

Der Effekt einer generalisierten Sepsis auf die
synaptische Plastizität im Hippocampus der Ratte

Katrin Lampadius

Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität
München, Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

Der Effekt einer generalisierten Sepsis auf die
synaptische Plastizität im Hippocampus der Ratte

Katrin Lampadius

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs

2. Univ.-Prof. Dr. Th. R. Tölle

Die Dissertation wurde am 24.05.2005 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für die Medizin am 14. 09. 2005
angenommen.

Meinen lieben Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
2. Stand der Forschung	10
2.1. Der Hippocampus der Ratte	10
2.1.1. Anatomie des Hippocampus	10
2.1.2. Die Rolle des Hippocampus bei der Konsolidierung des deklarativen Gedächtnis	13
2.2. Elektrophysiologie	14
2.2.1. Chemische synaptische Übertragung	14
2.2.2. Erregende und hemmende Transmittersysteme	16
2.2.3. Synaptische Plastizität	16
2.2.4. LTP in der CA1-Region des Hippocampus	19
2.2.4.1. Hochfrequente Stimulation als Modell für die Auslösung von LTP	22
2.2.4.2. Die Rolle des glutamatergen Neurotransmittersystems bei der LTP	24
2.2.4.3. Die Rolle retrograder Messenger bei präsynaptischen LTP-Mechanismen	27
2.3. Kognitives Defizit bei generalisierter Sepsis	29
2.3.1. Pathophysiologie	29
2.3.1.1. Die Rolle des zentralen NO-Metabolismus	30
2.3.1.2. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS)	32
2.3.2. Das Rattenmodell für Sepsis	34
2.3.3. Erfassung der kognitiven Leistung bei der Ratte	35
3. Fragestellung	37
4. Methodik	38
4.1. Verwendete Lösungen	38
4.1.1. Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF)	38
4.1.2. L-N ₆ -Iminoethyllysine (L-NIL)	38
4.1.3. N ^G -L-arginine methyl ester (L-NAME)	39

4.2.	Herstellung der Messelektroden	39
4.3.	Hirnschnittpräparation	40
4.4.	Elektrophysiologische Ableitungen	41
4.5.	Versuchsplanung	45
4.5.1.	Versuchsreihe zur Korrelation von <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> - Experimenten	45
4.5.2.	Versuchsreihe mit <i>in vitro</i> -Experimenten	47
4.6.	Auswertung und Statistik	48
5.	Ergebnisse	49
5.1.	<i>In vitro</i> -LTP bei trainierten Tieren	49
5.1.1.	Effekt der Sepsis auf die LTP	49
5.1.2.	LTP nach peroraler L-NIL-Applikation	53
5.2.	LTP unter NO-Synthase-Hemmung <i>in vitro</i>	56
5.2.1.	Effekt von L-NIL (Hemmung der iNOS) auf LTP	56
5.2.2.	Effekt von L-NAME (Hemmung der nNOS) auf LTP	59
6.	Diskussion	62
6.1.	Zusammenhang zwischen neurokognitivem Outcome und LTP im Hippocampus bei Sepsis	63
6.2.	Die Rolle der NO-Synthasen nNOS und iNOS	65
6.2.1.	Die nNOS und LTP	65
6.2.2.	Die iNOS und LTP	65
7.	Zusammenfassung	67
8.	Literaturverzeichnis	68
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
10.	Anhang	86
10.1.	Materialien und Geräte	86
10.1.1.	Verwendete Chemikalien und Lösungen	86
10.1.2.	Verbrauchsmittel	87
10.1.3.	Geräte	87
10.2.	Danksagung	88
10.3.	Lebenslauf	89

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
CA1	Cornu anterior (Region 1)
CP	Corynebacterium parvum
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (excitatory postsynaptic current)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
fEPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Feldpotenzial
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid)
HFS	Hochfrequente Stimulation (high-frequency stimulation)
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (inhibitory postsynaptic current)
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
LTD	Langzeitdepression(long-term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (long-term potentiation)
L-NIL	L-N ₆ -Iminoethyllysine
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl ester
n	Anzahl der gewerteten Experimente
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric oxide)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
SD	Standardabweichung
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Sepsis ist eine lebensbedrohliche Verlaufsform einer Infektion mit Bakterien, Pilzen oder Protozoen. Sie kann durch Dissemination des Erregers, aber auch von lokalen Infektionen ausgehen. Hierbei reagiert der infizierte Organismus überschießend mit einer nicht aufzuhaltenden Aktivierung endogener Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN } \gamma$, NO, Interleukin 1,2,6). Dies kann ein systemisches inflammatorisches Syndrom (SIRS) mit nachfolgendem Schock auslösen (Krause & Gubler, 1999).

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass während des Sepsis-Geschehens in verschiedenen Organsystemen eine bestimmte NO-Synthase induziert wird. Auch im Gehirn konnte bereits eine erhöhte Aktivität dieser induzierbaren NO-Synthase (iNOS) nachgewiesen werden. Daraus resultiert eine verstärkte neuronale NO-Synthase, die eine für die Nervenzellen toxisch wirkende erhöhte synaptische Freisetzung des Transmitters Glutamat bewirkt (Guerra-Romero et al., 1993). Dieser neuronale Pathomechanismus könnte für sepsisbedingte neurokognitive Defizite, z.B. Störungen von Aufmerksamkeit und Gedächtnisleistung, mitverantwortlich sein (Korzok et al., 2002).

Lern- und Gedächtnisvorgänge sind das Ergebnis komplexer reizinduzierter Modulationen der synaptischen Übertragungsstärke innerhalb verschiedener neuronaler Verschaltungen und Netzwerke, insbesondere in der Hippocampus-Region (Bliss, 1993; Danysz, 1995; Linden, 1995). Die neurophysiologischen und molekularbiologischen Grundlagen dieser sog. synaptischen Plastizität werden seit langem intensiv beforscht. Hierbei spielen neben dem glutamatergen und GABAergen Transmittersystem der neuronale NO-

Metabolismus, der den retrograden Informationsfluss der Synapse steuert, eine wichtige Rolle (Arancio, 1996). Eine mögliche Beeinflussung der synaptischen Plastizität durch ein Sepsis-Geschehen wurde jedoch bislang nicht untersucht. Die vorliegende *in vitro*-Untersuchung beschäftigt sich daher mit dem Effekt einer experimentell induzierten Sepsis auf die synaptische Plastizität im Hippocampus von Ratten.

2. Stand der Forschung

2.1. Der Hippocampus Ratte

2.1.1. Anatomie des Hippocampus

Wegen seiner gut untersuchten, charakteristischen Neuroanatomie stellt der Hippocampus ein prädestiniertes Hirnareal zur Untersuchung von Organisation und Funktion neuronaler Verschaltungen dar (Amaral & Witter, 1989)

Der Hippocampus ist Teil des Temporallappens und gehört zum limbischen System. Auf Grund seines typischen dreischichtigen Aufbaus (Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum moleculare) wird der Hippocampus dem Archikortex zugeordnet. Sein Endstück (pes hippocampi) liegt medial dem Unterhorn des Seitenventrikels an. Er erstreckt sich in einem Bogen bis zum caudalen Ende des Corpus callosum. In Form der Faserzüge der Fornix zieht er dann über den dritten Ventrikel hinweg zu den Corpora mamillaria (Abb. 2.1.).

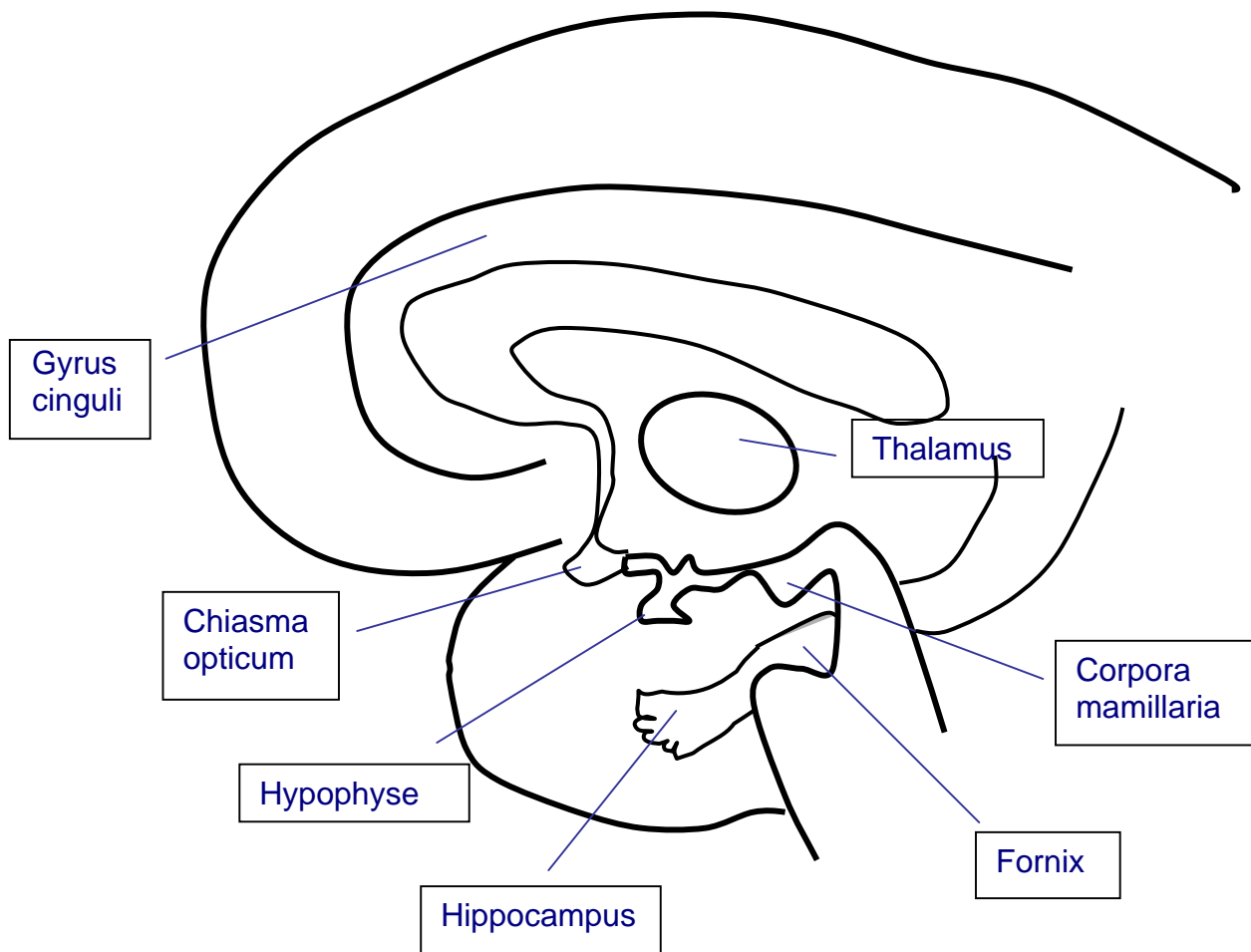


Abb. 2.1.: Das limbische System. Hierzu gehören Hippocampus, Amygdala, Septum, Mamillarkörper, Bulbi olfactorii, Fornix und Gyrus cinguli (nach Rahmann, 1988).

Neben der Gliederung in die großen hippocampalen Regionen Subiculum, Fascia dentata und Cornu Ammonis (Ammonshorn) ist das Cornu Ammonis wegen seiner Architektur und Verschaltung noch einmal in vier Subregionen (CA1 bis CA4) unterteilt. Insbesondere in der CA1 Region stehen die Pyramidenzellen über die glutamatergen Schaffer-Kollateralen (das sind spezielle Dendriten) miteinander in Verbindung. Diese stark vernetzte Verschaltung bildet die Grundlage für das deklarative Gedächtnis (Ramon y Cajal, 1968).

Der Hippocampus ist über die Fornix mit zahlreichen kortikalen und subkortikalen Gebieten verbunden. Zwei wichtige Afferenzen bilden dabei der Tractus alveans und der Tractus perforans. Der Tractus alveans zieht vom Cortex über die Fornix direkt zu den Pyramidenzellen der CA1 Region. Der Tractus perforans enthält Fasern vom entorhinalen Cortex, die über den Gyrus dentatus und die Pyramidenzellen der CA1 und CA3 Region zum Subiculum ziehen (hippocampale Formation) (Amaral & Insausti, 1990; Cerbone et al.1993).

Die Efferenzen verlaufen ebenfalls über die Fornix. Ein für die Konsolidierung deklarativer Gedächtnisinhalte wichtiger Schaltkreis ist der Papez-Neuronen-Kreis (Trepel, 1999). Er beginnt im Hippocampus, zieht über die Fornix zu den Corpora mamillaria und von dort über den Tractus mamillothalamicus zum Nucleus anterior des Thalamus. Über den Gyrus cinguli hat er schliesslich wieder Anschluss an den Hippocampus (Abb. 2.2.)

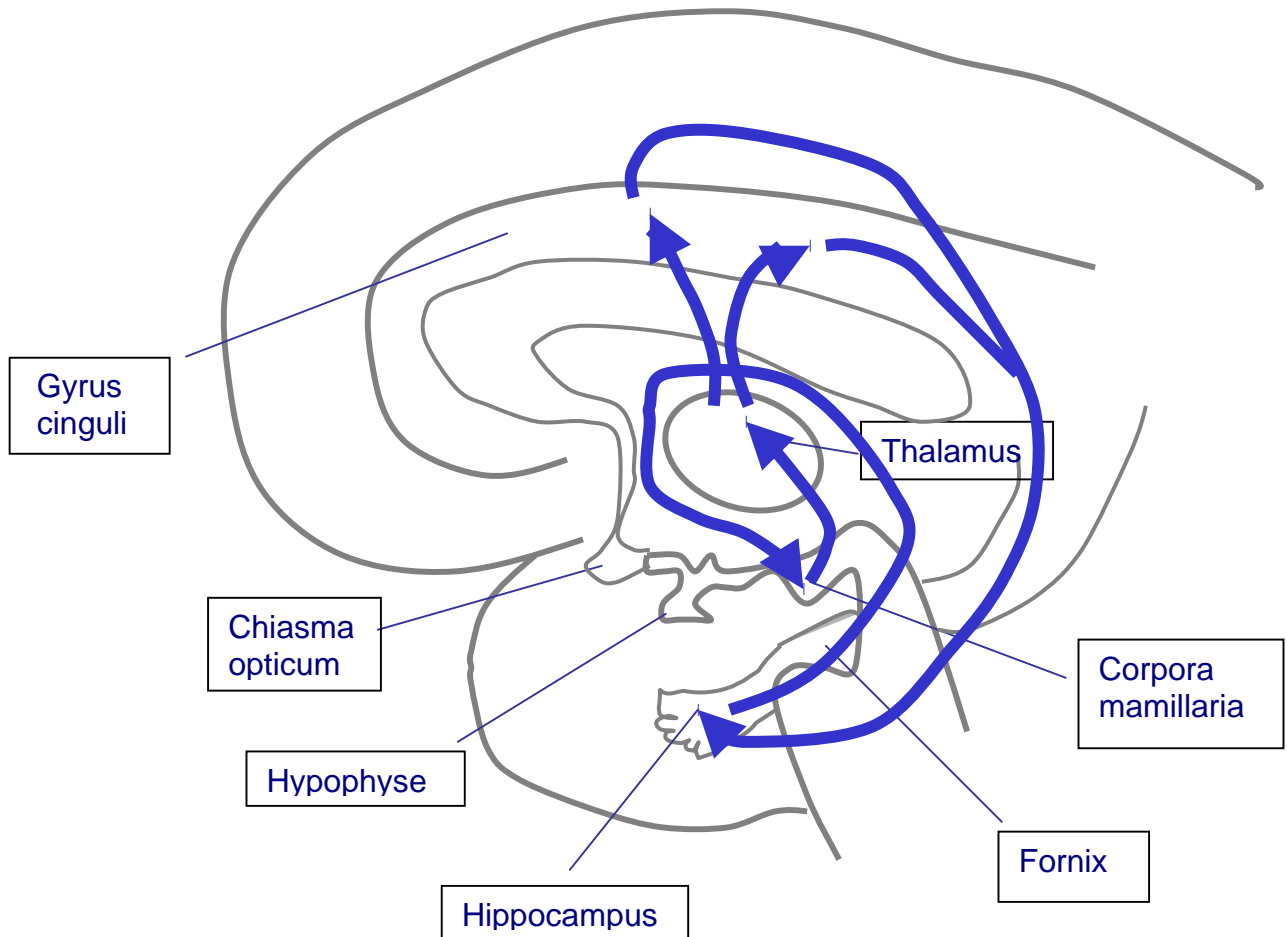


Abb. 2.2.: Der Papez Neuronenkreis. Der Neuronenkreis zieht vom Hippocampus über die Fornix zu den Corpora mamillaria, von dort über den Fasciculus mamillothalamicus zum Thalamus und von dort zum Gyrus cinguli. Dieser projiziert wiederum zum Hippocampus, so dass der Kreis geschlossen ist.

2.1.2. Die Rolle des Hippocampus bei der Konsolidierung des deklarativen Gedächtnis

1953 machte der Neurochirurg William Scoville die Entdeckung, dass die bilaterale Entfernung des Hippocampus und der darüberliegenden Cortexareale zu einer anterograden Amnesie führt. Testpsychologische Ergebnisse haben gezeigt, dass dabei nur das deklarative Gedächtnis gestört ist, nicht aber das prozedurale (nicht-deklarative) Gedächtnis (Birbaumer & Schmidt 1999).

Läsionsstudien an Affen zeigen, dass das deklarative Gedächtnis neben dem Hippocampus auch vom entorhinalen Cortex und den darüberliegenden perirhinalen und parahippocampalen Cortices abhängig ist (Daum et al. 1993).

Bei der Gedächtniskonsolidierung strömen Reize aus verschiedenen corticalen und subcorticalen Arealen ins limbische System ein. Die Rolle des Hippocampus und der ihn umgebenden Strukturen besteht darin, Gedächtnisinhalte assoziativ zu verketteten und einen gemeinsamen Kontext herzustellen. Innerhalb eines so gebildeten Assoziationsmusters kann schon ein einzelner Reiz das Erkennen und Wiedergeben von Gedächtnisinhalten auslösen (Birbaumer & Schmidt, 2000).

Auf neuronaler Ebene bilden sich die Assoziationsmuster innerhalb der Verschaltung zahlreicher afferenter und efferenter Bahnen. Der Hippocampus erhält über den Tractus alveans und den Tractus perforans Informationen aus allen Assoziationsfeldern des Neocortex, aus verschiedenen Regionen des Temporallappens und aus Teilen des limbischen Systems (Gyrus cinguli, Orbitofrontalcortex). Diese Informationen werden im Hippocampus zu Assoziationsmustern verarbeitet. Diese werden anschließend über efferente Bahnen zurück in die jeweiligen Assoziationsfelder projiziert und im Sinne einer Gedächtnisspeicherung abgelegt (Birbaumer & Schmidt, 2000).

2.2. Elektrophysiologie

2.2.1. Chemische synaptische Übertragung

Die Bildung von Assoziationsmustern und deren Speicherung ist letztlich auf die Modulation der synaptischen Übertragungsstärke zurückzuführen. Die der

Informationsausbreitung innerhalb eines Neurons zugrunde liegenden Aktionspotentiale beruhen auf Potentialveränderungen der Nervenzellmembran, die insbesondere durch spannungsabhängige Na^+ -Kanäle ausgelöst werden (Greger, 1996). Die Übertragung dieser Signale auf ein anderes Neuron geschieht durch elektrische oder (weitaus häufiger) chemische Synapsen. Letztere schütten zur Signalübertragung einen Botenstoff, den Transmitter, aus. Diese chemische Signalübertragung erfolgt somit indirekt und unidirektional: Die Transmitter werden in präsynaptischen Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert. Depolarisiert ein ankommendes Aktionspotential die Nervenendigung, strömen über die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle Ca^{2+} -Ionen in die Terminale ein. Diese sprunghafte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der präsynaptischen Terminale setzt einen komplexen Mechanismus in Gang, auf den hin die Vesikelmembran mit der Membran der Terminale verschmilzt. Dadurch wird der Transmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt. Die Bindung des Transmitters an spezifische Rezeptoren an der postsynaptischen Membran aktiviert die mit dem Rezeptor assoziierten Ionenkanäle. Dadurch ändert sich deren Permeabilität für bestimmte Ionen. Der daraus resultierende Ionenstrom führt zu einer Veränderung des postsynaptischen Membranpotentials (Klinke, 1996). Dies führt, je nach Art des Transmittersystems, zu einer Erhöhung oder zu einer Verminderung der Erregbarkeit des postsynaptischen Neurons, d.h. ein Aktionspotential wird ausgelöst (bei überschwelliger Depolarisation) oder die Auslösung wird gehemmt (bei Hyperpolarisation).

2.2.2. Erregende und hemmende Neurotransmittersysteme

Man unterscheidet exzitatorische (erregende) und inhibitorische (hemmende) Neurotransmittersysteme. Die Bindung eines exzitatorischen Transmitters (z. B. Glutamat) an seinen spezifischen Rezeptor bewirkt an der postsynaptischen Membran einen Kationen-Einstrom und damit ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP), d.h. eine Depolarisierung der Zellmembran. Dies wirkt insofern erregend, dass bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes des Membranpotentials in depolarisierender Richtung ein Aktionspotential ausgelöst wird.

Bindet ein inhibitorischer Transmitter (z.B. GABA) an seinen spezifischen Rezeptor (GABA_A-Rezeptor), so entsteht durch den ausgelösten Chlorid-Einstrom ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), d.h. eine postsynaptische Hyperpolarisation, die der Entstehung eines Aktionspotentials entgegenwirkt (Klinke, 1996).

2.2.3. Synaptische Plastizität

Die Verarbeitung und Speicherung von Informationen im ZNS geschieht durch Modulation der synaptischen Effizienz. Nach einer "synaptischen Potenzierung" löst ein synaptischer Input einen stärkeren Output aus als vorher. Den umgekehrten Fall nennt man "synaptische Depression". Beide Veränderungen werden durch typische Input-Reizmuster ausgelöst und können Minuten bis mehrere Wochen oder noch länger nachwirken. Der synaptische Input reguliert also den synaptischen Output. Diese Modulierbarkeit der synaptischen

Übertragung bezeichnet man als "synaptische Plastizität" oder "synaptisches Gedächtnis" (Bliss, 1993; Bear, 1994).

Bei der synaptischen Plastizität unterscheidet man neben Verstärkung (Potenzierung) und Verminderung (Depression) auch Kurzzeit- und Langzeit-Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke. Besonders die Langzeitveränderungen spielen bei neuronalen Anpassungsvorgängen, wie Konditionierung, Lernen/Gedächtnis, (selektive) Wahrnehmung, Habituation und Aversions-/Appetenz-Entwicklung eine entscheidende Rolle (Bliss, 1993) und sind auch bei der Schmerz-Chronifizierung von Bedeutung (Hunt, 2001). Langzeit-Verstärkung (long-term potentiation, LTP) und Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) kommen im gesamten ZNS (Neokortex, Cerebellum, Amygdala, Hippocampus, Rückenmark) vor (Bliss, 1993; Linden, 1994; Malenka, 1995) und spielen auch eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Sensorik und Wahrnehmung, z.B. in der Sehbahn (Tao, 2001).

Man kann LTP/LTD *in vivo* oder *in vitro* experimentell erfassen. Im Tierversuch kann man beispielsweise durch stereotaktisch-fixierte Elektroden Konditionierungs-Reize applizieren und so in bestimmten Hirnregionen LTP auslösen und messen. *In vitro* kann man LTP/LTD an Hirnschnittpräparaten, üblicherweise von Ratten oder Mäusen, nachweisen. Solche Hirnschnitte müssen dünn genug sein (< 0,5 mm), damit die Nervenzellen *per diffusionem* durch eine Nährlösung mit Glukose und Sauerstoff versorgt werden und so funktional bleiben. Für die Messung platziert man dann auf geeignete Weise die Reiz- und die Mess-Elektrode (am Beispiel des Hippocampus, Abb. 4.3.). Die Reiz-Elektrode provoziert, die Mess-Elektrode registriert die synaptischen

Antworten. Plaziert man die Mess-Elektrode intrazellulär, kann man die Antworten einzelner Neurone messen. Die sog. Feldpotenziale misst man als Summen-Antwort vieler Neurone eines Areals, das von einer extrazellulär platzierten Elektrode erfasst wird (MacIver, 1989; MacIver, 1996).

Appliziert man über die Reiz-Elektrode einen kurzen (1-5 Sekunden) höherfrequenten (> 10 Hz) Stimulus, sind daraufhin die synaptischen Antworten typischerweise dauerhaft vergrößert (LTP). Längere (> 10 min) niederfrequente (< 5 Hz) Stimuli lösen hingegen eine LTD aus (Bliss, 1993).

Die Beziehung zwischen Stimulus-Frequenz und der daraus resultierenden Veränderung kann allerdings erheblich variieren. Dies hängt u.a. vom jeweiligen Hirnareal und vom Alter des Tieres ab. Nach dem Stimulus stellt sich die Potenzierung/Depression der synaptischen Antworten meist unmittelbar ein. Man wertet sie im Experiment dann als Langzeitveränderung, also als LTP/LTD, sofern sie mindestens 45 Minuten erhalten bleibt. Wenn andernfalls die initiale Potenzierung/Depression nur kurz erhalten bleibt, spricht man entsprechend von einer Kurzzeit-Veränderung, also einer short-term potentiation/depression (STP/STD) (Bliss, 1993).

Die funktionelle Unfähigkeit einer Synapse, auf den jeweiligen Stimulus hin LTP/LTD zu generieren, kann u.a. zellular-pathologisch oder pharmakologisch-toxisch bedingt sein. Eine solche Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität kann bestimmten Hirnleistungs- oder Funktionsstörungen zugrundeliegen. Beispiele hierfür sind (anterograde) Amnesie, Gedächtnisstörungen und Beeinträchtigung des motorischen Lernens nach der Verabreichung von Benzodiazepinen (Lister, 1985; Butefisch, 2000), von denen man weiss, dass

sie *in vitro* die synaptische Plastizität im Hippocampus hemmen können (Trepel, 2000; Higashima, 1998; Seabrook, 1997). Die Unterdrückung der hippocampalen synaptischen Plastizität könnte also ein *in vitro*-Modell für Lern- und Gedächtnisstörungen darstellen.

2.2.4. LTP in der CA1-Region des Hippocampus

Unter Langzeitpotenzierung (LTP) versteht man eine dauerhafte Erhöhung (Tage bis Wochen) der synaptischen Übertragungsstärke auf eine höherfrequente afferente Stimulation hin. Am besten untersucht sind die LTP-Effekte, die man bei der Reizung von Afferenzen in der hippocampalen CA1-Region beobachtet (Bliss, 1993). Dabei ist die LTP in dieser Region von drei Grundbedingungen abhängig: Kooperativität, Assoziativität und Inputspezifität.

Nach der Theorie von Hebb (Hebb, 1949) ist für die Auslösung einer LTP das Zusammenspiel von prä- und postsynaptischer Aktivität notwendig. Das bedeutet, dass einerseits der Transmitter Glutamat aus präsynaptischen Endigungen infolge hochfrequenter Stimulation freigesetzt wird und andererseits gleichzeitig die postsynaptische Zelle durch diese Glutamatfreisetzung depolarisiert wird.

Induktion und Aufrechterhaltung einer LTP unterliegen komplexen Mechanismen, die größtenteils noch kontrovers diskutiert werden. Sie unterscheiden sich zudem in den verschiedenen Hirnregionen. Insbesondere herrscht Uneinigkeit darüber, ob die entscheidenden stimulusinduzierten Veränderungen (überwiegend) prä- oder postsynaptisch ablaufen.

In der CA1-Region des Hippocampus sind die Mechanismen der LTP bereits gut untersucht. Hier ist die LTP typischerweise NMDA-Rezeptor-abhängig (Schlüsselfunktion der NMDA-Rezeptoren). Neben den in der vorliegenden Arbeit erläuterten glutamatergen Mechanismen spielt auch die GABAerge Hemmung über Interneurone eine wichtige Rolle (Bliss, 1993).

Zunächst unterscheidet man Initialmechanismen (Sekunden), mittelfristige Vorgänge (Stunden) und längerfristige Veränderungen (Monate). Die initialen Auslösemechanismen unmittelbar nach einem hochfrequenten Stimulus gehen hauptsächlich darauf zurück, dass der Stimulus sowohl prä- als auch postsynaptisch eine Membran-Depolarisation bewirkt. Es kommt dadurch einerseits zu einer kurzzeitig erhöhten Transmitter- (Glutamat-) Ausschüttung in den synaptischen Spalt und andererseits zum Wegfall der spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockade der NMDA-Rezeptoren, welche daraufhin einen Ca^{2+} -Einstrom in die Postsynapse vermitteln (Tsumoto, 1992; Bear, 1994; Jodar, 1995). Damit beginnen die mittelfristigen Veränderungen, die sich – soweit bekannt – (überwiegend) in der Postsynapse abspielen. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration setzt eine Kaskade in Gang, die bestimmte Proteinkinasen aktiviert (Malenka, 1989) und in der Folge über intrazelluläre Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren deren Aktivität und damit die Glutamat-vermittelte synaptische Übertragung verstärkt. Die Abb. 2.3. dient einer schematischen Darstellung der hier stark vereinfacht beschriebenen Mechanismen.

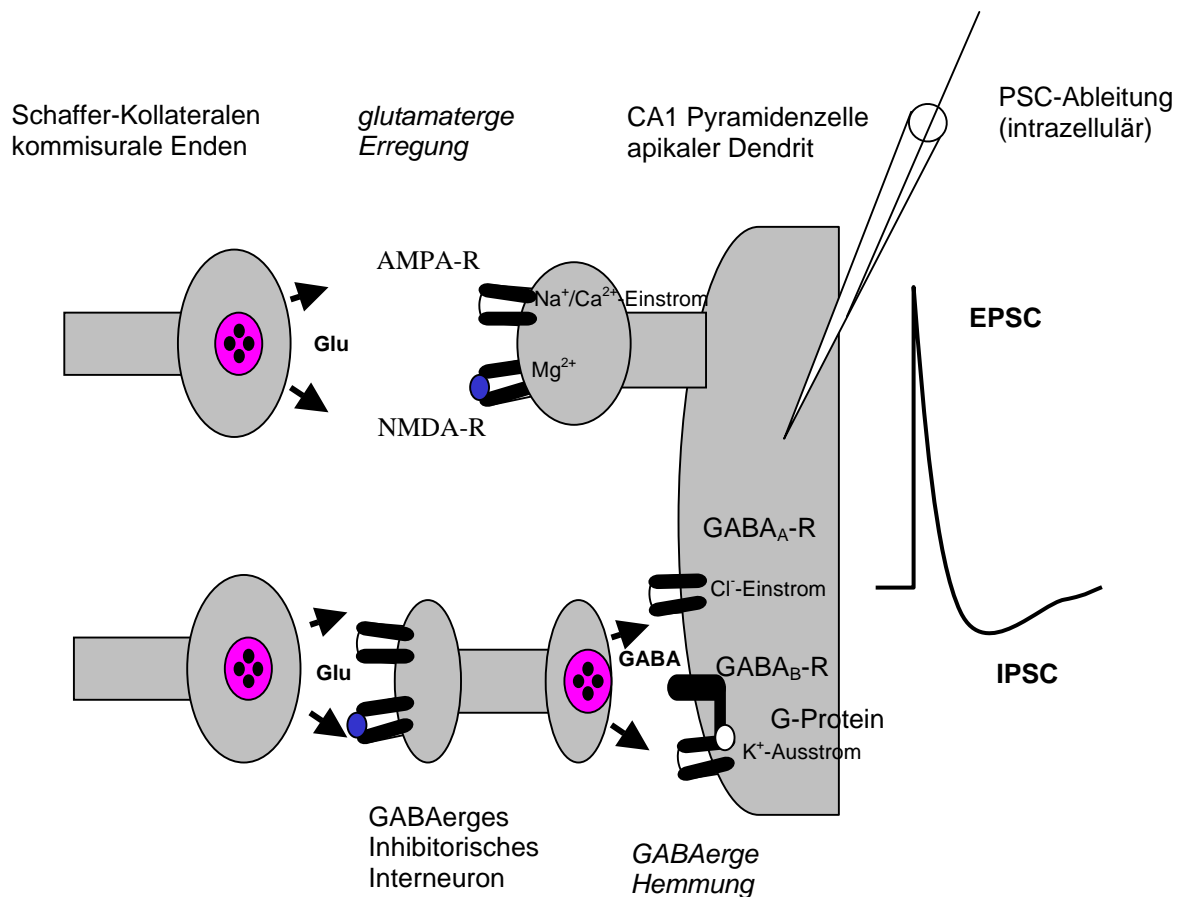


Abb. 2.3.: Exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission in der CA1-Region des Hippocampus

Die dadurch erhöhte postsynaptische Aktivität (frühe LTP-Phase, 2-3 Stunden) bewirkt schließlich die längerfristigen Veränderungen, die u.a. auf Protein-Expressions-Ebene stattfinden und der weiteren Aufrechterhaltung der LTP (späte Phase) zugrundeliegen (Bailey, 1996).

Eine NMDA-Rezeptor-abhängige LTP kann man an glutamatergen Synapsen verschiedener Hirnregionen beobachten. Man kann sie im Experiment typischerweise durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten (z.B. D-AP5) unterdrücken (Bliss, 1993).

2.2.4.1. Hochfrequente Stimulation als Modell für die Auslösung von LTP

LTP kann sowohl durch Chemikalien als auch durch hochfrequente Stimulation ausgelöst werden. Chemikalien, die LTP induzieren können, sind: Ca^{2+} , Arachidonsäure, der mGluR-Agonist Aminocyclopentan-1S,3R-Dicarboxylat (1S,3R-ACPD), der K^+ -Kanal-Blocker Tetraethylammonium (TEA) und der G-Protein-Aktivator NaF/AlCl_3 (Bortolotto & Collingridge, 1993; Williams et al., 1989; Aniksztejn & Ben Ari, 1991; Publicover, 1991). Dabei geht man davon aus, dass diese Chemikalien an der Präsynapse wirken, da gezeigt werden konnte, dass NMDA-Rezeptor-Blocker keinen Effekt auf chemikalieninduziertes LTP haben.

Soll LTP durch einen elektrischen Reiz induziert werden, so ist dazu eine hochfrequente (100 Hz pro s) Stimulation notwendig. Dies ist vor allem auf die unterschiedliche Kinetik der hierbei beteiligten Glutamat- und GABA-Rezeptoren zurückzuführen.

Sowohl bei niederfrequenter als auch bei hochfrequenter Stimulation kommt es zur Freisetzung des Transmitters Glutamat aus der präsynaptischen Terminalen und von γ -Aminobuttersäure (GABA) aus der Nervenendigung eines inhibitorischen Interneurons. Auf einen singulären Stimulus hin kommt es zur Aktivierung hauptsächlich der schnell-öffnenden AMPA- (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionicacid) Rezeptoren, dies sind Glutamat-Rezeptoren, die einen Na^+ -Einstrom und einen K^+ -Ausstrom bewirken und damit zu einer Depolarisation führen. Diese Depolarisation bildet das an der Postsynapse ableitbare EPSP. Gleichzeitig bewirkt die Aktivierung des inhibitorischen Interneurons die Ausschüttung von GABA und damit die Aktivierung der

nachgeschalteten GABA_A-Rezeptoren. Diese vermitteln einen Cl⁻-Einstrom, der die postsynaptische Membran hyperpolarisiert und somit der AMPA-Rezeptorvermittelten Depolarisation entgegenwirkt. NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren haben eine langsamere Aktivierungs-Kinetik als AMPA-Rezeptoren. Die Bindung von Glutamat kann die NMDA-Rezeptoren solange nicht aktivieren, als bei niedrigerer Stimulation die GABA-vermittelte Hyperpolarisation die spannungsabhängige Blockade der NMDA-Rezeptoren durch Mg²⁺ aufrecht erhält (Collingridge et al. 1988).

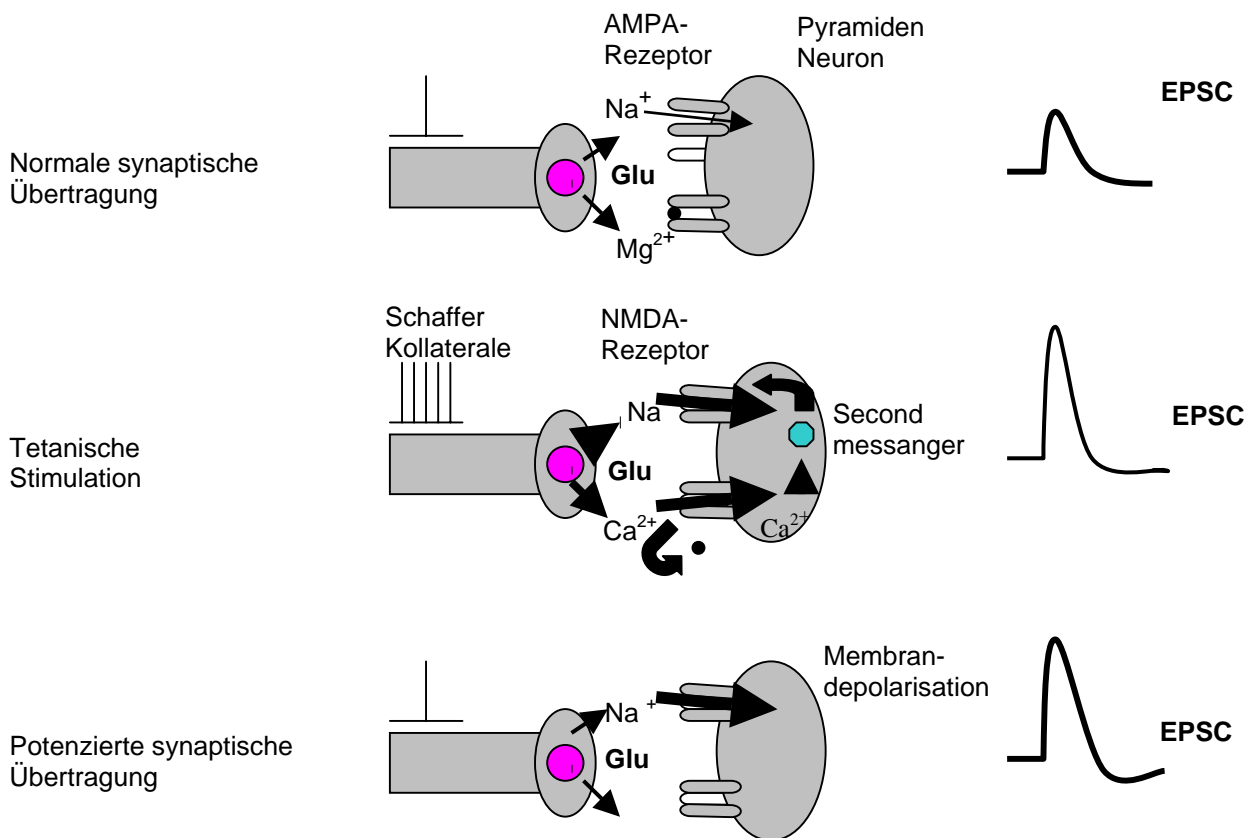


Abb. 2.4.: NMDA-Rezeptor-abhängiger Mechanismus der LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus.

Eine höherfrequente Stimulation bewirkt eine verlängerte und verstärkte postsynaptische Depolarisation. Dies ist vor allem auf zwei Mechanismen zurückzuführen: 1. Die Summation der durch AMPA-Rezeptor-Bindung ausgelösten EPSPs. 2. Die Bindung des im synaptischen Spalt überschüssig vorhandene GABA an autoregulatorisch wirksame präsynaptische GABA_B-Rezeptoren in der Nervenendigung der Interneurone. Dadurch wird, abhängig von der Frequenz der afferenten Stimulation, über eine Hemmung der GABA-Ausschüttung die GABA-vermittelte Membran-Hyperpolarisation erschwert.

Diese Depolarisation bewirkt die Aufhebung des spannungsabhängigen Mg²⁺-Blocks und damit einen NMDA-Rezeptor-vermittelten postsynaptischen Ca²⁺-Einstrom, der die Grundlage für die zur Induktion von LTP (im Hippocampus) notwendigen Signalkaskade bildet (Bliss & Collingridge, 1993).

Die Ausprägung der LTP hängt somit von der Stimulationsfrequenz ab: Im Unterschied zur niederfrequenten Reizung steigert eine hohe Stimulationsfrequenz nicht nur die Transmitterausschüttung, sondern führt auf Grund der hohen Frequenz vor allem zu einer starken Depolarisation der Membran, zur Entthemung der NMDA-Rezeptoren und damit zum deutlich gesteigerten postsynaptischen Ca²⁺-Einstrom. Die Folge ist sowohl eine verlängerte Dauer als auch eine erhöhte Ausprägung der LTP.

2.2.4.2. Die Rolle des glutamatergen Neurotransmittersystems bei der LTP

Der Transmitter L-Glutamat (Abb. 2.5.) gilt als der wichtigste erregende Transmitter im ZNS. Er vermittelt Sensorik, Motorik und höhere Hirnfunktionen, wie Lernen und Gedächtnis. Die Biosynthese von L-Glutamat findet

hauptsächlich in den neuronalen Terminalen statt. Ammoniumionen und α -Ketoglutarat reagieren dabei unter der katalytischen Wirkung des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase. In den Terminalen liegt dann L-Glutamat in Speichervesikel vor und steht zur Freisetzung in den synaptischen Spalt bereit. Freigesetztes Glutamat wird einerseits durch spezifische Carrier in die Terminale wiederaufgenommen, andererseits in Gliazellen transportiert. Gliales Glutamat wird in Glutamin umgewandelt und kann so der Terminale zur Resynthese von L-Glutamat zugeführt werden (Starke, 1998).

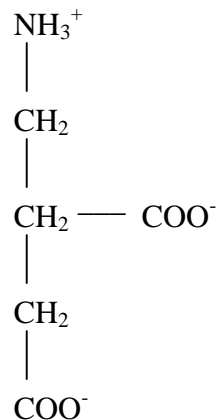


Abb. 2.5.: Strukturformel des Neurotransmitters Glutamat

Die Beteiligung von Glutamat und Glutamat-Rezeptoren an der Auslösung von LTP konnte durch verschiedene Untersuchungen mit Rezeptor-Antagonisten nachgewiesen werden (Coan & Collingridge, 1987; Bliss & Collingridge, 1993). Man geht zudem davon aus, dass die verschiedenen Glutamat-Rezeptoren, die je nach Typ sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein können, unterschiedliche Funktionen bei der Induktion und Aufrechterhaltung von LTP haben.

Bei der LTP-Induktion spielt vor allem der postsynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptor eine wichtige Rolle. Zunächst ist für eine Transmitter-Bindung an den NMDA-Rezeptor eine genügend große Glutamat-Konzentration im synaptischen Spalt notwendig. Zusätzlich muss eine langanhaltende und starke postsynaptische Membrandepolarisation vorliegen, damit sich der spannungsabhängige Mg^{2+} -Block löst und damit der Ionenkanal für Na^+ und Ca^{2+} durchlässig wird. Der Ca^{2+} -Einstrom bewirkt über die Aktivierung von Inositoltriphosphat (IP_3) eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Durch den darauffolgenden sprunghaften Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden Proteinkinasen aktiviert. Bei der LTP-Bildung spielen insbesondere die Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase (PKC), die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA), die Tyrosinkinase (PTK) und die MAP-Kinase (MAPK) eine wichtige Rolle (Sweatt, 1999). Dies führt zu intrazellulärer Phosphorylierung und translationalen Modifikationen von Substratproteinen und damit zu einer morphologischen Veränderung von Ionenkanälen und Rezeptoren (Dineley et al., 2001). Demnach resultiert die Induktion von LTP u.a. aus einer strukturell-bedingten Sensibilisierung der Glutamatrezeptoren (insbesondere AMPA-Typ) für den Transmitter Glutamat (Malinow, 1994).

Für die Aufrechterhaltung der LTP ist sowohl der durch den modifizierten AMPA-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Einstrom als auch eine erhöhte Transmitterausschüttung notwendig. Bei beiden Vorgängen spielen prä- und postsynaptisch lokalisierte metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR) eine wichtige Rolle. Bindet Glutamat an den postsynaptischen Rezeptor, so setzt

dies intrazellulär G-Protein-gekoppelte Mechanismen in Gang, die zur Entleerung der Ca^{2+} -Speicher und in der Folge IP_3 -vermittelt zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen führen. Die Endstrecke ist auch hier eine intrazelluläre Phosphorylierung u.a. des AMPA-Rezeptors. Präsynaptisch lokalisierte mGluR vermitteln die Erhöhung der Glutamatausschüttung in den synaptischen Spalt (Herrero et al., 1992; Mc Bain et al., 1994). Hierbei vermittelt zunächst ein postsynaptisches Signal durch einen retrograden Messenger die Bindung von Glutamat an die präsynaptischen mGluR. Dies aktiviert die Guanylatcyclase und cGMP-abhängige Proteinkinasen, was (in Abhängigkeit von der Stimulations-Frequenz) die Glutamatausschüttung aus der präsynaptischen Terminale dauerhaft erhöht (Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1995).

2.2.4.3. Die Rolle retrograder Messenger bei präsynaptischen LTP-Mechanismen

Man geht davon aus, dass insbesondere die langanhaltende Komponente einer LTP durch präsynaptische Mechanismen zustande kommt (Arancio et al., 1996, Hawkins et al., 1993). Diese bestehen insbesondere in einer verstärkten Mobilisierung der in der Präsynapse befindlichen Transmitter-Vesikel und einer damit verbundenen erhöhten Glutamat-Freisetzung. Das retrograde Signal aus der Postsynapse besteht möglicherweise aus mehreren Botenstoffen, wie Arachidonsäure, Kohlenmonoxid, extrazellulärer K^+ -Anstieg und insbesondere Stickstoffmonoxid (NO). Mittlerweile weiß man, dass NO in der frühen Phase der LTP postsynaptisch gebildet wird, als retrograder Messenger durch den

synaptischen Spalt diffundiert und die Transmitterausschüttung aus der präsynaptischen Terminale verstärkt (KO & Kelly, 1999; Hölscher, 1997; Arancio et al., 1996; Garthwaite & Boulton, 1995).

Dass NO postsynaptisch gebildet wird, konnte dadurch nachgewiesen werden, dass eine intrazelluläre postsynaptische Applikation von Hemmstoffen der NO-Synthase (NOS) eine LTP unterdrückt (Williams et al., 1993). Die entscheidende Rolle der NO-Rückdiffusion über den synaptischen Spalt hinweg konnte dadurch belegt werden, dass LTP durch Gabe von NO-bindendem Myoglobin gehemmt und durch anschließende Gabe des Myoglobin-bindenden Met-Myoglobins wieder enthemmt wird. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass eine extrazelluläre Injektion von NO ausreicht, um nach tetanischer Stimulation eine LTP zu bilden (bei gleichzeitiger postsynaptisch-intrazellulärer NO-Bindung durch Myoglobin). Das bedeutet u.a., dass NO die präsynaptische Membran freipassiert und letztlich an der Präsynapse wirkt. Letzteres wurde auch dadurch belegt, dass alleine die präsynaptisch-intrazelluläre Applikation eines NO-Donators (unter extrazellulärer NO-Bindung durch Myoglobin) für die LTP-Bildung ausreichend ist (Arancio, 1996).

Innerhalb der präsynaptischen Terminale stimuliert NO die cGMP-Synthese und damit die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen. Dieser Mechanismus ist mit jenem vergleichbar, der durch die Aktivierung des mGluR ausgelöst wird und eine gesteigerte Glutamatfreisetzung bewirkt (East & Garthwaite, 1991; Schuman et al., 1994; Meffert et al., 1996).

Zusammenfassend stellt man sich die Induktion und Aufrechterhaltung einer LTP folgendermaßen vor: Eine höherfrequente präsynaptische Stimulation

aktiviert postsynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren, die einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom vermitteln. Dadurch wird u.a. postsynaptisch eine NO-Synthese aktiviert, NO diffundiert daraufhin über den synaptischen Spalt hinweg zurück in die präsynaptische Nervenendigung und stimuliert dort cGMP-vermittelt die Transmitterfreisetzung (Abb. 2.6.). Eine dauerhaft erhöhte Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt bildet demnach die Grundlage für die länger dauernde LTP-Komponente.

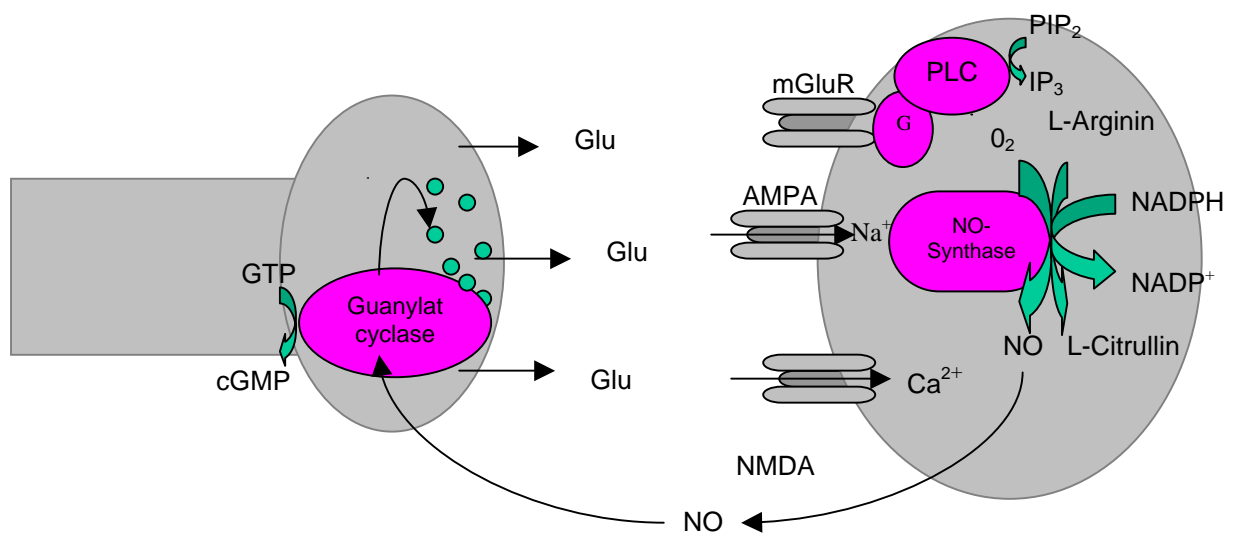


Abb. 2.6.: Die Rolle des retrograden Messengers NO bei der hippocampalen LTP. (Hölscher, 1997)

2.3. Kognitives Defizit bei generalisierter Sepsis

2.3.1. Pathophysiologie

Eine Sepsis ist eine lebensbedrohliche Allgemeininfektion mit Einschwemmung von Bakterien und/oder Toxinen in die Blutbahn und der daraus resultierenden Aktivierung der körpereigenen Abwehr. Am besten untersucht sind die als Endotoxin wirksamen Lipopolysaccharide (LPS). LPS sind mikrobielle

Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien und lösen kaskadenartig komplexe Entzündungsprozesse auf molekularer Ebene aus. Die dabei frei werdenden Entzündungsmediatoren Interferon γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor (TNF), Prostaglandine (PG), Interleukinen (IL), etc. richten sich vor allem gegen das Gefäßendothel und bewirken dort eine Zunahme der osmotischen Tonizität. Die Folge ist eine verminderte Gewebepfusion und eine daraus resultierende Organschädigung (Krause & Gubler, 1999).

Kommt es bei einer Sepsis zur Ausbreitung der Erreger über den Plexus choroideus ins Gehirn, so kann dies, ebenfalls getriggert durch Entzündungsmediatoren (IFN γ , TNF α , IL8,...), zur hypoxischen Schädigung von Hirnparenchym und damit zu schwerwiegenden neurologischen Defiziten führen (Ruef & Schaffner, 1999). Auf zellulärer Ebene beobachtet man die verstärkte Bildung der induzierbaren NO Synthase (iNOS), die grosse Mengen von NO und Peroxiden synthetisiert (Pou et al. 1999, Tolia et al., 1999). Zwar werden über diese Endprodukte eingewanderte Erreger abgetötet, jedoch kann die Bildung dieser hochreaktiven Substanzen auch zum Zelluntergang führen (Korcok et al., 2002). NO stimuliert präsynaptisch eine vermehrte Glutamat-Freisetzung, was eine Membran-Depolarisation und eine Erhöhung des Ca²⁺-Einstrom auslöst. Dies führt letztlich zum Untergang der Neurone (Guerra-Romero et al., 1993).

2.3.1.1. Die Rolle des zentralen NO-Metabolismus

Im Gehirn gibt es drei verschiedene NO-Synthasen (NOS): Die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS)

(Marletta, 1994). In hippocampalen Neuronen konnten bisher beim gesunden Tier nur die nNOS und die eNOS nachgewiesen werden. NO entsteht in der Postsynapse bei der durch Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase katalysierten Oxidation von L-Arginin zu Citrullin. Cofaktoren dieser Oxidationsreaktion sind NADPH und O_2 . Die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase erfolgt nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung durch einen hochfrequenten Stimulus. Hierbei entstehen sehr geringe Mengen (picomolar) von NO, das als gasförmiger Neuromodulator leicht durch Membranen diffundiert und dabei eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. Die Interaktion mit Membranbestandteilen erfolgt durch Reaktion mit Eisen oder Nitrat haltigen Seitengruppen, wie z.B. Hämverbindungen. Einer der Hauptbindungspartner von NO ist die Guanylatcyclase. Das in der Postsynapse synthetisierte NO diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an das Hämeisen der in der Präsynapse lokalisierten Guanylatcyclase. Durch Konformationsänderung wird diese in ihre aktive Form überführt und setzt cGMP frei, was seinerseits die cGMP-abhängige Proteinkinase zur Proteinphosphorylierung anregt. Dies führt zu einer vermehrten Glutamatfreisetzung aus der Präsynapse (Schuman & Madison, 1994). Bei höheren extrazellulären NO-Konzentrationen kommt es entweder zur Bindung von NO an eine der Nitrat-Seitengruppen des NMDA-Rezeptors (Lei et al., 1992) und damit zu dessen Inaktivierung oder über negatives Feedback zur Downregulation der nNOS (Dawson & Dawson, 1998).

NO ist somit ein retrograder Messenger, der die Neurotransmitter-Freisetzung moduliert und dadurch die synaptische Übertragungsstärke beeinflusst.

2.3.1.2. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass beim systemischen Inflammationssyndrom (SIRS, systemic inflammation response syndrome) die Expression der induzierbaren NO Synthase (iNOS) in Gehirnzellen (Astrozyten, Gliazellen) stimuliert wird. Dabei haben insbesondere mikrobielle Toxine (z.B. LPS) und Entzündungsmediatoren (z.B. IFN γ) Auslöserfunktion (Wallace & Bisland, 1994, Sugaya et al., 1998; Zhao et al., 1998, Korcok et al., 2002).

Zusätzlich wird auf diesen Reiz hin die Argininosuccinat-Synthetase stimuliert, was zur vermehrten Bildung des NOS-Substrats Arginin und damit zu einem erhöhten NO-Spiegel führt (Heneka et al., 1999; Abb. 2.7.).

Über diese beiden Mechanismen und auf Grund einer fehlenden Rückkopplungshemmung durch NO synthetisiert die iNOS im Unterschied zur nNOS und eNOS für mehrere Stunden große Mengen (nanomolar) von NO (Schuman & Madison, 1994). Diese hohen NO-Konzentrationen hemmen die mitochondriale Zellatmung, indem sie einerseits die Bindungsaffinität von Cytochrom C zu O₂ vermindern (Brown, 2000) und andererseits durch Reaktion mit Superoxid das Zellgift Peroxynitrit bilden (Beckmann, 1990, Beckmann et al., 1991, Bolanos et al., 1997). Die Folge ist ein starker Energieverlust der Zelle (Lin et al., 1999). Dies bewirkt wiederum eine Depolarisation der neuronalen Membran und damit eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung und in der Folge eine weitere Erhöhung der Glutamat-Ausschüttung mit sprunghaftem Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺. Letztlich führt dies durch Schädigung der DNA zum Zelluntergang (Zhang et al., 1994) .

Derzeit sucht man nach Substanzen, die z.B. durch Oxidationshemmung (Vit. C) (Korcok et al., 2002) oder durch spezifische Hemmung der iNOS (L-NIL) diesen Kreislauf durchbrechen und damit zur Neuroprotektion bei systemischer Inflammation beitragen könnten.

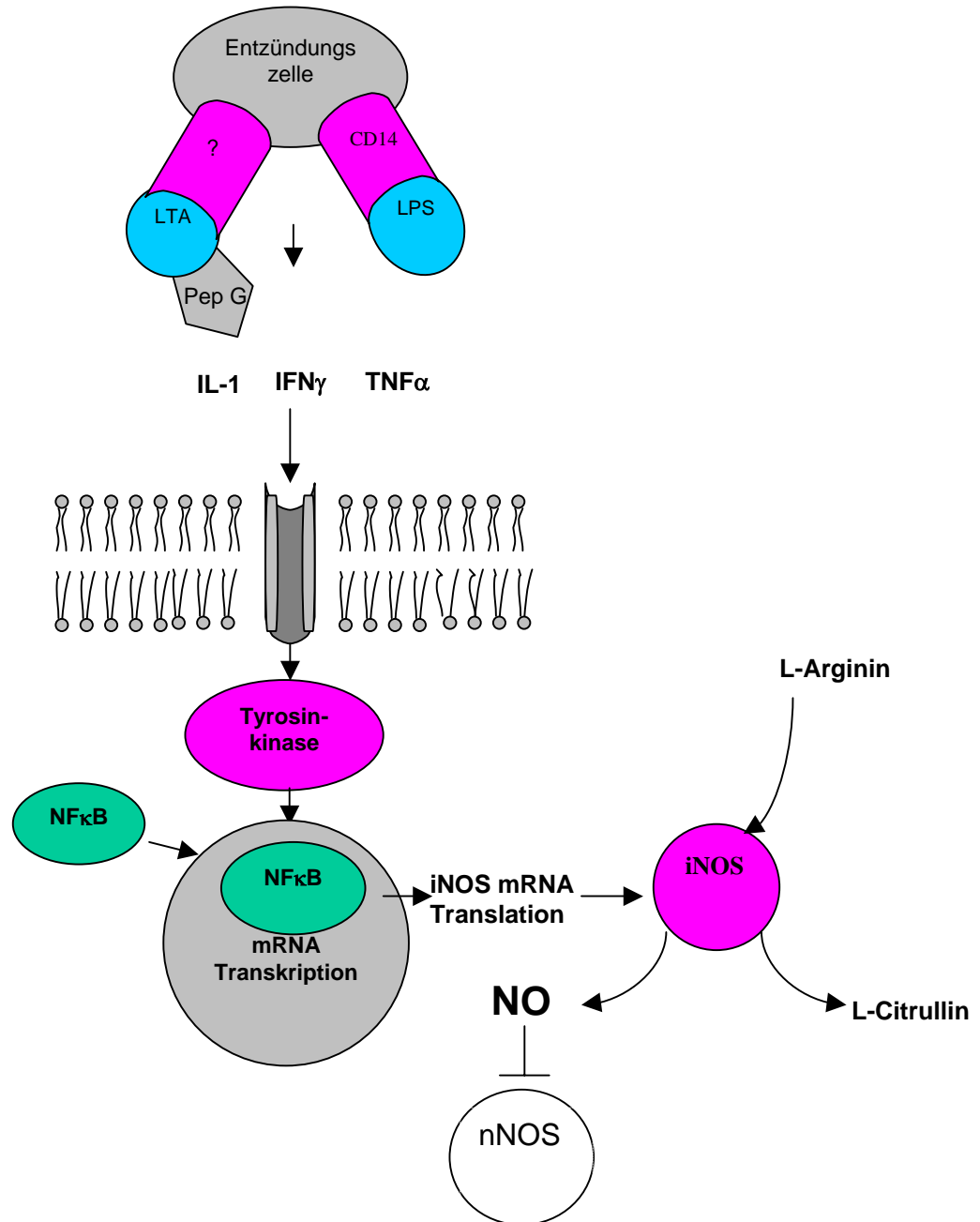


Abb. 2.7.: Sepsis vermittelt über Entzündungsmediatoren die Induktion der iNOS im Gehirn.

2.3.2. Das Rattenmodell für Sepsis

Um theoretische Überlegungen zur Induktion bestimmter NO-Synthasen bei SIRS verifizieren zu können, entwickelte man ein Rattenmodell. Hier konnte gezeigt werden, dass im Rahmen einer durch Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion experimentell induzierten Sepsis die Gedächtnisleistung der Ratte abnimmt. Gleichzeitig konnte man die Produktion von iNOS im Gehirn der Ratte feststellen (Wang et al., 1996; Garcion et al., 1998). Außerdem konnten am Rattenmodell die unterschiedlichen Wirkungsweisen der verschiedenen NO-Synthasen gezeigt werden: Während die nNOS durch negatives Feedback gehemmt wird, bleibt die iNOS weitgehend unbeeinflusst und synthetisiert auf diese Weise große Mengen NO. Einerseits stört diese hohe NO-Konzentration auf Grund ihrer Neurotoxizität die synaptische Übertragung (Dawson & Dawson, 1998) andererseits wird über Rückkopplungsmechanismen auch die nNOS beeinflusst. Dies führt zur Hemmung des nNOS-abhängigen retrograden Informationsflusses (Bohme et al., 1993; Schuman & Madison et al., 1994; Arrancio et al., 1995; Abb.2.7.).

Es wurde bereits beobachtet, dass eine Hemmung der nNOS im Gehirn von Ratten sich negativ auf die Gedächtnisleistung auswirkt (Zou et al., 1998). Auswirkungen bei der Hemmung der iNOS konnten bisher nicht nachgewiesen werden, sind aber Teil derzeitiger Forschung.

2.3.3. Erfassung der kognitiven Leistung bei der Ratte

Das für die Versuche verwendete Rattenmodell für generalisiert Sepsis wird seit mehreren Jahren zur Untersuchung der Auswirkung einer massiven Freisetzung von NO auf verschiedene Organe verwendet.

Um die kognitive Gedächtnisleistung bei einer septischen Enzephalopathie erfassen zu können verwendet man einen modifizierten "Hole Board"-Test (Ohl et al., 1998). Dieser erlaubt auf Grund seiner "open-field"-Charakteristik eine über die Untersuchung von visuell-räumlichen Gedächtnisinhalten hinausgehende Einschätzung der Gedächtnisleistung der Ratte. motivations-, angst- und motorisch bedingte Verhaltensmodifikationen können erfasst und von kognitiven Verhaltensänderungen unterschieden werden. Die Lernphase dauert 14 Tage. Danach werden die Ratten täglich dem "Hole Board"-Test unterzogen um ggf. eine Gedächtnisreduktion festzustellen. Da man beobachtet hat, dass die infizierten Tiere die schlechteste Gedächtnisleistung am dritten Tag nach Infektion zeigen, werden die *in vitro* Experimente an diesem Tag durchgeführt (Abb. 2.8.).

Lernphase für den Hole Board-Test (14 Tage)

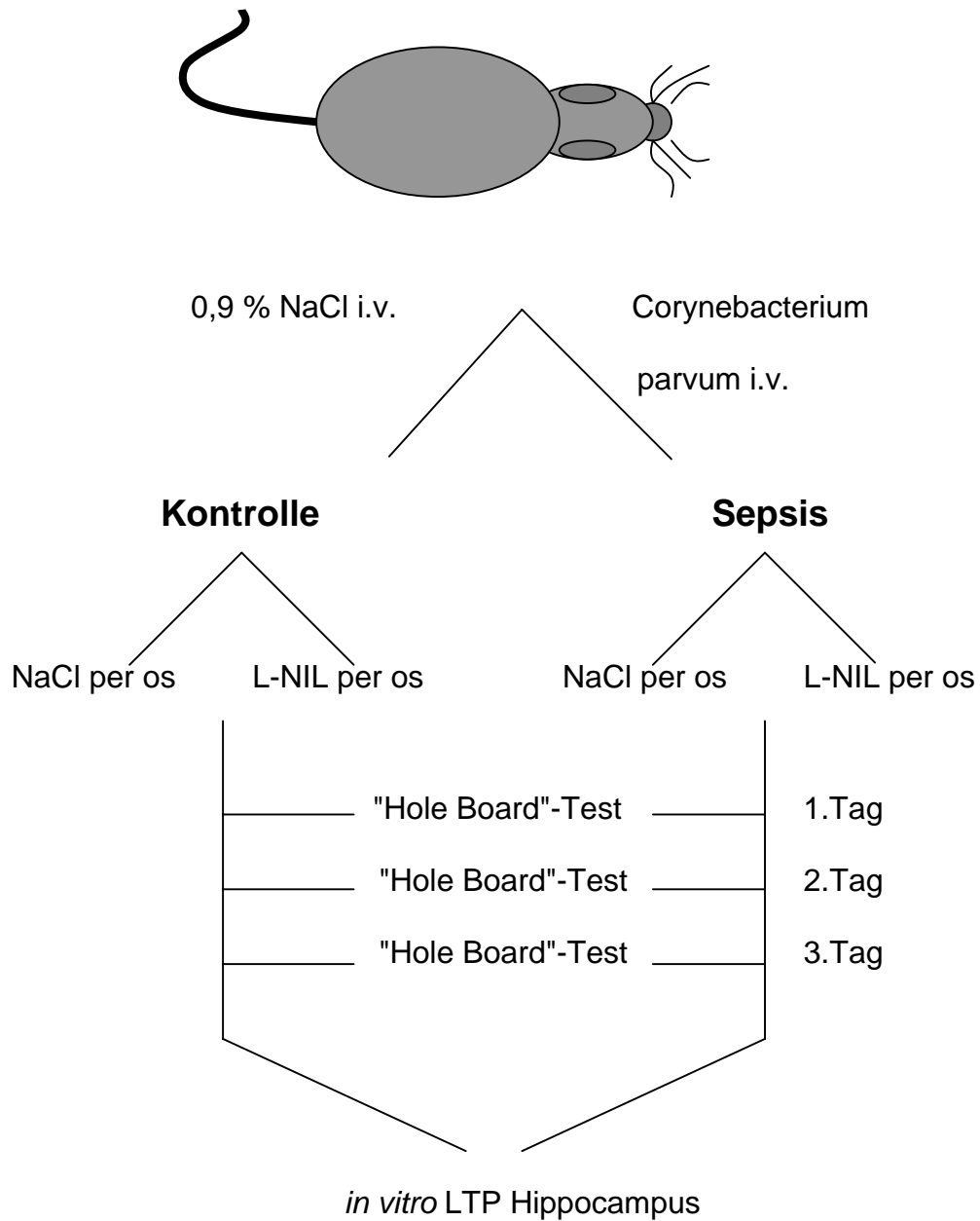


Abb. 2.8.: Das Tiermodell für Sepsis-bedingtes neurokognitives Defizit.

3. Fragestellung

Bestimmten Lern- und Gedächtnisvorgängen liegt auf neuronaler Ebene die hippocampale LTP als eine wichtige Form der synaptischen Plastizität zugrunde. LTP (Long-Term Potentiation) beschreibt eine *in vitro* messbare längerdauernde Verstärkung synaptischer Antworten auf einen höherfrequenten (100 Hz/1s) Stimulus hin.

Anhand eines Ratten-Modells wurde bereits gezeigt, dass eine induzierte generalisierte Sepsis (SIRS) die Gedächtnisleistung der Tiere beeinträchtigt. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob bei den kranken Tieren die hippocampale LTP *in vitro* reduziert ist.

Der zentrale NO-Metabolismus spielt im septischen Geschehen eine wichtige pathophysiologische Rolle. Bakterielle Toxine (LPS) stimulieren die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und die Bildung des NOS-Substrats Arginin. Das Fehlen einer Rückkopplungshemmung der iNOS führt im ZNS zu stark erhöhten NO-Spiegeln. Die nNOS (neuronale NOS) wird hingegen durch die hohen NO-Spiegel gehemmt. Eine Hemmung der nNOS beeinträchtigt *in vivo* Gedächtnisfunktionen (Chapman et al., 1992) und unterdrückt *in vivo* (Doyle et al., 1996) und *in vitro* (Wu et al., 1997) die hippocampale LTP. Zusätzlich wirken die hohen NO-Spiegel neurotoxisch, in dem sie auf Grund von Radikal-Bildung die DNA schädigen (Zhang et al., 1994). Deswegen soll in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der spezifischen Hemmung der iNOS durch L-NIL (Applikation *in vivo* und *in vitro*) auf die hippocampale LTP untersucht werden.

4. Methoden

4.1. Verwendete Lösungen

4.1.1. Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF)

Die sog. künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) ist in der Ionen-Zusammensetzung, dem pH-Wert und der Osmolarität der physiologischen Cerebrospinalflüssigkeit im Rattenhirn angeglichen (Zusammensetzung in mM: NaCl 124 KCl 3; NaH₂PO₄ 1,25; MgCl₂ 1; D-Glucose 10; NaHCO₃ 26; CaCl₂ 2; pH 7,3). Sie bildet sowohl das Umgebungsmilieu der Schnitte im Experiment, als auch den Inhalt der Messelektroden.

4.1.2. L-N₆-Iminoethyllysine (L-NIL)

L-NIL (MG = 271) ist ein Struktur analogon von L-Arginin (Abb. 4.1.) und hemmt spezifisch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Morales et al., 2002). Da diese Substanz sehr hydrophil ist, wird sie in aqua dest. gelöst. Um für den Versuch eine Konzentration von 1 mM (*in vivo* nehmen die Ratten die selbe Konzentration über das Trinkwasser auf) zu erreichen, wird kurz vor Versuchsbeginn ein Aliquot (1 ml; 60 mg L-NIL) zu 221 ml ACSF gegeben.



Abb. 4.1.: Strukturformel von L-NIL im Vergleich zu L-Arginin

4.1.3. N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

L-NAME (MG = 270) ist ebenfalls ein Struktur analogon von L-Arginin (Abb. 4.2.) und hemmt unspezifisch die neuronalen NO-Synthase (nNOS). Im Versuch verwendet man eine Konzentration von 200 μ M (Ko & Kelly, 1999). Um diese Konzentration zu erhalten werden kurz vor Versuchsbeginn 12 mg in 220 ml ACSF gelöst

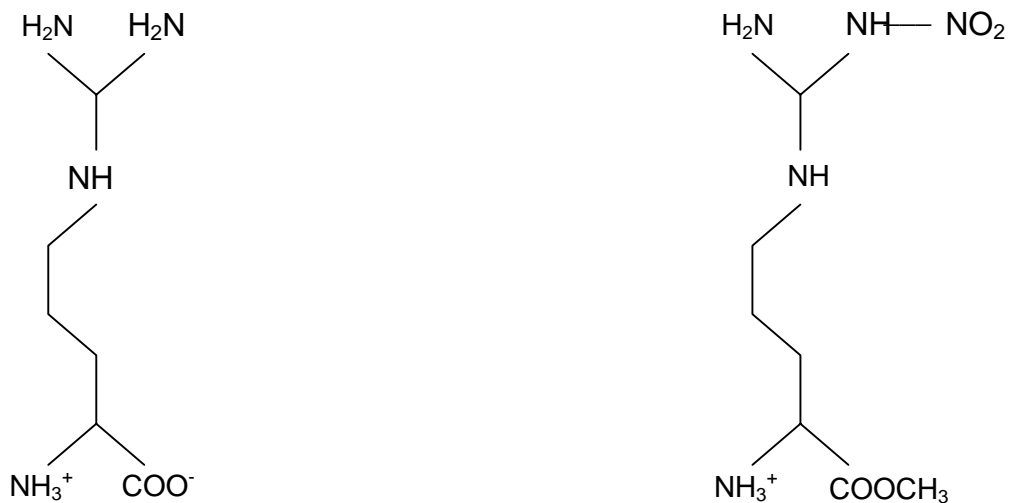


Abb. 4.2.: Strukturformel von L-NAME im Vergleich zu L-Arginin

4.2. Herstellung der Messelektroden

Verwendet werden Glaspipetten-Rohlinge aus Borosilikat (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm). Die Messelektroden werden mit einem Elektrodenziehgerät im Zweizugverfahren (DMZ-Universalpuller, Zeitz) hergestellt. Nach dem Vorziehen (die Pipette wird durch eine Glühwendel mittig angeschmolzen und dabei um ca. 1 cm ausgezogen) erfolgt in einem zweiten Schritt ein weiteres Auseinanderziehen, bis die Pipette an der dünnsten Stelle reißt. In einem dritten Schritt werden die ausgezogenen Enden mit der

Glühwendel hitzepoliert. Die Pipetten werden mit ACSF gefüllt und haben einen Widerstand von ca. 4 M Ω .

Um bei den extrazellulären Ableitungen möglichst wenig Rauschartefakte zu haben, vermindert man den Pipetten-Widerstand auf 1-2 M Ω durch Brechen der Pipettenspitze am Boden der Messkammer.

4.3. Hirnschnittpräparation

Die Ratten werden mit Sevofluran narkotisiert. Um ein Korrelat für den richtigen Grad der Betäubung zu erhalten, beobachtet man die Barthaare. Bewegungen dieser sind leicht, ist die Narkose noch stark genug um sauber zu dekapitieren, aber gleichzeitig wurde das Anästhetikum aber bereits in dem Maße abgeatmet, dass es keine Auswirkungen mehr auf das LTP haben kann.

Nach Dekapitierung wird der Ratte Blut abgenommen und dieses zentrifugiert (2 min bei 8000 Umdrehungen/min), so dass man Serum erhält. Dieses Serum wird auf Entzündungsparameter, und ggf. auf das Vorhandensein von *Corynebakterium parvum* (CP) getestet.

Alle weiteren Präparationsschritte erfolgen unter eisgekühlter und mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) gesättigter sog. künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Zusammensetzung in mM: NaCl 124 KCl 3; NaH₂PO₄ 1,25; MgCl₂ 1; D-Glucose 10; NaHCO₃ 26; CaCl₂ 2; pH 7,3).

Nach Durchtrennung der Medulla oblongata eröffnet man die Schädelkalotte durch einen Sagittalschnitt entlang der Mittellinie und hebt sie mit einer Knochenzange auf beiden Seiten vom Gehirn ab. Das Gehirn wird nach Durchtrennen der Nervi optici herausgelöst und auf ein mit ACSF getränktes

Filterpapier gelegt. Das Kleinhirn wird entfernt. Der Präfrontalkortex und ein Stück Temporallappen mit Hippocampus werden abgetrennt und sofort auf einem Trockeneisblock eingefroren, um ggf. die iNOS in diesen Hirngeweben nachweisen und evtl. quantifizieren zu können. Danach werden die Hemisphärenhälften entlang des Balkens getrennt. Eine Hemisphäre wird durch Cyanoacrylklebstoff mit der Schnittfläche nach unten auf einem Plexiglasquader fixiert. Dieser Quader wird in einer mit ACSF gefüllten Halterung befestigt. Nach Voreinstellung der gewünschten Schnittdicke von 400 μm und eines geeigneten Klingenvorschubs erzeugt das Vibratom (FTB, Mayer; Klingen: Vibratom Blades, TIM Ltd) die für die elektrophysiologische Messung benötigten Hippocampusschnitte. Vor den Messungen müssen die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in Carbogen begaster ACSF ruhen.

Für die extrazelluläre Ableitung werden die Schnitte in eine Messkammer mit gleichmäßigem Zu- und Abfluss der begasten ACSF gelegt. Die Flussrate beträgt 1,2 ml/min. Zur Fixierung der Hirnschnitte am Kammerboden verwendet man einen sog. Grid (mit dünnen Nylonfäden bespannter Platinrahmen).

Bei alle Experimenten beträgt die Temperatur in der Messkammer 25° C.

4.4. Elektrophysiologische Ableitung

Die Auslösung der Feldpotentiale (fEPSPs) erfolgt in der dendritischen CA1 Region durch Stimulation der Schaffer-Kollateralen durch bipolare Wolfram-Elektroden (5 μm Durchmesser; Abb. 4.3.).

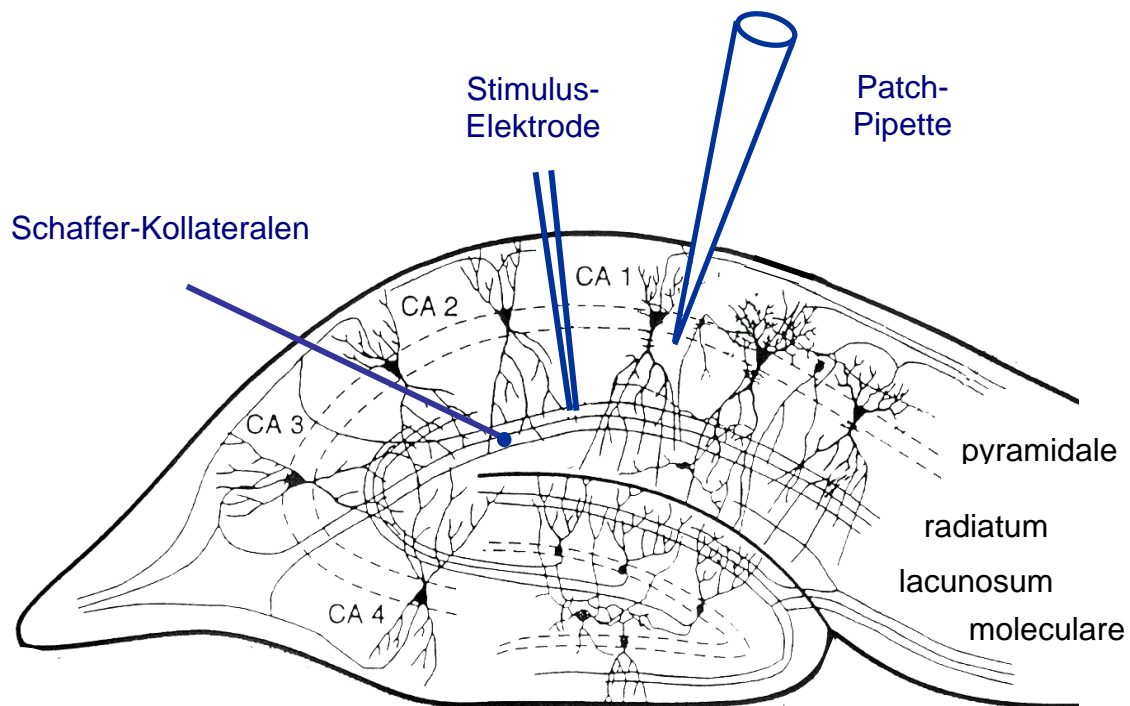


Abb. 4.3.: Feldpotentialableitung an einem Hippocampuschnitt

Durch geeignete Positionierung zweier Stimulationselektroden (Inputs) reizt man mit großer Wahrscheinlichkeit unterschiedliche Bündel dieser Kollateralen und damit unterschiedliche Synapsenpopulationen.

Dadurch hat man zwei unabhängige Stimulationsinputs zur Auslösung der Feldpotentiale und zur tetanischen Stimulation der jeweiligen Synapsen innerhalb eines Hippocampuschnitts. Abwechselnd löst nun ein Rechteckimpuls alle 15 Sekunden an einem Input ein EPSP aus (Impulsdauer: 200 μ s). Die Spannung wird dabei so gewählt, dass die Amplitude des Feldpotentials ca. 40% der maximalen Reizantwort entspricht (5-12 V;

Abb. 4.4.).

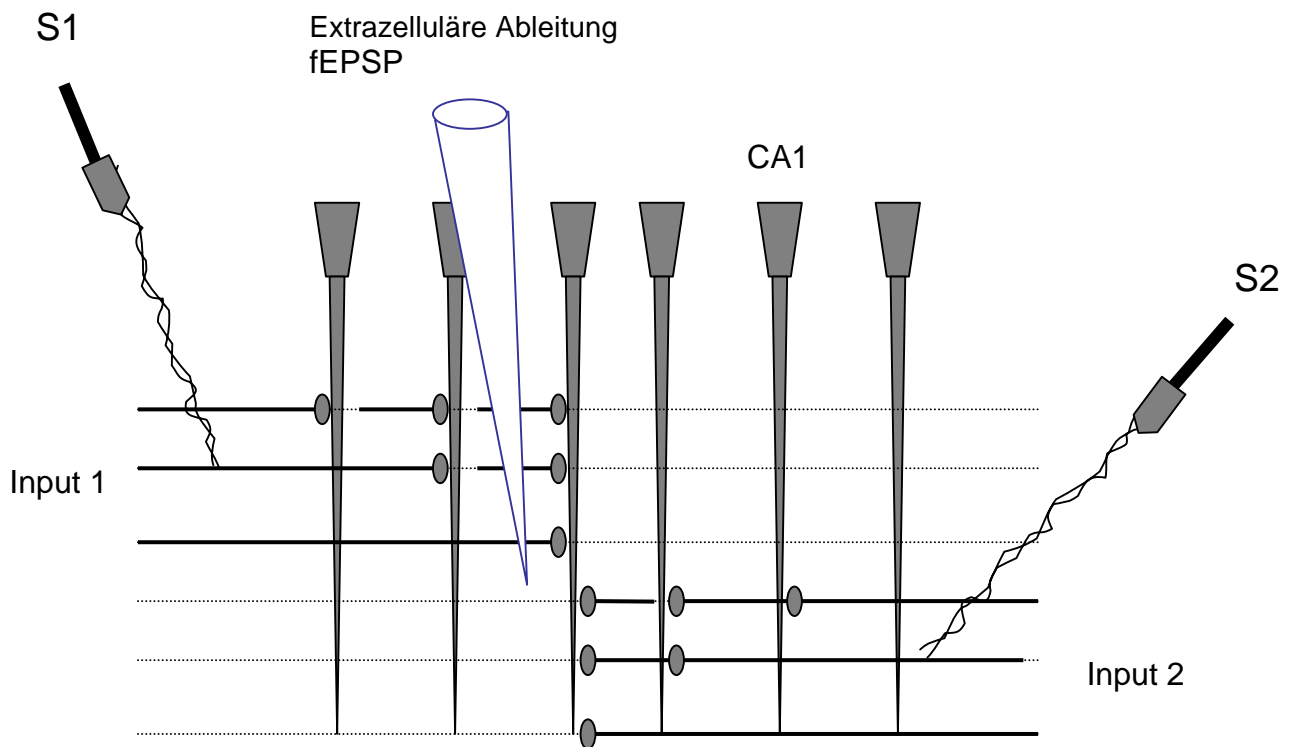


Abb. 4.4.: Aufzeichnung von fEPSPs in der CA1-Region des Hippocampus (schematisch). Zwei Bündel afferenter Fasern laufen getrennt voneinander an den Dendriten einer Neuronenpopulation zusammen und können deshalb separat stimuliert werden (Stimulationselektrode S1 und S2). Eine Stimulation über S1 bzw. S2 induziert synaptische Antworten, die auf den jeweiligen Input beschränkt sind (fEPSP = exzitatorisches postsynaptisches Potential)

Die Ableitung der Feldpotentiale (fEPSPs) erfolgt durch die mit ACSF gefüllte Glas-Pipette, die man zwischen den Stimulationsinputs platziert. Man wartet ab bis sich die Amplituden der Feldpotentiale durch die alle 15 Sekunden stattfindenden Impulse nicht mehr ändern. Das Experiment startet mit der Bildung einer Kontrollspur, d.h. der Aufzeichnung konstanter Amplitudenwerte

über eine Dauer von ca. 20 Minuten (Baseline). Zur LTP-Induktion werden die Schaffer-Kollateralen tetanisch gereizt (1 s lang mit 100 Hz) (Abb. 4.5.).

LTP *in vitro* in der CA1-Region des Hippocampus der Ratte

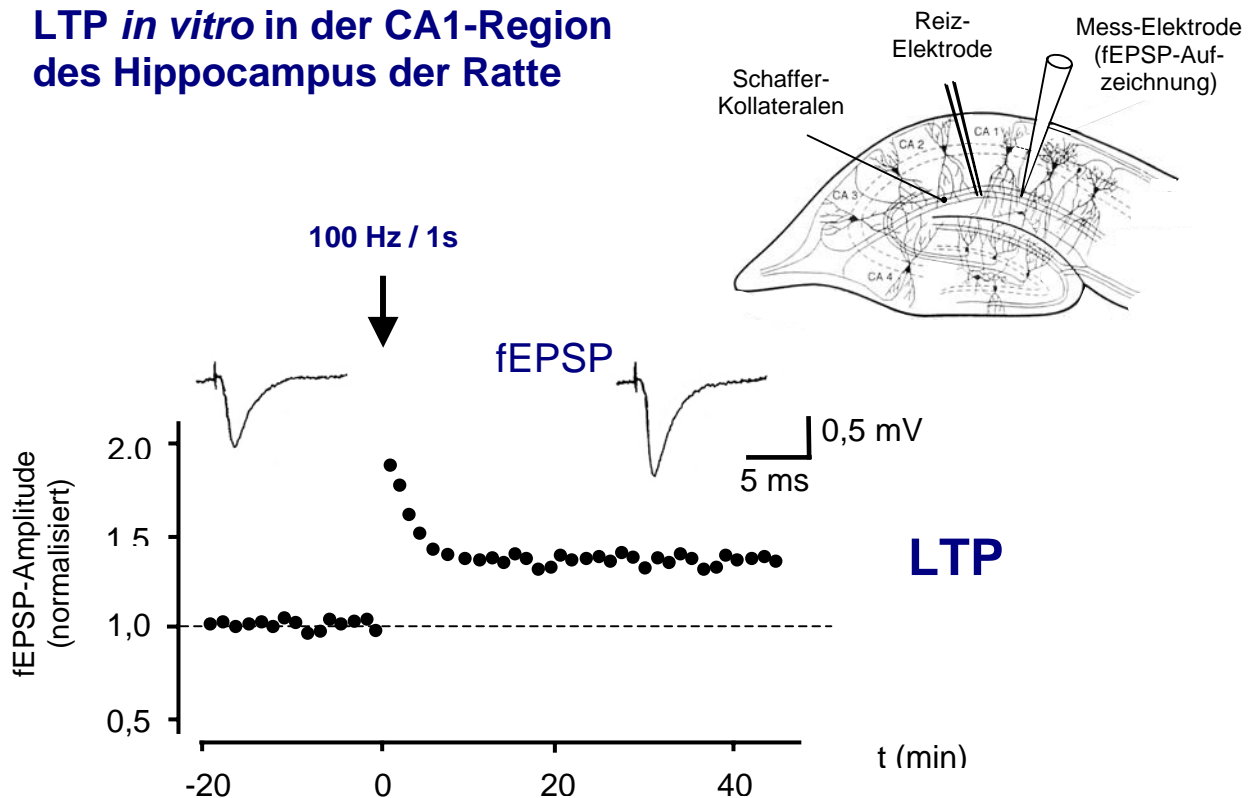


Abb. 4.5.: Induktion von LTP in einem Hippocampus-Schnitt (schematisch).

Erfolgt bei den Tieren, deren Ergebnisse mit dem „Hole Board“-Test korreliert werden sollen, das Auslösen des LTPs an beiden Eingängen unter den gleichen Bedingungen, werden bei der *in vitro*-Gruppe vor Auslösung des zweiten Stimulus 1mM L-NIL oder 200 μ M L-NAME eingewaschen. Mit der Zugabe der NO-Synthase-Inhibitoren soll ggf. die Anwesenheit der jeweiligen Enzyme im ZNS geprüft werden. Vor Auslösung des zweiten tetanischen Stimulus wird die jeweilige Substanz für eine Stunde eingewaschen und erneut

eine Baseline aufgezeichnet. Da die beiden Eingänge wie oben beschrieben unabhängig voneinander sind, kann der erste Input als Kontrollspur für das zweite posttetanische Ereignis gewertet werden.

4.5. Versuchsplanung

4.5.1. Versuchsreihe zur Korrelation von *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten

Für alle Experimente werden adulte männliche Sprague-Dawley Ratten von etwa 300-400 g verwendet.

Zunächst muss der Tag-Nacht-Rhythmus der Ratten verschoben werden, um die aktive Phase in den Tag zu verlegen. Dazu müssen die Tiere direkt nach dem Absetzen in das Versuchslabor gebracht werden, um sich an die „Zeitverschiebung“ gewöhnen zu können. Darüber hinaus müssen die Ratten in der frühen Wachphase, bzw. in der späten Schlafphase getestet werden, um ausreichende Konzentrationsfähigkeit bei gleichzeitiger nicht zu starker motorischer Aktivität zu gewährleisten.

Zu Beginn werden alle Tiere einem neurokognitiven Test (modifizierter „Hole Board“-Test) unterzogen. Während einer Übungsphase von 14 Tagen lernen die Ratten, eine Futterbelohnung aus drei markierten von 15 möglichen, sich selbst schließenden Futtermulden zu holen. Die Mulden werden zufällig ausgewählt und täglich gewechselt. Dabei haben die Ratten täglich vier Durchläufe zu absolvieren. Öffnen die Ratten bereits geleerte Mulden wiederholt oder suchen sie nicht markierte Mulden auf, wird dies als kognitiver Fehler gewertet. Dabei ist wiederholtes Öffnen als Defizit im Arbeitsgedächtnis

(präfrontaler Cortex), Öffnen einer unmarkierten Mulde als Defizit im deklarativen Gedächtnis (Hippocampus) anzusehen. Weiterhin fließen auch Motivation und motorische Fähigkeiten in die Bewertung ein. Nach dieser Lernphase, nach welcher die Tiere fast keine Fehler mehr machen, werden die Ratten in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (Abb. 2.8.), wobei die Zuteilung randomisiert ist.

Je nach Gruppenzugehörigkeit wird den Ratten in Inhalationsnarkose (Sevofluran) entweder 0,56 mg/kg *Corynebacterium parvum* in 0,5ml 0,9% NaCl (CP-Gruppe) oder nur 0,5 ml 0,9% NaCl (Kontrollgruppe) injiziert. Ab dem Zeitpunkt der Injektion bekommt die Hälfte der Tiere das Pharmakon L-N₆-Iminoethyllysine (L-NIL, 1 mM) über das Trinkwasser verabreicht, um die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu hemmen, die beim generalisierten septischen Geschehen pathophysiologisch bedeutsam ist (Garcion et al., 1998). Die Tiere werden dann täglich dem „Hole Board“-Test unterzogen, um die Reduktion der kognitiven Leistung zu erkennen. Am dritten Tag nach Infektion zeigen die Ratten im Test vermehrt wiederholte und falsche Versuche. Deshalb werden zu diesem Zeitpunkt die *in vitro* Experimente durchgeführt (Abb. 4.6.).

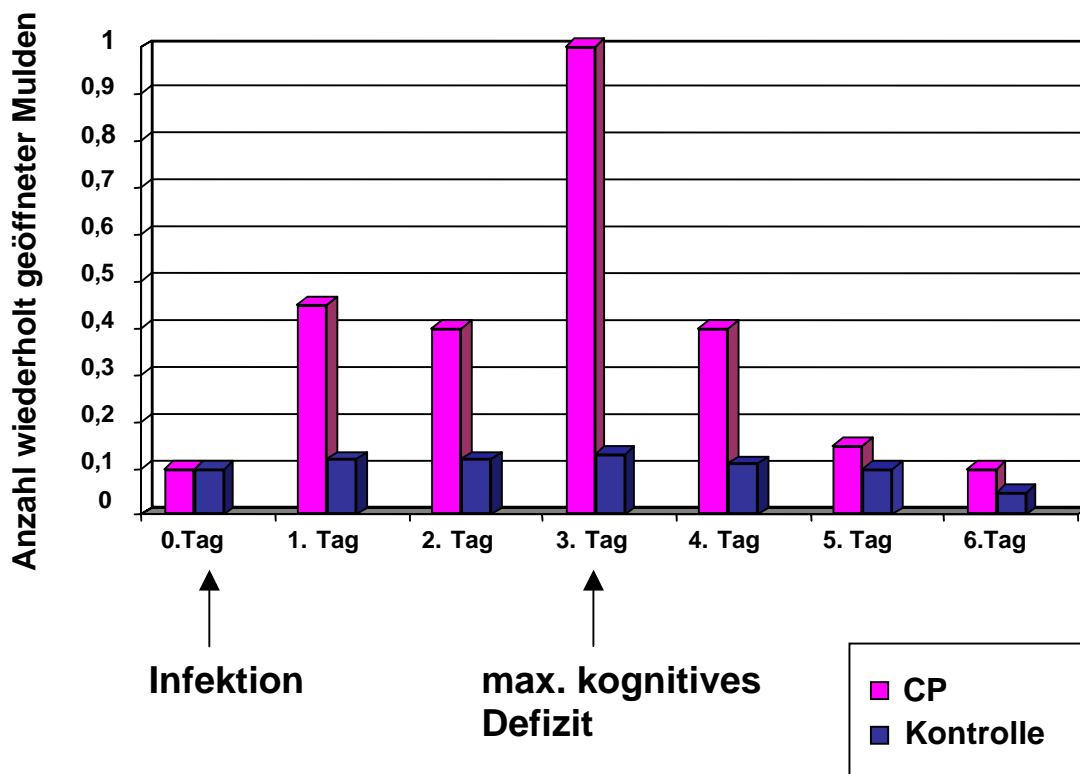


Abb. 4.6.: Zeitverlauf des kognitives Defizits bei Ratten nach Injektion von Corynebakterium. Am dritten Tag nach Infektion zeigen die Tiere im "Hole Board"-Test vermehrt wiederholte oder falsche Versuche, was auf ein Defizit im Arbeitsgedächtnis hinweist.

4.5.2. Versuchsreihe mit *in vitro*-Experimenten

In der zweiten Versuchsreihe, die allein aus *in vitro*-Experimenten besteht, werden die Tiere in vier Gruppen randomisiert aufgeteilt (Abb. 2.8.).

Den Ratten wird je nach Gruppenzugehörigkeit, wie oben bereits beschrieben, in Inhalationsnarkose entweder 0,56 mg/kg Corynebakterium parvum in 0,5 ml 0,9% NaCl (CP-Gruppe) oder nur 0,5 ml 0,9% NaCl (Kontrollgruppe) injiziert.

Nach der Dekapitierung, löst man am Schnitt den ersten tetanischen Stimulus aus. Danach wird der spezifische nNOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M) zur einen Hälfte der Hirnschnitte in der Messkammer gegeben. Die andere Hälfte erhält

den nicht spezifischen iNOS-Inhibitor L-NIL (1 mM). Nach Aufzeichnung der Baseline wird, wie oben erläutert, unabhängig vom ersten Input ein zweiter tetanischer Stimulus ausgelöst. Die Werte werden miteinander verglichen, wobei der erste Input als Kontrollspur gilt. Mit dieser Versuchsanordnung sollen Rückschlüsse auf die Anwesenheit und Wirkung von NO-Synthase-Inhibitoren *in vitro* gezogen werden.

4.6. Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe der Software IGOR Panel 2 (Wave Metrics, N.Y., USA). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanz-Abschätzung für LTP/LTD ab 30 Minuten nach der jeweiligen Stimulation erfolgte mittels Student's t-test.

5. Ergebnisse

5.1. *In vitro*-LTP bei trainierten Tieren

Vor den *in vitro*-Versuchen werden alle Tiere zunächst einem neurokognitiven Test ("Hole Board"-Test) unterzogen. Anschließend durchlaufen die Tiere an dieser Testvorrichtung eine Trainingsphase von 14 Tagen. Danach werden die Ratten randomisiert in vier Gruppen unterteilt. Je nach Gruppenzugehörigkeit wird den Ratten entweder *Corynebakterium parvum* (CP-Gruppe) oder NaCl (Kontroll-Gruppe) injiziert. Nach Injektion wird nun der einen Hälfte der Tiere L-NIL (spezifischer iNOS-Inhibitor) über das Trinkwasser gegeben. In den folgenden 3 Tagen wird mittels "Hole Board"-Test die Gedächtnisleistung der Ratten quantifiziert.

Die *in vitro*-Experimente werden am dritten Tag nach Infektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die kranken Tiere im Test die meisten Fehler machen. Die *in vitro*-Experimente bestehen in extrazellulärer Ableitung von fEPSPs und der Induktion und Quantifizierung von LTP nach hochfrequenter Stimulation (HFS) am Hippocampusschnitt. Der Experimentator ist gegenüber der Gruppenzuteilung verblindet.

5.1.1. Effekt der Sepsis auf die LTP

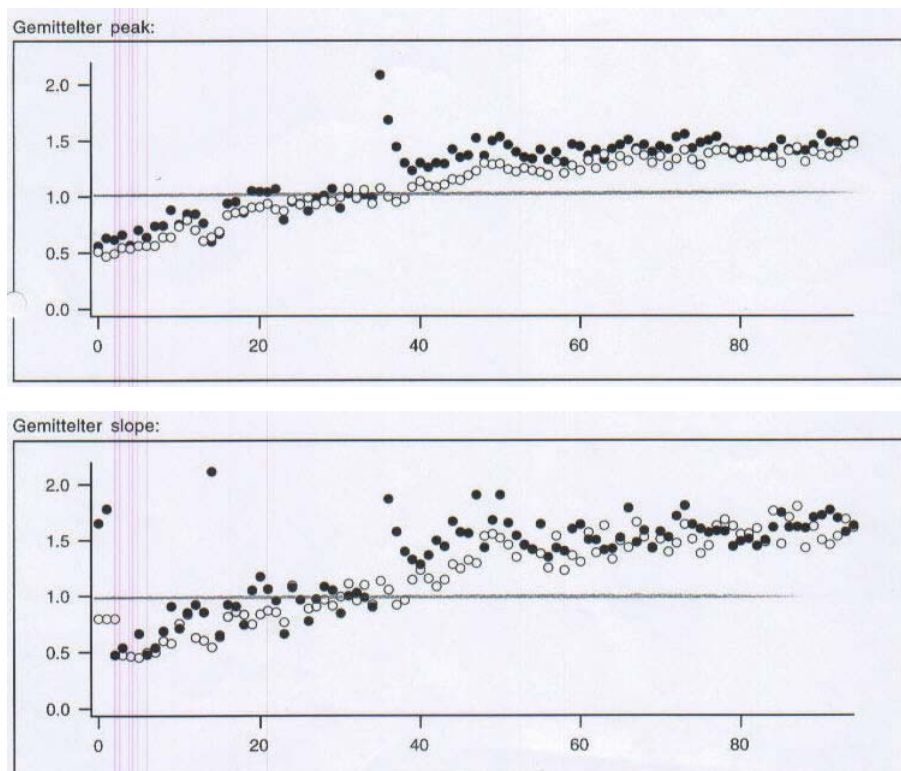
In der CA1-Region von Hippocampus-Schnitten erwachsener Ratten (3 Monate, septische versus gesunde Tiere) leiten wir Feldpotentiale (fEPSP) ab. Die der LTP-Quantifizierung zugrundeliegenden fEPSPs werden alle 30 s durch einen singulären Rechteckspuls (3-4 V, 20 μ s) ausgelöst und über eine Messpipette aufgezeichnet. Nach erfolgreicher Aufzeichnung einer mindestens 20 min

anhaltenden "stabilen baseline" erfolgt über die Stimulationselektrode eine HFS (high-frequency stimulation, 100 Hz/1 s). Unmittelbar nach der HFS kommt es typischerweise zu einem sprunghaften Anstieg der Antworten, der sogenannten posttetanischen Potentierung (PTP). Bleiben die fEPSP-Antworten nach der PTP dauerhaft (> ca. 60 min) erhöht, spricht man von einer LTP.

Innerhalb beider Gruppen (gesunde und kranke Tiere) fällt die Langzeitveränderung der fEPSPs nach HFS unterschiedlich aus. Im Anschluss an die initiale PTP sind sowohl dauerhaft erhöhte fEPSP-Antworten (LTP) als auch auf das Ausgangsniveau zurückgegangene fEPSPs zu beobachten.

Die gemittelten LTP-Werte [fEPSP-Amplitude und fEPSP-Steigung (gemessen an der Amplitude zwischen 20%-80%) werden aufgezeichnet und an der 'baseline' normalisiert] der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant (Abb. 5.1.)

**NaCl-
Plazebo**



CP-
Plazebo

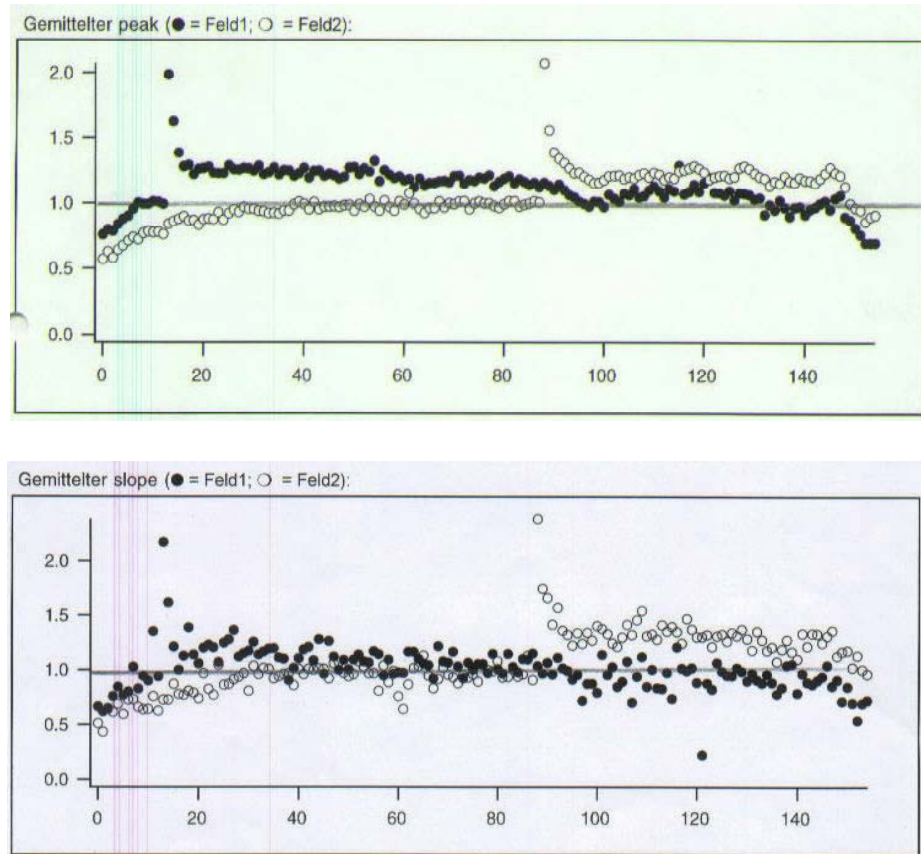


Abb. 5.1.: Sepsis hat keinen Einfluss auf die hippocampale LTP. Über einen Input werden fEPSP-Antworten evoziert. Jeder Datenpunkt (Kreis) errechnet sich aus dem Mittel von zwei aufeinanderfolgenden fEPSP-Antworten (2 Antworten pro Minute). Die gemittelten fEPSP-Amplituden ("Peak") und fEPSP-Steigungen ("Slope", gemessen zwischen 20%-80%) sind auf die "baseline" normalisiert (Input 1: volle Kreise; Input 2: leere Kreise). Die HFS induziert sowohl bei gesunden (NaCl-Plazebo) als auch bei septischen (CP-Plazebo) Ratten immer eine PTT, aber nicht immer eine LTP.

Tab. 5.1.: Darstellung der Werte aus den Gruppen CP-Plazebo und NaCl-Plazebo. Innerhalb einer Gruppe sind die Ergebnisse uneinheitlich, was sich in den deutlich variiierenden Werten zeigt. Im Vergleich der zwei Gruppen miteinander unterscheiden sich die Werte nicht signifikant.

NaCl-Plazebo

LTP-Wert (Peak)	Mittelwert	Standard- abweichung	LTP-Wert (Slope)	Mittelwert	Standard- abweichung
116	125	20	111	134	26
116			117		
113			143		
99			98		
127					
160			143		
124			156		
148			168		

CP-Plazebo

LTP-Wert (Peak)	Mittelwert	Standard- abweichung	LTP-Wert (Slope)	Mittelwert	Standard- abweichung
196	130	29	169	125	22
108			109		
127			134		
125			118		
106			108		
138			130		
116			109		
123					

5.1.2. LTP nach peroraler L-NIL-Applikation

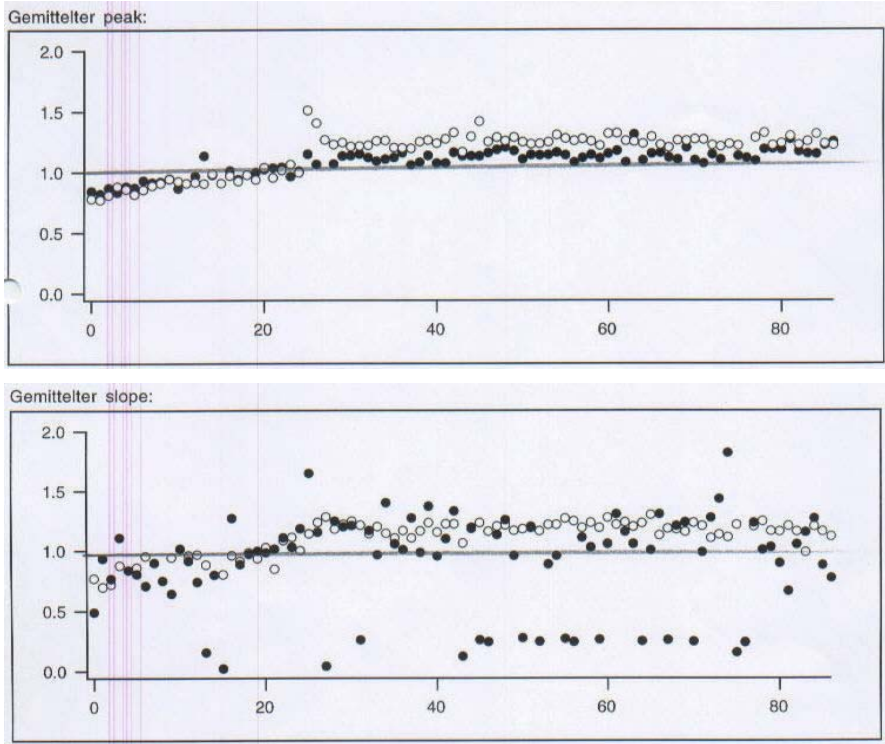
L-NIL wird ab dem Zeitpunkt der Injektion (CP oder NaCl) über das Trinkwasser verabreicht, um möglicherweise die für das Sepsis-Geschehen pathophysiologisch bedeutsame iNOS zu hemmen. Die Expression der iNOS wird gemeinsam mit der Bildung von Arginin (NOS-Substrat) durch bestimmte bakterielle Toxine stimuliert. Es kommt im ZNS zu stark erhöhten NO-Spiegeln, da die iNOS keiner Rückkopplungshemmung unterliegt. Jedoch wird die nNOS durch die erhöhte NO-Konzentration gehemmt. Dies führt *in vitro* zur Unterdrückung der hippocampalen LTP (Haley et al., 1993).

Es soll in dieser Versuchsreihe die Wirkung von peroral zugeführtem L-NIL auf die LTP *in vitro* untersucht werden. Dazu verwendet man den gleichen Versuchsaufbau wie unter 5.1.1.

Von den 'L-NIL-Ratten' (CP versus Kontrolle) werden am dritten Tag nach Infektion Hippocampusschnitte angefertigt. LTP wird anhand der abgeleiteten fEPSPs gemessen. Innerhalb der Gruppen (CP versus Kontrolle) fallen auch hier die Ergebnisse unterschiedlich aus. Nach HFS kommt es initial immer zur PTP, allerdings kommt es nicht immer zu einer LTP.

Die gemittelten Werte der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant ist kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 5.2.).

**NaCl-
L-NIL**



**CP-
L-NIL**

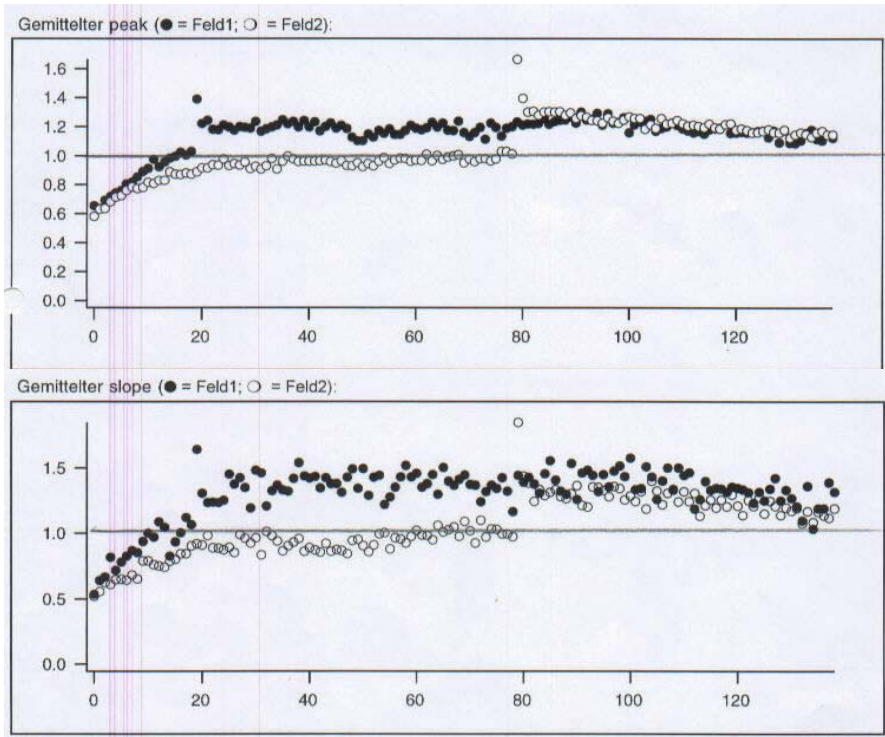


Abb. 5.2.: Perorale Zufuhr von L-NIL hat keine Auswirkung auf die hippocampale LTP. Über einen Input werden fEPSPs evoziert. Nach HFS ist die PTP immer deutlich ausgeprägt sichtbar. Allerdings kommt es im Anschluss daran weder bei kranken (NaCl-NIL) noch bei gesunden (CP-NIL) Tieren regelmässig zu einer dauerhaften Erhöhung der fEPSP-Antworten

Tab. 5.2.: Darstellung der Werte aus den Gruppen CP-L-NIL und NaCl-L-NIL. Die Werte der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant.

NaCl-L-NIL

LTP-Wert (Peak)	Mittelwert	Standard- abweichung	LTP-Wert (Slope)	Mittelwert	Standard- abweichung
126	121	12	116	113	16
136			133		
132			109		
106			105		
105			92		
124			134		
118			103		

CP-NIL

LTP-Wert (Peak)	Mittelwert	Standard- abweichung	LTP-Wert (Slope)	Mittelwert	Standard- abweichung
161	129	17	174	142	19
117			123		
125			137		
131					
136			145		
128			133		
106					

5.2. LTP unter NO-Synthase-Hemmung *in vitro*

In der zweiten Versuchsreihe werden die Tiere randomisiert in vier Gruppen aufgeteilt. Je nach Gruppenzugehörigkeit wird entweder *Corynebacterium parvum* (CP-Gruppe) oder NaCl (Kontroll-Gruppe) injiziert.

Nach Aufzeichnung einer Kontrollspur (baseline, HFS an Input 1, LTP) wird entweder L-NIL oder L-NAME eingewaschen. Unter Anwesenheit der NOS-Inhibitoren werden dann an Input 2 unabhängig fEPSPs gemessen. Es soll hierbei die Wirkung von NO-Synthase-Inhibitoren *in vitro* beobachtet werden.

5.2.1 Effekt von L-NIL (Hemmung der iNOS) auf LTP

In dieser Versuchsreihe wird in ein und dem selben Hippocampus-Schnitt über zwei getrennte, von einander unabhängige Inputs (Stimulationselektrode S1 und S2, siehe Abb. 4.4.) eine HFS appliziert. Diese Stimulation erfolgt zunächst über Input 1 vor dem Einwasch von L-NIL und danach über Input 2, etwa 60 min nach dem Einwasch von L-NIL.

Die fEPSPs werden alle 15 s ausgelöst, und zwar jeweils abwechselnd über Input 1 und Input 2 (jeder Input 2 x pro Minute) und über eine Messpipette aufgezeichnet. Die HFS erfolgt jeweils nach erfolgreicher Aufzeichnung einer mindestens 20 min langen "stabilen baseline".

Unmittelbar nach HFS sieht man auch hier eine PTP. Wichtig ist, dass die fEPSPs, die dem vom jeweils anderen Input stimulierten synaptischen Feld entspringen, unbeeinflusst bleiben (Abb. 5.3.). Die beiden Inputs, d.h. die zwei erfassten synaptischen Felder, sind also voneinander unabhängig.

Unter Input 1 (Kontrolle, vor NIL-Einwasch) zeigt sich nach HFS bei gesunden und kranken Tieren eine uneinheitliche Ausprägung der LTP.

Unter Einwasch von L-NIL ändert sich die fEPSP-Amplitude nicht. Ca. 60 min nach Einwasch von L-NIL erfolgt über Input 2 unabhängig eine HFS. Die HFS-induzierte fEPSP-Veränderung unter Input 1 unterscheidet sich nicht von derjenigen unter Input 2 in Anwesenheit von L-NIL. (Abb. 5.3.)

**L-NIL
*in vitro***

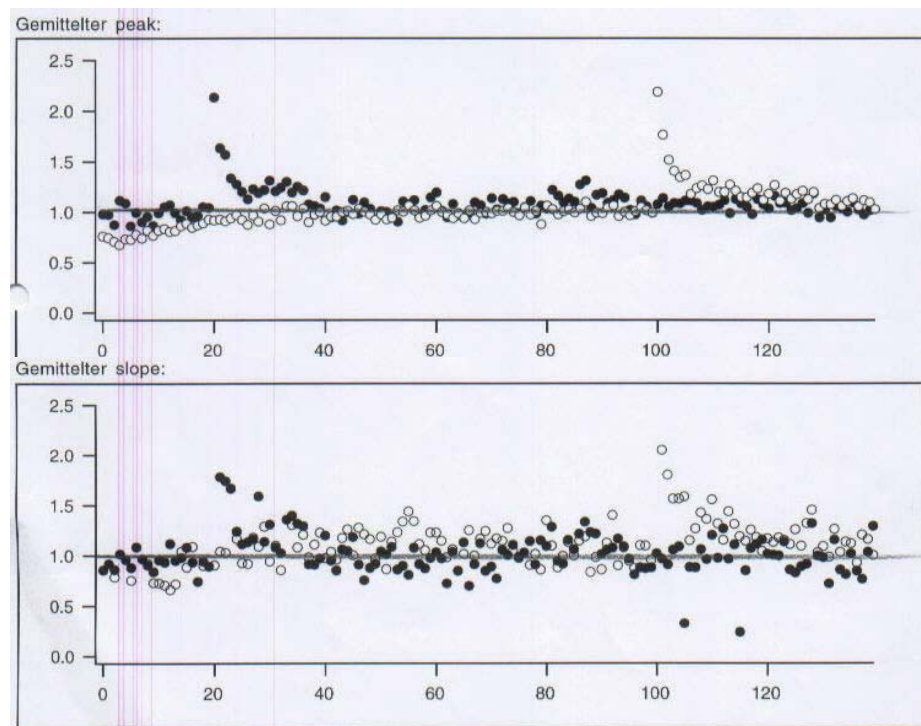


Abb: 5.3.: Die *in vitro*-Applikation von L-NIL führt nicht zur Veränderung der synaptischen Plastizität. Über Input 1 und Input 2 werden zwei unabhängige fEPSP-Antworten evoziert. Die HFS erfolgt zunächst über Input 1 vor dem L-NIL-Einwasch (Kontrolle) und danach über Input 2 unter Anwesenheit von L-NIL (1 mM). Sowohl unter Input 1 (Kontrollspur) als auch unter Input 2 (L-NIL-Applikation *in vitro*) sieht man immer eine PTP, aber keine regelmäßige LTP.

Tab. 5.3.: Effekt von L-NIL-Applikation *in vitro*. Die *in vitro*-Applikation von L-NIL hat keine Auswirkung auf die LTP.

L-NIL in vitro

Gruppe	LTP (peak)	LTP (slope)	LTP (peak)	LTP (slope)	LTP (peak)	LTP (slope)
	Kontrolle	Kontrolle	L-NIL	L-NIL	L-NIL/Kontrolle	L-NIL/ Kontrolle
NaCl	108	107	120	114	1,11	1,07
NaCl	123	122	93	74	0,76	0,61
NaCl	87		121		1,39	
NaCl	101	93	109	109	1,08	1,17
NaCl	142		95		0,67	
NaCl	100		90		0,90	
NaCl	131		112		0,85	
CP	69	84	99	91	1,43	1,08
CP	114	123	111	104	0,97	0,85
CP	116		83		0,72	
CP	106	106	112	134	1,06	1,26
CP	143		99		0,69	
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
	112	106	104	104	0,97	1,01
	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.
	22	15	12	20	0,26	0,24

5.2.2. Effekt von L-NAME (Hemmung der nNOS) auf LTP

L-NAME hemmt LTP *in vitro* (Böhme et al., 1991; O'Dell et al., 1991; Bon et al.; 1992). Diesen bekannten Effekt wollen wir mit unseren Messmethoden wiederholen.

Auch in dieser Versuchsreihe wird über zwei unabhängige Inputs eine HFS appliziert. Unter Input 1 zeigen sich bei beiden Gruppen (CP, Plazebo) nach HFS und initialer PTP unterschiedliche LTP-Ausprägungen. Unter Einwasch von L-NAME ändert sich die aufgezeichnete 'baseline' nicht. Etwa 60 min nach Einwasch stimuliert man hochfrequent über Input 2. Die HFS-induzierte fEPSP-Veränderung unter Input 2 unterscheidet sich bei beiden Gruppen (CP, Plazebo) signifikant von derjenigen unter Input 1. Unter L-NAME beobachtet man im Vergleich zur Kontrolle ein weniger ausgeprägtes LTP (Abb. 5.4.).

**L-NAME
in vitro**

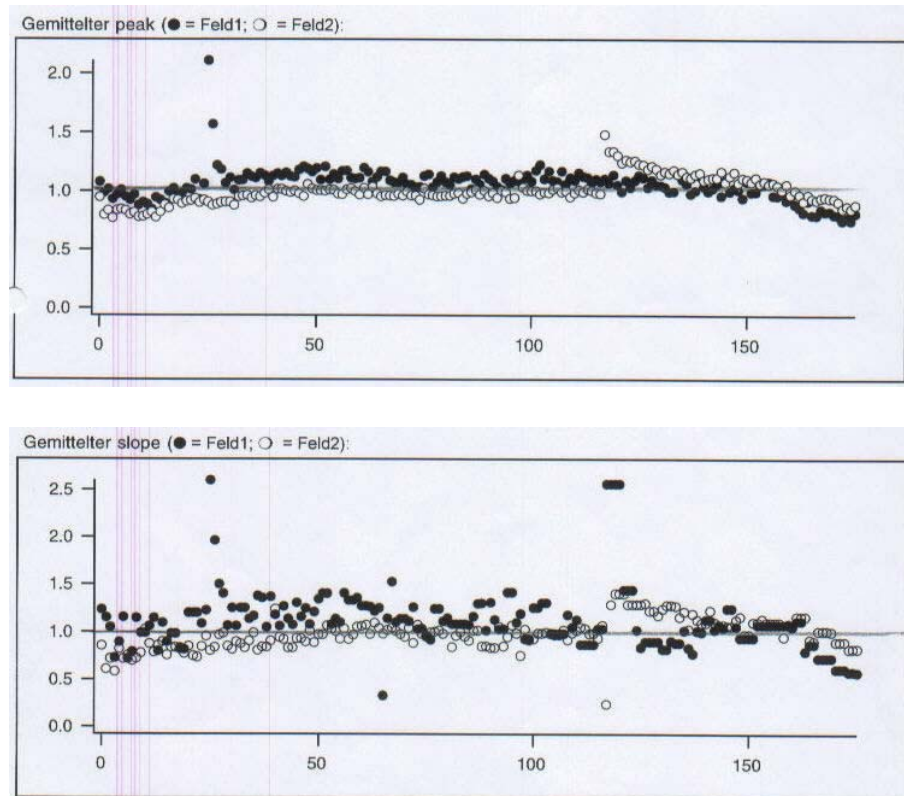


Abb. 5.4.: L-NAME hemmt die Auslösung von LTP. Über Input 1 und Input 2 werden zwei unabhängige fEPSPs abgeleitet. Die Datenpunkte werden aus 2 aufeinanderfolgenden fEPSPs ermittelt, dabei sind alle fEPSP-Antworten auf die "baseline" normalisiert. Unter Input 1 zeigt sich nach HFS sowohl bei gesunden als auch bei kranken Tieren vor L-NAME-Einwasch nicht immer eine LTP. Unter Anwesenheit von L-NAME (Input 2) bleibt bei beiden Tiergruppen die LTP aus. Die synaptische Transmission bleibt unbeeinflusst, das heißt die Amplituden- und Steigungsgröße der fEPSPs wird durch den Einwasch von L-NAME nicht reduziert.

Tab.5.4.: Effekt von L-NAME-Applikation *in vitro*. Die *in vitro*-Applikation von L-NAME unterdrückt die LTP.

L-NAME *in vitro*

Gruppe	LTP (peak) Kontrolle	LTP (slope) Kontrolle	LTP (peak) L-NAME	LTP (slope) L-NAME	LTP (peak) L-NAME/ Kontrolle	LTP (slope) L-NAME/ Kontrolle
NaCl	124	137	122	130	0,98	0,95
NaCl	179		173		0,97	
NaCl	137		109		0,80	
NaCl	180	127	99	95	0,55	0,75
CP	113	130	100	98	0,88	0,75
CP	140	148	80	67	0,57	0,45
CP	153		111		0,73	
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
	147	136	113	98	0,78	0,73
	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.	Standard- abweich.
	26	9	29	26	0,18	0,20
					Signifikanz	Signifikanz
					0,01	0,05

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt anhand des Ratten-Modells, inwieweit eine Sepsis, die im *in vivo*-Versuch die Gedächtnisleistung der Ratten beeinträchtigt, die synaptische Plastizität im Hippocampus *in vitro* beeinflusst. Pathophysiologisch spielen im Sepsis-Geschehen iNOS-induzierte erhöhte NO-Spiegel eine wichtige Rolle. Deshalb wurde zusätzlich die Auswirkung der spezifischen Hemmung der iNOS durch L-NIL (Applikation *in vivo* und *in vitro*) auf die hippocampale LTP untersucht. Es zeigt sich, dass sowohl eine induzierte Sepsis als auch die Applikation von L-NIL *in vivo* und *in vitro* keinen Effekt auf die *in vitro* gemessene LTP hat.

Dabei ist derzeit allerdings noch unklar, welche Rolle iNOS im ZNS spielt. Zwar konnte im Gehirn immunhistochemisch die Bildung von iNOS und eine daraus resultierende sprunghaft erhöhte NO-Synthese gezeigt werden (Dawson & Dawson, 1995), allerdings ist nicht klar, wie lang die erhöhte NO-Bildung anhält und welche Auswirkung der erhöhte NO-Spiegel auf die synaptische Plastizität hat.

In den Experimenten mit dem unspezifischen nNOS-Inhibitor L-NAME konnte gezeigt werden, dass dem NO-Metabolismus in der Modulation der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle zukommt. Wie Wu et al., 1997 konnten auch wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Hemmung der nNOS durch L-NAME die LTP *in vitro* unterdrückt.

6.1. Zusammenhang zwischen neurokognitivem Outcome und LTP im Hippocampus bei Sepsis

Die trainierten Ratten (Lernphase: 14 Tage) wurden nach Injektion des Corynebakterium parvum täglich dem "Hole Board"-Test unterzogen. Am dritten Tag nach Infektion kam es vermehrt zu wiederholten oder falschen Versuchen, was auf ein Defizit im Arbeitsgedächtnis hinweist. motivations-, angst- und motorisch bedingte Defizite, die man auf Grund der "open field"-Charakteristik des "Hole Board"-Tests beobachten und von kognitiven Veränderungen unterscheiden kann, zeigten sich nicht. Zum Zeitpunkt des ausgeprägtesten kognitiven Defizits (3. Tag) wurden die *in vitro*-Experimente durchgeführt. Beim LTP der gesunden Tiere war jedoch im Vergleich zur LTP bei den kranken Tieren *in vitro* kein Unterschied festzustellen. Eine elektrophysiologische Veränderung wurde also nicht beobachtet, obwohl die Ratten im *in vivo*-Experiment ein Gedächtnisdefizit zeigten. Dies könnte bedeuten, dass der "Hole Board"-Test bereits geringgradige Störungen der Gedächtnisleistung abbildet, bevor ein elektrophysiologisch messbares Korrelat nachweisbar ist. Das könnte daran liegen, dass es durch die *in vitro*-Verhältnisse (sehr dünne Hirnschnitte (400 μm), eng umschriebenes Areal: CA1-Region des Hippocampus) schwierig ist, so komplexe Vorgänge wie Lernen und Gedächtnis elektrophysiologisch abzubilden. Auch fällt durch die Präparation der Einfluss von nervalen Verschaltungen und Neurotransmitter-Projektionen aus anderen Hirnarealen auf die Gedächtnisbildung weg. Hölscher (1999) beschreibt zudem, dass bei der Konsolidierung von Gedächtnis und bei Prozessen, die die Gedächtnisbildung beeinflussen (z.B. Sepsis), die up- und down-Regulation von

Synapsen eine große Rolle spielt. Fallen nun Projektionen aus anderen Hirnarealen auf Grund der Versuchsanordnung (sehr dünne Hirnschnitte, begrenztes Messareal) weg, kann dies dazu führen, dass je nach Positionierung der Messelektroden auf dem Hirnschnitt die Veränderungen der synaptischen Effizienz in der Summe Null ergeben.

Es muss beim *in vitro*-Experiment auch damit gerechnet werden, dass es durch mechanische Manipulation und Aufbewahrung der Hirnschnitte in der mit künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit gefüllten Messkammer zu Schädigungen oder enzymatischen Veränderungen im Hirnschnitt kommen kann (Hölscher, 1999). Frühere Arbeiten weisen darauf hin, dass der gasförmige Transmitter NO sehr leicht durch die Membranen diffundiert (Bredt & Synder, 1992; Dawson & Synder, 1994; Garthwaite & Boulton, 1995). Wird nun Sepsis-bedingt eine iNOS-abhängige NO-Synthese induziert, entsteht ein hoher NO-Konzentrationsgradient zwischen intra- und extrazellulär. Dieser hohe Gradient führt möglicherweise zu einem raschen Entweichen von NO aus dem Gewebe, so dass es zu keiner Schädigung der an der synaptischen Plastizität beteiligten Neurone kommt (Dawson & Dawson, 1995). Darüber hinaus könnte es sein, dass der Sepsis-induzierte Konzentrationsanstieg der iNOS nicht ausreicht, um zu Veränderungen zu führen, die elektrophysiologisch messbar sind (Dawson & Dawson, 1996). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass durch gegenseitige Wechselwirkung der frei gesetzten Entzündungsmediatoren die Expression der iNOS unterdrückt wird (Thiemermann, 1997).

Es erweist sich also als schwierig, zwischen neurokognitivem Outcome *in vivo* und der elektrophysiologischen LTP-Messung *in vitro* einen Zusammenhang

herzustellen. Ein möglicher künftiger Versuchsansatz wäre folglich, eine LTP-Messung *in vivo* durchzuführen. Damit könnten Fehler, die daraus resultieren, dass man den Schnitt aus der Gesamtheit des Gehirns isoliert, mechanisch belastet und in einer künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit aufbewahrt, verhindert werden.

6.2. Die Rolle der NO-Synthasen nNOS und iNOS

6.2.1. Die nNOS und LTP

Die in unseren Versuchen ermittelte Unterdrückung der LTP durch Hemmung der nNOS (hier durch L-NAME) *in vitro* wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt (Gribkoff & Lum-Ragan, 1992; Haley et al., 1993; Lum-Ragan & Gribkoff, 1993; Wu et al., 1997). Es wurde aber auch gezeigt, dass diese Hemmung von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Diese sind: Temperatur (Williams et al., 1993), Stimulationsfrequenz (Haley et al., 1993), Einwaschzeit des Inhibitors (Izumi et al., 1992) und das Alter der Tiere (Kirson & Yaari, 1996). In einem solchen experimentellen Ansatz ist also ein kausaler Zusammenhang zwischen Hemmung der nNOS und einem neurokognitivem Defizit nicht unbedingt herzustellen.

6.2.2. Die iNOS und LTP

Im ZNS kommen drei verschiedene NO-Synthasen (nNOS, iNOS, eNOS) vor, wobei die iNOS nur durch bestimmte Noxen (z.B. Endotoxin) induziert wird und keiner Rückkopplungshemmung durch NO unterliegt. Führen die dadurch resultierenden NO-Spiegel zu einer starken synaptischen Freisetzung von

Glutamat und damit zu einer dauerhaften Depolarisation der neuronalen Zellmembran, kommt es zum Zelluntergang und damit auch zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität (Sugaya et al., 1998). Es wurde bereits gezeigt, dass ein septischer Schock (Thiemermann, 1997), eine HIV-Infektion (Lipton, 1992; Dawson et al., 1993b; Mollace et al., 1993) sowie eine Injektion von Endotoxin direkt ins Ventrikelsystem (Sugaya et al., 1998) eine hohe iNOS-Aktivität und damit hohe zentrale NO-Spiegel verursacht.

In unseren Versuchen, in denen mit *Corynebacterium parvum* infizierte Ratten im Gedächtnistest ein kognitives Defizit aufwiesen, konnten wir *in vitro* jedoch keine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität (LTP) feststellen. Dies könnte daran liegen, dass zum Zeitpunkt der elektrophysiologischen Messung die iNOS- und die NO-Konzentration nicht erhöht war. Dass der spezifische iNOS-Inhibitor L-NIL in unserer Versuchsreihe keinen Effekt auf die LTP hatte, könnte folglich darin begründet sein, dass zum Zeitpunkt der Messung iNOS im Hirnschnitt nicht oder kaum vorhanden war.

7. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, anhand eines Ratten-Modells zu untersuchen, ob eine experimentell induzierte Sepsis, die *in vivo* ("Hole Board"-Test) die Gedächtnisleistung der Tiere beeinträchtigt, auch *in vitro* die synaptische Plastizität (LTP) im Hippocampus beeinflusst. Zwischen kranken und gesunden Tieren konnte hierbei jedoch kein Unterschied festgestellt werden.

Wir untersuchten zusätzlich die Auswirkung einer spezifischen Hemmung der iNOS (induzierbare NO-Synthase) durch L-NIL (Applikation *in vivo* und *in vitro*) auf die hippocampale LTP, da iNOS-induzierte erhöhte NO-Spiegel im Sepsis-Geschehen pathophysiologisch eine wichtige Rolle spielen. Jedoch zeigte sich auch hierbei kein Effekt.

Für die Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung lässt sich also kein *in vitro*-Korrelat ableiten. Zudem kann in dem dargestellten experimentellen Ansatz die Beteiligung der iNOS nicht bestätigt werden. Offensichtlich ist also die hippocampale LTP *in vitro* kein ausreichend sensibler Messparameter zur Erfassung neurokognitiver Defizite. Möglicherweise könnte durch die Erfassung der synaptischen Plastizität am lebenden Tier ein elektrophysiologisches Korrelat für die Störung von Gedächtnisleistungen geschaffen werden.

8. Literaturverzeichnis

Amaral DG, Witter MP: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci* 31 (1989) 571-591

Amaral DG, Insausti R: Hippocampal formation. In „The human nervous system“, Praxinos G (Hrsg). Academic, San Diego, 1990, 711-755

Aniksztejn L, Bregestovski P, Ben Ari Y: Selective activation of quisqualate metabotropic receptor potentiates NMDA but not AMPA responses. *Eur J Pharmacol* 205 (1991) 327-328

Arrancio O, Kandel ER, Hawkins RD: Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3'-5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376 (1995) 74-80

Arrancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD: Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87 (1996) 1025-1035

Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER: Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 13445-13452

Baude A, Nusser Z, Roberts JDB, Mulvihill E, McIlhinney RAJ, Somogyi P: The metabotropic glutamate receptor (mGluR1) is concentrated at perisynaptic

membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. Neuron 11 (1993) 771-787

Bear MF, Malenka RC: Synaptic plasticity: LTP and LTD. Curr Opin Neurobiol 4 (1994) 389-399

Beckmann JS, Beckmann TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Acad Sci USA 87 (1990) 1620-1624

Beckmann JS: The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. J Dev Physiol 15 (1991) 53-59

Birbaumer N, Schmidt RF: "Biologische Psychologie", Schmidt RF, Birbaumer N (Hrsg), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, 4. Auflage

Birbaumer N, Schmidt RF: Lernen und Gedächtnis. In „Physiologie des Menschen“, Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrsg), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2000, 28. Auflage, 548-592

Birbaumer N, Schmidt RF: Lernen und Gedächtnis. In "Neuro- und Sinnesphysiologie", Schmidt RF, Schaible HG (Hrsg.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2001, 4.Auflage, 436-449

Bliss TV, Collingridge GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361 (1993), 31-39

Böhme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC: Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199 (1991) 379-381

Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ: Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative disease. *J Neurochem* 68 (1997) 2227-2240

Bon C, Böhme GA, Doble A, Stutzmann JM, Blanchard JC: A role for nitric oxide in long term potentiation. *Eur J Neurosci* 4 (1992) 420-424

Bortolotto ZA, Collingridge GL: On the mechanism of LTP induced by 1S,3R-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (ACPD) in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 34 (1993) 543-551

Bredt DS, Synder H: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8 (1992) 3-11

Brown GC: Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta PhysiolScand* 168 (2000) 667-674

Butefisch CM, Davis BC, Wise SP, Sawaki L, Kopylev L, Classen J, Cohen LG: Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. Proc Natl Acad Sci USA 97 (2000) 3661-3665

Cerbone A, Patacchioli FR, Sadile AG: A neurogenetic and morphogenetic approach to hippocampal functions based on individual differences and neurobehavioral covariations. Behav Brain Res 55 (1993) 1-16

Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, Haley JE, Steinmetz JE: Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. Neuroreport 3 (1992) 567-570

Chetkovich DM, Klann E, Sweatt JD. Nitric oxide synthase independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. Neuro Report 4 (1993) 919-922

Coan EJ, Collingridge GL. Effects of phencyclidine, SKF10,047 and related psychotomimetic agents on NMDA mediated synaptic responses in rat hippocampal slices. Br J Pharmacol 91 (1987) 547-556

Collingridge GL, Herron CE, Lester RAJ: Frequency dependent NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. J Physiol 399 (1988) 283-300

Danysz W, Zajackowski W, Parsons CG: Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. Behav Pharmacol 1995; 6:455-474

Daum I, Schugens M, Ackermann H, Lutzenberger W, Dichgans J, Birbaumer N: Classical conditioning after cerebellar lesion in humans. *Behav Neurosci* 107 (1993) 748-756

Dawson VL, Dawson TM, Uhl GR, Snyder SH: Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993b) 3256-3259

Dawson TM, Snyder SH: Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14 (1994) 5147-5159

Dawson VL, Dawson TM: Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 34 (1995) 323-342

Dawson VL, Dawson TM: Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain research* 118 (1998) 215-229

Dineley KT, Weeber EJ, Atkins C, Adams JP, Anderson AE, Sweatt JD: Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration, coordination. *J Neurochem* 77 (2001) 961-971

Doyle C, Hölscher C, Rowan MJ, Anwyl R: The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitro-inidazole blocks both long-term potentiation am depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. J Neurosci 16 (1996) 418-424

Dudel J: Synaptische Übertragung. In „Neuro- und Sinnesphysiologie“, Schmidt RF, Schaible HG (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001, 4. Auflage, 53-77

East SJ, Garthwaite J: NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cGMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. Neurosci lett 123 (1991) 17-19

Garcion E, Sindji L, Montero-Menei, Andre C, Brachet P, Darcy F: Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: Regulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Glia 22 (1998) 282-294

Garthwaite J, Boulton CL: Nitric oxide signalling in the central nervous system. Annu Rev Physiol 57 (1995) 683-706

Greenough WT: Structural correlates of information storage in the mammalian brain: a review and hypothesis. Trends in neurosci7 (1984) 229-233

Greger R: Membranpotential. In „Lehrbuch der Physiologie“, Klinker R, Silbernagel S (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996b, 2. Auflage, 47-58

Gribkoff VK, Lum-Raga JT: Evidence of nitric oxide synthase inhibitor-sensitive and insensitive hippocampal synaptic potentiation. *J Neurophysiol* 68 (1992) 639-642

Guerra-Romero L, Tureen JH, Fournier MA, Markrides V, Tauber MG: Amino acids in cerebrospinal and brain intestinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr Res* 33 (1993) 510-513

Haley JE, Malen PL, Chapman PF: Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperatures in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 160 (1993) 85-88

Hawkins RD, Kandel ER, Siegelbaum SA: Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity: *Annu Rev Neurosci* 16 (1993) 625-665

Heneka MT, Schmidlin A, Wiesinger H. Induction of argininosuccinate synthetase in rat brain glial cells after striatal microinjection of immunostimulates. *J Cerebr Blood Flow Metab* 19 (1999) 898-907

Herrero I, Mirasportugal MT, Sanchezprietto J: Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature* 360 (1992) 163

Higashima M, Kinoshita H, Koshino Y: Differences in the effects of zolpidem and diazepam on recurrent inhibition and long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 245 (1998) 77-80

Hirota K, Roth SH: Sevoflurane modulates both GABA_A and GABA_B Receptors in area CA1 of rat hippocampus. *Br J Anaesth* 78 (1997) 60-65

Hölscher C: Nitric Oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 20 (1997) 298-303

Hölscher C: Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J Neurosci Res* 58 (1999) 62-75

Hunt SP, Mantyh PW: The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2 (2001) 83-91

Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF: Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science* 257 (1992) 1273-1276

Jodar L, Kaneto H: Synaptic plasticity: stairway to memory. Jap J Pharmacol 68 (1995) 359-387

Kirson ED, Yaari Y: Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurons: Functional properties and sensitivity to Ifenprodil. J Physiol 497 (1996) 437-455

Klinke R: Erregungsübertragung in Zellverbänden. In „Lehrbuch der Physiologie“, Klinke R, Silbernagel S (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996, 2. Auflage, 59-78

Ko GY, Kelly PT: Nitric Oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci 19 (1999) 6784-6794

Korcok J, Wu F, Tymi K, Hammond RR, Wilson JX: Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and accumulation of ascorbate in astroglial cultures: intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition. J Neurochem 81 (2002) 185-193

Krause M, Gubler J: Systemische Infektionen. In "TIM", Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999, 1. Auflage 1807-1829

Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK: Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor channel complex. *Neuron* 8 (1992) 1087-1099

Lin H, Wan FJ, Kang BH, Wu CC, Tseng CJ: Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarii of rats. *Hypertension* 33 (1999) 1218-1224

Linden DJ: Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12 (1994) 457-472

Linden DJ, Connor JA: Long-term synaptic depression. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18:319-357

Lipton SA: Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor? *Trends Neurosci* 15 (1992) 75-79

Lister RG: The amnestic action of benzodiazepines in man. *Neurosci Biobehav Rev* 9 (1985) 87-94

Lum-Raga JT, Gribkoff VK: The sensitivity of hippocampal long-term-potentiation to nitric oxide synthase inhibitors is dependent upon the pattern of conditioning stimulation. *Neuroscience* 57 (1993) 973-983

Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P: Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurons in rat hippocampus in vitro. *J Physiol (Lond)* 524 PT 1 (2000) 91-116

MacIver MB, Tauck DL, Kenig JJ: General anesthetic modification of synaptic facilitation and long-term potentiation in hippocampus. *Br J Anaesth* 62 (1989) 301-310

MacIver MB, Mikulec AA, Amagasa SM, Monroe FA: Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology* 85 (1996) 823-834

Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN: An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340 (1989) 554-557

Malenka RC: Synaptic plasticity in hippocampus and neocortex: a comparison. In: „The cortical neuron“, Gutnick MJ, Moody I (Hrsg.), Oxford University Press, New York, 1995, 98-108

Malinow R: LTP: Desperately seeking resolution. *Science* 266 (1994) 1195-1196

Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem 268 (1993) 12231-12234

Marletta MA: Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. Cell 78 (1994) 927-930

Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H: Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions. Neuron 16 (1996) 1229-1236

Mollace V, Colasanti M, Persichini T, Bagetta G, Lauro GM, Nistico G: HIV gp 120 glycoprotein stimulates the inducible isoform of NO synthase in human cultures astrocytoma cells. Biochem Biophys Res Comm 194 (1993) 439-445

Morales ME, Santillan MB, Jauregui EA, Ciuffo GM: Structure-activity relationship of nitric oxide synthase inhibitors: a theoretical approach. Cell Mol Biol 48 (2002) 547-555

Musleh WY, Shahi K, Baudry M. Further studies concerning the role of nitric oxide in LTP induction and maintenance. Synapse 13 (1993) 370-375

Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM: Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. J Biol Chem 274 (1999) 9573-9580

O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O: Tests of the roles of two diffusible substances in long term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. Proc Natl Acad Sci USA 88 (1991) 11285-11289

Publicover SJ. Expl Brain Res 84 (1991) 680-684

Rahmann H: Synaptische Plastizität. In "Das Gedächtnis. Neurobiologische Grundlagen", Rahmann H (Hrsg.), Rahmann M, J.F. Bergmann Verlag, München, 1988, 1. Auflage, 219-230

Ramon y Cajal S: Histologie du système nerveux de l'homme et des Vertébrés. vol I,II Maloine, Paris (1909-1911)

Ramon y Cajal S: "The structure of Ammon's horn". Thomas, Springfield, 1968, 78

Rosenzweig MR, Leiman AL, Breedlove SM: „Biological psychologie“, Sinauer, Sunderland, Mass, 1996

Ruef C, Schaffner A: Infektionen des Zentralnervensystems. In "TIM", Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW,

Wolfram G, Zeitz M, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999, 1. Auflage, 1844-1853

Schumann EM, Meffert MK, Schulman H, Madison DV: An ADP-ribosyl transferase as a potential target of nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994) 11958-11962

Schuman EM, Madison DV: Nitric oxide and synaptic function. Annu Rev Neurosci 17 (1994) 153-183

Seabrook GR, Easter A, Dawson GR, Bowery BJ: Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABA_A receptor benzodiazepine site ligands. Neuropharmacology 36 (1997) 823-830

Starke K: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998, 7. Auflage, 121-124

Sugaya K, Chou S, Xu SJ, McKinney M: Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin. Brain Res Mol Brain Res 58 (1998) 1-9

Sweat JD: Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem* 6 (1999) 399-416

Tao HW, Zhang LI, Engert F, Poo M: Emergence of input specificity of LTP during development of retinotectal connections in vivo. *Neuron* 31 (2001) 569-580

Thiemermann C: Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 29 (1997) 159-166

Tolias CM, McNeil CJ, Kazlauskaitė J, Hillhouse EW: Superoxide generation from constitutive nitric oxide synthase in astrocytes in vitro regulates extracellular nitric oxide availability. *Free Rad Biol Med* 26 (1999) 99-106

Trepel : Limbisches System. In „Neuroanatomie, Struktur und Funktion“, Trepel (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg, Oldenburg, 1999, 2. Auflage, 199-202

Trepel C, Racine RJ: GABAergic modulation of neocortical long-term potentiation in the freely moving rat. *Synapse* 35 (2000) 120-128

Tsumoto T: Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Prog Neurobiol* 39 (1992) 209-228

Wallace MN, Bisland SK: NADPH-diaphorase activity in activated astrocytes represents inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience* 59 (1994) 905-919

Wang JH, Kelly PT: Regulation of synaptic facilitation by postsynaptic Ca²⁺/CaM pathways in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 76 (1996) 276-286

Williams JH, Errington ML, Lynch MA, Bliss TVP. Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341 (1989) 739-742

Williams JH, Li YG, Errington ML, Murphy KPSJ, Bliss TVP: The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. *Neuron* 11 (1993) 877-884

Wu J, Wang Y, Rowan MJ, Anwyl R: Evidence of involvement of the neuronal isoform of nitric oxide synthase during induction of long-term potentiation and long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* 78 (1997) 393-398

Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH: Nitric oxide activation of poly (ADP-Ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263 (1994) 687-689

Zhao ML, Liu JS, Dickson DW, Lee SC: Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Res* 813 (1998) 402-405

Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD: Role of guanyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* 368 (1994) 635-639

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- 2.1. Das limbische System
- 2.2. Der Papez-Neuronenkreis
- 2.3. Exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission in der CA1-Region des Hippocampus
- 2.4. NMDA-Rezeptor abhängiger Mechanismus der LTP-Induktion im Hippocampus
- 2.5. Strukturformel des Neurotransmitters Glutamat
- 2.6. Die Rolle des retrograden Messengers NO bei der hippocampalen LTP
- 2.7. Sepsis vermittelt über Entzündungsmediatoren die Induktion der iNOS im Gehirn
- 2.8. Das Tiermodell für Sepsis-bedingtes neurokognitives Defizit
- 4.1. Strukturformel von L-NIL im Vergleich zu L-Arginin
- 4.2. Strukturformel von L-NAME im Vergleich zu L-Arginin
- 4.3. Feldpotentialableitung am Hippocampusschnitt
- 4.4. Aufzeichnung von fEPSPs in der CA1-Region des Hippocampus (schematisch)
- 4.5. Induktion von LTP in einem Hippocampus-Schnitt (schematisch)
- 4.6. Zeitverlauf des kognitiven Defizits bei Ratten nach Injektion von *Corynebacterium parvum*
- 5.1. Sepsis hat keinen Einfluss auf die hippocampale LTP
- 5.2. Perorale Zufuhr von L-NIL hat keine Auswirkung auf die hippocampale LTP
- 5.3. Die *in vitro*-Applikation von L-NIL führt nicht zu einer veränderten synaptischen Plastizität
- 5.4. L-NAME hemmt die Auslösung von LTP

Tabellenverzeichnis

- 5.1. Darstellung der Werte aus den Gruppen CP-Plazebo und NaCl-Plazebo
- 5.2. Darstellung der Werte aus den Gruppen CP-L-NIL und NaCl-L-NIL
- 5.3. Effekt von L-NIL-Applikation *in vitro*
- 5.4. Effekt von L-NAME-Applikation *in vitro*

10. Anhang

10.1. Materialien und Geräte

10.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungen

ACSF (artificial cerebrospinal fluid)

CaCl ₂	2 (mM)	Merck, Darmstadt
D-Glukose	10	Merck, Darmstadt
KCl	3	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	1	Merck, Darmstadt
NaCl	124	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	26	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	1,25	Merck, Darmstadt

Intrazellulärflüssigkeit

Creatin-Phosphat	20 (mM)	Merck, Darmstadt
D-Glukose	5	Merck, Darmstadt
EGTA	0,5	Sigma, Deisenhofen
HEPES	10	Sigma, Deisenhofen
KCl	5	Merck, Darmstadt
K-D-Glukonat	130	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	2	Merck, Darmstadt
QX-314	5	Merck, Darmstadt

Weitere Chemikalien

D-AP5		Sigma, Deisenhofen
L-NIL	1 mM	Alexis, Lausen, Schweiz
L-NAME	200 µM	Alexis, Lausen, Schweiz

Gase

O ₂ , Carbogen (O ₂ / CO ₂ -Gemisch)	Linde AG, Höllriegelskreuth
---	-----------------------------

10.1.2. Verbrauchsmittel

Hirnschitt-Präparation

Glas-Petrischalen (20 x 100 mm) Sarstedt, Nümbrecht

Histoacryl[®]-Kleber B/Braun, Tuttlingen

Klingen MARTOR, Solingen

Elektrophysiologie

Silberdraht Heraeus Instruments, München

Mess-Pipetten, GC 150TF-10 Clark, Elektromedical Instruments, Pangbourne

Borosilikat-Kapillaren mit Reading, England

Filament, \varnothing_a 1,5 mm, \varnothing_i 1,17 mm

10.1.3. Geräte

Hirnschnitt-Präparation

Vibratom FTB, Villingen

Elektrophysiologie

Ziehgerät, DZM-Universalpuller Zeitz-Instruments, München

Verstärker SEC 1L/10L NPI electronic, Tamm

AD-Wandler ITC 16 Instrutech, corp., New York, USA

Mikroskop Zeiss, Jena

Schwarz-Weiss-Monitor Panasonic, Japan

Ableitkammer Luigs & Neumann GmbH, Ratingen

EDV

Aufzeichnungs-Software EPC9 HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht

Auswerte-Software

IGOR Panel II WaveMetrics, N.Y., USA

10.2. Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. E. Kochs für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Anaesthesiologie durchführen zu können, sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Zieglgänsberger danke ich für die Bereitstellung der Laborumgebung mit der technischen und personellen Ausstattung sowie für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. G. Hafelmeier für Betreuung, Anregungen und Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit.

Herrn Rainer Haseneder für die Hilfe bei der graphischen Ausarbeitung.

Frau Christiane Rewerts für die technische Hilfe.

Den am Tiermodell 'Hole Board'-Test beteiligten Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München für die Bereitstellung der Tiere.

Meinen Eltern und meinem Freund Harald Lengnick für die aufmunternde Unterstützung über die Dauer der Doktorarbeit hinweg

Allen Mitarbeitern der Abteilung 'Klinische Neuropharmakologie' danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre. Für die wissenschaftlichen aber auch die nicht-wissenschaftlichen Gespräche möchte ich mich insbesondere bei Jörg, Wanda, Christian, Tobi, Shahnaz, Matthias, Gerhard und Klaus bedanken.

10.3. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Katrin Lampadius
Wohnort: Adolf-von-Groß-Str. 7
95445 Bayreuth
Tel: 0921-1503685
Geburtstag und -ort: 14.04.1979 in München
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch
Eltern: Rainer Lampadius, Studiendirektor
Gabriele Lampadius, Oberstudienrätin

Schule

1985-1989 Grundschule Bad Heilbrunn
1989-1998 Gabriel-von-Seidl-Gymnasium Bad Tölz

Studium

1999-2001 Vorklinisches Studium / LMU München
2001-2004 Klinisches Studium / TU München
2001-2005 Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation
an der TU München, Klinik für Anaesthesiologie,
Klinikum rechts der Isar

Berufliche Tätigkeit

Seit Juni 2005 Assistenzärztin in der Kinderklinik Bayreuth