen. Der Auswasch wurde ohne photolytische Stimulation durchgeführt. **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch und photolytisch evozierten EPSCs, jeweils normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Ergebnisse wurden über einen Zeitabschnitt von 5 Minuten gemittelt. Die Amplitude der elektrisch evozierten EPSCs reduzierte sich unter Einfluss von 1 mM EACA auf $71,6 \pm 0,9$ % ($n = 5$; $p < 0,001$), die Steigung auf $61,2 \pm 4,5$ % ($n = 5$; $p < 0,001$). Für die Deaktivierungszeitkonstante ($120,2 \pm 12,3$ %; $n = 5$; $p = 0,141$) und den Ladungstransfer ($92,9 \pm 5,2$ %; $n = 5$; $p = 0,215$) ergaben sich keine signifikanten Änderungen.

In einer weiteren Messreihe für NMDA-Rezeptor-vermittelte postsynaptische Ströme führte die Zugabe von 3 mM EACA zu vergleichbaren Effekten auf die Kinetik. Dieselbe Konzentration zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die

photolytisch evozierten Ströme. Lediglich der Ladungsübertrag wurde geringfügig auf 90,1 % des Ausgangsniveaus reduziert (Abbildung 38).

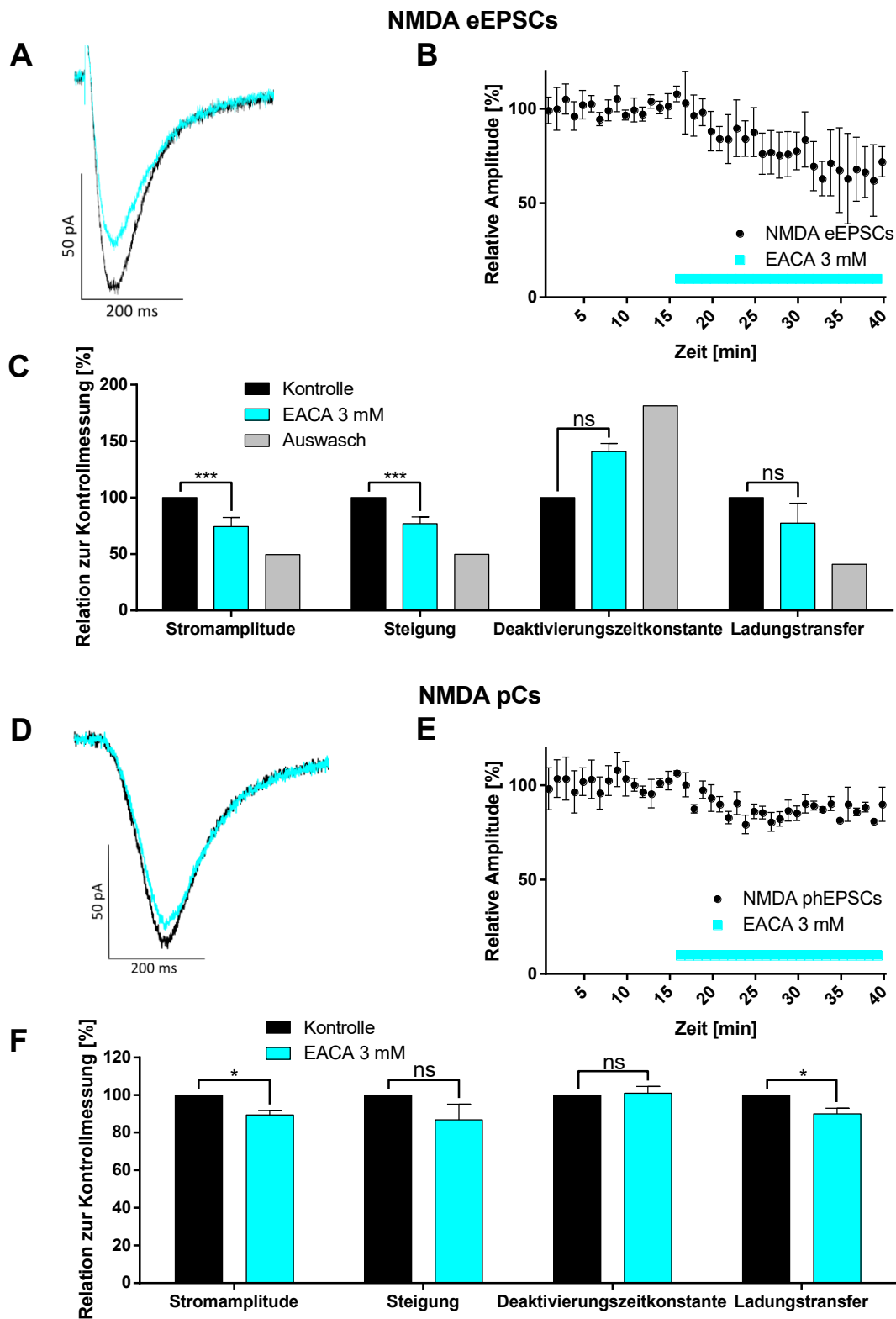


Abbildung 38: Die Wirkung von 3 mM ϵ -Aminocaprönsäure auf durch den NMDA-Rezeptor vermittelte elektrisch und photolytisch evozierte Ströme

A normierte Stromkurven eines repräsentativen Experiments, Versuchsaufbau nahezu identisch zu dem in Abbildung 37 geschilderten Experiment, jedoch Zugabe von 3 mM EACA. Zusätzlich erfolgte die Messung von NMDA-pCs, dazu wurde der zirkulierenden aCSF 100 μ M MNI-Caged-Glutamat zugesetzt **B** Verlauf der Amplituden der elektrisch und der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. **C** Relative Kinetik der Stromkurven, wiederum normiert auf die letzten 5 Minuten der Kontrollmessung. Die Amplitude der elektrisch evozierten EPSCs reduzierte sich unter Einfluss von 3 mM EACA auf $74,5 \pm 8,1 \%$ ($n = 5$; $p = 0,014$), die Steigung auf $77,1 \pm 5,8 \%$ ($n = 5$; $p = 0,004$), die Deaktivierungszeitkonstante verlängerte sich auf $140,8 \pm 7,0 \%$ ($n = 5$; $p < 0,001$), der Ladungstransfer wurde nicht signifikant beeinflusst ($77,4 \pm 17,6 \%$; $n = 5$; $p = 0,236$). Die Amplitude der photolytisch evozierten IPSCs verringerte sich nach Zugabe von 3 mM EACA auf $89 \pm 2,5 \%$ ($n = 3$; $p = 0,013$). Für die Steigung ($86,8 \pm 8,3 \%$; $n = 3$; $p = 0,187$) und die Deaktivierungszeitkonstante ($101,1 \pm 3,4 \%$; $n = 3$; $p = 0,768$) ergab sich keine signifikante Änderung. Der Ladungstransfer verminderte sich auf $90,1 \pm 3,0 \%$ ($n = 3$; $p = 0,030$) des Ausgangswertes.

3.9 EACA bewirkt bei Summenströmen eine Paired-Pulse Facilitation

Zusätzlich wurden Experimente zur Messung der Paired-Pulse Ratio durchgeführt. Dazu wurden elektrisch evozierte Summenströme mit verschiedenen Interstimulusintervallen gemessen. Dabei ergab sich insbesondere bei den Intervallen von 150 und 200 ms eine verstärkte Paired-Pulse Facilitation, wo unter Kontrollbedingungen noch eine Paired-Pulse Depression zu sehen war (siehe Abbildung 39). Aufgrund der niedrigen Anzahl an Experimenten konnte dabei für die einzelnen Interstimulusintervalle jedoch knapp keine statistische Signifikanz erreicht werden. Bei gepaartem Vergleich der gesamten Messreihe zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

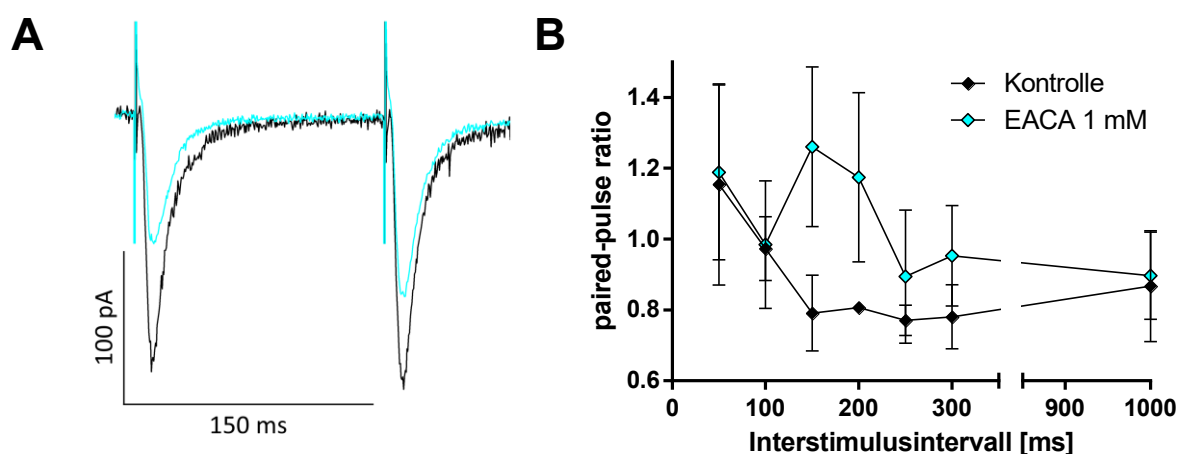


Abbildung 39: Die Wirkung von 1 mM EACA auf die Paired-Pulse Ratio

A Zu sehen sind Stromkurven eines repräsentativen Experiments, Versuchsaufbau identisch zu der Messung der Summenströme, es wurden keine Blockersubstanzen verwendet. Nach Etablierung der Ganzzelleableitung wurden für die Interstimulusintervalle 50 ms, 100 ms, 150 ms, 200 ms, 300 ms und 1000 ms jeweils vier Doppelstimulationspulse aufgezeichnet. Im Anschluss erfolgte die Applikation von 1 mM EACA. Nach 30 Minuten wurde die Messung wiederholt, daraufhin Auswaschen von EACA mit reiner aCSF, nach weiteren 30 Minuten erneute Messung. Die vier pro Interstimulusintervall (ISI) aufgenommenen Messspuren wurden gemittelt. Die abgebildeten Stromkurven zeigen die Stimulationen mit einem Interstimulusintervall von 150 ms vor, während und nach Einfluss von 1 EACA. **B** Die Paired-Pulse Ratio (PPR) wurde aus Division der Amplitude des zweiten postsynaptischen Stromes durch die des ersten berechnet und zwischen den vier pro ISI aufgenommenen Stimulationen gemittelt. Dabei zeigte sich bei 150 ms Interstimulusintervall unter Kontrollbedingungen eine PPR von $0,79 \pm 0,11$ ($n = 3$), nach Zugabe von EACA stieg diese auf $1,26 \pm 0,23$ ($p = 0,061$; $n = 3$). Bei einem ISI von 200 ms betrug die PPR zunächst $0,81 \pm 0,01$ ($n = 3$), nach Applikation von EACA $1,17 \pm 0,24$ ($p = 0,138$; $n = 3$). Im gepaarten Vergleich beider Gruppen über alle Interstimulusintervalle ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,044$).

3.10 EACA hemmt die spontane GABA- und Glutamat-Vesikelfreisetzung

Die gemessene Diskrepanz zwischen den elektrisch und photolytisch evozierten postsynaptischen Strömen über den GABA_A-Rezeptor ließ das Vorliegen eines präsynaptischen Effektes von ϵ -Aminocapronsäure auf die GABAerge synaptische Übertragung vermuten. Bei Messung der von spontan – unabhängig von Aktionspotentialen freigesetzten – Neurotransmittern ausgelösten postsynaptischen Ströme zeigte sich eine Reduktion der Anzahl von detektierten GABA_A-mIPSCs auf 50,0 % des Kontrollniveaus. Zugleich verringerte sich der gemittelte Ladungstransfer auf 78,5 % des Ausgangswertes (Abbildung 40).

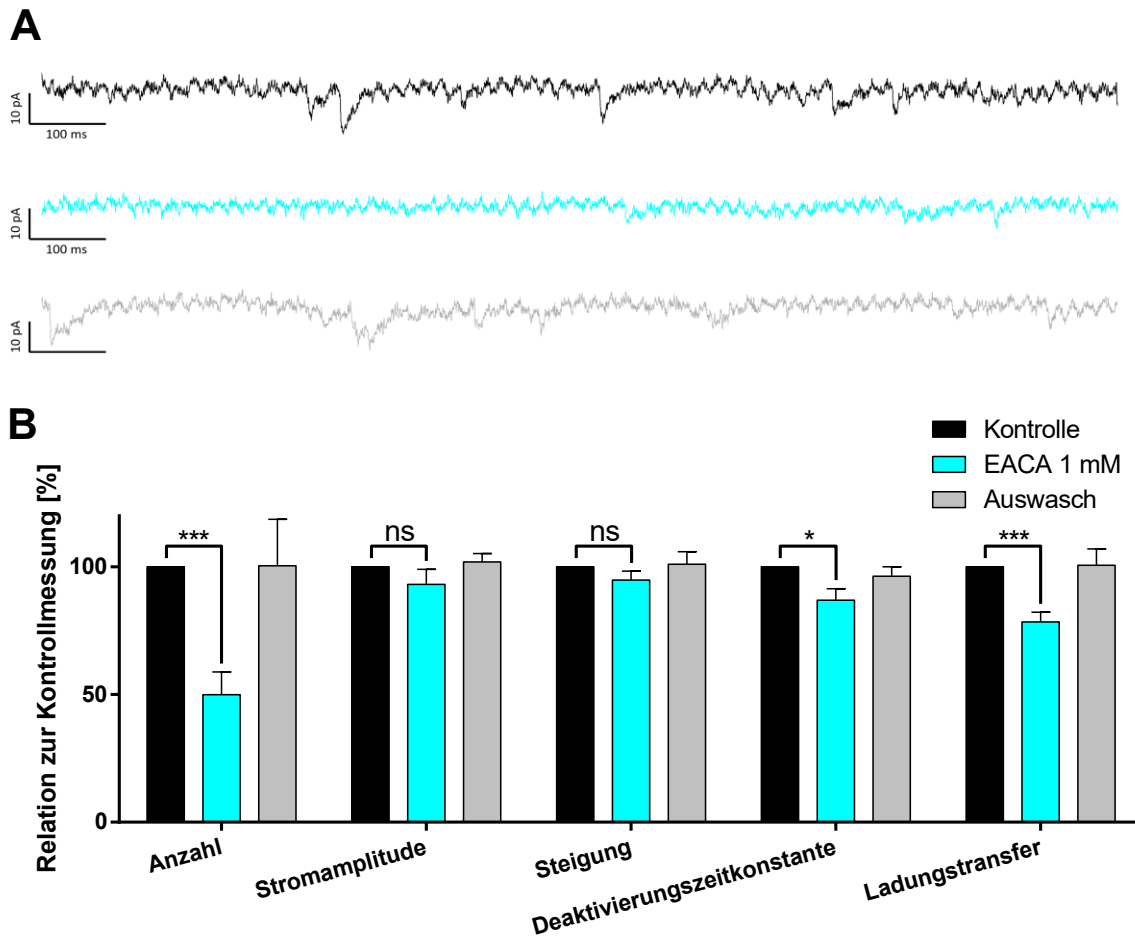


Abbildung 40: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den $GABA_A$ -Rezeptor vermittelten Miniaturpostsynaptischen Ströme

A Stromkurven mit $GABA_A$ -mIPSCs von spontanen Vesikelfreisetzungen. Verwendung von Blockersubstanzen analog zu den $GABA_A$ -Versuchsreihen mit evozierten Strömen, zusätzlich Zugabe von 1 μ M Tetrodotoxin (TTX) zu den zirkulierenden Lösungen. Zu sehen sind Stromkurven vor, während und nach Einfluss von 1 mM EACA. **B** Auswertung der mIPSCs in den jeweils 330 Sekunden aufgenommenen Stromkurven. Die Zahl der mIPSCs reduzierte sich nach Applikation von EACA auf $50,0 \pm 8,8$ % ($n = 8$; $p < 0,001$) des Ausgangswertes. Die Amplitude sank auf $93,1 \pm 6,87$ % ($n = 8$; $p = 0,264$), die Steigung auf $94,8 \pm 3,5$ % ($n = 8$; $p = 0,161$), die Deaktivierungszeitkonstante verkürzte sich auf $86,9 \pm 4,5$ % ($n = 8$; $p = 0,011$) und der Ladungstransfer verminderte sich auf $78,5 \pm 3,7$ % ($n = 8$; $p < 0,001$) des Ausgangswertes.

In einer weiteren Experimentreihe wurde die Wirkung von ϵ -Aminocapronsäure auf AMPA-mEPSCs gemessen. Hierbei reduzierte sich nach Zugabe von 1 mM EACA die Anzahl der mEPSCs auf 70,6 % des Kontrollniveaus, die übrigen Kinetikparameter wiesen keine signifikante Veränderung auf (siehe Abbildung 41).

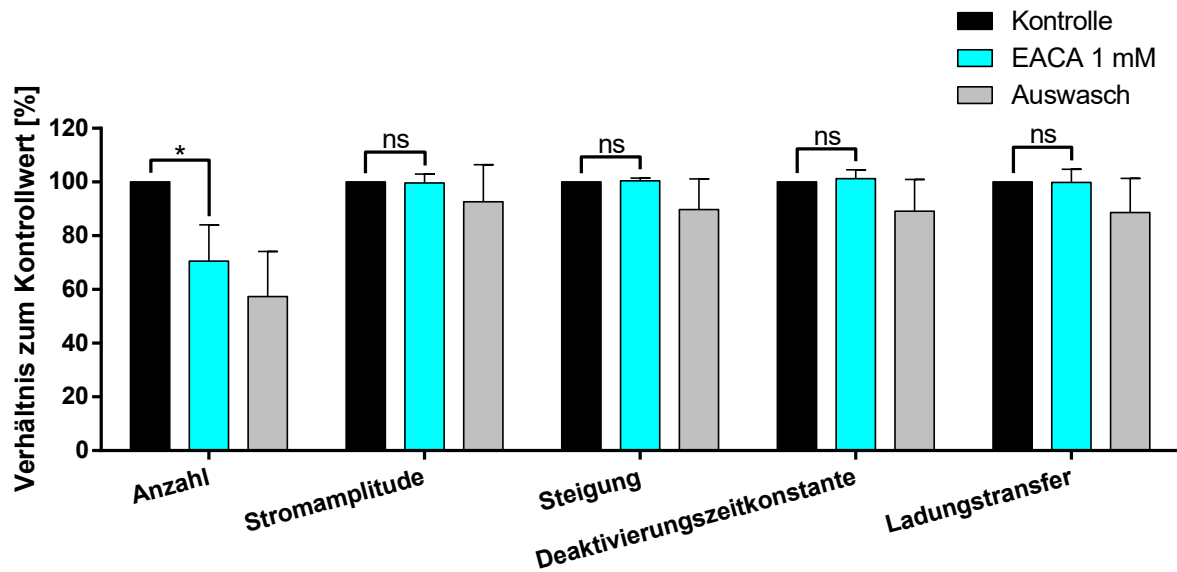


Abbildung 41: Die Wirkung von 1 mM ϵ -Aminocapronsäure auf durch den AMPA-Rezeptor vermittelten Miniaturpostsynaptischen Ströme

Kinetik der AMPA-mEPSCs von spontanen Vesikelfreisetzen vor, während und nach dem Einfluss von 1 mM EACA. Verwendung von Blockersubstanzen analog zu den AMPA-Versuchsreihen mit evozierten Strömen, auch hier Zugabe von 1 μ M Tetrodotoxin (TTX) zu den zirkulierenden Lösungen. Auswertung der mEPSCs in den jeweils 330 Sekunden aufgenommenen Stromkurven. Die Zahl der mEPSCs reduzierte sich nach Applikation von EACA auf $70,6 \pm 13,5$ % ($n = 9$; $p = 0,044$) des Ausgangswertes. Bei Amplitude ($99,6 \pm 3,3$ %; $n = 9$; $p = 0,913$), Steigung ($100,4 \pm 1,1$ %; $n = 9$; $p = 0,708$), Deaktivierungszeitkonstante ($101,2 \pm 3,4$ %; $n = 9$; $p = 0,725$) und Ladungstransfer ($99,9 \pm 4,8$ %; $n = 9$; $p = 0,980$) kam es nicht zu signifikanten Änderungen im Verhältnis zum Ausgangswert.

4 Diskussion

4.1 Die Wirkung von EACA auf die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala

Die in den VSDI-Messungen unter ϵ -Aminocapronsäure beobachtete Reduktion der Erregungsintensität in der ROI lassen sich prinzipiell durch eine direkte Beeinflussung der Zellmembran der abgeleiteten Zelle, durch eine Hemmung der exzitatorischen oder durch eine Verstärkung der inhibitorischen Afferenzen erklären.

Die VSDI-Messungen unter Teilblockade der GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin zeigten eine ähnliche Reduktion der Signalstärke in der Zielregion, was auf eine Hemmung der exzitatorischen synaptischen Übertragung hinweist. Da EACA unter dem Einfluss von Bicucullin zu einer stärkeren Reduktion der Signalintensität führt, liegt die Vermutung nahe, dass dies am partiellen Wegfall einer durch ϵ -Aminocapronsäure bewirkten GABA_A-vermittelten Disinhibition liegt. Dies steht im Kontrast zu der Datenlage bei Tranexamsäure, nach welcher die Erregungsausbreitung in der basolateralen Amygdala wegen einer Hemmung des GABA_A-Rezeptors durch Tranexamsäure deutlich verstärkt wird (Kratzer et al., 2014).

Neben der Hemmung der Reizweiterleitung ist in den VSDI-Messreihen jedoch auch ein gegensätzlicher Effekt festgestellt worden, nämlich eine Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstante, die sowohl durch eine Verzögerung der Repolarisierung als auch durch eine prolongierte Propagation der Exzitationswelle hervorgerufen worden sein könnte.

Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit in Einzelzellmessungen mittels Patch-Clamp-Technik demonstriert werden, dass EACA exzitatorisch wirkende Summenströme in der basolateralen Amygdala im Gegensatz zu TXA hemmt. Dies steht im Einklang mit der in den VSDI-Experimenten sichtbaren Reduktion der Erregungsausbreitung und kann als deren Pendant auf Einzelzellebene verstanden werden.

Nach Blockade des GABA_A-Rezeptors kam es zu einem fast unveränderten Effekt von ϵ -Aminocapronsäure auf die Summenströme, was auf das zusätzliche Vorliegen eines vom GABA_A-Rezeptor unabhängigen Geschehen hinweist. Lediglich die

Deaktivierungszeitkonstante wurde nach Zugabe von Bicucullin nicht mehr durch EACA verlängert.

Die Auswertungen der Ruhemembranpotentiale und Strom-Spannungs-Kurven sowie der Aktionspotentialfrequenz unter Depolarisation ergaben keinen Hinweis auf eine Wirkung auf die zelluläre Erregbarkeit und die passiv-elektrischen Membraneigenschaften. Somit scheinen die beobachteten Phänomene Folge eines Effektes von EACA auf die synaptische Übertragung in der Amygdala zu sein.

4.2 Die Wirkung von EACA auf durch den GABA_A-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme

Die nachgewiesene Wirkung von Tranexamsäure auf den GABA_A-Rezeptor (Kratzer et al., 2014) legt aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur ϵ -Aminocaprinsäure nahe, dass auch hier eine direkte Interaktion mit diesem Rezeptor denkbar wäre. Tatsächlich konnte schon vor 20 Jahren radioaktiv markiertes Muscimol durch EACA von GABA_A-Rezeptoren verdrängt werden (Furtmuller et al., 2002). Die nun durchgeführten Versuchsreihen mit pharmakologischer Isolation des GABA_A-Rezeptors zeigen eine Reduktion der postsynaptischen Ströme sowohl bei elektrischer als auch photolytischer Stimulation. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass EACA eine zu TXA vergleichbare Inhibition der durch den GABA_A-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme bewirkt. Im Vergleich zur Wirkung von Tranexamsäure ist der Effekt auf die photolytisch evozierten und somit rein postsynaptischen vermittelten Ströme bei ϵ -Aminocaprinsäure geringer. Zudem besteht eine Diskrepanz zwischen den photolytisch und elektrisch evozierten postsynaptischen Strömen, letztere erfahren durch EACA eine stärkere Reduktion. Bei TXA ergab sich hier für beide Stimulationsarten eine ähnlich starke Hemmung der postsynaptischen Ströme (Kratzer et al., 2014).

4.3 Kein Hinweis auf eine Hemmung glutamaterger Rezeptoren

Die vom GABA_A-Rezeptor unabhängige Reduktion der Summenströme war hinweisend auf eine Hemmung der exzitatorischen Übertragung. Diese ist in der Amygdala durch die glutamatergen ionotropen AMPA-, NMDA und Kainat-

Rezeptoren getragen (Gean, 1990). Es konnte nun gezeigt werden, dass EACA keinen signifikanten Effekt auf die photolytisch evozierten AMPA- und NMDA-PSCs hat. In dieser Arbeit wurden bei der Messung der durch den AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme Kainat-Rezeptoren nicht blockiert. Somit wurden diese in den AMPA-Messreihen mitgemessen, welche strenggenommen als non-NMDA-Messreihen bezeichnet werden müssten. Die Hemmung der Summenströme erklärt sich folglich nicht durch einen Effekt von ϵ -Aminocaprinsäure auf glutamaterge Rezeptoren.

4.4 Hinweis auf präsynaptische Hemmung der Vesikelfreisetzung

Neben der stärker geminderten postsynaptischen Transmission durch den GABA_A-Rezeptor bei elektrischer gegenüber photolytischer Stimulation gibt es weitere Hinweise auf eine Hemmung der präsynaptischen Vesikelfreisetzung. Bei AMPA- und NMDA-Rezeptoren zeigt sich kein Effekt von EACA auf die photolytisch evozierten postsynaptischen Ströme, jedoch eine Reduktion ebengenannter bei elektrischer Stimulation. Der signifikante Effekt auf die Paired-Pulse Ratio spricht ebenfalls für ein präsynaptisches Geschehen.

Auch die gemessene Reduktion der Zahl pro Zeitspanne spontan freigesetzter GABA_A-Vesikel unterstützt diese Annahmen. Da hierbei Vesikel detektiert werden, die unabhängig von Aktionspotentialen mit der Zellmembran fusionieren, spricht dies darüber hinaus spezifischer für ein durch ein von ϵ -Aminocaprinsäure beeinflusstes Geschehen in der Axonterminale der präsynaptischen Zelle.

Ein Argument für die transmitterunspezifische Hemmung der präsynaptischen Vesikelfusion ist die unter dem Einfluss von EACA verminderte Anzahl an freigesetzten Glutamatvesikeln. Diese konnten mithilfe der Anzahl der von postsynaptischen AMPA-Rezeptoren detektierten mEPSCs quantifiziert werden, welche nach Zugabe von EACA deutlich abnahmen.

4.5 Relevanz der gewählten Konzentrationen

Wichtig für die Aussagekraft dieser Arbeit ist die Einordnung der verwendeten Konzentrationen von ϵ -Aminocaprinsäure und der Vergleich mit typischen Wirkspiegeln sowie Plasmaspitzenkonzentrationen *in vivo*.

Seit 1962 ist die zumeist anvisierte Plasma-Zielkonzentration von EACA bei 1 mmol/l, oft wird das Risiko einer Überdosierung jedoch in Kauf genommen, um die Wahrscheinlichkeit einer Unterdosierung und somit einer erhöhten Fibrinolyse zu minimieren (Nielsen, Cankovic und Steenwyk, 2007).

Die Fachinformation des Herstellers empfiehlt bei fibrinolytischer Blutung die initiale intravenöse Gabe von 4–5 g EACA (Hospira Inc.; Lake Forest; IL 60045, 2019). Dies würde nach Gabe als Bolus bei einem 75 kg schweren Patienten mit normwertigem Blutanteil und Hämatokrit in Plasmakonzentrationen von 8,1–16,8 mmol/l resultieren¹. Allerdings würden diese Maximalspiegel nur bei Bolusgabe entstehen, zudem führen Umverteilung und Exkretion zu einem raschen Abfall auf niedrigere Konzentrationen.

Eine Vergleichsstudie aus dem Jahr 1980, welche die Unterschiede zwischen enteraler und parenteraler Gabe von ϵ -Aminocapronsäure untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass ein intravenös verabreichter EACA-Bolus von 100 mg/kg zu einem initialen Plasmaspiegel von 150 μ g/ml führte, was einer Konzentration von 11,4 mmol/l entspricht (Nilsson, 1980).

Butterworth et. al versuchten ein Dosierungsschema zu etablieren, dabei führten initiale Gaben von 30 bzw. 100 mg/kg als Kurzinfusion über 10 Minuten zu Plasmakonzentrationen von 0,7–1,6 mmol/l respektive 3,8–8 mmol/l (Butterworth et al., 1999). Nach einer Gabe von EACA von 150 mg/kg über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde bei Operationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ein durchschnittlicher Plasmaspiegel von 4,5 mmol/l gemessen (Bennett-Guerrero et al., 1997). Der höchste erfasste Wert lag bei 7,6 mmol/l. Bei Verwendung eines gewichtsunabhängigen Schemas bei Koronarby-pass-Operationen mit einer EACA-Basalrate von 1 g/h resultierte eine Bolusgabe von 5 g in einer durchschnittlichen Plasmakonzentration von 4,8 mmol/l. In dieser Studie lag der Höchstwert bei über 13,7 mmol/l (Strauss et al., 2021). Eine frühere Studie maß EACA-Spitzenkonzentrationen zwischen 3,2 und 6,9 mmol/l nach Verabreichung von 100 mg/kg über 15 Minuten, 5 g im Herz-Lungen-Maschinen-Priming-Volumen von 2 Litern und einer Basalrate von 30 mg/kg (Greilich et al., 2004).

¹ Ausgehend von einem Blutanteil von 77 ± 10 ml/kg bei Männern und 65 ± 10 ml/kg bei Frauen sowie einem Hämatokrit von 42–50 % bzw. 37–45 %.

Weitere Dosierungskonzepte beinhalten Initialdosen von 15 g und Primingdosen von bis zu 10 g (Hardy et al., 1998). Eine weitere Studie berichtet davon, in einer Studiengruppe von 159 Patienten nach Gabe von bis zu 90 g EACA über den Zeitraum von zwei Stunden keine schädliche Wirkung beobachtet zu haben (Lambert et al., 1979), sodass hier von deutlich höheren Plasmaspiegeln ausgegangen werden muss.

Lecker et al. konnten 2012 zeigen, dass intraoperative Plasmakonzentrationen von 2 mmol/l TXA zu einer Liquorkonzentration von über 200 µmol/l führten. Mangels vergleichbarer Studien in Bezug auf Liquorkonzentrationen von ε-Aminocapronsäure können diese Werte zur groben Abschätzung dienen, da EACA und TXA strukturelle Ähnlichkeit und eine vergleichbare Molmasse aufweisen. Ebenso liegt die Plasmakonzentration von Lysin (Schmidt et al., 2016), der biogenen Aminosäure, mit der EACA und TXA am nächsten verwandt sind, etwa um den Faktor 10 über ihrer Liquorkonzentration (Blau, Duran und Gibson, 2008). Somit könnten Spitzenliquorkonzentrationen von ε-Aminocapronsäure bei üblicher Anwendung von circa 1 mmol/l durchaus realistisch sein. Zur Bestätigung dieser Abschätzung sind jedoch weitere experimentelle Studien notwendig.

4.6 Vereinbarkeit mit der aktuellen Studienlage

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Einordnung der Ergebnisse in die vorbekannte klinische Studienlage zu neurologischen Nebenwirkungen von Lysinanaloga.

4.6.1 Vasospasmen bei Subarachnoidalblutungen nach EACA-Gabe

4.6.1.1 Klinisch

Eine der ersten neurologischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Antifibrinolytika traten bei Patienten mit aneurysmatischen Subarachnoidalblutungen (SAB) auf (Sonntag und Stein, 1974). Eine häufige Komplikation dieser Erkrankung sind Vasospasmen der hirnersorgenden Gefäße, die zerebrale Ischämien verursachen können. Bei Betroffenen traten ischämische Defizite nach Therapie mit Lysinanaloga häufiger auf (Kassell, Torner und Adams, 1984) oder hatten ein

schlechteres Outcome (Roos et al., 2003). In der Folge kam es zum Konsens, Antifibrinolytika bei Subarachnoidalblutungen nicht mehr einzusetzen (Roos et al., 2003). Dieses Dogma steht mittlerweile in der Diskussion, nachdem nun die rasche operative oder interventionelle Versorgung des Aneurysmas in den Vordergrund gerückt ist und sich das Ischämierisiko durch eine verkürzte antifibrinolytische Therapie und verbesserte Therapiekonzepte mittels Calciumkanalantagonisten und optimiertem Volumenmanagement senken ließ (Bouillon-Minois et al., 2021; Gaberel et al., 2012).

4.6.1.2 Experimentell

Die Ätiologie der Aggravation der Vasospasmen durch Antifibrinolytika ist noch nicht geklärt. Ein Erklärungsansatz wäre die vasokonstriktive Wirkung von Lysinanaloga, die für ϵ -Aminocaprinsäure bereits gezeigt werden konnte (Heyman et al., 2004). Möglicherweise geschieht dies durch ihre anti-glycinerge und – auch in dieser Arbeit bestätigte – anti-GABAerge Wirkung. Dies wäre nicht undenkbar, zumal vasodilatatorische Effekte von GABA (Alborch et al., 1984) und Glycin (Tyukina et al., 2017) bereits beschrieben sind. Diese These unterstützen würde die Tatsache, dass SAB-Patienten, die präoperativ statt der vollen Dosis TXA eine Kombination aus Aprotinin und der halben Dosis TXA erhielten, kein erhöhtes Ischämierisiko zu haben scheinen (Guidetti und Spallone, 1981; Schisano und Nina, 1997; Spallone et al., 1987).

4.6.2 Krampfanfälle nach EACA-Gabe

4.6.2.1 Klinisch

Bisher konnte das vermehrte Auftreten von Krampfanfällen unter antifibrinolytischer Therapie insbesondere bei Hochdosisapplikation von Tranexamsäure nachgewiesen werden (Murkin et al., 2010), eine aktuelle Studie sieht ein erhöhtes Risiko ab 2 g/d (Murao et al., 2021). Die Inzidenz von Krampfanfällen lag bei einer Studie aus Winnipeg bei circa 1 % der mit TXA behandelten kardiochirurgischen Patienten, die Dosierung war hier 30 mg/kg als initialer Bolus, gefolgt von einer kontinuierlich

infundierten Erhaltungsdosis von 16 mg/kg/h (Manji et al., 2012). Eine vergleichbare Abhandlung über Krampfanfälle bei kardiochirurgischen Eingriffen, die TXA mit EACA vergleicht, verzeichnet Inzidenzen von 7,6 % bzw. 3,3 % (Martin et al., 2011). Die Krampfanfälle traten typischerweise 5–6 Stunden postoperativ auf, was auf die Koinzidenz von noch bestehenden TXA-Spiegeln und abfallenden protektiven Hypnotikaspiegeln zurückgeführt wurde (Manji et al., 2012).

Dem gegenüber steht die klinische Datenlage zu Krampfanfällen nach Gabe von ϵ -Aminocapronsäure. Durch die obengenannte Studie kann leider noch keine Aussage getroffen werden, ob EACA Krampfanfälle begünstigt, da es gerade nach kardiochirurgischen Eingriffen tendenziell häufiger zu Krampfanfällen kommt und eine entsprechende Kontrollgruppe fehlt (Martin et al., 2011). Interessanter ist hier der Vergleich zwischen EACA und Aprotinin, da bei letzterem eine erhöhte Häufigkeit von Krampfanfällen bei nicht-kardiochirurgischen Eingriffen bisher nicht berichtet worden ist. Dabei zeigt der Vergleich von EACA und Aprotinin bei kardiochirurgischen Operationen ein vergleichbares Auftreten von Krampfanfällen in beiden Studiengruppen (Martin et al., 2013).

Eine erhöhte Inzidenz von Krampfanfällen nach Gabe von ϵ -Aminocapronsäure nach nicht-kardiochirurgischen Eingriffen scheint noch nicht beschrieben worden zu sein, es gibt auch nur zwei Fallberichte von Krampfanfällen, die unmittelbar mit der Gabe von EACA in Verbindung gebracht werden (Feffer, Parray und Westring, 1978; Rabinovici et al., 1989). In beiden Fällen wurde EACA (6 g bzw. 3 g) beim wachen Patienten intravenös verabreicht.

Wichtig vor dem Hintergrund dieser Datenlage ist die Tatsache, dass die antifibrinolytische Potenz von Tranexamsäure etwa um den Faktor 6–10 höher ist als die von ϵ -Aminocapronsäure und TXA dementsprechend auch in niedrigerer Dosierung angewandt wird. Demzufolge kann man daraus schließen, dass das krampffördernde Potenzial von TXA deutlich höher ist als das von EACA. Dies bestätigt sich auch in der Praxis (Keyl et al., 2011).

4.6.2.2 Experimentell

Diese Beobachtungen lassen sich mit elektrophysiologischen Untersuchungen zu Lysinanaloga durchaus in Einklang bringen. Auf synaptischer Ebene konnte gezeigt werden, dass Tranexamsäure sowohl die durch den GABA_A-Rezeptor (Kratzer et al., 2014) als auch die durch den Glycin-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme hemmt (Lecker et al., 2012). Eine Hemmung dieser inhibitorischen Rezeptoren bewirkt wiederum eine Disinhibition, die ein Krampfgeschehen begünstigen würde. Zudem demonstrierten VSDI-Messungen eine durch TXA dosisabhängig verstärkte Erregungsausbreitung in Amygdala und Hippocampus (Irl et al., 2017; Kratzer et al., 2014). Ein Effekt auf präsynaptische Mechanismen sowie die glutamaterge Übertragung konnte in ebengenannten Studien nicht gefunden werden. Somit würde Tranexamsäure durch eine rein disinhibitorische Wirkung indirekt pro-exzitatorisch und krampfanfallfördernd wirken.

Es wurde gezeigt, dass ϵ -Aminocaprinsäure tendenziell weniger mit Krampfanfällen assoziiert wird als TXA. Dies ist kongruent mit den Daten dieser Arbeit, wonach EACA *in vitro* eine Inhibition der Erregungsausbreitung in der Amygdala bewirkt. Dieser Unterschied zur durch Tranexamsäure gesteigerten Signalausbreitung lässt sich auch auf Zellebene feststellen. Im Rahmen der Patch-Clamp-Experimente konnte gezeigt werden, dass EACA GABA_A-Rezeptoren in ähnlichem Ausmaß wie TXA postsynaptisch hemmt (Kratzer et al., 2014). Die aktuellen Experimente zur ϵ -Aminocaprinsäure weisen darüber hinaus auf eine unspezifische präsynaptische Hemmung der Transmitterfreisetzung hin, die in der Summe eine Inhibition der synaptischen Übertragung in der Amygdala zur Folge hat. Bereits vorher bekannt war eine Hemmung von Glycin-Rezeptoren durch TXA und EACA, aber auch hier hat TXA mit einer niedrigeren IC₅₀ einen stärkeren disinhibitorischen Effekt als ϵ -Aminocaprinsäure (Lecker et al., 2012).

Auch bei Tierversuchen am intakten Gehirn konnte schon vor über 40 Jahren gezeigt werden, dass Tranexamsäure Krampfanfälle stärker begünstigt als EACA. Dabei wurden Katzen hohe Lysinanaloga-Dosen injiziert, bis das EEG anfallstypische Muster aufwies. Hierzu waren bei der Verwendung von ϵ -Aminocaprinsäure um ein Vielfaches höhere Dosen notwendig als beim Einsatz von TXA (Yamaura et al., 1980).

4.7 Limitationen und Ausblick

Diese Arbeit gibt Erklärungsansätze für das geringere epileptogene Potenzial von ϵ -Aminocapronsäure gegenüber Tranexamsäure, wirft jedoch auch weitere Fragen zu prä- und postsynaptischen Interaktionen auf. So lässt sich die starke Inhibition von Summenströmen und Erregungsausbreitung durch EACA nicht hinreichend durch Summation der Effekte auf GABA_A-, AMPA- und NMDA-Rezeptoren erklären. Bisher nicht untersucht sind Interaktionen mit GABA_B-, Kainat-, metabotropen Glutamatrezeptoren, Natrium-, Kalium- und Kalziumkanälen.

Krampfanfälle nach der Applikation von EACA und insbesondere TXA sind ein Phänomen, welches größtenteils nach Verabreichung von hohen Dosen im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine auftritt. Ob diese erhöhte Inzidenz allein der Dosierung oder zu einem gewissen Teil auch operationsassoziierten Pathologien wie Embolien geschuldet ist, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht sagen. Inwieweit Lysinanaloga das Risiko für Krampfanfälle bei nicht-kardiochirurgischen Eingriffen steigern, bedarf noch weiterer Untersuchung.

In diesem Zusammenhang könnte auch der experimentell bereits bestätigte vasokonstriktorische Effekt von ϵ -Aminocapronsäure eine wichtige Rolle spielen, welcher auch einen Erklärungsansatz für die erhöhte Inzidenz von Ischämien nach Einsatz bei Patienten mit Subarachnoidalblutungen bietet. Die genaue Ätiologie ist jedoch bisher unerforscht.

Die Liquorgängigkeit von ϵ -Aminocapronsäure wurde in der vorliegenden Arbeit nur estimiert, experimentell bestimmte Werte wie bei Tranexamsäure (Lecker et al., 2012) könnten jedoch in weiteren Studien bei Operationen mit Einsatz eines Spinalkatheters unter Antifibrinolyse durch EACA bestimmt werden. Hierzu könnte eine neue Methode zur Konzentrationsbestimmung von EACA dienlich sein (Anwer et al., 2022).

Möglicherweise könnten in der Zukunft Antifibrinolytika mit einem günstigeren Nebenwirkungsprofil zur Anwendung kommen. Momentan gibt es theoretische Überlegungen zu einigen artverwandten Molekülen, welche eine rechnerisch noch höhere Affinität zur Lysinbindestelle des Plasminogens aufweisen (Steinmetzer et al., 2020).

5 Zusammenfassung

Seit 2007 kam es im Bereich der antifibrinolytischen Therapie nach Aussetzen der Zulassung von Aprotinin gezwungenermaßen zu einer plötzlichen Umstellung. Seitdem stehen ausschließlich Lysinanaloga zur Verfügung, von welchen nur ϵ -Aminocaprinsäure und Tranexamsäure im operativen Setting breite Anwendung finden. Mangels Alternativen ist bei diesem Duopol eine genaue Kenntnis der jeweiligen unerwünschten Arzneimittelwirkungen unabdinglich. Insbesondere nach kardiochirurgischen Eingriffen konnte bei mit Lysinanaloga behandelten Patienten eine Häufung von Krampfanfällen beobachtet werden. Patienten, die Tranexamsäure erhielten, waren dabei vermehrt betroffen. In den letzten zehn Jahren konnte gezeigt werden, dass Tranexamsäure auf die erregungshemmende, GABA_A-Rezeptor-vermittelte synaptische Übertragung postsynaptisch inhibitorisch wirkt und somit die Entstehung von Krampfanfällen begünstigt. Über die Wirkung von ϵ -Aminocaprinsäure auf die synaptische Übertragung war deutlich weniger bekannt. Nun konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ϵ -Aminocaprinsäure zwar GABA_A-Rezeptor-vermittelte synaptische Übertragung in der Amygdala prä- und postsynaptisch hemmt, aber auch die glutamaterge Übertragung präsynaptisch inhibiert wird. Bei den VSDI-Messungen ergab sich durch ϵ -Aminocaprinsäure eine gedämpfte Erregungsausbreitung in der murinen Amygdala. Auch die in Patch-Clamp-Experimenten demonstrierte Hemmung der Summenströme passte zur klinischen Datenlage, nach welcher Tranexamsäure, die keine inhibitorische Wirkung auf Summenströme hat, ein deutlich höheres epileptogenes Potenzial aufweist. Die genauen Mechanismen, wodurch die prä- und postsynaptischen Effekte hervorgerufen werden, sind jedoch noch nicht bekannt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Ebenso wirft die Diskrepanz zwischen der starken Hemmung der Summenströme und der schwächeren Hemmung der glutamatergen synaptischen Übertragung via AMPA- und NMDA-Rezeptoren zusätzliche Fragen auf, die in diesem Dissertationsvorhaben nicht beantwortet werden konnten. Die Frage, ob aus Gründen der Prävention perioperativer epileptischer Anfälle die Gabe von ϵ -Aminocaprinsäure anstatt von Tranexamsäure erfolgen sollte, erfordert neben weiteren Studien zur Inzidenz insbesondere außerhalb kardiochirurgischer Eingriffe eine ausführliche Nutzen-Risiko-Abwägung bezüglich der anderen potenziellen Nebenwirkungen.

Literaturverzeichnis

- Alborch, E., G. Torregrosa, J. C. Terrasa und C. Estrada. (1984). GABA receptors mediate cerebral vasodilation in the unanesthetized goat. *Brain Res*, 321(1), 103-110. doi:10.1016/0006-8993(84)90685-1
- Alkjaersig, N., A. P. Fletcher und S. Sherry. (1959). xi-Aminocaproic acid: an inhibitor of plasminogen activation. *J Biol Chem*, 234(4), 832-837.
- Anwer, E. F., D. A. M. Nour El-Deen, S. M. Derayea und M. A. Omar. (2022). Benzofurazan - based fluorophore for the spectrofluorimetric determination of 6-Aminocaproic acid: Application to spiked human plasma and urine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 268, 120723. doi:10.1016/j.saa.2021.120723
- Barnes-Davies, M. und I. D. Forsythe. (1995). Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. *J Physiol*, 488 (Pt 2), 387-406. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020974
- Bennett-Guerrero, E., J. G. Sorohan, A. T. Canada, L. Ayuso, M. F. Newman, J. G. Reves und M. G. Mythen. (1997). epsilon-Aminocaproic acid plasma levels during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*, 85(2), 248-251. doi:10.1097/00000539-199708000-00002
- Bennett, M. V. (1997). Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol*, 26(6), 349-366. doi:10.1023/a:1018560803261
- Blau, N., M. Duran und K. M. Gibson. (2008). *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. Berlin: Springer.
- Bouillon-Minois, J. B., C. Croizier, J. S. Baker, B. Pereira, F. Moustafa, J. Outrey, J. Schmidt, N. Peschanski und F. Dutheil. (2021). Tranexamic acid in non-traumatic intracranial bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 11(1), 15275. doi:10.1038/s41598-021-94727-y
- Bowie, D. (2012). Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. *J Physiol*, 590(1), 49-61. doi:10.1113/jphysiol.2011.221689
- Brohan, J. und B. G. Goudra. (2017). The Role of GABA Receptor Agonists in Anesthesia and Sedation. *CNS Drugs*, 31(10), 845-856. doi:10.1007/s40263-017-0463-7
- Butterworth, J., R. L. James, Y. Lin, R. C. Prielipp und A. S. Hudspeth. (1999). Pharmacokinetics of epsilon-aminocaproic acid in patients undergoing aortocoronary bypass surgery. *Anesthesiology*, 90(6), 1624-1635.
- Cacabelos, R., M. Takeda und B. Winblad. (1999). The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 14(1), 3-47. doi:10.1002/(sici)1099-1166(199901)14:1<3::aid-gps897>3.0.co;2-7
- Chapin, J. C. und K. A. Hajjar. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*, 29(1), 17-24. doi:10.1016/j.blre.2014.09.003
- Darlison, M. G., I. Pahal und C. Thode. (2005). Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. *Cell Mol Neurobiol*, 25(3-4), 607-624. doi:10.1007/s10571-005-4004-4
- Dotz, H. U., M. Eder, A. Schierloh und W. Zieglgansberger. (2002). Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices. *Sci STKE*, 2002(120), pl2. doi:10.1126/stke.2002.120.pl2
- Dutar, P. und R. A. Nicoll. (1988). A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature*, 332(6160), 156-158. doi:10.1038/332156a0
- Edmunds, L. H., Jr. (2010). Managing fibrinolysis without aprotinin. *Ann Thorac Surg*, 89(1), 324-331. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.10.043
- Evenseth, L. S. M., M. Gabrielsen und I. Sylte. (2020). The GABAB Receptor-Structure, Ligand Binding and Drug Development. *Molecules*, 25(13). doi:10.3390/molecules25133093
- Farrar, S. J., P. J. Whiting, T. P. Bonnert und R. M. McKernan. (1999). Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem*, 274(15), 10100-10104. doi:10.1074/jbc.274.15.10100

- Feffer, S. E., H. R. Parry und D. W. Westring. (1978). Seizure after infusion of aminocaproic acid. *JAMA*, 240(22), 2468.
- Fergusson, D. A., P. C. Hebert, C. D. Mazer, S. Fremes, C. MacAdams, J. M. Murkin, K. Teoh, P. C. Duke, R. Arellano, M. A. Blajchman, J. S. Bussieres, D. Cote, J. Karski, R. Martineau, J. A. Robblee, M. Rodger, G. Wells, J. Clinch, R. Pretorius und B. Investigators. (2008). A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med*, 358(22), 2319-2331. doi:10.1056/NEJMoa0802395
- Furtmuller, R., M. G. Schlag, M. Berger, R. Hopf, S. Huck, W. Sieghart und H. Redl. (2002). Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma-aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(1), 168-173. doi:10.1124/jpet.301.1.168
- Furukawa, H., S. K. Singh, R. Mancusso und E. Gouaux. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), 185-192. doi:10.1038/nature04089
- Gaberel, T., C. Magheru, E. Emery und J. M. Derlon. (2012). Antifibrinolytic therapy in the management of aneurismal subarachnoid hemorrhage revisited. A meta-analysis. *Acta Neurochir (Wien)*, 154(1), 1-9; discussion 9. doi:10.1007/s00701-011-1179-y
- Gean, P. W. (1990). NMDA receptor-independent epileptiform activity induced by magnesium-free solution in rat amygdala neurons is blocked by CNQX. *Neurosci Lett*, 119(1), 53-55. doi:10.1016/0304-3940(90)90753-v
- Goddard, G. V. (1967). Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*, 214(5092), 1020-1021. doi:10.1038/2141020a0
- Greilich, P. E., C. F. Brouse, C. S. Rinder, B. R. Smith, B. A. Sandoval, H. M. Rinder, R. C. Eberhart und M. E. Jessen. (2004). Effects of epsilon-aminocaproic acid and aprotinin on leukocyte-platelet adhesion in patients undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology*, 100(2), 225-233. doi:10.1097/00000542-200402000-00008
- Guidetti, B. und A. Spallone. (1981). The role of antifibrinolytic therapy in the preoperative management of recently ruptured intracranial aneurysms. *Surg Neurol*, 15(4), 239-248. doi:10.1016/s0090-3019(81)80001-8
- Hardy, J. F., S. Belisle, C. Dupont, F. Harel, D. Robitaille, M. Roy und L. Gagnon. (1998). Prophylactic tranexamic acid and epsilon-aminocaproic acid for primary myocardial revascularization. *Ann Thorac Surg*, 65(2), 371-376. doi:10.1016/s0003-4975(97)01016-3
- Herrling, P. L. (1984). Evidence for GABA as the transmitter for early cortically evoked inhibition of cat caudate neurons. *Exp Brain Res*, 55(3), 528-534. doi:10.1007/BF00235284
- Hess, J. R., K. Brohi, R. P. Dutton, C. J. Hauser, J. B. Holcomb, Y. Kluger, K. Mackway-Jones, M. J. Parr, S. B. Rizoli, T. Yukioka, D. B. Hoyt und B. Bouillon. (2008). The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*, 65(4), 748-754. doi:10.1097/TA.0b013e3181877a9c
- Heyman, S. N., Z. Hanna, T. Nassar, A. Shina, S. Akkawi, M. Goldfarb, S. Rosen und A. A. Higazi. (2004). The fibrinolytic system attenuates vascular tone: effects of tissue plasminogen activator (tPA) and aminocaproic acid on renal microcirculation. *Br J Pharmacol*, 141(6), 971-978. doi:10.1038/sj.bjp.0705714
- Honore, T. (1989). Excitatory amino acid receptor subtypes and specific antagonists. *Med Res Rev*, 9(1), 1-23. doi:10.1002/med.2610090102
- Hospira Inc.; Lake Forest; IL 60045, U. S. A. (2019). Prescribing Information - Aminocaproic Acid; Injection USP; 5 g/20 mL (250 mg/mL) Plastic Fliptop Vial. Retrieved from <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/getFile.cfm?setid=1c5bc1dd-e9ec-44c1-9281-67ad482315d9&type=pdf>
- Hsu, G., J. A. Taylor, J. E. Fiadjoe, A. M. Vincent, E. Y. Pruitt, S. P. Bartlett und P. A. Stricker. (2016). Aminocaproic acid administration is associated with reduced perioperative blood loss and transfusion in pediatric craniofacial surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*, 60(2), 158-165. doi:10.1111/aas.12608
- Hübner, G. E., R. C. Koch, K. B. Sprenger, P. J. Stadler und C. F. Golker. (1996). Examination of the biological safety of a drug derived from mammalian organs.

- Arzneimittelforschung*, 46(6), 657-661.
- Hunt, B. J. (2014). Bleeding and coagulopathies in critical care. *N Engl J Med*, 370(9), 847-859. doi:10.1056/NEJMra1208626
- Irl, H., S. Kratzer, S. Schwerin, E. Kochs, M. Blobner, G. Schneider, G. Rammes und R. Haseneder. (2017). Tranexamic acid impairs hippocampal synaptic transmission mediated by gamma aminobutyric acid receptor type A. *Eur J Pharmacol*, 815, 49-55. doi:10.1016/j.ejphar.2017.10.001
- Iwata, J., K. Chida und J. E. LeDoux. (1987). Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res*, 418(1), 183-188. doi:10.1016/0006-8993(87)90978-4
- Jegla, T. J., C. M. Zmasek, S. Batalov und S. K. Nayak. (2009). Evolution of the human ion channel set. *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(1), 2-23. doi:10.2174/138620709787047957
- Kassell, N. F., J. C. Torner und H. P. Adams, Jr. (1984). Antifibrinolytic therapy in the acute period following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Preliminary observations from the Cooperative Aneurysm Study. *J Neurosurg*, 61(2), 225-230. doi:10.3171/jns.1984.61.2.0225
- Keifer, O. P., Jr., R. C. Hurt, K. J. Ressler und P. J. Marvar. (2015). The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. *Physiology (Bethesda)*, 30(5), 389-401. doi:10.1152/physiol.00058.2014
- Keshavarzi, S., R. K. Sullivan, D. J. Ianno und P. Sah. (2014). Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *J Neurosci*, 34(26), 8699-8715. doi:10.1523/JNEUROSCI.1176-14.2014
- Keyl, C., R. Uhl, F. Beyersdorf, S. Stampf, C. Lehane, C. Wiesenack und D. Trenk. (2011). High-dose tranexamic acid is related to increased risk of generalized seizures after aortic valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg*, 39(5), e114-121. doi:10.1016/j.ejcts.2010.12.030
- Kim, J. J., A. Gharpure, J. Teng, Y. Zhuang, R. J. Howard, S. Zhu, C. M. Noviello, R. M. Walsh, Jr., E. Lindahl und R. E. Hibbs. (2020). Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature*, 585(7824), 303-308. doi:10.1038/s41586-020-2654-5
- Kornhuber, J., J. Bormann, W. Retz, M. Hubers und P. Riederer. (1989). Memantine displaces [3H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol*, 166(3), 589-590. doi:10.1016/0014-2999(89)90384-1
- Kratzer, S., H. Irl, C. Mattusch, M. Burge, J. Kurz, E. Kochs, M. Eder, G. Rammes und R. Haseneder. (2014). Tranexamic acid impairs gamma-aminobutyric acid receptor type A-mediated synaptic transmission in the murine amygdala: a potential mechanism for drug-induced seizures? *Anesthesiology*, 120(3), 639-649. doi:10.1097/ALN.000000000000103
- Kuhse, J., H. Betz und J. Kirsch. (1995). The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol*, 5(3), 318-323. doi:10.1016/0959-4388(95)80044-1
- Lambert, C. J., A. J. Marengo-Rowe, J. E. Leveson, R. H. Green, J. P. Thiele, G. F. Geisler, M. Adam und B. F. Mitchel. (1979). The treatment of postperfusion bleeding using epsilon-aminocaproic acid, cryoprecipitate, fresh-frozen plasma, and protamine sulfate. *Ann Thorac Surg*, 28(5), 440-444. doi:10.1016/s0003-4975(10)63153-0
- Law, R. H., T. Caradoc-Davies, N. Cowieson, A. J. Horvath, A. J. Quek, J. A. Encarnacao, D. Steer, A. Cowan, Q. Zhang, B. G. Lu, R. N. Pike, A. I. Smith, P. B. Coughlin und J. C. Whisstock. (2012). The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep*, 1(3), 185-190. doi:10.1016/j.celrep.2012.02.012
- Lecker, I., D. S. Wang, A. D. Romaschin, M. Peterson, C. D. Mazer und B. A. Orser. (2012). Tranexamic acid concentrations associated with human seizures inhibit glycine receptors. *J Clin Invest*, 122(12), 4654-4666. doi:10.1172/JCI63375
- Lecker, I., D. S. Wang, P. D. Whissell, S. Avramescu, C. D. Mazer und B. A. Orser. (2016).

- Tranexamic acid-associated seizures: Causes and treatment. *Ann Neurol*, 79(1), 18-26. doi:10.1002/ana.24558
- Lerma, J. und J. M. Marques. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron*, 80(2), 292-311. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.045
- Li, Y. und J. Wang. (2019). Efficacy of aminocaproic acid in the control of bleeding after total knee and hip arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 98(9), e14764. doi:10.1097/MD.00000000000014764
- Llinas, R., I. Z. Steinberg und K. Walton. (1981). Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J*, 33(3), 323-351. doi:10.1016/S0006-3495(81)84899-0
- Loew, L. M., L. B. Cohen, J. Dix, E. N. Fluhler, V. Montana, G. Salama und J. Y. Wu. (1992). A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J Membr Biol*, 130(1), 1-10. doi:10.1007/BF00233734
- Loscher, W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res*, 42(7), 1873-1888. doi:10.1007/s11064-017-2222-z
- Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*, 84(4), 1051-1095. doi:10.1152/physrev.00042.2003
- Mahdy, A. M. und N. R. Webster. (2004). Perioperative systemic haemostatic agents. *Br J Anaesth*, 93(6), 842-858. doi:10.1093/bja/aeh227
- Mangano, D. T., I. C. Tudor, C. Dietzel, G. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research, R. Ischemia und F. Education. (2006). The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med*, 354(4), 353-365. doi:10.1056/NEJMoa051379
- Manji, R. A., H. P. Grocott, J. Leake, R. E. Ariano, J. S. Manji, A. H. Menkis und E. Jacobsohn. (2012). Seizures following cardiac surgery: the impact of tranexamic acid and other risk factors. *Can J Anaesth*, 59(1), 6-13. doi:10.1007/s12630-011-9618-z
- Mannucci, P. M. und M. Levi. (2007). Prevention and treatment of major blood loss. *N Engl J Med*, 356(22), 2301-2311. doi:10.1056/NEJMra067742
- Maren, S., G. Aharonov und M. S. Fanselow. (1996). Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci*, 110(4), 718-726. doi:10.1037//0735-7044.110.4.718
- Martin, K., R. Gertler, M. MacGuill, N. P. Mayr, A. Hapfelmeier, J. Horer, M. Vogt, P. Tassani und G. Wiesner. (2013). Replacement of aprotinin by epsilon-aminocaproic acid in infants undergoing cardiac surgery: consequences for blood loss and outcome. *Br J Anaesth*, 110(4), 615-621. doi:10.1093/bja/aes430
- Martin, K., J. Knorr, T. Breuer, R. Gertler, M. Macguill, R. Lange, P. Tassani und G. Wiesner. (2011). Seizures after open heart surgery: comparison of epsilon-aminocaproic acid and tranexamic acid. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 25(1), 20-25. doi:10.1053/j.jvca.2010.10.007
- McCutcheon, A. D. (1963). Experimental Pancreatitis: Use of a New Antiproteolytic Substance, Trasylol. *Ann Surg*, 158, 233-239.
- McNamara, J. O., M. C. Byrne, R. M. Dasheiff und J. G. Fitz. (1980). The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol*, 15(2), 139-159. doi:10.1016/0301-0082(80)90006-4
- Mennerick, S., M. Chisari, H. J. Shu, A. Taylor, M. Vasek, L. N. Eisenman und C. F. Zorumski. (2010). Diverse voltage-sensitive dyes modulate GABAA receptor function. *J Neurosci*, 30(8), 2871-2879. doi:10.1523/JNEUROSCI.5607-09.2010
- Midura-Nowaczek, K., M. Purwin, A. Markowska, D. Drozdowska und M. Bruzgo. (2013). Effect of short peptides containing lysine and epsilon-aminocaproic acid on fibrinolytic activity of plasmin and topoisomerase II action on supercoiled DNA. *Acta Pol Pharm*, 70(3), 431-434.
- Mouri, G., E. Jimenez-Mateos, T. Engel, M. Dunleavy, S. Hatazaki, A. Paucard, S. Matsushima, W. Taki und D. C. Henshall. (2008). Unilateral hippocampal CA3-predominant damage and short latency epileptogenesis after intra-amygdala

- microinjection of kainic acid in mice. *Brain Res*, 1213, 140-151. doi:10.1016/j.brainres.2008.03.061
- Murao, S., H. Nakata, I. Roberts und K. Yamakawa. (2021). Effect of tranexamic acid on thrombotic events and seizures in bleeding patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 25(1), 380. doi:10.1186/s13054-021-03799-9
- Murkin, J. M., F. Falter, J. Granton, B. Young, C. Burt und M. Chu. (2010). High-dose tranexamic Acid is associated with nonischemic clinical seizures in cardiac surgical patients. *Anesth Analg*, 110(2), 350-353. doi:10.1213/ANE.0b013e3181c92b23
- Negrete-Diaz, J. V., T. S. Sihra, G. Flores und A. Rodriguez-Moreno. (2018). Non-canonical Mechanisms of Presynaptic Kainate Receptors Controlling Glutamate Release. *Front Mol Neurosci*, 11, 128. doi:10.3389/fnmol.2018.00128
- Nibler, R. und S. Boudeau. (2016). Eingeschränkte Indikation und Sicherheitsinformationen zu Aprotinin (Trasylol®). In:
- Nielsen, V. G., L. Cankovic und B. L. Steenwyk. (2007). Epsilon-aminocaproic acid inhibition of fibrinolysis in vitro: should the 'therapeutic' concentration be reconsidered? *Blood Coagul Fibrinolysis*, 18(1), 35-39. doi:10.1097/MBC.0b013e328010a359
- Nilsson, I. M. (1980). Clinical pharmacology of aminocaproic and tranexamic acids. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 14, 41-47.
- Noto, T., G. Zhou, Q. Yang, G. Lane und C. Zelano. (2021). Human Primary Olfactory Amygdala Subregions Form Distinct Functional Networks, Suggesting Distinct Olfactory Functions. *Front Syst Neurosci*, 15, 752320. doi:10.3389/fnsys.2021.752320
- Okamoto, S. und U. Okamoto. (1962). Amino-Methyl-Cyclohexane-Carboxylic Acid: Amcha. *The Keio Journal of Medicine*, 11(3), 105-115. doi:10.2302/kjm.11.105
- Rabinovici, R., A. Heyman, Y. Kluger und E. Shinar. (1989). Convulsions induced by aminocaproic acid infusion. *DICP*, 23(10), 780-781. doi:10.1177/106002808902301008
- Ranft, A., J. Kurz, M. Deuringer, R. Haseneder, H. U. Dodt, W. Zieglgansberger, E. Kochs, M. Eder und G. Hapfelmeier. (2004). Isoflurane modulates glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the amygdala. *Eur J Neurosci*, 20(5), 1276-1280. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03603.x
- Richter, L., C. de Graaf, W. Sieghart, Z. Varagic, M. Morzinger, I. J. de Esch, G. F. Ecker und M. Ernst. (2012). Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nat Chem Biol*, 8(5), 455-464. doi:10.1038/nchembio.917
- Roos, Y. B., G. J. Rinkel, M. Vermeulen, A. Algra und J. van Gijn. (2003). Antifibrinolytic therapy for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD001245. doi:10.1002/14651858.CD001245
- Root, C. M., C. A. Denny, R. Hen und R. Axel. (2014). The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. *Nature*, 515(7526), 269-273. doi:10.1038/nature13897
- Sack, E., T. H. Spaet, R. L. Gentile und P. B. Hudson. (1962). Reduction of postprostatectomy bleeding by epsilon-aminocaproic acid. *N Engl J Med*, 266, 541-543. doi:10.1056/NEJM196203152661105
- Sah, P., E. S. Faber, M. Lopez De Armentia und J. Power. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, 83(3), 803-834. doi:10.1152/physrev.00002.2003
- Salussolia, C. L., M. L. Prodromou, P. Borker und L. P. Wollmuth. (2011). Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *J Neurosci*, 31(31), 11295-11304. doi:10.1523/JNEUROSCI.5612-10.2011
- Scheefhals, N. und H. D. MacGillavry. (2018). Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Mol Cell Neurosci*, 91, 82-94. doi:10.1016/j.mcn.2018.05.002
- Schisano, G. und P. Nina. (1997). Antifibrinolytic therapy. *J Neurosurg*, 87(3), 486-487. doi:10.3171/jns.1997.87.3.0486a
- Schlicker, E. und T. Feuerstein. (2017). Human presynaptic receptors. *Pharmacol Ther*, 172,

- 1-21. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.11.005
- Schmidt, J. A., S. Rinaldi, A. Scalbert, P. Ferrari, D. Achaintre, M. J. Gunter, P. N. Appleby, T. J. Key und R. C. Travis. (2016). Plasma concentrations and intakes of amino acids in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans: a cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort. *Eur J Clin Nutr*, 70(3), 306-312. doi:10.1038/ejcn.2015.144
- Schmutzler, R. und E. Beck. (1962). [Effect of 6-aminocaproic acid and Trasylol on fibrinolysis]. *Schweiz Med Wochenschr*, 92, 1368-1370.
- Shaye, H., B. Stauch, C. Gati und V. Cherezov. (2021). Molecular mechanisms of metabotropic GABAB receptor function. *Sci Adv*, 7(22). doi:10.1126/sciadv.abg3362
- Sonntag, V. K. und B. M. Stein. (1974). Arteriopathic complications during treatment of subarachnoid hemorrhage with epsilon-aminocaproic acid. *J Neurosurg*, 40(4), 480-485. doi:10.3171/jns.1974.40.4.0480
- Spallone, A., F. S. Pastore, A. Rizzo und B. Guidetti. (1987). Low-dose tranexamic acid combined with aprotinin in the pre-operative management of ruptured intracranial aneurysms. *Neurochirurgia (Stuttg)*, 30(6), 172-176. doi:10.1055/s-2008-1054089
- Staley, K. (2015). Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci*, 18(3), 367-372. doi:10.1038/nn.3947
- Steinmetzer, T., O. Pilgram, B. M. Wenzel und S. J. A. Wiedemeyer. (2020). Fibrinolysis Inhibitors: Potential Drugs for the Treatment and Prevention of Bleeding. *J Med Chem*, 63(4), 1445-1472. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01060
- Stepan, J., J. Dine, T. Fenzl, S. A. Polta, G. von Wolff, C. T. Wotjak und M. Eder. (2012). Entorhinal theta-frequency input to the dentate gyrus trisynaptically evokes hippocampal CA1 LTP. *Front Neural Circuits*, 6, 64. doi:10.3389/fncir.2012.00064
- Strauss, E. R., E. Dahmane, M. Judd, D. Guo, B. Williams, M. Meyer, J. S. Gammie, B. Taylor, M. A. Mazzeffi, J. V. S. Gobburu und K. A. Tanaka. (2021). A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Investigation of an epsilon-Aminocaproic Acid Regimen Designed for Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 35(2), 406-417. doi:10.1053/j.jvca.2020.07.048
- Stuart, G. J. und S. J. Redman. (1991). Mechanisms of presynaptic inhibition studied using paired-pulse facilitation. *Neurosci Lett*, 126(2), 179-183. doi:10.1016/0304-3940(91)90548-8
- Svoboda, P., J. Teisinger, J. Novotny, L. Bourova, T. Drmota, L. Hejnova, Z. Moravcova, V. Lisy, V. Rudajev, J. Stohr, A. Vokurkova, I. Svandova und D. Durchankova. (2004). Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res*, 53 Suppl 1, S141-152.
- Thomas, K. und M. H. G. Goerne. (1914). Über die Herkunft des Kreatins im tierischen Organismus. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 92.
- Travis, J. und G. S. Salvesen. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*, 52, 655-709. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003255
- Tsurupa, G. und L. Medved. (2001). Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains. *Biochemistry*, 40(3), 801-808. doi:10.1021/bi001789t
- Tyukina, E., E. Sheshegova, Y. Nartsissov und G. Podoprigora. (2017). Vasodilatory Effect of the Dissolved Glycine locally applied on Pial Microvessels. *Ann Circ*, 034-037. doi:10.17352/ac.000010
- West, P. J., K. Thomson, P. Billingsley, T. Pruess, C. Rueda, G. W. Saunders, M. D. Smith, C. S. Metcalf und K. S. Wilcox. (2021). Spontaneous recurrent seizures in an intra-amygdala kainate microinjection model of temporal lobe epilepsy are differentially sensitive to antiseizure drugs. *Exp Neurol*, 349, 113954. doi:10.1016/j.expneurol.2021.113954
- Westaby, S. (1993). Aprotinin in perspective. *Ann Thorac Surg*, 55(4), 1033-1041. doi:10.1016/0003-4975(93)90149-c
- Witsch, J., D. Golkowski, T. T. Hahn, S. Petrou und H. Spors. (2015). Cortical alterations in a model for absence epilepsy and febrile seizures: in vivo findings in mice carrying a

- human GABA(A)R gamma2 subunit mutation. *Neurobiol Dis*, 77, 62-70.
doi:10.1016/j.nbd.2015.02.018
- Yamaura, A., T. Nakamura, H. Makino und Y. Hagihara. (1980). Cerebral complication of antifibrinolytic therapy in the treatment of ruptured intracranial aneurysm. Animal experiment and a review of literature. *Eur Neurol*, 19(2), 77-84.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	artificial cerebro-spinal fluid; künstlicher Liquor
AMCHA	<i>trans</i> -4-(Aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid; <i>trans</i> -4-(Aminomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AMPAR	AMPA-Rezeptor
AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
BART	Blood Conservation using Antifibrinolytics in a Randomized Trial; Blutersparnis durch den Gebrauch von Antifibrinolytika in einer randomisierten Studie
BLA	basolaterale Amygdala
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
BPTI	bovine pancreatic trypsin inhibitor; boviner pankreatischer Trypsininhibitor (Aprotinin)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CCD	charge-coupled device; ladungsgekoppeltes Bauteil
Di-4-ANEPPS	4-(2-(6-(Dibutylamino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3- sulfopropyl)pyridiniumhydroxid
DMSO	dimethyl sulfoxide; Dimethylsulfoxid
EACA	ϵ -aminocaproic acid; ϵ -Aminocaprionsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
eEPSC	evoked excitatory postsynaptic current; evozierter exzitatorischer postsynaptischer Strom
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency; Europäische Arzneimittel-Agentur
EPSC	excitatory postsynaptic current; exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	excitatory postsynaptic potential; exzitatorisches postsynaptisches Potential
FDA	Food and Drug Administration; Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FDS	fast, depolarisation-mediated VSDI signal; schnelles, depolarisationsvermitteltes VSDI-Signal
GABA	γ -aminobutyric acid; γ -Aminobuttersäure
GIRK	G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel; G-protein-gekoppelter einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
GlyR	Glycinrezeptor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPSC	inhibitory postsynaptic current; inhibitorischer postsynaptischer Strom
ISI	Interstimulusintervall
KOH	Kaliumhydroxid
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current; Miniatur-exzitatorischer-postsynaptischer-Strom
mIPSC	miniature inhibitory postsynaptic current; Miniatur-inhibitorischer-postsynaptischer-Strom
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline; 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]chinoxalin-2,3-dion
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartic acid; <i>N</i> -Methyl-D-Asparaginsäure

NMDAR	NMDA-Rezeptor
PAMBA	<i>para</i> -aminomethylbenzoic acid; <i>para</i> -Aminomethylbenzoesäure
pC	photocurrent; photolytisch evozierter Strom
PPD	paired-pulse depression
PPF	paired-pulse facilitation
PPR	paired-pulse ratio
PSC	postsynaptic current; postsynaptischer Strom
PSP	postsynaptic potential; postsynaptisches Potential
t-PA	tissue-type plasminogen activator; Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TTX	Tetrodotoxin
TXA	tranexamic acid; Tranexamsäure
u-PA	urokinase-type plasminogen activator; Urokinase
VLC	VideoLAN client
VSDI	voltage-sensitive dye imaging; Bildgebung mit spannungsabhängigen Farbstoffen

Verwendete Substanzen**(Standard-)aCSF**

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
Calciumchlorid-Dihydrat	147,01 g/mol	Sigma-Aldrich	2 mmol/l
D-(+)-Glucose Monohydrat	198,17 g/mol	Sigma-Aldrich	25 mmol/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	203,30 g/mol	Sigma-Aldrich	1 mmol/l
Natriumchlorid	58,44 g/mol	Sigma-Aldrich	125 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	84,01 g/mol	Sigma-Aldrich	25 mmol/l
Natriumphosphat (monobasisches Monohydrat)	198,17 g/mol	Sigma-Aldrich	1,25 mmol/l
Kaliumchlorid	74,55 g/mol	Sigma-Aldrich	2,5 mmol/l

Präparations-aCSF

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
Calciumchlorid-Dihydrat	147,01 g/mol	Sigma-Aldrich	0,5 mmol/l
D-(+)-Glucose Monohydrat	198,17 g/mol	Sigma-Aldrich	25 mmol/l
Kaliumchlorid	74,55 g/mol	Sigma-Aldrich	2,5 mmol/l
Natriumchlorid	58,44 g/mol	Sigma-Aldrich	125 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	84,01 g/mol	Sigma-Aldrich	25 mmol/l
Natriumphosphat (monobasisches Monohydrat)	198,17 g/mol	Sigma-Aldrich	1,25 mmol/l

Saccharosebasierter Präparations-aCSF für VSDI-Messungen

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
Calciumchlorid-Dihydrat	147,01 g/mol	Sigma-Aldrich	2 mmol/l
D-(+)-Glucose-Monohydrat	198,17 g/mol	Sigma-Aldrich	25 mmol/l
Kaliumchlorid	74,55 g/mol	Sigma-Aldrich	2,5 mmol/l
Natriumchlorid	58,44 g/mol	Sigma-Aldrich	125 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	84,01 g/mol	Sigma-Aldrich	25 mmol/l
Natriumphosphat (monobasisches Monohydrat)	198,17 g/mol	Sigma-Aldrich	1,25 mmol/l
Saccharose	342,3 g/mol	Sigma-Aldrich	75 mmol/l

Intrazelluläre Lösung für glutamaterge PSCs und pCs

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
K-Gluconat	234,25 g/mol	Sigma-Aldrich	130 mmol/l
Natriumchlorid	58,44 g/mol	Sigma-Aldrich	5 mmol/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	203,30 g/mol	Sigma-Aldrich	2 mmol/l
HEPES	238,30 g/mol	Sigma-Aldrich	10 mmol/l
EGTA	380,35 g/mol	Sigma-Aldrich	0,5 mmol/l
ATP-K₂	583,36 g/mol	Sigma-Aldrich	2 mmol/l
GTP-Na₂	523,18 g/mol	Sigma-Aldrich	0,3 mmol/l
Lidocain-N-Ethyl-Chlorid	298,85 g/mol	Sigma-Aldrich	5 mmol/l

Mit 0,1 molarem KOH auf pH 7,3 titriert

Intrazelluläre Lösung mit hohem Chloridanteil für GABA-erge PSCs und pCs

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
Cäsium-Methansulfonat	228,0 g/mol	Sigma-Aldrich	100 mmol/l
Cäsiumchlorid	168,36 g/mol	Sigma-Aldrich	60 mmol/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	203,30 g/mol	Sigma-Aldrich	1 mmol/l
HEPES	238,30 g/mol	Sigma-Aldrich	10 mmol/l
EGTA	380,35 g/mol	Sigma-Aldrich	0,2 mmol/l
Kreatinphosphat	327,14 g/mol	Sigma-Aldrich	20 mmol/l
Lidocain-N-Ethyl-Chlorid	298,85 g/mol	Sigma-Aldrich	5 mmol/l

Mit 0,1 molarem KOH auf pH 7,3 titriert

Spezifische Rezeptorantagonisten und veresterte Neurotransmitter

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
Bicucullin-Methiodid	509,29 g/mol	Sigma-Aldrich	20 µmol/l
CGP 35348	225,22 g/mol	Novartis Laboratories	200 µmol/l
CGP 55845	438,71 g/mol	Sigma-Aldrich	5 µmol/l
CNB-caged GABA	396,28 g/mol	Invitrogen	100 µmol/l
MNI-caged-Glutamat	323,3 g/mol	Tocris	100 µmol/l
D-AP5	197,13 g/mol	Sigma-Aldrich	50 µmol/l
NBQX Dinatriumsalz Hydrat	380,24 g/mol	Sigma-Aldrich	5 µmol/l
Tetrodotoxin (TTX)	319,27 g/mol	Sigma-Aldrich	1 µmol/l

Sonstige Substanzen

Substanz	Molekulargewicht	Hersteller	Konzentration
EACA	131,173 g/mol	Sigma-Aldrich	1–3 mmol/l
Di-4-ANEPPS	480,66 g/mol	Invitrogen	7,5 µmol/l

Danksagung

Ich will an dieser Stelle all jenen, die mich bei meinem Dissertationsvorhaben unterstützt haben, von Herzen danken.

Ohne den Rückhalt durch meine Familie und Freunde wäre ich auf meinem Lebensweg sicherlich nicht ansatzweise in die Nähe eines solchen Projektes gekommen.

Besondere Erwähnung gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Haseneder und meinem Betreuer PD Dr. Stephan Kratzer. Nur durch deren fachkundige Betreuung, unendliche Geduld und regelmäßige motivierende Worte konnte dieses Projekt bezwungen werden. Zudem danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dipl.-Phys. Eberhard Kochs und Herrn Univ.-Prof. Dr. Gerhard Schneider für die Möglichkeit, die Promotion an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Klinikums rechts der Isar durchzuführen.

Weitere unverzichtbare Unterstützung erhielt ich von meinen Patch-Clamp-Setup-Kameraden Dr. Claudia Kopp, Dr. Corinna Mattusch und Dr. Stefan Schwerin.

Außerdem möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen unter der Führung von Prof. Gerhard Rammes und Dr. Matthias Eder bedanken, die mir mit ihrer fachlichen Expertise bei technischen Problemen mehrfach aushelfen konnten. Wichtige Wegbegleiter aus beiden Arbeitsgruppen waren Dr. Martina Bürge, Dr. Julien Dine, Dr. Tatiana Engel und Татьяна Эрвиновна Фидлер. Nina Bayer und Andreas Blaschke standen mir stets mit technischer und organisatorischer Hilfe zur Seite.

Für die Unterstützung außerhalb des Labors auf verschiedenen Ebenen danke ich Christine, David, Michaela und Sophie.

Ein spezieller Dank gilt Frau Dr. Doris Ziegler-Pithamitsis, die in mir das Interesse für das Fachgebiet Anästhesie geweckt hat und über die ich meine ersten Kontakte zur Abteilung im Klinikum rechts der Isar knüpfen konnte.