



Technische Universität München

Klinikum rechts der Isar/Klinik für Anaesthesiologie

(Direktor: Prof. Dr. Eberhard Kochs)

Der Einfluss von Tranexamsäure auf die synaptische Transmission im vitalen Mäusehirnschnittpräparat

Hedwig Maria Irl

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

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Rainer Haseneder
2. Prof. Dr. Eberhard Kochs

Die Dissertation wurde am 14.04.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2016 angenommen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Tranexamic acid impairs γ -aminobutyric acid receptor type A-mediated transmission in the murine amygdala: a potential mechanism for drug-induced seizures?

Kratzer S., Irl H., Mattusch C., Bürge M., Kurz J., Kochs E., Eder M., Rammes G., Haseneder R.; *Anesthesiology* 2014, März; 120 (3): 639-49.

Tranexamic acid antagonizes γ -aminobutyric acid receptor type A-mediated synaptic transmission in the hippocampus: an in vitro patch-clamp study.

Irl H., Kratzer S., Mattusch C., Kochs E., Rammes G., Haseneder R.; Manuskript in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tranexamsäure	1
1.1.1	Klinische Anwendung	1
1.1.2	Neurologische Komplikationen im Zusammenhang mit TXA	3
1.1.3	Neuropharmakologische Wirkung von TXA	4
1.2	Synaptische Transmission.....	5
1.2.1	GABAerges System	6
1.2.2	Glycin-Rezeptoren	9
1.2.3	Glutamaterges System.....	10
1.3	Amygdala	13
1.3.1	Anatomie und Physiologie	13
1.3.2	Amygdala als Fokus für Krampfanfälle	15
1.4	Hippocampus	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Herstellung der in vitro Schnittpräparate.....	20
2.2	Patch-Clamp-Experimente	21
2.2.1	Versuchsaufbau	21
2.2.2	Biologische Grundlagen	24
2.2.3	Patch-Clamp-Technik.....	25
2.2.4	Etablierung einer Ganzzelleableitung	26
2.2.5	Elektrische und photolytische Stimulation.....	27
2.2.6	Postsynaptische Ströme.....	29
2.2.7	Steuerung und Messparameter der Einzelexperimente	31
2.2.8	Auswertung und Statistik	33
2.3	Voltage Sensitive Dye Imaging.....	33
2.3.1	Messprinzip	33
2.3.2	Versuchsaufbau	34

2.3.3	Auswertung und Statistik	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Messungen in der basolateralen Amygdala	37
3.1.1	Tranexamsäure steigert die Erregungsausbreitung im neuronalen Netzwerk ..	37
3.1.2	Tranexamsäure zeigt keinen Effekt auf die biophysikalischen Membraneigenschaften	39
3.1.3	Tranexamsäure verlängert die Deaktivierungszeitkonstante der Summenströme	40
3.1.4	Die glutamaterge synaptische Transmission wird von Tranexamsäure nicht beeinflusst	41
3.1.5	GABA _A -Rezeptor-vermittelte Ströme werden dosisabhängig von Tranexamsäure reduziert	44
3.1.6	Tranexamsäure hat keinen Effekt auf die Paired Pulse Ratio	46
3.2	Messungen im Hippocampus	46
3.2.1	Tranexamsäure erhöht die Erregungsausbreitung im Hippocampus	46
3.2.2	Tranexamsäure hat keinen Einfluss auf die biophysikalischen Membraneigenschaften	47
3.2.3	Tranexamsäure verlängert die Deaktivierungszeit der Summenantworten	48
3.2.4	Tranexamsäure hat keinen Einfluss auf die glutamaterge synaptische Transmission	49
3.2.5	Tranexamsäure inhibiert die Amplituden GABA _A -Rezeptor-vermittelter Ströme dosisabhängig	50
4	Diskussion	52
4.1	Pharmakologischer Wirkmechanismus	52
4.2	Zugrundeliegender postsynaptischer Mechanismus der verminderten GABAergen Transmission	55
4.3	Vereinbarkeit mit bisherigen Studien	56
4.4	Klinische Relevanz der Ergebnisse	59
5	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	63
	Anhang	1

Abkürzungsverzeichnis	1
Verwendete Substanzen	2
Danksagung	5
Lebenslauf	6

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1 Antifibrinolytischer Effekt von Tranexamsäure	2
Abb. 1.2.1 GABA _A -Rezeptor	8
Abb. 1.3.1 Amygdala	14
Abb. 1.4.1 Aufbau des Hippocampus	17
Abb. 2.1.1 Präparationsschritte	21
Abb. 2.2.1 Schematische Darstellung des Infrarotmikroskops	22
Abb. 2.2.2 Darstellung von Neuronen mittels Infrarotvideomikroskopie	23
Abb. 2.2.3 Schaltbild einer Ganzzelleableitung	26
Abb. 2.2.4 Elektrische und photolytische Stimulation	28
Abb. 2.2.5 Kommandospannung des hyperpolarisierenden Spannungssprungs (Testpuls -10 mV) und Antwort in der Ganzzelleableitung	32
Abb. 2.2.6 Antwortparameter	33
Abb. 2.3.1 Voltage Sensitive Dye Imaging Aufbau	35
Abb. 3.1.1 Tranexamsäure zeigt eine verstärkende Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit im Voltage Sensitive Dye Imaging	38
Abb. 3.1.2 Effekt von Tranexamsäure auf die VSDI Signale unter Gabe spezifischer Rezeptorantagonisten in der BLA	39
Abb. 3.1.3 Tranexamsäure zeigt keinen Einfluss auf die biophysikalischen Membraneigenschaften der Neurone der BLA in Ganzzelleableitung	40
Abb. 3.1.4 Tranexamsäure (1 mM) erhöht die Deaktivierungszeitkonstante der elektrisch stimulierten Summenströme ohne einen Einfluss auf die Amplituden dieser Antworten zu haben	41
Abb. 3.1.5 Tranexamsäure zeigt keine Wirkung auf die Amplituden der elektrisch evozierten AMPA-Rezeptor-vermittelten erregenden Ströme (EPSCs)	42
Abb. 3.1.6 Tranexamsäure (1 mM) beeinflusst weder die Deaktivierungszeitkonstante noch den Ladungstransfer der AMPA-EPSCs	42
Abb. 3.1.7 Tranexamsäure (1 mM) zeigt keine Wirkung auf elektrisch evozierte NMDA-EPSCs in der basolateralen Amygdala	43
Abb. 3.1.8 Tranexamsäure zeigt keinen Effekt auf die beiden Antwortparameter Deaktivierungszeitkonstante und Ladungstransfer der NMDA-EPSCs	43
Abb. 3.1.9 Tranexamsäure verringert in der BLA dosisabhängig die Amplitude der GABA _A -IPSCs und GABA-pCs in vergleichbarem Ausmaß	45
Abb. 3.1.10 Tranexamsäure (1 mM) verringert den relativen Ladungstransfer ohne Wirkung auf die Deaktivierungszeitkonstante	45
Abb. 3.1.11 Tranexamsäure (1 mM) hat keinen Einfluss auf die Paired Pulse Ratio (PPR) von GABA _A -IPSCs	46
Abb. 3.2.1 Tranexamsäure (1 und 3 mM) steigert in VSDI-Experimenten die neuronale Erregungsausbreitung im Hippocampus	47
Abb. 3.2.2 Tranexamsäure (1 mM) hat keinen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der hippocampalen CA1-Neurone	48

Abb. 3.2.3 Tranexamsäure vergrößert die Deaktivierungszeit der Summenantworten (PSCs) ohne die Amplituden oder den Ladungstransfer zu beeinflussen	49
Abb. 3.2.4 Tranexamsäure hat keinen Einfluss auf die Amplituden der glutamaterg-vermittelten Ströme	50
Abb. 3.2.5 Tranexamsäure verringert dosisabhängig die Amplitude der GABA _A -IPSCs	51
Abb. 4.3.1 Verteilung der beiden GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten α 1 und α 2 in verschiedenen Hirnregionen der Maus	57

1 Einleitung

1.1 Tranexamsäure

1.1.1 Klinische Anwendung

Tranexamsäure (trans-4-(Aminomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure; TXA; Handelsname in Deutschland: Cyclokapron[®]) ist ein synthetisches Lysinderivat und wird klinisch als Fibrinolysehemmer eingesetzt.

Verletzungen in Blutgefäßen werden vom Körper mithilfe der sogenannten Hämostase abgedichtet. Die primäre Hämostase, die Blutstillung, ist charakterisiert durch die Aggregation von Thrombozyten. Um den so entstandenen Thrombus zu stabilisieren, bildet sich in der sekundären Hämostase, der Blutgerinnung, ein Netz aus Fibrinpolymeren. Im Rahmen der weiteren Wundheilung wird dieses Netzwerk wieder aufgelöst (Fibrinolyse). Die Serinprotease Plasmin katalysiert dabei die Spaltung der Fibrinpolymere in lösliche Abbauprodukte. Dazu muss Plasmin über einen endothelialen Gewebspasminogenaktivator (t-PA, tissue plasminogen activator) oder einen renalen Plasminogenaktivator aus seinem Vorläuferenzym Plasminogen aktiviert werden. Dabei fungiert Fibrin nicht nur als Abbauprodukt, sondern ist auch an der Aktivierung des Enzyms mitbeteiligt (siehe Abb. 1.1.1) (Law, Caradoc-Davies et al. 2012). TXA verhindert als Lysinanalogon die Bindung von Plasminogen an Fibrin, die über eine Lysinbindungsstelle vermittelt wird (Dunn und Goa 1999; Shakur, Roberts et al. 2010). Der daraus resultierende antifibrinolytische Effekt führt zur Reduktion der Gefahr von Nachblutungen, da die entstandenen Thromben stabil bleiben (Yeh, Lau et al. 2003).

Große Blutverluste stellen eine extreme Herausforderung für das Koagulationssystem dar. Bei polytraumatisierten Patienten oder im Rahmen großer chirurgischer Eingriffe reagiert der Körper neben der Blutgerinnung auch mit einer Aktivierung des Fibrinolysesystems, welche pathologische Ausmaße annehmen kann (Hyperfibrinolyse) (Roberts, Shakur et al. 2012). Dies kann zusätzlich zum eigentlichen Blutverlust zu einer verstärkten Blutungsneigung führen.

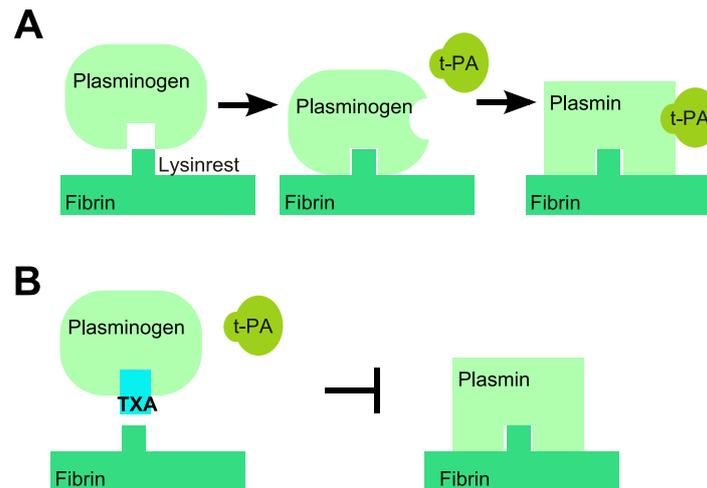


Abb. 1.1.1 Antifibrinolytischer Effekt von Tranexamsäure

Law et al. legen in einer Arbeit die Bedeutung von Lysininteraktionen für den Konformationswechsel nahe (Law, Caradoc-Davies et al. 2012), was einer Inaktivierbarkeit von Plasminogen unter TXA entspricht. **A** Unter physiologischen Bedingungen wird Plasminogen durch die Bindung an Fibrin über eine Lysinbindungsstelle in eine geöffnete Konformation überführt. Erst jetzt kann der Gewebepasminogenaktivator (t-PA) binden und Plasminogen zu Plasmin aktivieren. Plasmin kann daraufhin Fibrinpolymere abbauen. **B** Tranexamsäure blockiert als Lysinanalogon diese Fibrinbindungsstelle und verhindert somit die darauffolgenden notwendigen Schritte für die Fibrinolyse. (Zusammenfassend aus Law, Caradoc-Davies et al. 2012.)

Massive Blutverluste und die daraus resultierende Notwendigkeit von allogenen Bluttransfusionen tragen, beispielsweise in der Kardiochirurgie, zu erhöhter postoperativer Morbidität, Mortalität, verlängertem Krankenhausaufenthalt und gesteigerten Kosten bei (Murphy, Reeves et al. 2007; Pattakos, Koch et al. 2012; Murkin, Falter et al. 2010). Bluttransfusionen bergen zusätzlich zu den bekannten Risiken wie Infektionen und Transfusionsreaktionen weitere potentielle Gefahren, die aktuell noch nicht genau abschätzbar sind, wie beispielsweise die Immunmodulation oder die Übertragung der Creutzfeldt-Jakoberkrankung (Goodnough 2013). Auf Grund dieses Nebenwirkungsprofils und gesundheitsökonomischer Probleme wurden Strategien zur Verminderung der perioperativen Fremdblutgabe entwickelt. Dazu zählen neben präoperativer autologer Spende, normovolämischer Hämodilution und „Cell Salvage“-Verfahren auch der Einsatz von Antifibrinolytika (Laupacis und Fergusson 1997). Die Anwendung von TXA ist bei Vorliegen einer lokalen oder generalisierten Hyperfibrinolyse indiziert (Packungsbeilage TXA (Cyclokapron®)). In einer Übersichtsarbeit, die über zweihundert randomisierte und placebokontrollierte Studien zur Antifibrinolytikagabe bei geplanten Operationen an Erwachsenen umfasst (darunter 65 Studien mit über 4800 Patienten zur TXA-Gabe), konnte gezeigt werden, dass TXA den perioperativen Blutverlust reduziert und auch die Notwendigkeit der Fremdblutgabe verringert (Henry, Carless et al. 2011). Die positiven Effekte ließen sich für unterschiedliche operative Eingriffe zeigen (u.a. orthopädisch, vaskulär und kardiochirurgisch) (Henry, Carless et al. 2011). Der Einsatz des Antifibrinolytikums beschränkt sich jedoch nicht auf Operationen. Vielmehr wurde auch die

Wirksamkeit für die Behandlung von Hypermenorrhoe nachgewiesen und erste Studien zur Reduktion von postpartalen Blutungen sind vielversprechend (Sentilhes, Lasocki et al. 2015). Für die Gabe bei oberen gastrointestinalen Blutungen gibt es in Metaanalysen zwar bereits Hinweise auf eine verringerte Morbidität unter TXA, bisher wurde aber noch keine klare Empfehlung ausgesprochen (Manno, Ker et al. 2014).

Da unkontrollierbare Blutungen eine häufige Todesursache von Traumapatienten darstellen, findet TXA auch hier Anwendung (Roberts, Shakur et al. 2012). Eine internationale placebokontrollierte Multicenter-Studie an 20.000 Patienten konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtmortalität sowie der Mortalität durch Exsanguination in der TXA-Gruppe zeigen. Die Autoren schlugen damals eine Aufnahme von TXA in die Liste der unentbehrlichen Medikamente der WHO (EML: essential medicines list) vor (Shakur, Roberts et al. 2010), in der die Substanz heute aufgeführt ist. Neben Tranexamsäure können ϵ -Aminocaprinsäure, ein weiteres Fibrinanalogen, sowie Aprotinin, eine Serinprotease, zur Fibrinolysehemmung eingesetzt werden (Henry, Carless et al. 2011). Aprotinin wurde jedoch aufgrund erhöhter Nebenwirkungen - u.a. auch einer Erhöhung der Mortalität (Fergusson, Hebert et al. 2008) - vom Markt genommen, allerdings 2013 für den Einsatz bei aortokoronaren Bypassoperationen unter Auflagen wieder zugelassen. Obwohl sich durch die Hemmung der Fibrinolyse das Entstehen von thrombotischen Ereignissen als potentielle Nebenwirkung vermuten ließe, zeigte sich in der Übersichtsarbeit von Henry et al. kein erhöhtes Risiko für tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien, Schlaganfälle oder Myokardinfarkte (Henry, Carless et al. 2011).

1.1.2 Neurologische Komplikationen im Zusammenhang mit TXA

In den siebziger Jahren wurden Antifibrinolytika therapeutisch bei Subarachnoidalblutungen eingesetzt, mit dem Ziel, die mit hoher Mortalität assoziierte Komplikation einer zweiten Blutung (Reblutung) bis zur definitiven Operation zu verhindern (Adams 1982). Inzwischen wird in den aktuellen deutschen AWMF-Leitlinien vom Gebrauch antifibrinolytischer Medikamente zur Behandlung einer Subarachnoidalblutung abgeraten. Schon früh vermutete man neurologische Komplikationen unter Anwendung von TXA (Yamaura, Nakamura et al. 1980). In Tierexperimenten konnten damals erste Hinweise auf die epileptogene Wirkung von TXA gefunden werden. So ließen sich durch topische Applikation auf den Kortex von Katzen generalisierte Krampfanfälle auslösen (Pellegrini, Giaretta et al. 1982). Auch die intravenöse (20-55 mg/kg) oder intracisternale (1-5 mg/kg) Gabe des Antifibrinolytikums zeigte bei Katzen neben einer drastischen Erhöhung des intrakraniellen Drucks, der zerebralen Durchblutung und des Blutdrucks eine krampfauslösende Wirkung im EEG

(Yamaura, Nakamura et al. 1980). Einige klinische Fallberichte zeigten, dass diese Beobachtungen auch Bedeutung für den Menschen haben. Bei akzidentieller intrathekaler Gabe von TXA, meist im Rahmen einer Spinalanästhesie, kam es zu Symptomen, die von Schmerzen und Myoklonien bis zu einem Status epilepticus reichten. Die Patienten waren unterschiedlichen Alters (18-68 Jahre), Geschlechts und Gesundheitszustandes. Appliziert wurden dabei zwischen 50 mg und 500 mg TXA. Die in diesem Zusammenhang beschriebenen Todesfälle gingen auf nicht beherrschbares Kammerflimmern zurück. Die überlebenden Patienten zeigten im weiteren Verlauf neurologisch entweder eine komplette Remission oder nur leichte Defizite (de Leede-van der Maarl, Hilkens et al. 1999; Mohseni, Jafari et al. 2009; Garcha, Mohan et al. 2007; Yeh, Lau et al. 2003; Butala, Shah et al. 2012). Das Kammerflimmern und eine in einem Fall aufgetretene deutliche Hypertension sind möglicherweise Folge einer massiven sympathotonen Entladung durch TXA (Yeh, Lau et al. 2003).

Diese genannten Komplikationen traten bei nicht sachgerechter Verabreichung von TXA auf. In einer retrospektiven Studie konnten Murkin et al. jedoch zeigen, dass auch die lege artis durchgeführte intravenöse Applikation mit einer erhöhten Rate an postoperativen Krampfanfällen assoziiert ist. In einem Kollektiv von Herzchirurgiepatienten stiegen die Krampfanfallraten nach Einführung von hochdosierter Tranexamsäuregabe (61 – 259 mg/kg) deutlich auf beinahe das Dreifache des Ausgangswertes an. Die Krampfanfälle traten im Mittel etwa fünf Stunden postoperativ auf. Zeitlich korrelierte ihr Auftreten in einigen Fällen mit dem Abdosieren des Hypnotikums Propofol. Klinisch manifestierten sich die Anfälle vor allem als generalisierte Konvulsionen, wobei keiner der Patienten eine relevante neue zerebrale ischämische Läsion zeigte. Die in dieser Studie beschriebenen Patienten erholten sich komplett und ohne weitere Krampfanfälle (Murkin, Falter et al. 2010). Andere Autoren konnten an einem Kollektiv von Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen mit Herzlungenbypassen zeigen, dass postoperative Krampfanfälle mit signifikant längerer künstlicher Beatmung, häufigerem neu aufgetretenem Nierenversagen und längerem Aufenthalt in der Intensivstation einhergingen (Kalavrouziotis, Voisine et al. 2012).

1.1.3 Neuropharmakologische Wirkung von TXA

Die direkte neuronale Wirkung von TXA wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Eine ältere Arbeit an kultivierten, transfizierten Nierenzellen beschreibt einen TXA-vermittelten, kompetitiven dosisabhängigen Antagonismus an GABA_A-Rezeptoren mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von ca. 7 nM. Eine Wirkung von TXA auf NMDA-Rezeptoren konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden (Furtmüller, Schlag et al. 2002).

Eine aktuellere Studie untersuchte die Wirkung von TXA an kultivierten Neuronen sowie an vitalen Schnittpräparaten. Dort wurde eine TXA-induzierte dosisabhängige Hemmung postsynaptischer Glycin- ($IC_{50} = 0,09-1,4 \text{ mM}$) und $GABA_A$ -Rezeptor-vermittelter Ströme beschrieben ($IC_{50} = 0,9-1,5 \text{ mM}$), die in der Folge zu erhöhter exzitatorischer synaptischer Transmission führt (Lecker, Wang et al. 2012).

1.2 Synaptische Transmission

Synapsen sind enge Verbindungen zwischen zwei Nervenzellen, über die entweder chemische oder elektrische Signale weitergegeben werden (Rozental, Giaume et al. 2000). Die elektrische Synapse, die sogenannte „gap junction“ ist ein Kanal, der zwei Zellen leitend miteinander verbindet und damit den direkten Austausch von Ionen ermöglicht. Somit kann die elektrische Aktivität von Zellen synchronisiert werden. Möglicherweise nutzen aber auch „second messenger“ diesen Kanal. Jeweils sechs Untereinheiten formen an einer Zelle ein Connexon, das gepaart mit dem einer anderen Zelle eine gap junction bildet. Elektrische Synapsen scheinen für Neurone ihre Bedeutung vor allem in der Gehirnentwicklung zu haben. Im adulten Gehirn dagegen finden sie sich bevorzugt an Gliazellen. Welche Aufgabe gliale gap junctions haben ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Es gibt jedoch Hinweise auf ihre Beteiligung an bestimmten Signalen - sogenannten Kalzium-Wellen - und neuroprotektiven Vorgängen (Rozental, Giaume et al. 2000).

Den Hauptanteil der synaptischen Transmission vermitteln chemische Synapsen. Ein ankommendes elektrisches Signal wird hier zunächst in ein chemisches Signal (Neurotransmitter) umgewandelt, um dann am nächsten Neuron wieder ein elektrisches Signal auszulösen. Die interneuronale Synapse besteht aus einer präsynaptischen Membran, einem synaptischen Spalt und der postsynaptischen Membran. Die Neurotransmitter sind präsynaptisch in Vesikeln gespeichert und werden, auf ein eintreffendes Aktionspotential und dem daraus folgenden Kalziumeinstrom hin, über Exozytose freigesetzt. Die Transmittermoleküle diffundieren nun über den Spalt und aktivieren die Rezeptoren der Postsynapse. Je nach Transmitter und Rezeptor lösen sie den Einstrom positiver oder negativer Ladung aus beziehungsweise setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Bewegung. Folglich entsteht an der Postsynapse entweder eine Verschiebung hin zu positiveren (exzitatorisches postsynaptisches Potential, EPSP) oder zu negativeren (inhibitorisches postsynaptisches Potential, IPSP) Membranpotentialen. Diese Form der Signalweiterleitung erfolgt im Gegensatz zur elektrischen Synapse unidirektional und mit einer gewissen Zeitverzögerung (Latenz ca. 0,5 ms).

1.2.1 GABAerges System

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Holtkamp und Meierkord 2007). Das biogene Amin wird über eine Decarboxylierung aus dem erregenden Transmitter Glutamat synthetisiert. Katalysiert wird dieser Vorgang durch die Glutamatdecarboxylase. Um die GABA-Moleküle nach der chemischen Signalübertragung wieder aus dem synaptischen Spalt zu entfernen, besitzen Gliazellen und Neurone Transporter (u.a. GABA Transporter GAT1-3), die den Transmitter zurück in die Zellen aufnehmen (Gadea und Lopez-Colome 2001). Die zerebrale GABA-Konzentration wird durch das Enzym GABA-Transaminase kontrolliert, welches den Neurotransmitter in Succinat-Semialdehyd umwandelt (Holtkamp und Meierkord 2007).

Die inhibitorische Transmission spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krampfaktivität. In übererregbaren neuronalen Schaltkreisen herrscht unabhängig von der primären Ursache letztlich ein Ungleichgewicht von erregender und hemmender Aktivität. Das GABAerge System kontrolliert die neuronale Aktivität und kann epileptische Entladungen verhindern (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Dementsprechend besitzen Agenzien, die die GABAerge Transmission beeinträchtigen eine deutliche prokonvulsive Potenz. Viele der gebräuchlichen antiepileptischen Medikamente beeinflussen die inhibitorische Transmission (Meldrum und Rogawski 2007). Einige dieser Medikamente wirken an den Rezeptoren direkt (z.B. Benzodiazepine, Barbiturate), während andere die Konzentration des Transmitters im synaptischen Spalt erhöhen, indem sie in den GABA-Metabolismus eingreifen (Gabapentin, Valproat, Vigabatrin) oder die Wiederaufnahme hemmen (Tiagabine) (Holtkamp und Meierkord 2007).

Die GABAerge Transmission scheint jedoch nicht ausschließlich inhibitorisch zu sein. Es gibt einige Hinweise darauf, dass GABA sowohl im normalen adulten Gehirn (Bernard 2005) als auch bei Patienten mit Temporallappenepilepsie und möglicherweise während eines Status epilepticus (Holtkamp und Meierkord 2007) exzitatorische Potentiale erzeugen kann.

1.2.1.1 $GABA_A$ -Rezeptoren

Der $GABA_A$ -Rezeptor, ein ligandengesteuerter Ionenkanal, gehört zur Gruppe der Cys-Loop-Rezeptoren (Tsetlin, Kuzmin et al. 2011). Er vermittelt den Hauptanteil der schnellen inhibitorischen, synaptischen Transmission im ZNS (Korpi, Grunder et al. 2002). Die Cys-Loop Rezeptorfamilie ist durch eine pentamere Struktur und eine Schleife zwischen zwei Cysteinresten (Cys-Loop) der aminoterminalen Extrazellulärdomäne gekennzeichnet (Tsetlin, Kuzmin et al. 2011). Die fünf Untereinheiten liegen in die Zellmembran eingebettet und formen in ihrem Inneren eine zentrale Pore, durch die im geöffneten Zustand Cl^- und

HCO_3^- , ihrem Gradienten folgend, fließen (Tsetlin, Kuzmin et al. 2011; Holtkamp und Meierkord 2007).

Jede der Untereinheiten setzt sich aus folgenden Abschnitten zusammen: Die aminoternale Domäne für die Ligandenbindung liegt extrazellulär und beinhaltet die namensgebende Schleife. Die Transmembrandomäne besteht aus vier Transmembranfragmenten (M1-4) und die Intrazellulärdomäne, welche Interaktionen mit intrazellulären Proteinen ermöglicht, wird durch eine lange zytoplasmatische Schleife zwischen M3 und M4 gebildet. Das C-terminale Ende liegt extrazellulär (Tsetlin, Kuzmin et al. 2011). Bisher wurden folgende Untereinheiten beschrieben: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3 (Smart und Paoletti 2012): dies ermöglicht eine riesige Diversität an Rezeptorsubtypen mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften (Sieghart, Ramerstorfer et al. 2012). Der Hauptanteil der GABA_A -Rezeptoren setzt sich allerdings aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit zusammen (Sieghart, Ramerstorfer et al. 2012). Die dabei häufigste vorkommende Kombination bei Säugetieren ist ein Pentamer vom Typ $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (McKernan und Whiting 1996).

Ein Pentamer aus ρ -Untereinheiten (Qian und Ripps 2009) bildet einen Bicucullin- und Benzodiazepin-insensitiven Rezeptor, der hauptsächlich in der Retina lokalisiert ist. Diese spezielle Form des GABA_A -Rezeptors wurde lange Zeit auch GABA_C -Rezeptor bezeichnet (Barnard, Skolnick et al. 1998).

Die Permeabilität des Ionenkanals wird über Konformationsänderungen der Proteinstruktur gesteuert, die durch das Binden von Agonisten (endogen z.B. GABA) induziert werden (Campagna-Slater und Weaver 2007). Aus dem Einstrom negativ geladener Ionen resultiert eine Hyperpolarisation der Nervenzelle, die die Generierung von neuen Aktionspotentialen erschwert (inhibitorisches postsynaptisches Potential, IPSP). Die zwei Bindungsstellen für GABA liegen zwischen der α - und β -Untereinheit (Campagna-Slater und Weaver 2007). Eine Reduktion oder Blockade der inhibitorischen Transmission führt zu epileptischer Entladung (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Entsprechend zeigt der in dieser Arbeit verwendete kompetitive GABA_A -Rezeptorantagonist Bicucullin (Uemura und Kimura 1988), wie auch Picrotoxin, bei wiederholter Applikation in die Amygdala einen Kindling-ähnlichen (Erklärung siehe Kapitel 1.3.2) Effekt (Cain 1987). Wie bereits erwähnt, stellt der GABA_A -Rezeptor eine wichtige Zielstruktur antikonvulsiver Medikamente dar. Barbiturate verlängern die Dauer des Offenheitszustandes, während Benzodiazepine die Frequenz der Kanalöffnungen erhöhen (Holtkamp und Meierkord 2007).

Benzodiazepine vermitteln über eine eigene Bindungsstelle am Übergang der α - zur γ -Untereinheit sogenannte allosterische Effekte, ohne den Rezeptor direkt zu aktivieren

(Sieghart, Ramerstorfer et al. 2012). Im Gegensatz zu diesem allosterischen Effekt der Benzodiazepine können inhalative und intravenöse Anästhetika, Steroide und Barbiturate in niedrigen Konzentrationen GABA-vermittelte Ströme verstärken, sowie in höheren Konzentrationen direkt selbst Ströme in Abwesenheit von GABA erzeugen, indem sie sich in Bindungstaschen innerhalb der Transmembranabschnitten anlagern (Sieghart, Ramerstorfer et al. 2012).

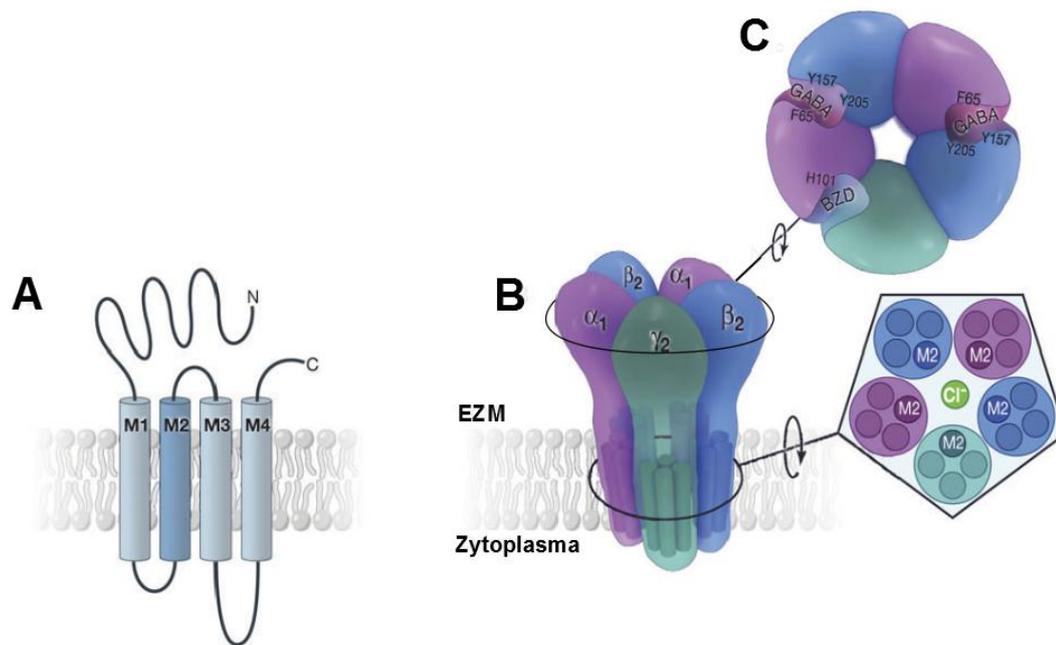


Abb. 1.2.1 GABA_A-Rezeptor

A Schematische Darstellung einer GABA_A-Untereinheit mit vier Transmembranomänen und dem extrazellulären Amino- (N) und Carboxy- (C) Ende. **B** Charakteristische pentamere Struktur des GABA_A-Rezeptors zusammengesetzt aus zwei α -, zwei β - und einer γ - Untereinheit. Der Querschnitt des transmembranen Abschnitts zeigt den Chloridkanal, der von den helicalen M2 Bereichen der Untereinheiten gebildet wird. **C** Aufsicht auf den Rezeptor mit beiden GABA-Bindungsstellen, zwischen der α - und der β - Untereinheit und der Benzodiazepin-Bindungsstelle zwischen der α - und der γ - Untereinheit. (Abbildung modifiziert nach Meldrum und Rogawski 2007.)

1.2.1.2 GABA_B-Rezeptoren

Der GABA_B-Rezeptor gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bei Bindung eines Liganden kommt es über eine Konformationsänderung im Protein zur Weiterleitung des Signals über sekundäre Botenstoffe (second messenger) ins Zellinnere. Wie andere metabotrope Rezeptoren ist dieser aus sieben Transmembranomänen aufgebaut. Das obligat heterodimere Protein ist aus den beiden Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2} aufgebaut.

GABA_B-Rezeptoren haben ihre Bedeutung sowohl in der präsynaptischen, als auch der langsamen postsynaptischen Hemmung (IPSP) und beeinflussen dadurch die Erregbarkeit. Der im ZNS weit verbreitete metabotrope Rezeptor beeinflusst über Signalkaskaden die

Leitfähigkeiten von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen. Postsynaptische GABA_B -Rezeptoren rufen durch die Öffnung von K^+ -Kanälen eine Hyperpolarisation hervor und können vermutlich so die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen eines Aktionspotentials herabsetzen. Eine Aktivierung der präsynaptischen Rezeptoren führt über Kalziumkanalblockade und Reduktion der cAMP-Konzentration zur verminderten Vesikelfreisetzung des jeweils gespeicherten Neurotransmitters (GABA oder Glutamat). (Zusammenfassend aus Benarroch 2012.)

Der metabotrope GABA-Rezeptor scheint ebenfalls an der Pathophysiologie von Krampfanfällen beteiligt zu sein. Seine Rolle ist jedoch komplex und noch nicht gänzlich verstanden. Einerseits zeigen Mäuse, die keine funktionierenden GABA_B -Rezeptoren bilden können, spontane Krampfanfälle, andererseits scheint eine Aktivierung dieser Rezeptoren im thalamo-kortikalen Netzwerk eine Bedeutung für die Entstehung von Absence-Epilepsien zu haben (Holtkamp und Meierkord 2007).

1.2.2 Glycin-Rezeptoren

Glycin ist zusätzlich zu seiner Funktion als Coagonist des NMDA-Rezeptors neben GABA ein weiterer inhibitorischer Neurotransmitter. Glycinerge Synapsen vermitteln schnelle inhibitorische Transmission vor allem im Rückenmark und Hirnstamm und kontrollieren eine Vielzahl von motorischen und sensorischen Funktionen. Glycinrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle und gehören, wie auch die GABA_A -Rezeptoren, zur Familie der Cys-Loop-Rezeptoren. Sie setzen sich aus den Untereinheiten $\alpha 1-4$ und β zu Pentameren aus zwei α - und drei β -Untereinheiten zusammen, die über das Protein Gephyrin in der Membran verankert werden. Das Binden von Glycin bewirkt einen Cl^- Einstrom durch den Kanal und hyperpolarisiert so die postsynaptische Membran. Im Gegensatz zu diesen inhibitorischen Strömen in adulten Neuronen depolarisiert Glycin embryonale Motoneurone aufgrund einer in diesem Entwicklungsstadium erhöhten intrazellulären Chloridkonzentration und spielt damit wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Synaptogenese. (Zusammenfassend aus Dutertre, Becker et al. 2012.)

Im Hippocampus sind hochaffine extrasynaptische Glycinrezeptoren möglicherweise an der Pathologie der Temporallappenepilepsie beteiligt (Yevenes und Zeilhofer 2011). Strychnin ist ein spezifischer Glycin-Rezeptorantagonist (Dutertre, Becker et al. 2012) und besitzt krampfauslösende Eigenschaften (Makarovsky, Markel et al. 2008). Im Gegensatz zur GABA, welche im gesamten ZNS schnelle hemmende Transmission vermittelt, ist Glycin als inhibitorischer Transmitter begrenzter verbreitet. Zwar sind Glycinrezeptoren deshalb im Vergleich zu GABA_A -Rezeptoren kein häufig gewähltes pharmakologisches Ziel von Medikamenten für ZNS-Erkrankungen (z.B. Schlafstörungen und Epilepsie), dennoch binden

neben einigen endogenen Molekülen auch Medikamente (z.B. volatile Anästhetika) an allosterische Bindungsstellen und interagieren mit dem Rezeptor (Yevenes und Zeilhofer 2011).

1.2.3 Glutamaterges System

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im ZNS (Paoletti, Bellone et al. 2013).

Synthetisiert wird dieser in den Nervenendigungen über die Glutamatdehydrogenase aus den Vorstufen α -Ketoglutarat und Ammoniumionen. Wie bei allen Neurotransmittern, wird Glutamat zur Beendigung der synaptischen Übertragung mittels Transporter (hier EAA-Transporter: excitatory amino acids transporter) aus dem Spalt entfernt. Dies hat bei Glutamat zusätzlich einen neuroprotektiven Effekt, da hohe Glutamatkonzentrationen zur sogenannten Exzitotoxizität führen. Den Hauptanteil übernehmen dabei die glialen EAAT1-2 Transporter (Beart und O'Shea 2007).

Primär lassen sich ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren unterscheiden. Die kationenpermeablen Kanäle werden in drei Gruppen unterteilt, benannt nach ihren pharmakologischen Agonisten: AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure), NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) und Kainat (Salz der Kainsäure) (Contractor und Heinemann 2002; Mayer und Armstrong 2004). Eine in der Elektrophysiologie übliche weitere Klassifikation ist die Einteilung in NMDA- und nonNMDA-Rezeptoren, welche AMPA- und Kainat-Rezeptoren umfassen.

Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren sind im Gehirn an den postsynaptischen Membranen der meisten exzitatorischen Synapsen weit verbreitet. Die Untergruppen der glutamatergen Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Kinetik, ihrer Kalziumpermeabilität und einem Magnesiumblock. Zusammen formen sie den durch Glutamat hervorgerufenen Ionenstrom und bilden ein System, das sowohl eine sehr schnelle Informationsweiterleitung, als auch eine langfristige Erregungskontrolle als Grundlage für die synaptische Plastizität ermöglicht (Kumar und Mayer 2013).

Die Sekundärstruktur der ionotropen Glutamatrezeptoren unterscheidet sich deutlich von anderen ligandengesteuerten Kanälen. Einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne folgt zunächst eine einzelne Transmembrandomäne (M1), darauf eine, die Membran nur zum Teil durchdringende Schleife (M2), die den Ionenkanal bildet. Die Transmembrandomänen M3 und M4 verbindet eine große extrazelluläre Schleife, die zusammen mit dem N-terminalen Abschnitt die Ligandenbindungsstelle formt. Das auf M4 folgende C-terminale Ende liegt intrazellulär (Contractor, Mülle et al. 2011).

Bezüglich der Fragestellung dieser Dissertation erscheint dieses exzitatorische Transmittersystem interessant, da es unabhängig von der primären Ursache einer Epilepsie bzw. Krampfnéigung eine zentrale Rolle in der Initiation sowie Ausbreitung der Krämpfe zu spielen scheint. Während der Transmitter selbst oder andere Agonisten Konvulsionen erzeugen können, zeigen Antagonisten an den ionotropen Rezeptoren krampfösende Eigenschaften. Veränderungen an den ionotropen und metabotropen Rezeptoren, aber auch an den Glutamtransportern haben Einfluss auf die Krampfschwelle. So fand sich beispielsweise bei Patienten mit Temporallappenepilepsie eine funktionelle Steigerung der NMDA-Rezeptoren oder bei Patienten mit therapieresistenten Krampfleiden Veränderungen einer AMPA-Rezeptoruntereinheit (Chapman 2000). Auch Kainatrezeptoren lassen sich im Tiermodell klar in Verbindung mit Krampfanfällen bringen (Contractor, Mülle et al. 2011).

1.2.3.1 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren sind an Prozessen beteiligt, die neuronale Aktivität in strukturelle und funktionelle Veränderungen der Synapsen (Plastizität) umwandeln. So wichtig ihre physiologische Funktion z.B für das Lernen und das Gedächtnis ist, so folgenschwer können Pathologien dieser Rezeptoren sein. NMDA-Rezeptor-Dysfunktionen sind bei unterschiedlichsten neurologischen und psychiatrischen Krankheiten, inklusive Schlaganfall, neurodegenerativen Erkrankungen und Schizophrenie zu finden.

Die hetero-tetrameren Rezeptoren setzen sich aus vier von sieben bisher bekannten Untereinheiten zusammen: GluN1, GluN2A-D und GluN3A-B, wobei zwei GluN1 essentiell sind. Die Heterogenität wird durch alternatives Splicing der Untereinheiten GluN1 und GluN3A gesteigert. Durch Kombination der zwei GluN1 Untereinheiten mit GluN2 oder GluN3 Einheiten entstehen di-heteromere oder tri-heteromere Rezeptoren. Die Zusammensetzung ändert sich im Laufe der Gehirnentwicklung, was auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen Untereinheiten in der Reifung des ZNS schließen lässt. Im adulten Gehirn, vor allem in höheren Strukturen wie dem Hippocampus sind die Isoformen GluN2A und B vorherrschend. Der Ligandenbindungsabschnitt für Glutamat liegt in GluN2, während er für Glycin oder D-Serine von GluN1 und GluN3 gebildet wird. (Zusammenfassend aus Paoletti, Bellone et al. 2013.) Die Aktivierung eines NMDA-Rezeptors setzt das Binden des Liganden Glutamat, des Co-Agonisten Glycin sowie eine Depolarisation voraus. Diese sogenannte Vordepolarisation ist notwendig, um den spannungsabhängigen Magnesiumblock der NMDA-Rezeptoren zu lösen. Erst dann können Kationen inklusive Kalziumionen fließen (Molnar 2011). Kalziumionen sind wichtige „second messenger“ und aktivieren im Zellinneren unterschiedliche Signalkaskaden, die zu einer Veränderung der synaptischen Struktur und Funktion führen können (Paoletti, Bellone et al. 2013). Andererseits spielen NMDA-Rezeptoren eine herausragende Rolle für die u.a. durch hohe

Kalziumspiegel vermittelte Exzitotoxizität, einem Zelluntergang aufgrund neuronaler Übererregung bedingt durch erhöhte synaptische Glutamatkonzentrationen. Bei einer Vielzahl an Krankheiten, darunter auch Krampfanfälle werden exzitotoxische Komponenten vermutet (Lynch und Guttman 2002).

1.2.3.2 *NonNMDA-Rezeptoren*

Der größte Teil der schnellen exzitatorischen Transmission wird über AMPA-Rezeptoren vermittelt. AMPA-Rezeptoren werden aus vier homomeren oder heteromeren Untereinheiten der Typen GluR1-4 gebildet. Von diesen spielt vor allem der GluR2 Subtyp eine Rolle für die kinetischen Eigenschaften des Rezeptors und die Kalziumpermeabilität (Liu und Cull-Candy 2002). Der Hauptanteil der AMPA-Rezeptoren enthält postnatal den GluR2 Typ und ist damit impermeabel für Kalzium (Molnar 2011).

Auch AMPA-Rezeptoren sind an Vorgängen der synaptischen Plastizität beteiligt. Der Anteil an AMPA-Rezeptor-vermittelten Strömen am EPSC steigt deutlich nach der Induktion einer Langzeitpotenzierung (LTP) während er nach einer Langzeitdepression (LTD) vermindert wird. Zum einen erhöht eine Phosphorylierung der membranständigen AMPA-Rezeptoren über NMDA-Rezeptor-induzierte Signalkaskaden deren Leitfähigkeit, andererseits gibt es Hinweise darauf, dass es im Falle einer LTP zum Einbau intrazellulär gespeicherter, GluR1 enthaltener AMPA-Rezeptoren in die Membran bzw. zu deren Abbau bei LTD kommt (Contractor und Heinemann 2002; Malinow und Malenka 2002).

Kainatrezeptoren lassen sich im gesamten ZNS finden, sie sind jedoch – anders als NMDA- und AMPA-Rezeptoren nicht hauptsächlich an der exzitatorischen Postsynapse lokalisiert. Kainatrezeptoren fungieren als Modulatoren der synaptischen Transmission und der neuronalen Erregbarkeit, indem sie nicht nur die postsynaptische Depolarisation vermitteln sondern auch präsynaptisch einen Einfluss auf die Freisetzung erregender und inhibitorischer Neurotransmitter haben. Damit können sie in das Gleichgewicht von Erregung und Hemmung eingreifen. Ihre tetramere Struktur wird von vier der fünf bekannten Untereinheiten GluK1-5 gebildet (Contractor, Mülle et al. 2011).

Der Begriff nonNMDA-Rezeptor umfasst sowohl AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Einige Studien zeigten jedoch, dass der Hauptanteil der schnellen synaptischen Transmission vor allem über Erstgenannte vermittelt wird (Vignes und Collingridge 1997; Cossart, Epsztein et al. 2002).

1.3 Amygdala

1.3.1 Anatomie und Physiologie

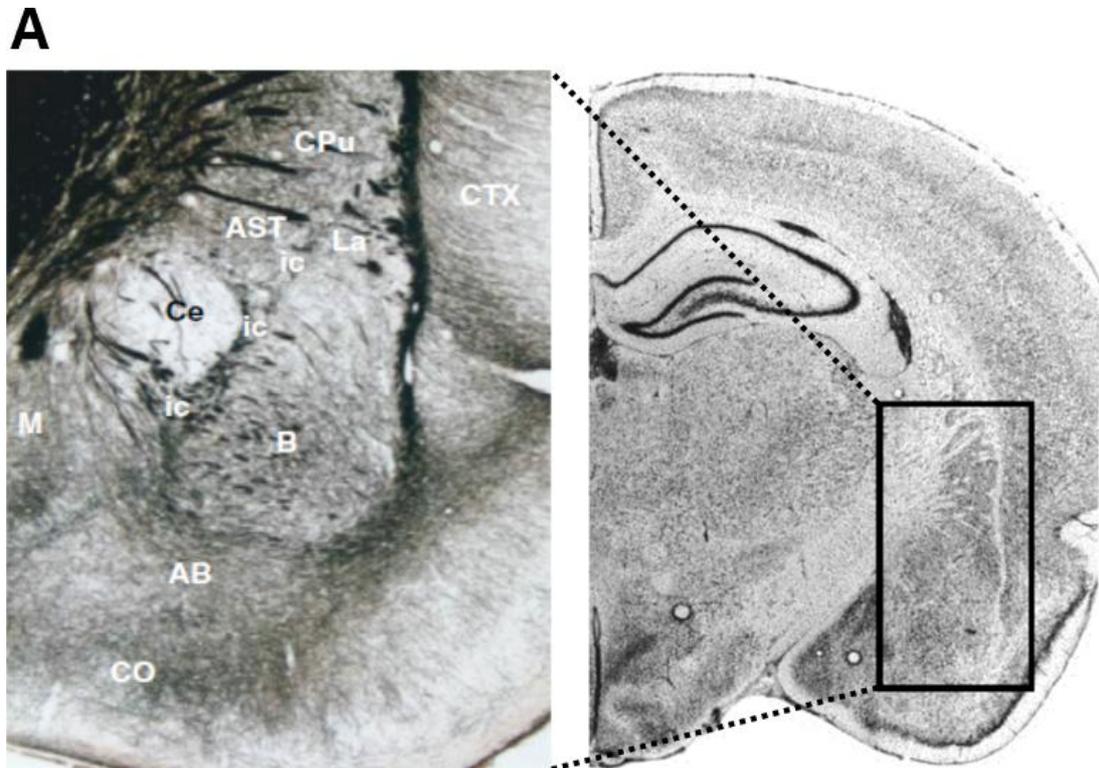
Die Amygdala, deren mandelförmige Makroskopie namensgebend war (gr. amygdale = Mandel), ist eine komplexe Struktur des limbischen Systems im medialen Temporallappen (LeDoux 2007). Vereinfacht gesagt ist sie für die emotionale Färbung von sensorischen Wahrnehmungen, sowie die passende Verhaltensweise auf emotional bedeutsame sensorische Stimuli verantwortlich (Sah, Faber et al. 2003; Pitkanen, Tuunanen et al. 1998). Die Amygdala ist daran beteiligt, Emotionen in visuellen und akustischen Signalen, wie beispielsweise Angst in den Gesichtsausdrücken anderer Menschen wahrzunehmen und Gedächtnisinhalte emotionaler Ereignisse zu verarbeiten (Pitkanen, Tuunanen et al. 1998; Sah, Faber et al. 2003).

Wie die meisten Hirnregionen ist sie keine einförmige Zellmasse, sondern besteht aus vielen einzelnen Kernen und Untergruppen, die sich unterschiedlich kategorisieren lassen (LeDoux 2007). Insgesamt lassen sich über 10 Kerne identifizieren, die stark über inter- und intranukleäre Verbindungen kommunizieren (Sah, Faber et al. 2003). Eine verbreitete Einteilung ist die Unterscheidung zwischen der, dem evolutionär primitiven olfaktorischen System assoziierten, kortiko-medialen Region und der basolateralen Region, die mit dem entwicklungs geschichtlich jüngeren Neokortex in Verbindung gebracht wird. Erstere besteht aus kortikalen, medialen und zentralen Kernen, die basolaterale Region aus den lateralen, basalen und akzessorischen Kernen (LeDoux 2007). Der basale und der laterale Kern werden als basolaterale Amygdala (BLA) zusammengefasst. (Sah, Faber et al. 2003.)

Die Amygdala enthält ein sehr prominentes inhibitorisches Netzwerk, das spontane zelluläre Aktivität unterdrückt und damit verhindert, dass Aktionspotentiale auf irrelevante Reize folgen (LeDoux 2007).

Die laterale Amygdala wird als die größte Eingangsregion der Hirnstruktur gesehen und empfängt sensorische Informationen aus dem visuellen, auditorischen, olfaktorischen, somatosensorischen System sowie dem Geschmacksinn. Diese Eingänge sind sowohl thalamischen als auch kortikalen Ursprungs (LeDoux 2007). Die kortikalen glutamatergen Eingänge erreichen die Amygdala über die externe Kapsel (Sah, Faber et al. 2003). Der zentrale Kern gilt als der Hauptaussgang der Amygdala. Dieser projiziert in den Hypothalamus, den Hirnstamm oder das periaquäduktale Grau, über welche dann die physiologischen Reaktionen (z.B. Sympatikusatktivierung, Aufmerksamkeitssteuerung) auf sensorische Reize entstehen. Zu den wichtigsten Amygdala-assoziierten Emotionen gehören Angst und Aggressionen. Aber auch sexuelles, aggressives, mütterliches und nahrungsbezogenes Verhalten werden stark durch diese limbische Struktur beeinflusst

(LeDoux 2007). Ein eindrucksvolles Beispiel der Verknüpfung von sensorischen Eindrücken und Gefühlen ist die Angstkonditionierung, also das erlernte Angstverhalten auf einen primär neutralen Stimulus. Diese findet ihr neurobiologisches Korrelat in der synaptischen Plastizität der lateralen Amygdala, die durch das Aufeinandertreffen der beiden Stimuli, konditioniert und unkonditioniert zustande kommt (LeDoux 2007).



B

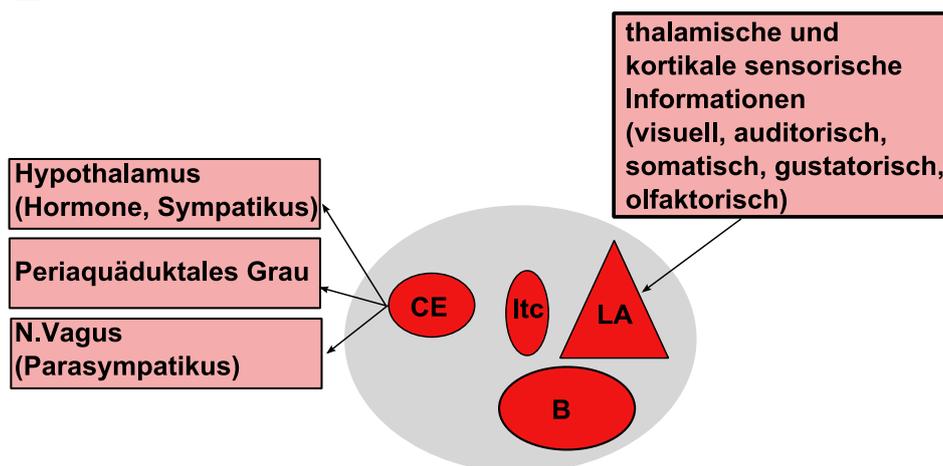


Abb. 1.3.1 Amygdala

A Die abgebildeten Kernareale der murinen Amygdala in Silberfärbung kommen auch im menschlichen Gehirn vor: AB akzessorisch basaler Nucleus, B basaler Nucleus, Ce zentraler Nucleus, La lateraler Nucleus, M medialer Nucleus, CO kortikaler Nucleus, ITC intercalated cells (Glanzstreifen), CTX Kortex; linke Abb. aus LeDoux 2007, rechte Abb. aus Sah, Faber et al. 2003 **B** Darstellung einiger Eingänge in die laterale Amygdala als Haupteingang und einiger wichtiger Ziele des Hauptauesganges, des zentralen Kerns. (Abb. nach LeDoux 2007.)

1.3.2 Amygdala als Fokus für Krampfanfälle

Die Amygdala spielt nicht nur eine Rolle in der physiologischen Funktion des Gehirns, sondern sie ist auch an bestimmten Pathologien mitbestimmend oder entscheidend. Es bestehen einige Hinweise darauf, dass die Amygdala bedeutend für das Generieren von Krampfaktivität, sowohl bei Epilepsie als auch bei provozierten Anfällen ist.

Im Kindling-Tiermodell zeigte sich, dass von mehreren untersuchten Hirnstrukturen (u.a. Hippocampus) die Amygdala und der piriforme Kortex am anfälligsten für das Entstehen von Epilepsie sind (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Als Kindling wird die Erzeugung von epileptischen Schaltkreisen im Gehirn durch wiederholtes elektrisches Stimulieren bezeichnet (Kairiss, Racine et al. 1984; Aroniadou-Anderjaska, Qashu et al. 2007). Die elektrischen Impulse führen zu einer Erniedrigung der Krampfschwelle, so dass letztendlich auch unprovozierte, spontane Krampfaktivität auftritt (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Für einige krampfauslösende Agenzien, wie das Nervengift Soman (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008), Aluminiumhydroxid (Kairiss, Racine et al. 1984) und Lokalanästhetika (Lidocain) (DeToledo 2000; Zink und Graf 2003) konnte gezeigt werden, dass der Fokus der epileptischen Entladung primär in der Amygdala liegt. So konnten bei Ratten nach Amygdalektomie keine Krampfanfälle mit Kokain ausgelöst werden. Klinisch werden Lidocain-induzierte Krampfanfälle in den meisten Fällen als generalisiert beschrieben, nachdem sie anfangs dem Bild einer Temporallappenepilepsie gleichen (Zink und Graf 2003).

Auch bei neurologischen Patienten lassen sich Hinweise für die Bedeutung der Amygdala bei der Entstehung von Krampfaktivität finden. Bei Patienten mit Temporallappenepilepsie, der häufigsten Form fokaler Epilepsie, kann teilweise eine Amygdalopathie (Atrophie) nachweisbar sein, die sowohl isoliert, als auch zusätzlich zu krankhaften Veränderungen im Hippocampus auftreten kann (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008; Pitkanen, Tuunanen et al. 1998). Im Falle einer isolierten Amygdalopathie konnte gezeigt werden, dass bereits eine chirurgische Entfernung der Amygdala ohne hippocampale Resektion zur Anfallsfreiheit führte (Jooma, Yeh et al. 1995).

Die neuronalen krampfassoziierten Veränderungen, Nervenzellverlust und Gliose, wurden bei Epilepsiepatienten in den lateralen und basalen Kernen der Amygdala beschrieben (Pitkanen, Tuunanen et al. 1998). Die Experimente dieser Arbeit wurden in der BLA durchgeführt, da unter den verschiedenen Kernen dieser die wichtigste Rolle bei der Initiation und Ausbreitung der Krämpfe spielt (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008).

Für die Prädisposition der Amygdala zum Generieren von epileptischen Entladungen gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Möglicherweise spielt eine Rolle, dass die kleinsten

Funktionseinheiten sehr dichte Netzwerke zwischen den Untereinheiten der Kerne bilden. Eine Aktivierung von einer nur kleinen Anzahl Neurone kann so sehr schnell eine größere Anzahl Neurone innerhalb eines ganzen Kerns rekrutieren. Des Weiteren eignen sich die Projektionen der Amygdala in das extrapyramidale System, den Kortex und den Hippocampus, um epileptische Entladungen innerhalb kürzester Zeit weit im Hirn zu verbreiten. Besonders die Verbindung des basalen Kerns zum Striatum könnte erklären, wie sich Krampfanfälle mit Ursprung in der Amygdala als sekundär generalisierte Konvulsionen manifestieren. Passend zum Aufgabengebiet der Amygdala, beschreibt in einer Studie etwa ein Drittel der Patienten mit Temporallappenepilepsie, möglicherweise abhängig vom Ausmaß der Atrophie, ein Angstgefühl während des Krampfanfalles. (Zusammengefasst nach Pitkanen, Tuunanen et al. 1998.)

1.4 Hippocampus

Der Hippocampus ist eine Hirnstruktur des limbischen Systems und wird dem Allokortex, dem entwicklungsgeschichtlich älteren Kortex, zugeordnet. Als erster beschrieb Arantius 1587 diese Struktur und verglich es aufgrund seiner Form mit einem Seepferdchen (lat. Hippocampus). Der Hippocampus spielt eine bedeutende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung, beim Lernen sowie bei bestimmten Aspekten der motorischen Kontrolle und der Regulation hypothalamischer Funktionen.

Grundsätzlich setzt sich der Hippocampus aus zwei Lagen, dem Cornu Ammonis (= Ammonshorn) und dem Gyrus dentatus zusammen, die sich während der Gehirnentwicklung ineinander aufrollen. Zusammen mit dem entorhinalen Kortex und dem Subiculum werden die beiden als hippocampale Formation beschrieben, durch die Informationen über ein festes Schema fließen. Das Cornu Ammonis besteht aus vier unterschiedlichen Feldern CA1-CA4. Dabei liegt CA4 in der Konkavität des Gyrus dentatus, CA3 am Knie des Hippocampus, CA1 liegt dem Subiculum an und CA2 liegt zwischen CA3 und CA1. Histologisch lässt sich das Ammonshorn in sechs Schichten einteilen. Der Gyrus dentatus ist weitaus einfacher in drei Lagen aufgebaut (siehe Abb. 1.4.1).

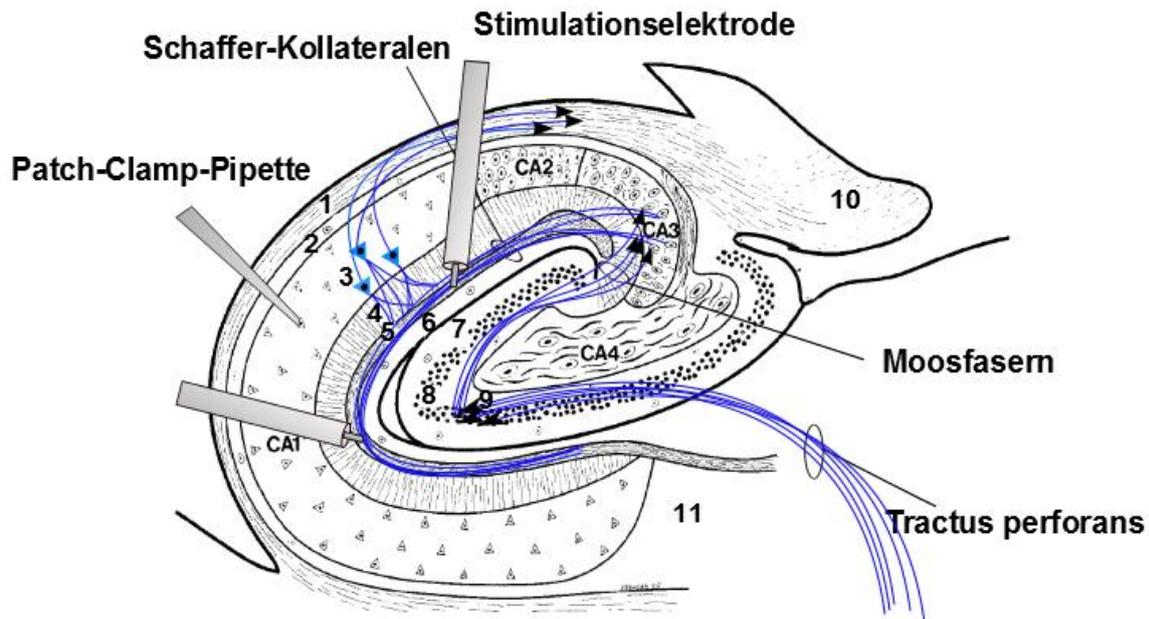


Abb. 1.4.1 Aufbau des Hippocampus

Das Cornu Ammonis wird aus den Regionen CA1 bis CA4 gebildet. Der Alveus (1) beinhaltet vor allem die Efferenzen des Hippocampus, die zur Fimbria ziehen. Darunter findet sich das Stratum oriens (2) und das Stratum pyramidale (3), welches die Pyramidenzellen beinhaltet. Ihre Axone formen zu Teilen den Alveus. Das darunter gelegene Stratum radiatum (4) wird hauptsächlich durch den apikalen Dendritenbaum der Pyramidenzellen gebildet. Hier formen die Schaffer-Kollateralen Synapsen mit den Dendriten. Das darauffolgende Stratum lacunare (5) enthält die Schaffer-Kollateralen und Fasern des Tractus perforans. Am weitest innen gelegen ist das Stratum moleculare (6). Der Gyrus dentatus ist dreilagig aufgebaut: Im Stratum moleculare (7) empfangen die Dendriten der Körnerzellen Informationen aus dem Tractus perforans, dem Haupteingang des Hippocampus. Das Stratum granulosum (8) enthält die Somata der Körnerzellen, deren Axone als Moosfasern durch die polymorphe Schicht (9) zu den Pyramidenzellen der CA3 Region projizieren; Fimbria (10) Subiculum (11); Der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt: die zusätzliche Verschaltung von CA1 Pyramidenzellen mit Zellen im Subiculum, die dann ebenfalls über den Alveus in die Fimbria projizieren. (Zusammenfassend aus Duvernoy 2005.) In blau dargestellt ist der polysynaptische Weg vom entorhinalen Kortex über den Tractus perforans bis zur Fimbria. Abgebildet sind außerdem die möglichen Positionen der Stimulationselektroden. Um Antworten in CA1-Pyramidenzellen zu generieren, können die Schaffer-Kollateralen sowohl anterograd (rechte Elektrode) als auch retrograd (linke Elektrode) erregt werden. (Abbildung modifiziert nach Duvernoy 2005.)

Zwei Wege durch den Hippocampus sind bisher beschrieben. Der polysynaptische Weg beginnt mit Neuronen des entorhinalen Kortex, dem Eingang des Hippocampus, die über den Tractus perforans in den Gyrus dentatus projizieren. Die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, erregen nun Pyramidenzellen in CA3, deren Nervenfortsätze ihrerseits ein Nervenbündel, die Schaffer-Kollateralen bilden. Diese formen Eingänge für die Pyramidenzellen in CA1. Die Axone der Pyramidenzellen verlaufen nun teilweise über den Alveus direkt in die Fimbria oder sie bilden Kollateralen, die Nervenzellen im Subiculum aktivieren. Deren Axone bilden nun die Hauptmasse des Alveus und führen in die Fimbria. Alle genannten neuronalen Kontakte werden über glutamaterge Synapsen vermittelt. Der zweite Schaltkreis, der als direkter intrahippocampaler Weg bezeichnet wird, entspringt ebenfalls im

entorhinalen Kortex und erregt die CA1 Neurone jedoch direkt. Diese können dann über das Subiculum wieder zurück in den entorhinalen Kortex projizieren.

Informationen aus den isokortikalen Arealen des Gehirns laufen im entorhinalen Kortex zusammen und werden gewissermaßen im Hippocampus gefiltert, bevor sie dann endgültig im Langzeitgedächtnis des Isokortex gespeichert werden. Es kann also zwischen neuem Gedächtnis, das dem Hippocampus zugerechnet wird (Kurzzeitgedächtnis) und alten Inhalten (Langzeitgedächtnis) des Isokortex unterschieden werden. Ausfälle des Hippocampus können sich so klinisch als Kurzzeitgedächtnisstörung und anterograde Amnesie, also das Unvermögen neue Gedächtnisinhalte zu bilden, manifestieren. (Zusammengefasst nach Duvernoy 2005.)

Hippocampale Neurone weisen eine sehr hohe Plastizität auf (Duvernoy 2005). Hochfrequente Stimulation führt zu einer dauerhaften Veränderung der neuronalen Übertragung (Langzeitpotentierung, LTP). Diese Langzeitpotentierung wird als synaptisches Modell von Lernen und Gedächtnis angesehen (Bliss und Collingridge 1993).

Gehirnstrukturen im Temporallappen, allen voran der Hippocampus, die Amygdala und der piriforme Kortex sind die Areale des Gehirns, die am anfälligsten für krampfauslösende und Epilepsie-verursachende Läsionen sind und so stellt auch die Temporallappenepilepsie die häufigste Form der Epilepsien dar (Aroniadou-Anderjaska, Fritsch et al. 2008). Die mesiale Temporallappenepilepsie ist dabei mit einer Hippocampussklerose, der am häufigsten auftretenden strukturellen Abnormalität bei Epilepsien, assoziiert (Engel 1996). Das unilaterale Applizieren von Kainsäure in den dorsalen Hippocampus von Affen ermöglicht das Etablieren eines Tiermodells der humanen mesialen Temporallappenepilepsie unter neuropathologischen und klinischen Gesichtspunkten (Chen, Liu et al. 2013).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der zugrunde liegende Mechanismus der krampferzeugenden Wirkung von TXA ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Die bisher vorliegenden Daten, die ein Eingreifen in die GABAerge Transmission nahelegen, wurden an heterologen Expressionssystemen und Zellkulturen durchgeführt. Im Gegensatz dazu sollten hier die neuronalen Wirkmechanismen von TXA in weniger artifiziellen *in vitro* Modellen untersucht werden. An sogenannten Akut-Hirnschnittpräparaten lassen sich die Neurone im weitgehend erhaltenen Netzwerk untersuchen und die Wirkung des Antifibrinolytikums auf die synaptische Transmission und auf die Rezeptorfunktion *in situ* abbilden. Die dabei betrachteten Hirnregionen Amygdala und Hippocampus spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krampfaktivität.

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens beantwortet werden:

- Verändert TXA die neuronale Erregbarkeit?
- Welchen Einfluss hat TXA auf die GABAerge und glutamaterge Übertragung?
- Vermittelt TXA seine Effekte über prä- oder postsynaptische Mechanismen?
- Unterscheiden sich die Effekte oder deren Wirkstärke in den untersuchten Hirnarealen?

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der in vitro Schnittpräparate

Die Experimente dieser Arbeit wurden an vitalen Hirnschnittpräparaten durchgeführt. Als Versuchstiere wurden 21-56 Tage alte, männliche C57 Black 6 Mäuse verwendet. Dieses Alter eignet sich aufgrund höherer Hypoxietoleranz und den dadurch erleichterten Experimentierbedingungen besonders für die Versuche. Die Tiere wurden mit dem volatilen Anästhetikum Isofloran narkotisiert und anschließend dekapitiert.

Die Präparation des Gehirns erfolgte in Carbogengas-gesättigtem (95 % O₂/5 % CO₂), eiskaltem künstlichen Liquor (Präparations-aCSF, artificial cerebrospinal fluid; Zusammensetzung: NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM, NaH₂PO₄-Monohydrat 1,25 mM, D-(+)Glucose-Monohydrat 25 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgCl₂-Hexahydrat 6 mM, CaCl₂-Dihydrat 0,5 mM). Die erhöhte MgCl₂ Konzentration und die verringerte CaCl₂ Konzentration, verglichen mit der für die Messungen verwendeten Standard-aCSF, soll die Neurotoxizität verringern und damit die Schnitte in ihrer Qualität verbessern. Für die Experimente im Voltage Sensitive Dye Imaging-Aufbau wurde ein künstlicher Liquor mit erhöhtem Zuckergehalt verwendet (Zusammensetzung: NaCl 87 mM, KCl 2,5 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄-Monohydrat 1,25 mM, CaCl₂-Dihydrat 0,5 mM, MgCl₂-Hexahydrat 7 mM, D-(+)Glucose-Monohydrat 25 mM, und Saccharose 75 mM).

Nach Freilegung der Schädelkalotte wurden zwei horizontale Einschnitte vom Foramen magnum nach rostral geführt. Um die Kalotte nun mit einer Pinzette nach außen aufklappen zu können, wurde ein sagittaler Schnitt entlang der Sutura sagittalis von kaudal nach rostral vorgenommen. Das nun freiliegende Gehirn wurde vorsichtig von den Nervi optici abgetrennt und mithilfe eines abgerundeten Spatels aus der Schädelhöhle entnommen (Abb. 2.1.1).

Die weitere Präparation wurde in Abhängigkeit des zu untersuchenden Hirnareals durchgeführt:

Basolaterale Amygdala

Für die Experimente in der basolateralen Amygdala wurden Koronarschnitte angefertigt. Dazu wurde das Cerebellum in koronarer Schnitfführung mit einer Rasierklinge abgetrennt und das Gehirn mit der so entstandenen Schnittfläche auf einen Metallblock mit Cyanoakrylatklebstoff (Histoakryl, B. Braun, Melsungen, Deutschland) an einen Agarblock angelehnt aufgebracht.

Hippocampus

Für die Messungen im Hippocampus wurden Sagittalschnitte entnommen. Dazu wurden die Hemisphären nach Abtragung des Kleinhirns in der Fissura longitudinalis cerebri sagittal durchtrennt. Die Hirnhälften wurden an der Schnittfläche mit Cyanoakrylatklebstoff an den Metallblock geklebt.

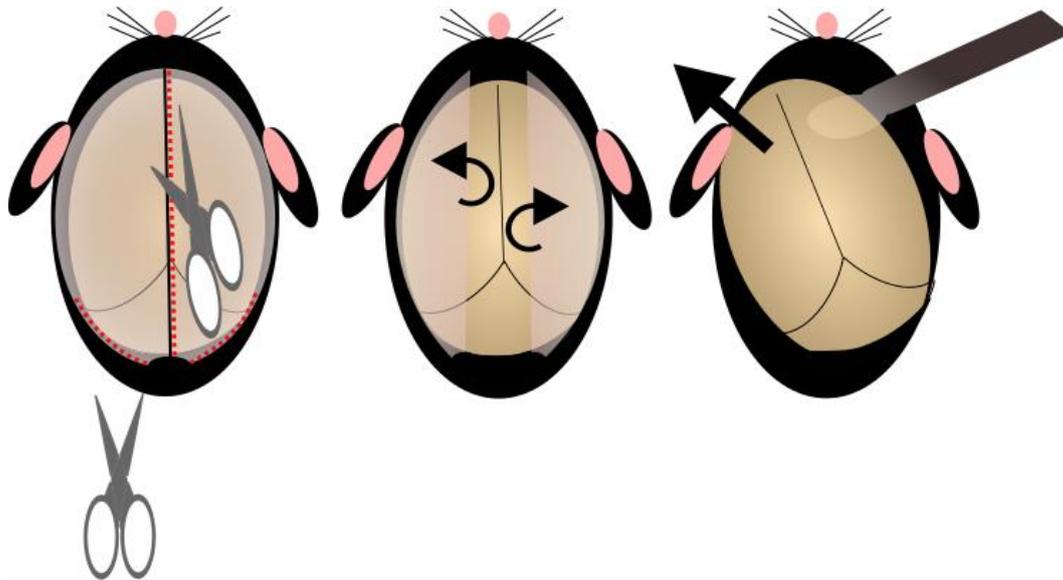


Abb. 2.1.1 Präparationsschritte

Zwei Einschnitte werden horizontal von kaudal nach rostral geführt und ein longitudinaler Schnitt erfolgt entlang der Sutura sagittalis. Die beiden so entstehenden Kalottenhälften werden mithilfe einer Pinzette vorsichtig weggeklappt, um das somit freiliegende Gehirn aus der Schädelhöhle zu heben.

Für alle Präparationen identisch wurde der Metallblock anschließend in ein Schneidegefäß mit der gleichen, wie zuvor verwendeten, eiskalten carbogengasgesättigten aCSF gegeben. Mit Hilfe eines Vibratoms (HM 650 V, Microm International, Walldorf, Deutschland) wurden 350 µm dicke Hirnschnitte angefertigt. Diese wurden in ein Aufbewahrungsgefäß mit Standard-aCSF (Zusammensetzung: NaCl 125 mM, KCl 2,5 mM, NaH₂PO₄-Monohydrat 1,25 mM, D-(+)-Glucose-Monohydrat 25 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgCl₂-Hexahydrat 1 mM, CaCl₂-Dihydrat 2 mM) übertragen. Die Schnitte wurden daraufhin für 30-45 Minuten im 34°C warmen Wasserbad gelagert, während sie anschließend bis zum Überführen in das Messsystem bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden.

2.2 Patch-Clamp-Experimente

2.2.1 Versuchsaufbau

Für die Patch-Clamp-Experimente wurde ein Infrarotvideomikroskop verwendet. Infrarotlicht (Wellenlänge $\lambda=780$ nm) durchdringt Hirngewebe deutlich besser als sichtbares Licht, da es

weniger gestreut wird (Dodt, Eder et al. 2002). Ungefärbtes Hirngewebe kann aufgrund seines geringen Kontrastes durch Lichtmikroskopie nicht dargestellt werden. Die Neurone stellen jedoch Phasenobjekte dar, die dadurch sichtbar gemacht werden, dass die Optik ihren Phasengradienten in einen Amplitudengradienten umwandelt (Dodt, Eder et al. 2002). Zur Optimierung der Bildqualität werden ein sogenanntes Dodt Gradient Contrast System (GC), das durch Verringerung des Streulichts den Kontrast verstärkt, sowie Bildbearbeitung anhand Videotechnologie verwendet (Dodt und Zieglgansberger 1994) (Abb. 2.2.1).

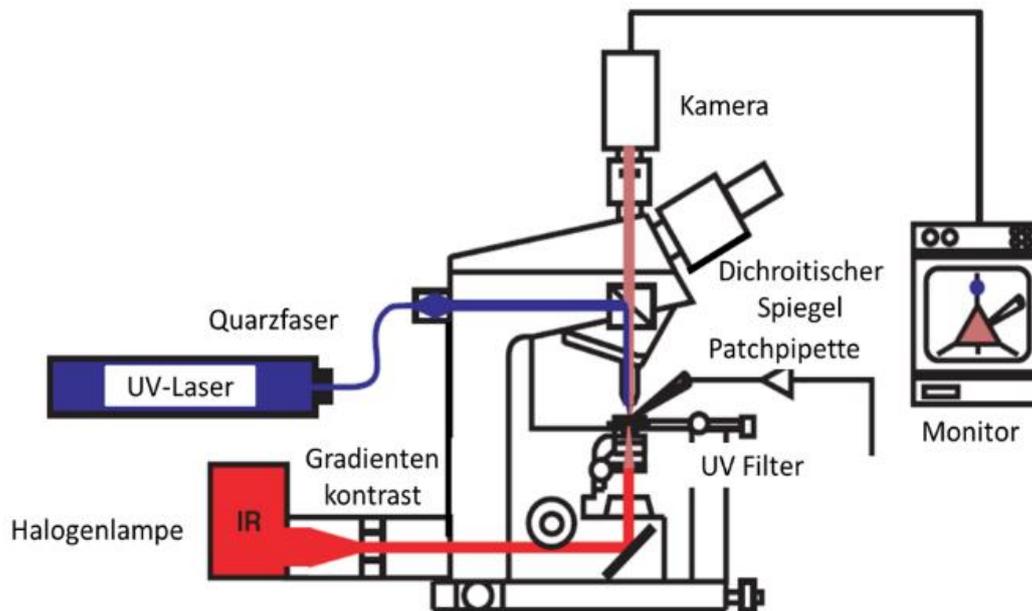


Abb. 2.2.1 Schematische Darstellung des Infrarotmikroskops

Mithilfe eines Infrarot-Interferenzfilters, eingebracht zwischen Halogenlampe und Kondensator, wird erreicht, dass Infrarotlicht mit einer Wellenlänge von 780 nm, welches die besten Ergebnisse liefert (Dodt, Eder et al. 2002) in den Strahlengang des Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gelangt. Das Mikroskop ist mit einem 60-fach vergrößernden Wasser-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus) ausgestattet. Das so entstehende Bild wird mittels zweifacher Vergrößerung einer Streuungslinse (Barlow-Linse) auf einer infrarotsensitiven Videokamera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) abgebildet. Der in den Versuchen zur photolytischen Stimulation verwendete UV-Laser emittiert Licht der Wellenlänge $\lambda=355$ nm, das über eine Quarzfaser von 25 μm Durchmesser in den Strahlengang des Mikroskops eingeleitet wird. Über einen dichroitischen Strahlenteiler (FT 460) gelangt der Strahl in das Objektiv (60x, numerische Apertur 0,9; Olympus) und letztendlich als gebündelter Lichtpunkt von ca. 5 μm Durchmesser in die Brennebene. (Abb. modifiziert nach Dodt, Eder et al. 2002.)

Die Kombination aus Infrarotlicht, Bildbearbeitung durch Videotechnologie und einem Kontrastsystem (Gradientenkontrast GC) erlaubt damit die Darstellung tieferliegender (80-100 μm) Neurone (Dodt und Zieglgansberger 1998) in dickeren (350 μm) Hirnschnitten (Dodt und Zieglgansberger 1990). Somit ist es möglich die Pipette unter Sicht an das Neuron heranzuführen und eine Ganzzelleableitung unter visueller Kontrolle zu etablieren.



Abb. 2.2.2 Darstellung von Neuronen mittels Infrarotvideomikroskopie
(Dodt und Zieglansberger 1994)

Die für die Patch-Clamp-Messungen verwendeten Glaspipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (1,17 mm Innendurchmesser und 1,5 mm Außendurchmesser; Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz, Martinsried, Deutschland) angefertigt und hitzepoliert. Es wurden Pipetten mit Spitzendurchmesser um 1 μm und somit Gleichstromwiderständen von 4-7 $\text{M}\Omega$ im mit Intrazellulärlösungen (siehe 2.2.6) befüllten Zustand verwendet. Der Widerstand jeder Pipette wurde nach dem Eintauchen in die Messkammerflüssigkeit im Brückenmodus (siehe unten) des Patch-Clamp-Verstärkers gemessen.

Für die Patch-Clamp-Experimente war das Infrarotmikroskop mit motorisierten Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) ausgestattet. Dadurch wurde die Feinjustierung der Patchpipette, der Stimulationselektrode und des Mikroskops in allen drei Dimensionen unabhängig voneinander ermöglicht. Der Hirnschnitt wurde in der Ableitkammer mithilfe eines mit Nylonfäden bespannten Platinrahmens fixiert und mit zirkulierender Standard-aCSF (20 ml Gesamtvolumen) umspült. Das Zirkulationsvolumen wurde in Teflonschläuchen mittels einer Schlauchpumpe bewegt. Die benötigten Substanzen (spezifische Antagonisten, TXA) wurden, um sie dem Kreislauf hinzuzufügen, ins Reservoir pipettiert, in welchem die Standard-aCSF auch mit Carbogengas versetzt wurde. Um die Hypoxietoleranz der Zellen zu steigern, wurden die Versuche bei Zimmertemperatur (20-22°C) durchgeführt. Die Positionierung der Stimulationselektrode sowie die abzuleitenden Zellen wurden in Abhängigkeit von der untersuchten Gehirnstruktur gewählt.

Basolaterale Amygdala

Für die Ableitungen in der basolateralen Amygdala (BLA) wurden die Fasern in der Capsula externa elektrisch stimuliert. Dazu wurde diese Struktur lichtmikroskopisch identifiziert und eine bipolare Wolfram-Elektrode vorsichtig auf die Nervenfasern aufgesetzt. Die abzuleitenden Neurone wurden medial und basal davon videomikroskopisch identifiziert.

Hippocampus

Für die Messungen an hippocampalen Pyramidenzellen der CA1-Region wurden die Schaffer-kollateralen mithilfe der Wolfram-Elektrode retrograd oder anterograd elektrisch stimuliert (Abb 1.4.1).

Für die Einzelzelleitungen dieses Dissertationsvorhabens wurde ein Patch-Clamp-Verstärker (SEC 10L, NPI electronic, Tamm, Deutschland) verwendet. Die wichtigsten Modi des Verstärkers sind der Voltage-Clamp-Modus, der Current-Clamp-Modus und der Brückenmodus (sog. Wheatstone'sche Messbrücke). In der Voltage-Clamp-Konfiguration hält der Verstärker ein individuell festgesetztes Potential (Spannungsklemme). Abweichungen, die durch das Ein- oder Ausströmen von Ionen entstehen, müssen vom Verstärker durch Strominjektion wieder ausgeglichen werden. Dazu überwacht er im diskontinuierlichen Einzelelektroden-Voltage-Clamp-Verfahren (dSEVC, „discontinuous single electrode voltage clamp“) das Membranpotential. Der Verstärker wechselt dabei mit einer Frequenz von 60-80 Hz zwischen Spannungsmessung und Stromapplikation. Die Injektion des Kompensationsstroms dient dem Wiederherstellen des voreingestellten Membranpotentials und stellt damit indirekt Ströme über die Membran dar. Definitionsgemäß wird das Einströmen von positiver Ladung als EPSC (erregender postsynaptischer Strom, englisch: current) bezeichnet. Graphisch zeigt sich hierbei ein negativer Ausschlag, da der Verstärker, um die Zelle auf dem vorgegeben Potential zu halten zum Ausgleich negative Ladung applizieren muss. Im Gegensatz dazu wird im Current-Clamp-Modus eine genau definierte Menge Strom mittels Pipette in die Zelle injiziert, während der Verstärker die abfallende Spannung misst. Mithilfe dieser Einstellung lässt sich beispielsweise das Ruhemembranpotential eines Neurons ermitteln oder eine Stromspannungskurve erstellen. Im Brückenmodus kann mithilfe der Wheatstone'schen Messbrücke der Widerstand der Pipette abgebildet werden.

2.2.2 Biologische Grundlagen

Neurone werden, wie alle lebenden Zellen, von einer Plasmamembran, einer Phospholipid-Doppelschicht mit Proteinen unterschiedlichster Funktion umgeben. Diese Membran stellt elektrisch gesehen eine Isolierschicht zwischen zwei leitenden Medien (Intra- und

Extrazellulärflüssigkeit) dar, welche als Kondensator (mit Kapazität C_m) beschrieben werden kann. Die Ionenzusammensetzung der beiden Kompartimente unterscheidet sich vor allem im hohen Kaliumanteil intrazellulär sowie einer hohen NaCl-Konzentration extrazellulär. Im Ruhezustand der Zelle ist die Membran hauptsächlich für Kaliumionen durchlässig. Ihrem Konzentrationsgradienten folgend (Diffusion) fließen K^+ -Ionen nach außen. Da mit jedem Ion, das die Membran überquert auch eine positive Ladung die Zelle verlässt, wird die Zelle im Vergleich zum Extrazellulärmedium immer negativer geladen und ein elektrisches Potential, das positive Ionen nach Innen zieht, baut sich auf. Der Nettoionenfluss, elektrophysiologisch der Strom, sistiert, sobald ein Gleichgewicht zwischen chemischer und elektrischer Kraft eintritt. Dieses Gleichgewichtspotential kann mit Hilfe der Nernst-Gleichung für jedes Elektrolyt berechnet werden.

$$E = RT/zF \times \ln\left[\frac{[Ion]_{\text{außen}}}{[Ion]_{\text{innen}}}\right]$$

R = universelle Gaskonstante, T = Temperatur in Kelvin, z = Oxidationsstufe, F = Faraday'sche Konstante

Da die Zelle in Ruhe vor allem für Kalium durchlässig ist entspricht das Ruhemembranpotential (je nach Zelltyp $E = -50 - -80\text{mV}$) weitestgehend dem Kaliumgleichgewichtspotential ($E_k = -80 - -90 \text{ mV}$). Kommt es nun, beispielsweise durch Ligandenbindung, zur Öffnung anderer Ionenkanäle, werden nun diese Elektrolyte versuchen ihr Gleichgewichtspotential einzustellen und fließen ihrem Gradienten folgend. Dies kann elektrophysiologisch als Strom (I_{ion}) gemessen werden. Die Leitfähigkeiten der Ionenkanäle bestimmen als stromlimitierender Faktor den Widerstand der Membran (R_m). (Zusammenfassend aus Molleman 2003.)

2.2.3 Patch-Clamp-Technik

Die Einzelzelleitungen im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens erfolgten mit der Patch-Clamp-Technik. Diese basiert auf den grundlegenden elektrophysiologischen Erkenntnissen von Hodgkin und Huxley (1952) und beruht auf folgender Idee von Neher und Sakmann (1976): Anstatt wie ihre Vorgänger die Membran zu durchstoßen (intrazelluläre Ableitung) erzeugten sie einen sehr dichten Abschluss zwischen Pipette und Zelle mit einem Abdichtwiderstand im Gigaohm-Bereich („Gigaseal“) und durchbrachen den dazwischenliegenden Membranflecken („Patch“). Somit entsteht eine leitende Verbindung zwischen Pipettenlösung und Intrazellulärmedium und es ist möglich die gesamte Membran der Nervenzelle abzuleiten (Ganzzelleitungen, Whole-cell-Konfiguration, Abb. 2.2.3) (Molleman 2003). Alle in dieser Arbeit durchgeführten Einzelzellmessungen erfolgten in der Whole-cell-Konfiguration.

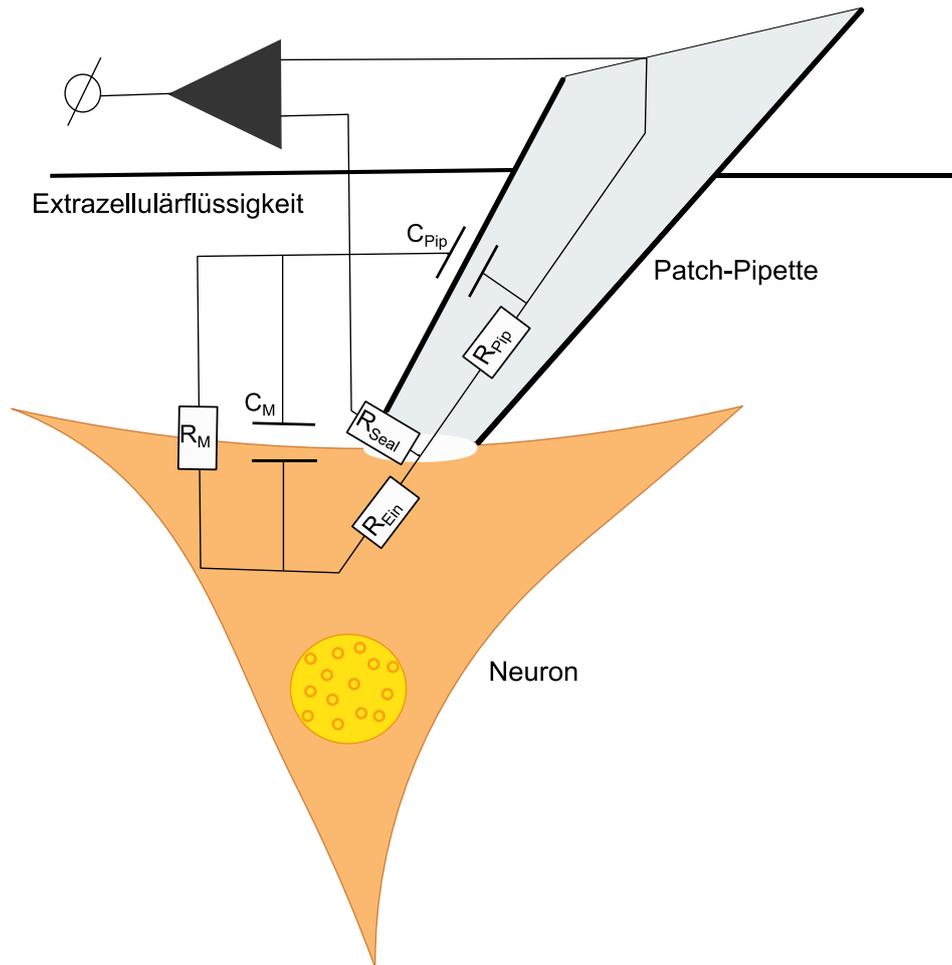


Abb. 2.2.3 Schaltbild einer Ganzzelleableitung

Von den in Serie geschalteten Widerständen stellt R_M (Membranwiderstand über der gesamten Zellmembran) den größten und damit dem stromlimitierenden Widerstand dar. Mit dieser Anordnung können demnach alle Ströme durch die Plasmamembran dargestellt werden (Ganzzelleableitung). Der dazu parallel geschaltete Widerstand R_{Seal} des „Seals“ muss größtmöglich gehalten werden (im $G\Omega$ -Bereich) um Kurzschlüsse der Membranströme (Leckströme) zu vermindern. Die kapazitive Eigenschaft der Membran (C_M) bildet zusammen mit dem Serienwiderstand R_S , der sich aus $R_{Pipette}$ und $R_{Eingang}$ zusammensetzt, ein signifikantes RC-Glied. Der Widerstand am Membranflicken bildet die Membranreste ab, die sich nach dem Eröffnen der Zelle an diesem Zugang ablagern.

2.2.4 Etablierung einer Ganzzelleableitung

Eine mit Intrazellulärlösung gefüllte Pipette wurde mithilfe der Mikromanipulatoren dem abzuleitenden Neuron angenähert. Ein Silberchloriddraht stellte die elektrische Verbindung dieser Flüssigkeit zum Verstärker her. Die Zusammensetzung der Lösung wurde den jeweiligen Versuchen angepasst und bestimmte nach dem Erhalt der Ganzzelleableitung das Intrazellulärmedium, da das Volumen der Zelle im Vergleich zum Pipettenvolumen vernachlässigbar klein ist. Um eine Verschmutzung und damit ein Verstopfen der Pipettenspitze zu verhindern wurde leichter Überdruck mit einer Spritze angelegt bevor die Pipette in die Extrazellulärflüssigkeit eintauchte. Sobald sich dann der Stromkreis in der aCSF schloss konnte im Brückenmodus der Widerstand der Pipette abgelesen werden. Eine defekte Pipettenspitze oder eine minimale Verschmutzung konnten so schon an einem zu

geringen respektive zu großen Widerstand abgelesen werden. Die Pipette wurde nun nahe an das ausgewählte Neuron geführt und der Druck auf die Pipettenlösung verringert. Über vorsichtige Annäherung der Spitze an die Membran wurde eine leichte Eindellung erzeugt. Durch das Ablassen des Überdruckes, stülpte sich die Membran über die Pipettenspitze und erzeugte einen äußerst dichten Abschluss von mehreren Giga-Ohm (sog. Gigaseal). Um eine leitenden Verbindung ins Zellinnere zu schaffen, musste der Membranflicken innerhalb dieses Seals durch vorsichtiges Anlegen von Unterdruck aufgebrochen werden.

Eine vollständig etablierte Ganzzelleableitung führte bei einem hyperpolarisierenden Spannungssprung im Voltage-Clamp-Modus aufgrund der kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran zu einer Verzögerung der Umladung (siehe Abb. 2.2.5) und konnte so elektrophysiologisch verifiziert werden. Bevor die Messungen an der Zelle vorgenommen wurden, wurde einige Minuten abgewartet, um das Auswaschen des Zellinhalts durch die Pipettenlösung über Diffusion zu erlauben. Bei allen Experimenten wurden zehn bis 15 Minuten stabile Antworten aufgezeichnet bevor TXA eingewaschen wurde.

2.2.5 Elektrische und photolytische Stimulation

Um postsynaptische Antworten abzuleiten, wurden die Neurone alle 15 s abwechselnd über elektrische und photolytische Stimulation erregt (siehe Abb. 2.2.4).

Elektrische Stimulation

Für die elektrisch evozierten Antworten wurden auf das abgeleitete Neuron projizierende Nervenfasern mittels einer bipolaren konzentrischen Stimulationselektrode aus Wolfram (Außendurchmesser 200 μm , Innendurchmesser 100 μm , SNEX-100X, Hugo-Sachs-Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) stimuliert. Die Elektrode wurde, wie oben beschrieben auf die jeweilige Hirnstruktur aufgebracht. Um die Fasern überschwellig zu erregen und eine adäquate Antwort zu erhalten, konnten am Stimulationsgerät Dauer (0,05-0,5 ms) und Intensität (0,1-100 V) des Stromimpulses eingestellt werden.

Photolytische Transmitterfreisetzung

Das Infrarotvideomikroskop in Kombination mit einem UV-Laser (Nd:YVO₄, 100 kHz Pulswiederholrate; DPSS Lasers, San Jose, USA) ermöglicht es Nervenzellen zu visualisieren und dadurch bestimmte Strukturen gezielt durch photolytische Transmitterfreisetzung zu erregen (siehe Abb. 2.2.1). Eine, in einigen Experimenten der Standard-aCSF hinzugefügte, veresterte Form des Neurotransmitters GABA (sogenannte CNB-caged GABA, 100 μM Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, California) wird mithilfe eines UV-Lasers aktiviert und kann daraufhin am Rezeptor binden. Das UV-Licht

(Wellenlänge 355 nm) spaltet die inaktivierende Estergruppe ab (Photolyse), sodass biologisch aktive GABA freigesetzt wird. Somit kann der Neurotransmitter unter Umgehung der präsynaptischen Terminale zeitlich begrenzt postsynaptische Rezeptoren aktivieren. Die auf diese Weise hervorgerufenen Ströme sind deshalb unabhängig von Mechanismen der präsynaptischen Transmitterfreisetzung. Unter diesen Bedingungen auftretende Substanzeffekte sprechen demnach für einen postsynaptischen Wirkmechanismus.

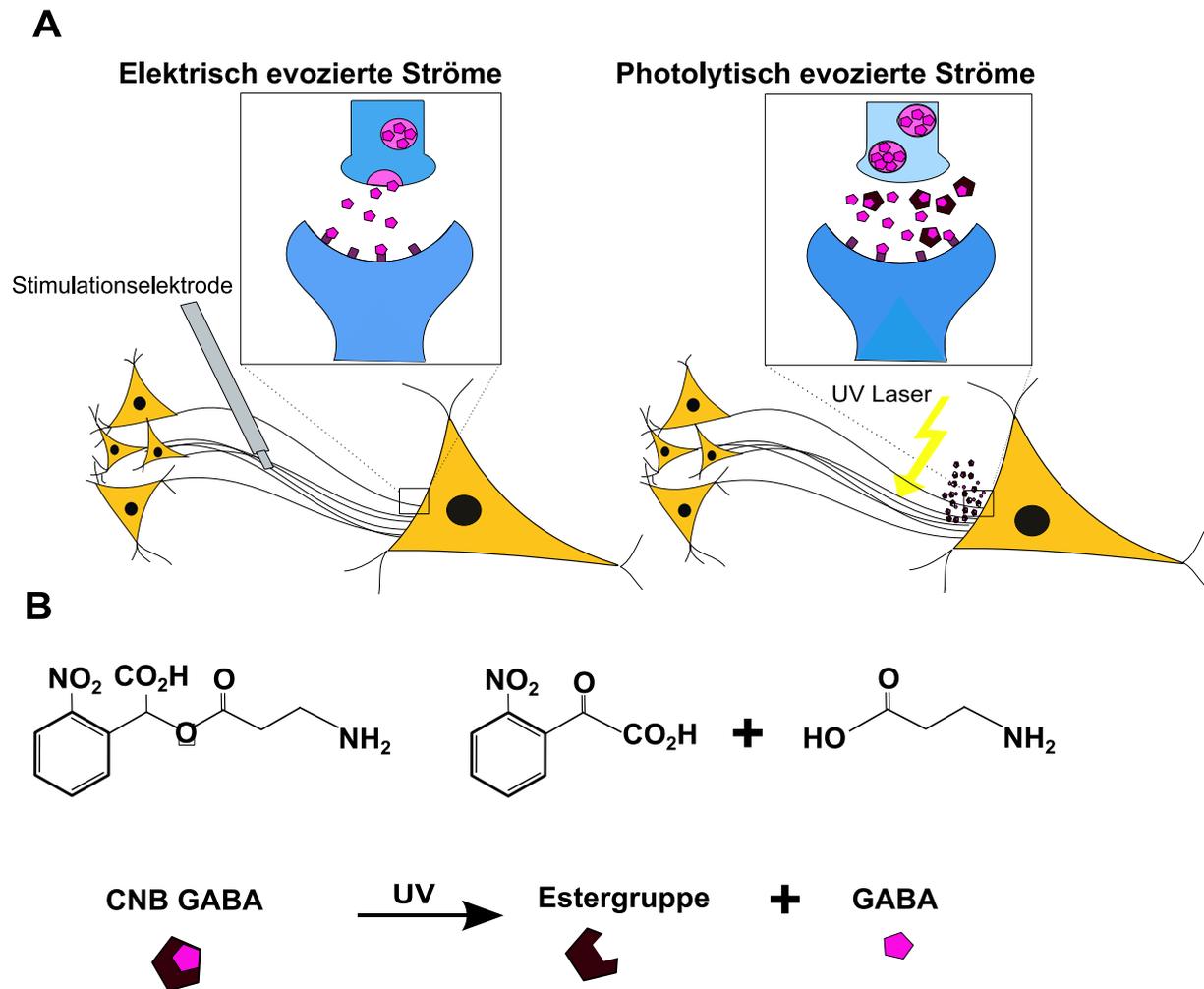


Abb. 2.2.4 Elektrische und photolytische Stimulation

A Unterschied der beiden Stimulationsarten: mittels einer bipolaren Wolfram-Elektrode werden auf das abgeleitete Neuron projizierende Nervenfasern elektrisch stimuliert. Diese Stimulation führt an der präsynaptischen Endigung zur Transmitterfreisetzung, die dann die postsynaptischen Ströme verursacht. Die Photolyse von caged GABA (100 μM im Extrazellulärmedium) durch den Laser bewirkt einen Anstieg der Konzentration an freier, biologisch aktiver GABA, welche postsynaptisch lokalisierte GABA-Rezeptoren aktiviert. **B Photolyse** des biologisch inaktiven Transmitters (caged GABA): ein UV-Laserimpuls ($\lambda=355 \text{ nm}$) spaltet die (CNB-)Estergruppe vom Transmitter ab und setzt somit aktive GABA frei.

Die photolytische Transmitterfreisetzung wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit zur Differenzierung von prä- und postsynaptischen Substanzeffekten genutzt. Über einen Polarisationsfilters konnte die Lichtleistung des Lasers zwischen 50 und 100 mW variabel

eingestellt werden, um ausreichend große Stromantworten zu erzeugen. Die Dauer der UV-Laserpulse wurde auf 10 ms gesetzt. Nachdem der veresterte Transmitter der Extrazellulärflüssigkeit zugesetzt wurde, konnten nach etwa zehn Minuten mittels eines Laserspots, der auf einen Dendriten des Neurons fokussiert wurde, Antworten ausgelöst werden. Die Intensität des Lasers wurde dann für eine ausreichend große Stromantwort nachjustiert.

2.2.6 Postsynaptische Ströme

Summen-Ströme

Die Ströme, die in Abwesenheit von spezifischen Rezeptorantagonisten gemessen werden können, setzen sich aus Ionenströmen verschiedener exzitatorischer und inhibitorischer Rezeptoren zusammen und werden im Folgenden als postsynaptische Summenströme (postsynaptic currents; PSC) bezeichnet. Die Summenströme in der Amygdala werden von GABA_A⁻, GABA_B⁻, NMDA- und nonNMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen gebildet (Ranft, Kurz et al. 2004). PSCs wurden bei einem Haltepotential von -70 mV gemessen. Für alle Ableitungen wurde, wenn nicht anders vermerkt die folgende Intrazellulärlösung verwendet: (in mM) K-Gluconat 130, NaCl 5, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 0,5, ATP-K 2, GTP-Na 0,3. Um das Auftreten spontaner Aktionspotentiale zu verhindern wurde der Intrazellulärlösung teilweise Lidocain-N-Ethyl-Chlorid (5 mM) hinzugefügt.

GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme

Um die inhibitorischen Ströme durch den GABA_A-Rezeptor pharmakologisch zu isolieren wurden der Standard-aCSF spezifische Antagonisten hinzugefügt. GABA_B-Rezeptoren wurden durch Zugabe von CGP 35348 (CGP; 200 µM; (Olpe, Karlsson et al. 1990)), NMDA-Rezeptoren durch 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (AP5; 50 µM) und non-NMDA-Rezeptoren durch Hinzufügen von 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX; 5 µM) gehemmt. Um möglichst lange gute Ableitbedingungen zu schaffen, wurde für die Messungen ein Haltepotential gewählt, das nahe dem physiologischen Ruhemembranpotential der Neurone liegt (-70 mV). Bei Verwendung der Standard-Intrazellulärlösung in Kombination mit der Standard-aCSF würde das Umkehrpotential für Chloridionen jedoch bei etwa -68 mV liegen und damit kaum Ionenströme messbar sein. Deshalb wurde eine Intrazellulärlösung mit hoher Cl⁻ Konzentration (in mM: Cäsiummethansulfonat 100; CsCl 60; HEPES 10; MgCl 1; EGTA 0,2; Kreatinphosphat 20; Lidocain 5; Gleichgewichtspotential für Chlorid ca. -20 mV) gewählt. Unter diesen Umständen führt eine Aktivierung des Rezeptors zum Ausstrom negativ geladener Chloridionen. Da elektrisch gesehen der Verlust negativer Ladungen einem Einstrom positiver Ladung entspricht müssten die Ströme korrekterweise als EPSC bezeichnet

werden. Da gleichwohl Ströme durch inhibitorische GABA_A-Rezeptoren gemessen wurden, werden die durch elektrische Stimulation verursachten Chloridströme hier im Weiteren als GABA_A-IPSC bezeichnet. Die unter gleichen Bedingungen photolytisch evozierten GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme werden als GABA_A-pCs bezeichnet.

In einer zusätzlichen Serie von Experimenten erfolgten im Abstand von 15 Sekunden jeweils zwei identische elektrische Stimulationen der präsynaptischen Terminalen. Die Interstimuluszeit dieser beiden wurde auf 50 ms und 150 ms gesetzt. Das Verhältnis der Amplitude der zweiten zur ersten Antwort wurde berechnet (PPR, Paired Pulse Ratio) und dieses Verhältnis unter Kontrollbedingungen mit jenem nach TXA-Applikation verglichen. Für diesen Versuchsaufbau wurde Zerebrospinalflüssigkeit mit einer erniedrigten Ca²⁺ Konzentration von 0,5 mM verwendet. Die übrigen Bedingungen entsprachen denen der GABA-IPSC Messung.

Derartige höherfrequente Stimulation führt an Synapsen zu einer Modulation (Paired Pulse Modulation) der postsynaptischen Ströme und stellt somit die einfachste Form kurzzeitiger, neuronaler Plastizität dar. Die sogenannte „Paired Pulse Facilitation“, also eine PPR >1 wird über präsynaptische Mechanismen erklärt (siehe auch Kapitel 4.2) (Kravchenko, Moskalyuk et al. 2006; Zucker und Regehr 2002). Eine Änderung der PPR unter dem Einfluss von TXA spricht also für einen präsynaptischen Wirkmechanismus.

NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme

NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme (NMDA-EPSCs) wurden durch die Zugabe von NBQX (5 µM), CGP (200 µM) und dem spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (20 µM) isoliert. Die Zellen wurden auf ein Membranpotential von -60 mV geklemmt und für die Zeitspanne während und nach der Stimulation wurde zusätzlich ein Spannungssprung von +20 mV an die Membran appliziert. Dadurch wurde die Magnesiumblockade der NMDA-Rezeptoren gelöst und die Ströme durch die isolierten Rezeptoren konnten gemessen werden. Der in einigen Experimenten verwendete spezifische NMDA-Rezeptor-Antagonist AP5 ist ein selektiver, kompetitiver Antagonist an der Glutamatbindestelle.

AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme

Die schnellen Glutamat-vermittelten Ströme wurden durch Zugabe von AP5 (50 µM), CGP (200 µM) und Bicucullin (20 µM) in die Extrazellulärflüssigkeit isoliert. Das Membranpotential wurde dabei auf -70 mV geklemmt. Um AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme zu unterbinden, wurde in den Versuchen der spezifische Antagonist NBQX verwendet (Zeman und Lodge 1992).

Strom-Spannungskurven

Die Strom-Spannungskurven wurden im Current-Clamp-Modus aufgezeichnet. Strompulse wurden über 500 ms in steigender depolarisierender (-90 pA bis $+130$ pA) Richtung ($\Delta I = 10$ pA) an die Zelle abgegeben und ihre anliegende Membranspannung in Abhängigkeit der Ströme gemessen.

2.2.7 Steuerung und Messparameter der Einzelexperimente

Die Steuerung des Verstärkers, der elektrischen und photolytischen Stimulation sowie die Aufnahme der Spuren erfolgte durch die Software „HEKA Pulse“ (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden die Messungen mit einem Tiefpass-Filter (3 kHz) aufgenommen. Die Daten wurden mit einer Sampling-Frequenz von 9 kHz digitalisiert (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corp., Port Washington, USA) und anschließend mit der Software Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA) offline ausgewertet.

Um die Membraneigenschaften und den Zustand der Ganzzelle während der Messungen beurteilen und überwachen zu können, wurde die Zelle vor jeder Stimulation über einen Testpuls für 200 ms um -10 mV hyperpolarisiert.

Durch diesen Spannungssprung können folgende Parameter abgelesen werden:

R_M und R_{Seal} : Über das Vorzeichen und die Größe des Haltestroms kann das Verhältnis der beiden parallel-geschalteten Widerstände abgeschätzt werden. Da die Leckströme nicht ionenselektiv sind, liegt ihr angestrebtes Gleichgewichtspotential bei 0 mV. Das Ruhemembranpotential entspricht, wie oben erklärt, beinahe dem Kaliumgleichgewichtspotential. Das bedeutet bei einem physiologischen Haltepotential von etwa -70 mV und einer Intrazellullärlösung, die der Originalzusammensetzung (hohes K^+) ähnelt nimmt der Haltestrom Werte um 0 A an, wenn R_{Seal} ausreichend groß ist. Ist dieser jedoch zu gering, muss der Verstärker einen sehr viel höheren Haltestrom für die gesamten -70 mV applizieren.

Zur Berechnung des Membranwiderstands über den Testpuls lässt sich das Ohm'sche Gesetz anwenden: $R_M = U/I_{offset}$

R_S : Der Serienwiderstand, der sich aus $R_{Pipette}$ und $R_{Eingang}$ zusammensetzt kann am Anfang des Testpulses über $R_S = U/I_{max}$ berechnet werden.

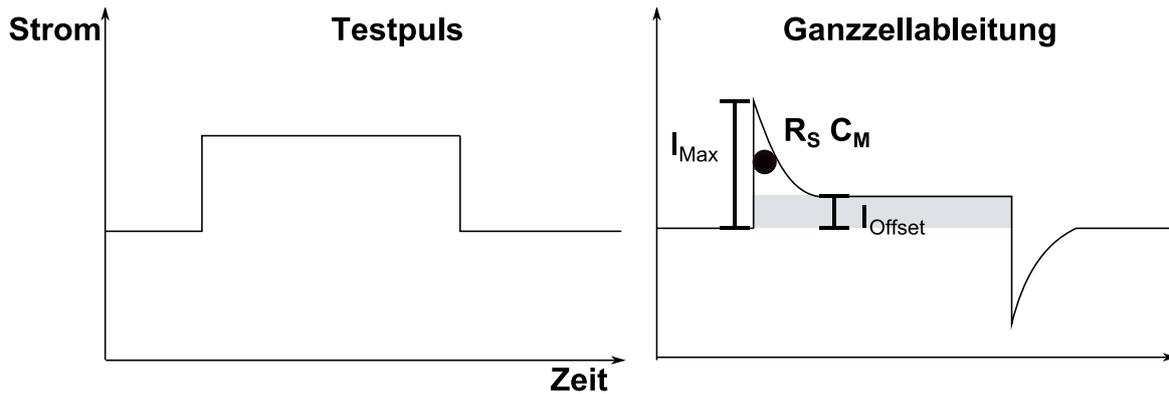


Abb. 2.2.5 Kommandospannung des hyperpolarisierenden Spannungssprungs (Testpuls -10 mV) und Antwort in der Ganzzelleableitung

Links im Bild dargestellt ist die Kommandospannung, rechts schematisch abgebildet die verzögerte Umladung der Membran aufgrund ihrer kapazitiven Eigenschaften ($R_S C_M$ -Glieder). Über I_{Max} lässt sich der Serienwiderstand R_S ($R_S = U_{Test} / I_{Max}$), anhand I_{Offset} der Membranwiderstand R_M ($R_M = U_{Test} / I_{Offset}$) berechnen.

Zusätzlich wird das Ruhemembranpotential des Neurons im Current-Clamp-Modus ($I = 0$ pA) angezeigt. Um das physiologische Potential zu bestimmen, muss dies zeitnah zur Eröffnung der Zelle abgelesen werden. Während des Experiments ist das Membranpotential je nach Zusammensetzung der Intrazellulärlösung künstlich verändert. Als weiterer Parameter wird der Pipettenwiderstand $R_{Pipette}$ wie bereits erörtert zu Beginn des Experiments beobachtet.

Die elektrisch und photolytisch evozierten Stromantworten des Neurons wurden nach folgenden Gesichtspunkten analysiert:

Stromamplitude (peak): Die Stromamplitude ist die maximale Auslenkung der Stromantwort gemessen von der Ausgangslinie in pA.

Ladungstransfer (charge): Die Ladung, die über den gesamten Zeitraum der Antwort geflossen ist, lässt sich als Integral der Stromstärke über die Zeit darstellen und entspricht deshalb der Fläche unter dem Graphen.

Deaktivierungszeitkonstante (decay): Die Deaktivierung, also der Abfall der Stromantwort wird mit einer Konstante τ beschrieben. Mit Hilfe eines Computerprogramms wird diese über ein Iterationsverfahren approximiert. Je nach Rezeptortyp und der daraus folgenden Kinetik wird entweder ein monoexponentieller (AMPA, Summenantworten) oder ein biexponentieller (NMDA und $GABA_A$) Verlauf zugrunde gelegt.

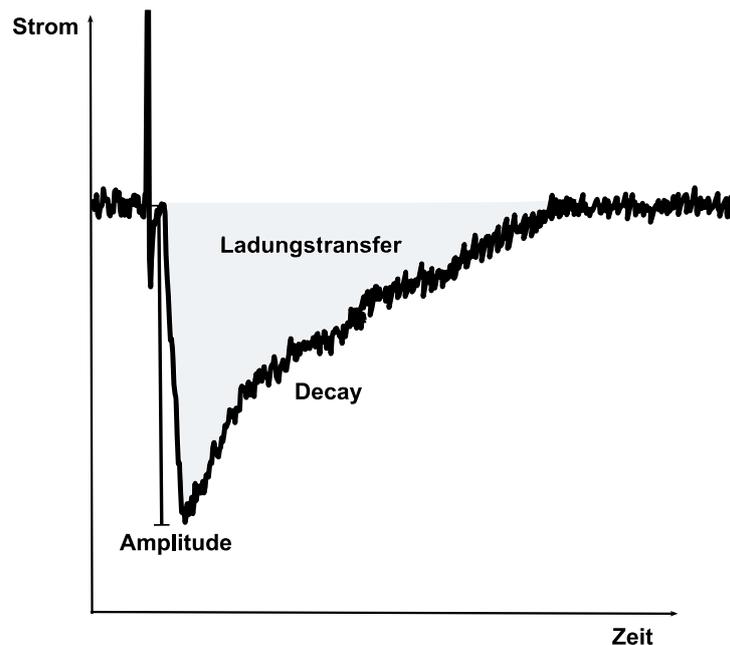


Abb. 2.2.6 Antwortparameter

Die postsynaptischen Stromantworten wurden nach den charakteristischen Parametern Amplitude (größter Ausschlag bezogen auf den Ruhezustand), Ladungstransfer (entspricht graphisch der Fläche unter der Kurve) und Deaktivierungszeitkonstante (Decay) analysiert

2.2.8 Auswertung und Statistik

Um die Wirkung von TXA sichtbar zu machen wurden die Antworten in den letzten fünf Minuten vor dem Einwasch auf 1,0 normalisiert. Die Änderung der Antwortparameter Amplitude, Ladungstransfer sowie Deaktivierungszeitkonstante unter TXA-Einfluss wurden so als relative Änderung auf die normalisierten Antworten berechnet. Die Zusammenfassung der Daten sowie die Überprüfung auf Signifikanz wurden in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau der erhobenen Daten wurde auf $p < 0,05$ gesetzt und p mit dem Student's t-Test für unabhängige bzw. abhängige Daten ermittelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwerte mit dem SEM („Standard error of the mean“) - Wert dargestellt.

2.3 Voltage Sensitive Dye Imaging

2.3.1 Messprinzip

Voltage Sensitive Dye Imaging (VSDI) ist eine optische Messung von Nervenzellaktivität mithilfe von spannungssensitiven Farbstoffen (voltage sensitive dye, VSD). Diese lagern sich in die Zellmembran der Neurone ein und ändern ihre optischen Eigenschaften (Fluoreszenz oder Absorption) abhängig vom Membranpotential. Das bedeutet sie übersetzen Membranpotentialänderungen in optische Signale. Diese Art der Bildgebung hat ihren wesentlichen Vorteil in der hohen zeitlichen (Millisekunden) sowie räumlichen Auflösung (bis

zu 20-50 μm) (Grinvald und Hildesheim 2004; Chemla und Chavane 2010). Es ermöglicht die Visualisierung ganzer Nervenzellverbände in Echtzeit (Chemla und Chavane 2010). Studien konnten zeigen, dass intrazelluläre Ableitungen und VSDI Daten sehr eng bezüglich der synaptischen Membranpotentialveränderungen korrelieren (Chemla und Chavane 2010). Die messbaren Unterschiede in der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F$) können sowohl aus den Änderungen des Zellmembranpotentials, als auch aus Störgrößen resultieren, wobei nur ersteres direkt proportional zur verwendeten Lichtintensität ist. Daraus folgt, dass sich das Signal zu Rausch-Verhältnis grundsätzlich durch eine erhöhte Lichtintensität verbessern ließe. Da dies jedoch mit einer erhöhten Lichttoxizität und dem Ausbleichen des Schnittes einhergehen würde, benützt man sogenannte CCD (charged coupled device) gestützte Kameras, die auf Grund ihrer hohen Sensitivität bei sehr geringen Intensitäten eingesetzt werden können (Tominaga, Tominaga et al. 2000). Um das damit schlechtere Signal zu Rausch-Verhältnis auszugleichen werden sequentiell durchgeführte Aufnahmen mathematisch gemittelt. In den Versuchen wurden der Fluoreszenzfarbstoff Di-4-ANEPPS verwendet. Dieser kann auf Potentialänderung im Millisekundenbereich optisch reagieren und gehört damit laut Herstellerangaben zu den schnellen VSD.

2.3.2 Versuchsaufbau

Nach Präparation in Saccharose-basierter aCSF wurden die Hirnschnitte 15 Minuten lang in mit Di-4-ANEPPS (7,5 mg/ml; < 0,1% DMSO) angereicherter Standard-aCSF gefärbt. Dieser und folgende Schritte wurden abgedunkelt und mit eigens angefertigten Gehäusen vorgenommen, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Danach wurden die Schnitte für mindestens weitere 30 Minuten in carbogengasgesättigter, reiner Standard-aCSF aufbewahrt.

Das verwendete Epifluoreszenzmikroskop (BX51WI, Olympus) war mit einer MiCAM02-HR Kamera (CCD Kamera) und einem XLFlour4X/340 Objektiv ausgestattet. Als Lichtquelle diente eine Halogenlampe, deren Lichtstrahl den Anregungsfilter nur im Wellenbereich von $\lambda < 488 \text{ nm}$ passieren kann. Mittels eines dichroitischen Spiegels wird das Lichtbündel gebrochen und auf den Schnitt projiziert. Das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht wird vom dichroitischen Spiegel (Wellenlänge $\lambda > 600 \text{ nm}$) nicht abgelenkt und kann von der CCD-Kamera aufgenommen werden (siehe Abb. 2.3.1). Der Schnitt wurde, wie beim Patch-Clamp-Aufbau in der Messkammer fixiert und kontinuierlich mit Standard-aCSF (2-3 ml Flussrate) umspült. Mittels einer bipolaren Wolframelektrode wurden Nervenfasern am Gyrus dentatus respektive am lateralen Nucleus der Amygdala über elektrische Rechteckimpulse (200 μs , 10- 25 V) stimuliert.

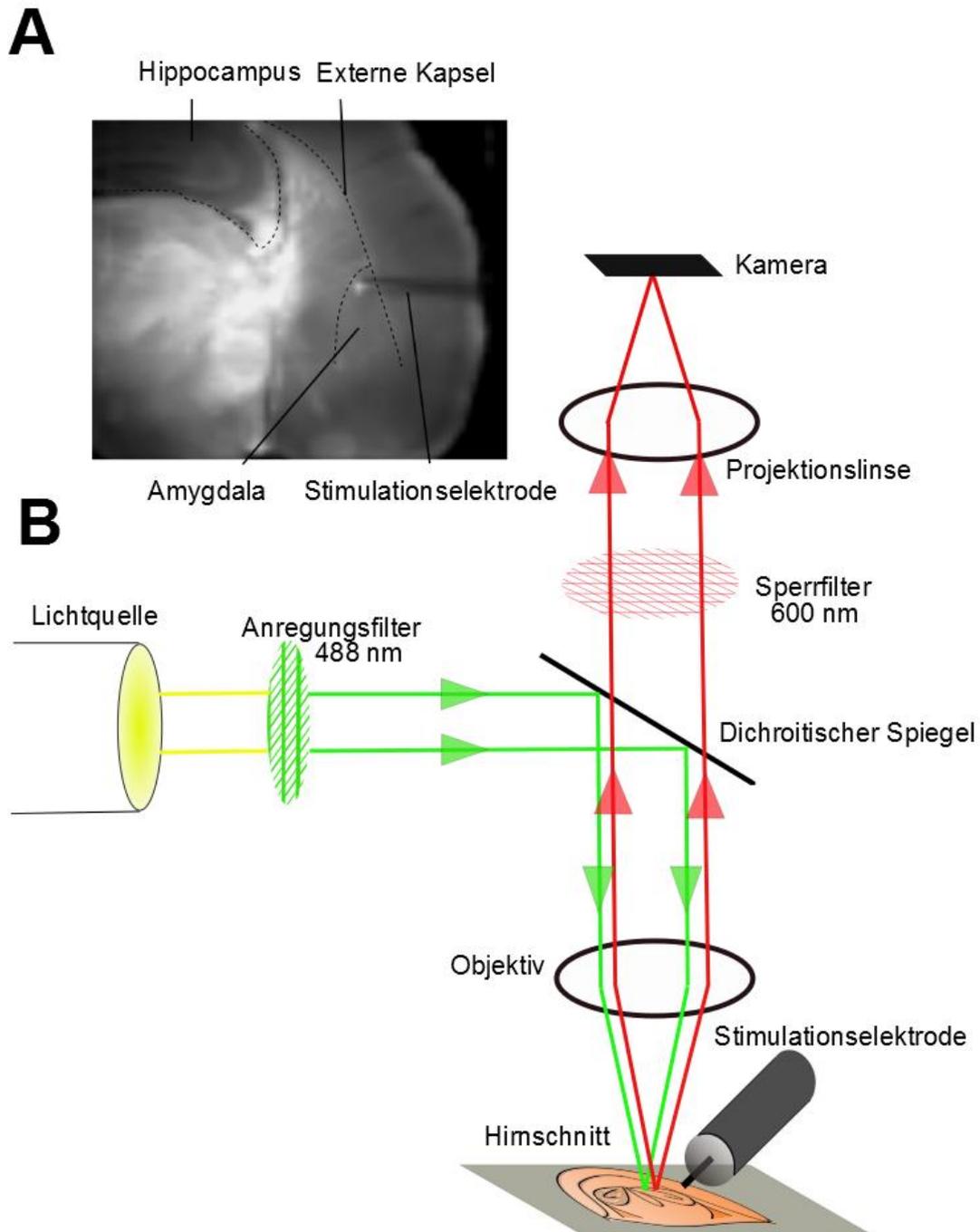


Abb. 2.3.1 Voltage Sensitive Dye Imaging Aufbau

A Stimulation der lateralen Amygdala: Für die Signalaufnahmen der basolateralen Amygdala wurde die Stimulationselektrode auf Nervenfasern in der lateralen Amygdala gesetzt **B Voltage Sensitive Dye Imaging Aufbau:** Das von der Halogenlampe emittierte Licht, kann den Anregungsfilter nur im Wellenbereich von $\lambda < 488$ nm passieren. Mittels eines dichroitischen Spiegels wird das Lichtbündel gebrochen und auf den Schnitt projiziert. Dieses kurzwellige Licht regt hier den Fluoreszenzfarbstoff an. Das vom ihm daraufhin ausgesandte langwelligere Licht kann den dichroitischen Spiegel durchdringen und wird von der CCD-Kamera aufgenommen. Mit Hilfe eines zweiten eingebrachten Filters (Sperrfilter) kann sichergestellt werden, dass nur Wellenlängen $\lambda > 600$ nm, also vom Farbstoff emittiertes Licht gemessen wird.

Die Aufnahmeeinstellungen wurden auf 88 × 60 Pixel Bildgröße, bei einer Pixelgröße von 36,4 × 40,0 µm und 2,2 ms Abtastdauer gesetzt. Die zu beobachteten Regionen, (ROI, regions of interest; je 3×3 Pixel) wurden manuell, orientiert an wichtigen anatomischen Strukturen, in der basolateralen Amygdala beziehungsweise der CA1-Region des Hippocampus, gesetzt.

2.3.3 Auswertung und Statistik

Aus den detektierten Signalen wurde die partielle Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F$) berechnet. Für weitere Betrachtungen wurden diese mit einem 3 × 3 (räumlich) × 3 (zeitlich) Filter geglättet. Um VSDI Signale graphisch darzustellen wurde ein 5 × 5 × 3 Filter angewandt. Es wurden jeweils acht aufeinanderfolgende Aufnahmen im Abstand von 15 s gemittelt. Als VSDI Messgröße der neuronalen Aktivität wurden die Amplituden der schnellen, Depolarisations-vermittelten VSDI Signale (fast, depolarisation-mediated VSDI signal, FDS) des ROIs gewählt, da diese stimulierten Signale neuronale Aktionspotentiale und exzitatorische postsynaptische Potentiale darstellen (Stepan, Dine et al. 2012).

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Effekt von TXA auf die synaptische Transmission in der basolateralen Amygdala und der CA1-Region des Hippocampus untersucht.

3.1 Messungen in der basolateralen Amygdala

3.1.1 Tranexamsäure steigert die Erregungsausbreitung im neuronalen Netzwerk

Zunächst wurden die Auswirkungen von TXA auf die neuronale Erregungsausbreitung mittels VSDI untersucht, um einen ersten Hinweis auf die Wirkungsweise der Substanz zu erhalten. Das Antifibrinolytikum wurde der rezirkulierenden aCSF in einer Konzentration von 1 mM hinzugefügt, nachdem Amplitude und Kinetik der FDS für mindestens 10 Minuten konstant waren (baseline). Die Applikation von 1 mM TXA führte zu einer Vergrößerung der FDS Amplituden auf $129,4 \pm 5,9$ % ($n=5$; $p=0,036$ Abb. 3.1.1 A,B) bezogen auf die Kontrollbedingungen. Eine weitere Steigerung der TXA-Konzentration auf 3 mM TXA in der Extrazellulärlösung erhöhte die Amplituden der FDSs auf $219,6 \pm 25,8$ % des Kontrollniveaus ($n=5$; $p=0,026$; Abb. 3.1.1 A,B). Der Effekt war bei beiden Konzentrationen reversibel. Unter dem Einfluss von 1 mM TXA ließ sich ein Überspringen der Depolarisation von der Amygdala auf den Kortex beobachten. Diese gesteigerte Ausbreitung konnte nach Beendigung der TXA-Zufuhr nicht mehr nachgewiesen werden (Abb 3.1.1 C).

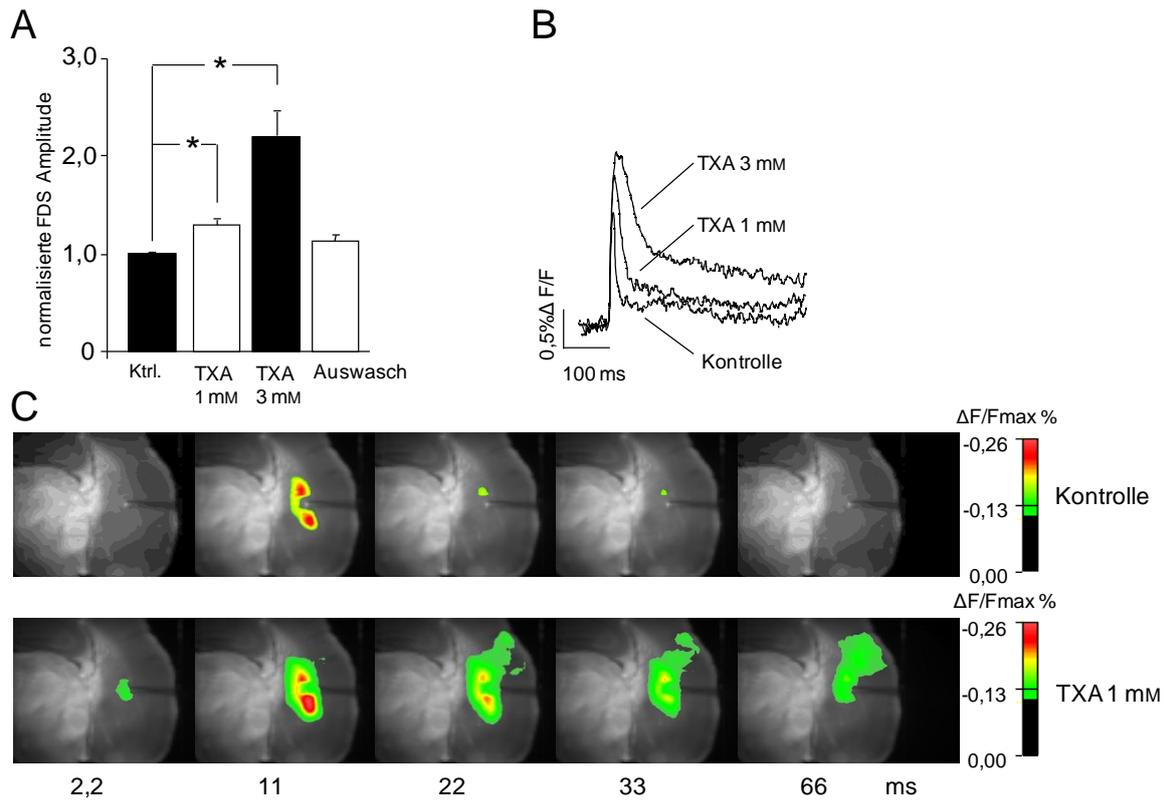


Abb. 3.1.1 Tranexamsäure zeigt eine verstärkende Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit im Voltage Sensitive Dye Imaging

Um Signale (FDS) in der BLA zu messen wurden die mit Di-4-ANEPPS angefärbten Schnitte am lateralen Nucleus der Amygdala elektrisch stimuliert. Nach Aufnahme stabiler Kontrollantworten wurde zunächst 1 mM TXA hinzugegeben und nach der vollständigen Ausprägung des Effekts die Konzentration auf 3 mM erhöht. **A** Verstärkender Effekt unterschiedlicher TXA-Konzentrationen (1 und 3 mM) auf die Amplituden der VSDI-Antworten (normalisiert): 1 mM TXA erhöhte die Amplitude auf $129,4 \pm 5,9 \%$ ($n=5$; $p=0,036$), 3 mM steigerte sie auf $219,6 \pm 25,8 \%$ ($n=5$; $p=0,026$) der Kontrolle **B** **Änderung der Fluoreszenzintensität im Zeitverlauf in einem repräsentativen Einzelexperiment** unter Kontrollbedingungen und TXA (1 mM und 3 mM) **C** **Repräsentative Aufnahmereihe** eines Experiments unter Kontrollbedingungen und 1 mM TXA: TXA-Applikation führte zu einer gesteigerten Ausbreitung neuronaler Erregung und zu kortikaler Aktivität nach Stimulation an der lateralen Amygdala.

Um den Beitrag inhibitorischer Rezeptoren an der durch TXA vermittelten, gesteigerten neuronalen Erregungsausbreitung genauer zu charakterisieren, wurde in einigen zusätzlichen Experimenten die Wirkung von TXA unter dem Einfluss entweder des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (20 μM), des GABA_B-Rezeptorantagonisten CGP35348 (200 μM) oder des Glycin-Rezeptorantagonisten Strychnin (1 μM) untersucht. TXA steigerte dabei die Amplituden der FDS unter GABA_A-Rezeptorblockade nicht weiter ($103,8 \pm 3,5 \%$ der Kontrolle; $n=7$; $p=1,000$). Dagegen hatte weder der spezifische GABA_B- noch der Glycinrezeptorantagonist Einfluss auf die Amplituden-steigernde Wirkung von TXA (Abb. 3.1.2).

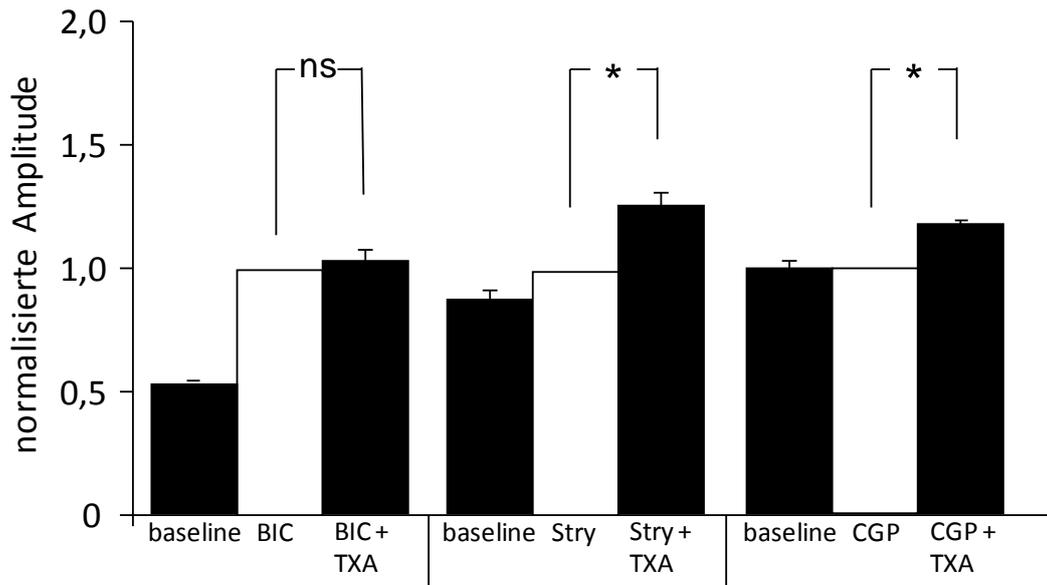


Abb. 3.1.2 Effekt von Tranexamsäure auf die VSDI Signale unter Gabe spezifischer Rezeptorantagonisten in der BLA

Nach Aufnahme konstanter Kontrollamplituden (baseline) durch elektrische Stimulation der lateralen Amygdala wurde zunächst ein spezifischer Antagonist (Bicucullin (BIC), Strychnin (Stry) oder CGP) in die rezirkulierende aCSF gegeben. Anschließend wurde zusätzlich TXA (1 mM) hinzugefügt. Während die spezifische GABA_A-Rezeptorblockade den Amplituden-verstärkenden Effekt von TXA (1 mM) verschwinden ließ, zeigten die spezifischen Rezeptorantagonisten Strychnin (1 μ M) und CGP (200 μ M) darauf keinen Einfluss.

3.1.2 Tranexamsäure zeigt keinen Effekt auf die biophysikalischen Membraneigenschaften

Um festzustellen, ob die TXA-vermittelte gesteigerte Depolarisationsausbreitung durch eine erhöhte intrinsische Erregbarkeit der Neurone zu begründen ist, wurde zunächst in Patch-Clamp-Experimenten die Auswirkung von TXA auf die biophysikalischen Membraneigenschaften untersucht. Einzelzellaufzeichnungen im Current-Clamp-Modus zeigten keinen Einfluss von 1 mM TXA auf das Ruhemembranpotential ($-57,9 \pm 3,8$ mV unter Kontrollbedingungen gegenüber $-61,0 \pm 1,6$ mV unter TXA; $n=7$; $p=0,109$; Abb. 3.1.3 A). Die durch schrittweise Strominjektion ermittelte Stromspannungsbeziehung blieb ebenfalls durch TXA unverändert (Abb. 3.1.3 B). Der Eingangswiderstand änderte sich unter 1 mM TXA ($321,4 \pm 64,2$ M Ω) nicht signifikant zu den Kontrollbedingungen ($267,1 \pm 40,2$ M Ω ; je $n=7$; $p=0,14$). Unter Ausgangsvoraussetzungen führte eine Strominjektion von +90 pA zu Aktionspotentialen mit einer mittleren Frequenz von $14,3 \pm 0,5$ Hz bei einer Amplitude von $55,5 \pm 3,1$ mV. TXA-Applikation (1 mM) hatte weder eine Auswirkung auf die Frequenz ($15,2 \pm 1,3$ Hz; $n=9$; $p=1,0$ Abb. 3.1.3 C) noch auf die Amplitude ($55,2 \pm 3,7$ mV; $n=9$; $p=0,86$). Die Schwelle für das Auftreten von Aktionspotentialen lag unter Kontrollbedingungen in Höhe von $-41,3 \pm 0,1$ mV und verschob sich nicht unter dem Einfluss von TXA ($-41,4 \pm 0,1$ mV; $n=7$; $p=0,91$ Abb. 3.1.3 D).

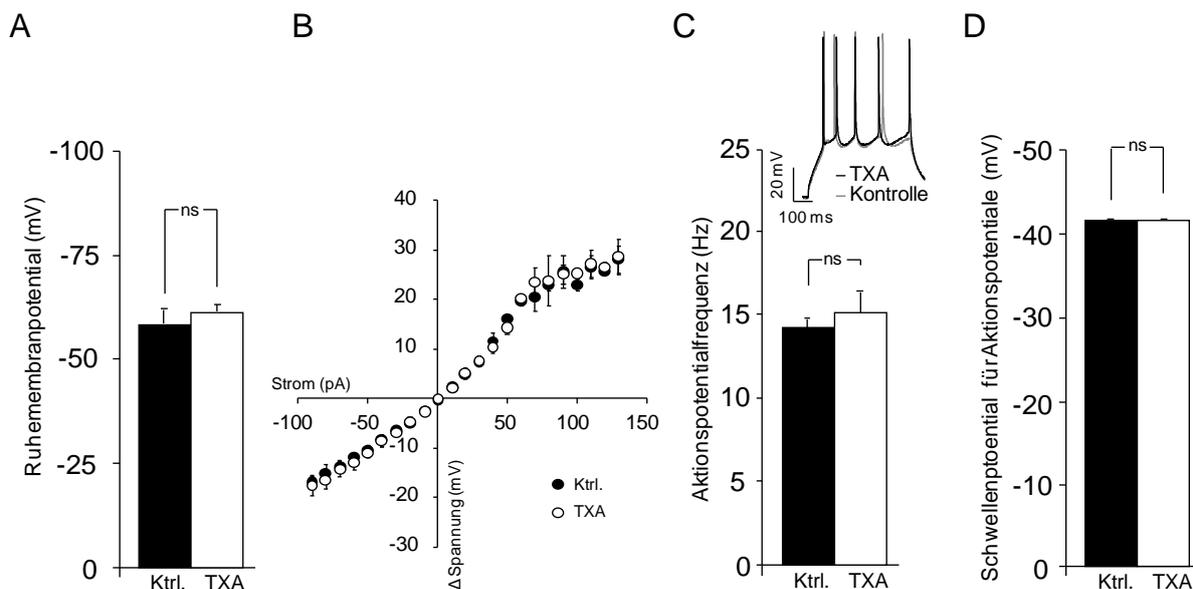


Abb. 3.1.3 Tranexamsäure zeigt keinen Einfluss auf die biophysikalischen Membraneigenschaften der Neurone der BLA in Ganzzelleableitung

Gemessen wurde mittels Patch-Clamp-Technik im Current-Clamp-Modus. **A** Die Applikation von 1 mM TXA zeigte keinen Effekt auf das Ruhemembranpotential ($-61,0 \pm 1,6$ mV) der Zelle im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Ktrl.: $-57,9 \pm 3,8$ mV; $n=7$; $p=0,109$). **B** Die durch schrittweise Depolarisation erzielte Stromspannungsbeziehung der Zellmembran wurde durch TXA nicht verändert. **C** Die Frequenz der Aktionspotentiale unterschied sich nicht signifikant unter TXA-Einfluss ($15,2 \pm 1,3$ Hz) im Vergleich zu Kontrollbedingungen ($14,3 \pm 0,5$ Hz; $n=9$; $p=1,0$) **D** Das Schwellenpotential für das Auftreten von Aktionspotentialen von $-41,3 \pm 0,1$ mV blieb unter Tranexamsäuregabe unverändert ($-41,4 \pm 0,1$ mV; $n=7$; $p=0,91$).

3.1.3 Tranexamsäure verlängert die Deaktivierungszeitkonstante der Summenströme

Da sich die in den beschriebenen VSDI-Messungen dargestellte, gesteigerte Depolarisationsausbreitung nicht durch eine Modulation der biophysikalischen Membraneigenschaften erklären lässt, könnte der gezeigte Effekt von TXA in einer verstärkten erregenden synaptischen Transmission begründet liegen. Deshalb wurden in einer nächsten Experimentenserie Ganzzelleableitungen ohne Zugabe spezifischer Rezeptorantagonisten durchgeführt, um die Wirkung von TXA auf die basale synaptische Transmission abzubilden. Die Amplitude der postsynaptischen Ströme (PSCs) blieb unter dem Einfluss von 1 mM TXA unverändert ($91,5 \pm 7,2$ % des Kontrollniveaus; $n=6$; $p=0,481$; Abb. 3.1.4 A). Dagegen verlängerte TXA die Deaktivierungszeitkonstante signifikant von $18,4 \pm 2,8$ auf $23,6 \pm 3,6$ ms ($n=6$; $p=0,032$; Abb. 3.1.4 B). Dabei vergrößerte sich auch der Ladungstransfer auf $118,7 \pm 5,3$ % ($n=6$; $p=0,023$; Abb. 3.1.4 C) des Ausgangsniveaus.

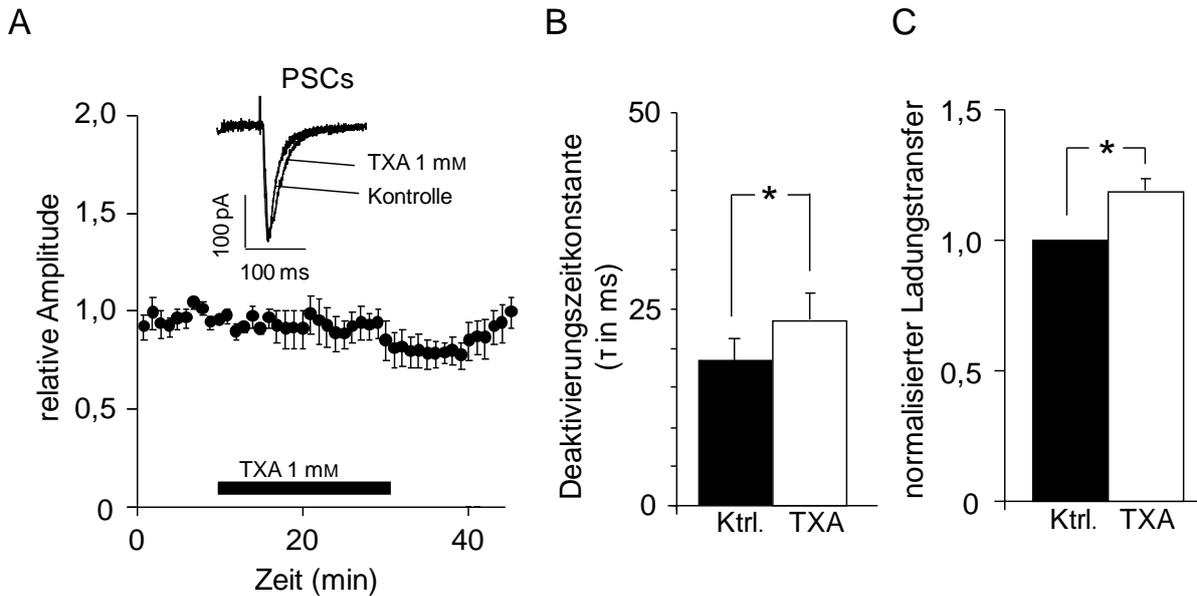


Abb. 3.1.4 Tranexamsäure (1 mM) erhöht die Deaktivierungszeitkonstante der elektrisch stimulierten Summenströme ohne einen Einfluss auf die Amplituden dieser Antworten zu haben

Nach Etablierung einer Ganzzelleableitung im Voltage-Clamp-Modus wurden ohne Zugabe spezifischer Rezeptorantagonisten Nervenfasern der externen Kapsel elektrisch stimuliert. **A** TXA zeigte keine Wirkung auf die Amplitude der elektrisch evozierten Summenströme (PSCs) in der BLA; darüber abgebildet Originalspuren **B** TXA (1 mM) verlängerte die Deaktivierungszeitkonstante auf $23,6 \pm 3,6$ ms verglichen mit $18,4 \pm 2,8$ ms unter Kontrollbedingungen ($n=6$; $p=0,032$). **C** Folglich vergrößerte sich auch der Ladungstransfer um $18,7 \pm 5,3$ % ($n=6$; $p=0,023$)

3.1.4 Die glutamaterge synaptische Transmission wird von Tranexamsäure nicht beeinflusst

Eine verlängerte Deaktivierungszeit der Summenströme PSCs lässt sich sowohl durch eine Modulation der glutamatergen als auch der GABAergen synaptischen Transmission begründen. Um den beschriebenen Effekt einer Rezeptorgruppe zuordnen zu können, wurden als erstes die glutamatergen Rezeptorsubtypen pharmakologisch isoliert und ihr Beitrag an der Wirkung von TXA auf die Deaktivierungszeit untersucht. Zunächst wurde der Einfluss von TXA auf pharmakologisch isolierte AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme untersucht. 1 mM TXA hatte weder einen Effekt auf die Amplitude der AMPA-EPSCs ($96,5 \pm 4,9$ % des Kontrollniveaus; $n=5$; $p=0,5110$; Abb. 3.1.5) noch änderten sich die Deaktivierungszeitkonstante oder der Ladungstransfer unter Substanzeinfluss (Abb. 3.1.6). In zusätzlichen Experimenten ($n=3$) wurde die TXA-Konzentration auf 5 mM erhöht: auch diese Konzentration zeigte keine Wirkung auf die genannten Parameter (Originalantwort ii siehe Abb. 3.1.5).

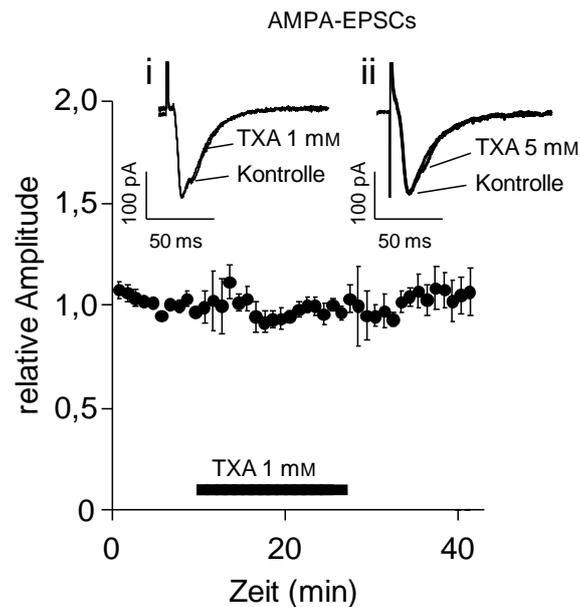


Abb. 3.1.5 Tranexamsäure zeigt keine Wirkung auf die Amplituden der elektrisch evozierten AMPA-Rezeptor-vermittelten erregenden Ströme (EPSCs)

Unter Zugabe spezifischer Rezeptorantagonisten für NMDA- (AP5 50 μM), GABA_B- (CGP 200 μM) und GABA_A-Rezeptoren (Bicucullin 20 μM) zeigte die Applikation von 1 mM TXA keine Auswirkungen auf die Amplituden der AMPA-EPSCs ($96,5 \pm 4,9$ % des Kontrollniveaus; $n=5$; $p=0,5110$). Die abgebildeten Spuren zeigen repräsentative Stromantworten einer Kontrolle mit 1 mM (i) und 5 mM (ii) TXA.

AMPA -EPSCs

	Kontrolle	TXA 1 mM
τ_{decay} (ms)	$19,7 \pm 1,0$	$19,0 \pm 1,4$ (#)
Relativer Ladungstransfer (%)	100	$103,7 \pm 15,2$ (#)

Abb. 3.1.6 Tranexamsäure (1 mM) beeinflusst weder die Deaktivierungszeitkonstante noch den Ladungstransfer der AMPA-EPSCs

nicht signifikant gegenüber der Kontrolle

Anschließend wurde der Einfluss von TXA auf NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme untersucht. Dabei zeigte sich kein Effekt von 1 mM TXA auf die Amplituden der NMDA-EPSCs ($102,5 \pm 9,3$ % des Kontrollniveaus; $n=5$; $p=0,706$; Abb. 3.1.7). Auch eine Steigerung der TXA-Konzentration auf 5 mM zeigte keine Veränderung der Amplitude. (Originalantwort ii siehe Abb. 3.1.7) Sowohl die beiden Zeitkonstanten τ_{decay} schnell und τ_{decay} langsam, als auch der Ladungstransfer blieben unter 1 mM TXA-Gabe unverändert (siehe Abb. 3.1.8).

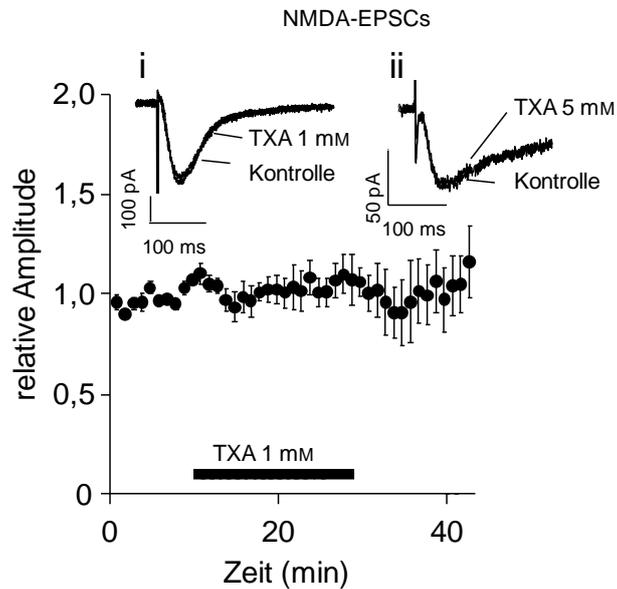


Abb. 3.1.7 Tranexamsäure (1 mM) zeigt keine Wirkung auf elektrisch evozierte NMDA-EPSCs in der basolateralen Amygdala

Gemessen wurden NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme nach Etablierung einer Ganzzelleableitung im Voltage-Clamp-Modus mithilfe elektrischer Stimulation an der externen Kapsel. 1 mM Tranexamsäure führte unter dem Einfluss der spezifischen Rezeptorantagonisten CGP (200 μM), NBQX (5 μM) und Bicucullin (20 μM) zu keiner Änderung der Amplitude ($102,5 \pm 9,3$ % des Ausgangsniveaus; $n=5$; $p=0,706$). Die abgebildeten Spuren zeigen repräsentative Stromantworten einer Kontrolle mit 1 mM (i) und 5 mM (ii) TXA.

NMDA-EPSCs

	Kontrolle	TXA 1 mM
τ_{decay} schnell (ms)	$63,1 \pm 4,2$	$63,6 \pm 3,9$ (#)
τ_{decay} langsam (ms)	$74,1 \pm 6,9$	$66,7 \pm 3,6$ (#)
Relativer Ladungstransfer (%)	100	$114,6 \pm 15,2$ (#)

Abb. 3.1.8 Tranexamsäure zeigt keinen Effekt auf die beiden Antwortparameter Deaktivierungszeitkonstante und Ladungstransfer der NMDA-EPSCs

nicht signifikant gegenüber der Kontrolle

3.1.5 GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme werden dosisabhängig von Tranexamsäure reduziert

Da die Experimente an der glutamatergen synaptischen Transmission keine Erklärung für die gesteigerte Deaktivierungszeit der PSCs unter TXA lieferten, wurden im Weiteren GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme pharmakologisch isoliert und somit die Wirkung von TXA auf die GABAerge synaptische Transmission untersucht. TXA (1 mM) verminderte die Amplituden der elektrisch evozierten GABA_A-IPSCs deutlich auf $35,9 \pm 3,2$ % des Kontrollniveaus ($n=9$; $p<0,001$; Abb. 3.1.9 A). Auch der Ladungstransfer wurde unter dieser Konzentration auf $39,9 \pm 8,4$ % ($n=9$; $p=0,008$; Abb. 3.1.10) reduziert, während die Deaktivierungszeit unverändert blieb (Abb. 3.1.10). Die Amplituden der durch photolytische Transmitterfreisetzung ausgelösten GABA_A-pCs wurden durch 1 mM TXA in vergleichbarem Ausmaß auf $40,7 \pm 5,4$ % des Ausgangsniveaus ($n=5$; $p<0,001$; Abb. 3.1.9 A) vermindert. Die Stärke der TXA-induzierten Reduktion unterschied sich bei beiden Stimulationsarten nicht signifikant. Des Weiteren wurde die Wirkung unterschiedlicher TXA-Konzentrationen (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM; $n=5-9$ für jede Konzentration) untersucht. TXA reduzierte die Amplituden der GABA_A-IPSCs und GABA_A-pCs dosisabhängig (Abb. 3.1.9 B). Die GABA_A-IPSCs wurden durch TXA mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 0,76 mM (Hill -0,8) reduziert. Die IC_{50} der GABA_A-pCs lag bei 0,84 mM (Hill -1,0, Abb. 3.1.9 B). Die Applikation von Bicucullin (20 μ M) am Ende einiger exemplarischer Experimente führte zur kompletten Blockade der Antwort.

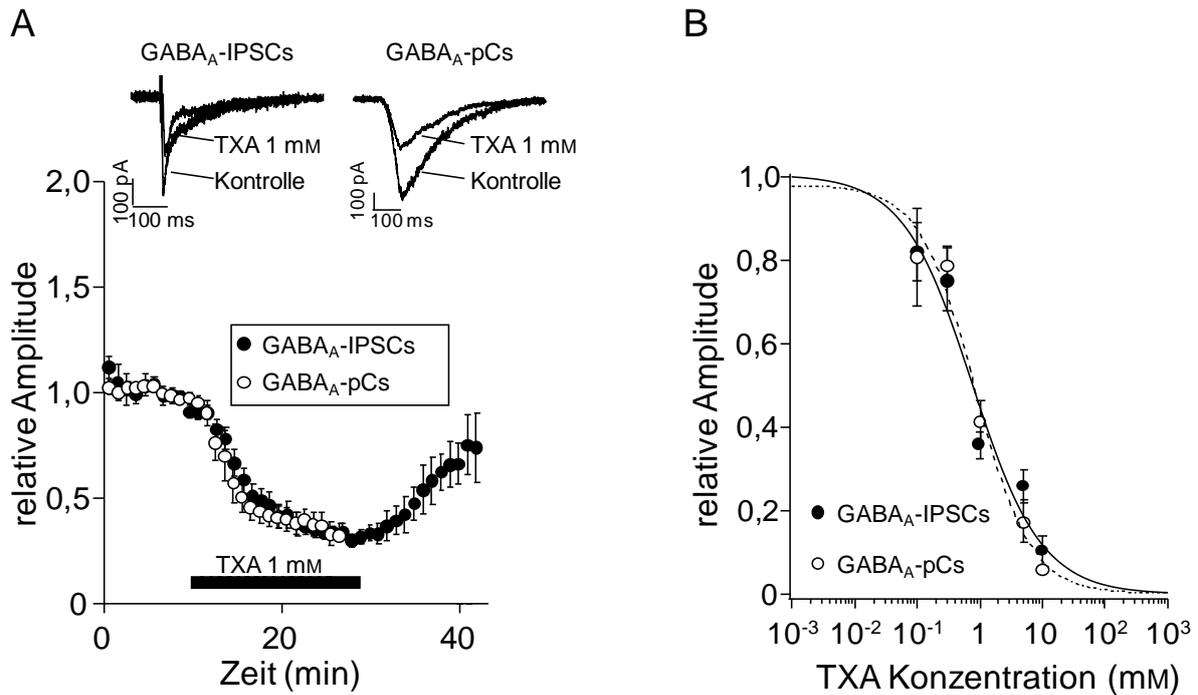


Abb. 3.1.9 Tranexamsäure verringert in der BLA dosisabhängig die Amplitude der GABA_A-IPSCs und GABA_A-pCs in vergleichbarem Ausmaß

A Abgebildet sind die Amplituden von sowohl elektrisch als auch photolytisch evozierten GABA_A-Rezeptor-vermittelten Strömen im Verlauf des Experiments, normalisiert auf die letzten fünf Minuten unter Kontrollbedingungen. Die GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme wurden durch Zugabe der spezifischen Rezeptorantagonisten CGP (200 μM), NBQX (5 μM) und AP5 (50 μM) pharmakologisch isoliert. TXA (1 mM) reduzierte die Amplitude der GABA_A-IPSCs (schwarze Punkte) auf $35,9 \pm 3,2$ % der Kontrolle ($n=9$; $p<0,001$) und die Amplitude der GABA_A-pCs (weiße Punkte) auf $40,7 \pm 5,4$ % der Kontrolle ($n=5$; $p<0,001$). Die Stärke des Effekts auf die unterschiedlichen stimulierten Ströme unterschied sich nicht signifikant. Oben: Repräsentative Stromantworten eines Experiments. **B** TXA reduzierte GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme dosisabhängig. Dargestellt sind die auf die letzten 5 Minuten der Kontrollantworten normalisierten und aus 5-9 Einzelexperimenten gemittelten Amplituden der Antworten (●GABA_A-IPSCs; ○GABA_A-pCs) unter verschiedenen TXA-Konzentrationen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der mittleren inhibitorischen Konzentration von TXA (IC_{50}) für GABA_A-IPSCs (0,76 mM) und GABA_A-pCs (0,84 mM).

GABA_A-IPSC

	Kontrolle	TXA 1 mM
τ_{decay} schnell (ms)	$21,9 \pm 2,6$	$29,7 \pm 7,8$ (#)
τ_{decay} langsam (ms)	$73,3 \pm 8,1$	$79,4 \pm 10,4$ (#)
Relativer Ladungstransfer (%)	100	$39,9 \pm 8,4$ (*)

Abb. 3.1.10 Tranexamsäure (1 mM) verringert den relativen Ladungstransfer ohne Wirkung auf die Deaktivierungszeitkonstante

* signifikant, # nicht signifikant

3.1.6 Tranexamsäure hat keinen Effekt auf die Paired Pulse Ratio

Um einen weiteren Hinweis auf den Wirkmechanismus von TXA zu erhalten, wurden im Rahmen der Ableitung von GABA_A-Rezeptor-Strömen die Zellen wiederholten Stimulationen (Interstimulusintervall 50 und 150 ms) ausgesetzt und die beiden Amplituden zueinander ins Verhältnis gesetzt (Paired Pulse Ratio, PPR). Unter dem Einfluss von TXA (1 mM) verkleinerten sich die Amplituden der beiden Antworten. Das Verhältnis änderte sich dadurch jedoch nicht signifikant (n=5 für beide Interstimulusintervalle; p=0,295 für 50 ms und p=0,517 für 150 ms; Abb. 3.1.11).

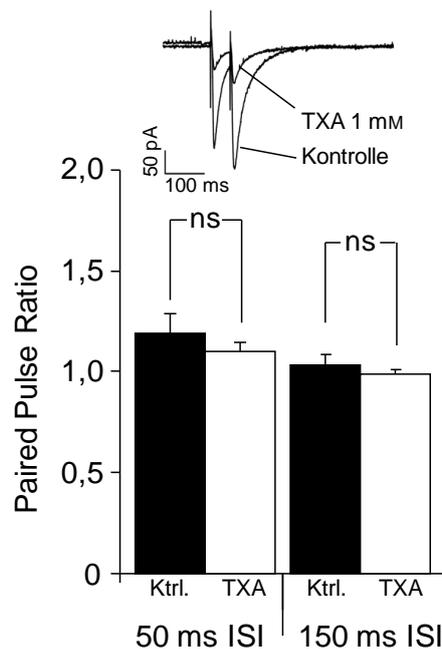


Abb. 3.1.11 Tranexamsäure (1 mM) hat keinen Einfluss auf die Paired Pulse Ratio (PPR) von GABA_A-IPSCs

Im Abstand von 15 Sekunden wurden jeweils zwei identische elektrische Stimulationen der projizierenden Nervenfasern mit einem Interstimulusintervall (ISI) von 50 ms bzw. 150 ms appliziert. Das Verhältnis der Amplitude der zweiten zur ersten Antwort wurde berechnet (PPR, Ratio) und die Ratio unter Kontrollbedingungen mit der unter TXA verglichen. Die Messung erfolgte unter den spezifischen Rezeptorantagonisten CGP (200 µM), NBQX (5 µM) und AP5 (50 µM). Sowohl für 50 ms (p=0,295; n=5) als auch für 150 ms (p=0,517; n=5) Interstimulusintervall zeigte sich unter TXA keine Veränderung der PPR.

3.2 Messungen im Hippocampus

3.2.1 Tranexamsäure erhöht die Erregungsausbreitung im Hippocampus

Um die Wirkung von TXA in einem weiteren Hirnareal zu charakterisieren, wurden Versuchsserien in der CA1-Region des Hippocampus analog zu den Experimenten in der BLA durchgeführt. Zuerst wurde mithilfe der VSDI-Technik der Effekt von TXA auf die Signalstärke quantifiziert. Dazu wurde TXA in einer Konzentration von 1 mM in die aCSF

gegeben. Dies hatte eine Steigerung der Amplitude auf $154,8 \pm 18 \%$ ($p=0,027$; $n=6$; Abb. 3.2.1 B) des Kontrollniveaus zur Folge. Die Erhöhung der TXA-Konzentration auf 3 mM führte zu einer weiteren Vergrößerung der Amplitude auf $517,5 \pm 128,5 \%$ ($p=0,023$; $n=6$; Abb. 3.2.1 B) bezogen auf die Ausgangswerte unter Kontrollbedingungen. Der Effekt war bei beiden Konzentrationen reversibel.

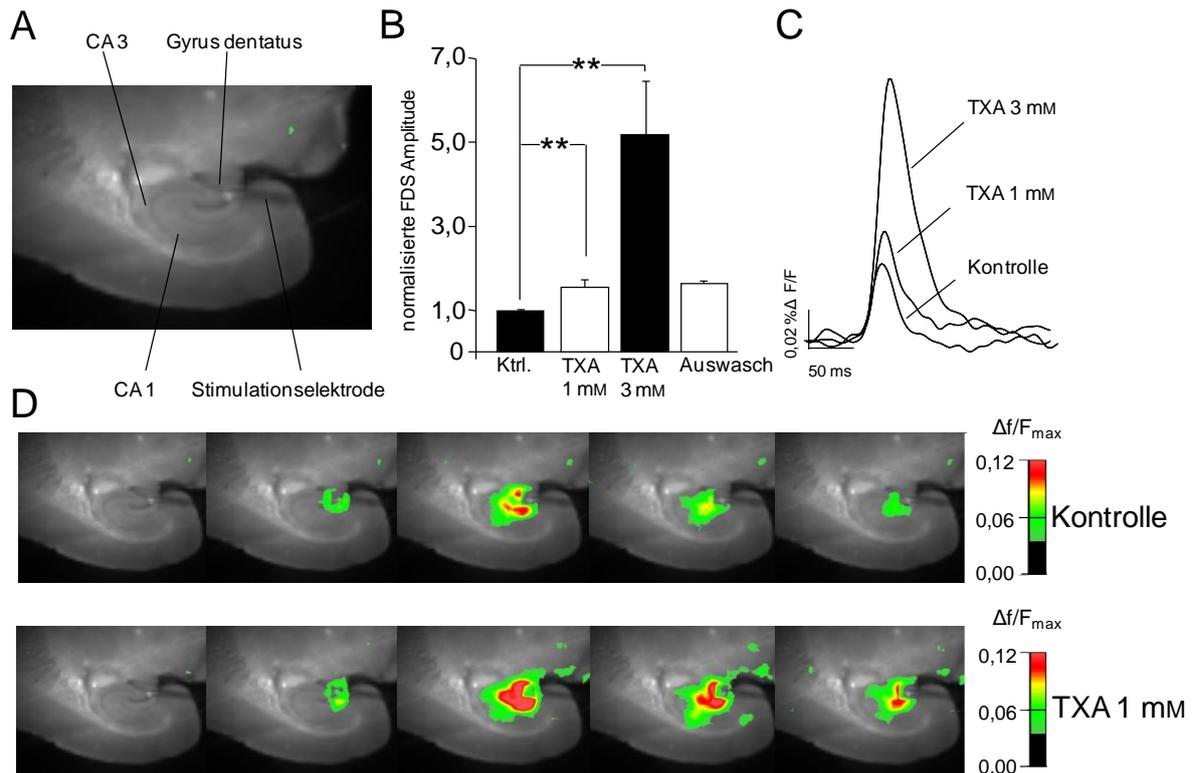


Abb. 3.2.1 Tranexamsäure (1 und 3 mM) steigert in VSDI-Experimenten die neuronale Erregungsausbreitung im Hippocampus

In mit Di-4-ANEPPS angefärbten Schnitten wurden Nervenfasern im hippocampalen Gyrus dentatus stimuliert und die dadurch erzeugten Signale (FDS) in der CA1-Region gemessen. **A Versuchsanordnung** mit anatomisch wichtigen Landmarken und der Stimulationselektrode am Gyrus dentatus **B** TXA erhöhte die Amplituden der schnellen VSDI-Signale. 1 mM TXA steigerte sie auf $154,8 \pm 18 \%$ ($p=0,027$; $n=6$), 3 mM TXA auf $517,5 \pm 128,5 \%$ ($p=0,023$; $n=6$). Der gezeigte Effekt war im Auswasch reversibel. **C Änderung der Fluoreszenzintensität** im Zeitverlauf in einem repräsentativen Einzelexperiment **D Repräsentative Aufnahmeserie**

3.2.2 Tranexamsäure hat keinen Einfluss auf die biophysikalischen Membraneigenschaften

Um eine gesteigerte intrinsische Erregbarkeit als mögliche Erklärung für die, in den VSDI-Experimenten gezeigte, erhöhte Erregungsausbreitung zu untersuchen, wurde, wie bereits in der Amygdala, der Einfluss von TXA auf die biophysikalischen Eigenschaften der neuronalen Zellmembran untersucht. In Einzelzelleitungen wurden die Neurone im Current-Clamp-

Modus durch schrittweise Strominjektionen hyper- bzw. depolarisiert und die abfallende Spannung gemessen. TXA hatte keinen Einfluss auf die so ermittelte Stromspannungskurve der abgeleiteten Neurone (Abb. 3.2.2 B). Ebenso unterschied sich das Ruhemembranpotential unter dem Einfluss von 1 mM TXA ($-57,9 \pm 7,1$ mV) nicht signifikant zu jenem unter Ausgangsbedingungen ($-59,0 \pm 6,9$ mV; $n=6$; $p=0,912$; Abb. 3.2.2 A).

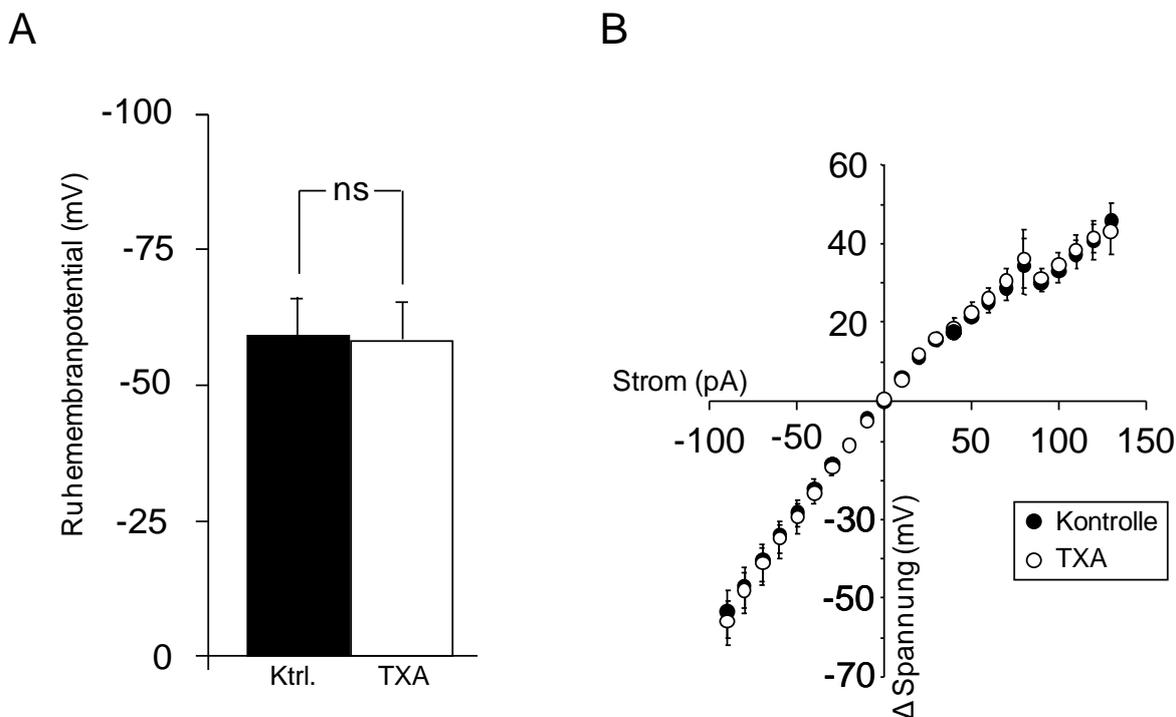


Abb. 3.2.2 Tranexamsäure (1 mM) hat keinen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der hippocampalen CA1-Neurone

Abgebildet sind die anliegenden Spannungswerte bei variabler Strominjektion gemessen im Current-Clamp-Modus. Die Versuche wurden ohne Zugabe spezifischer Rezeptorantagonisten durchgeführt. **A** Das Ruhemembranpotential wurde durch TXA nicht signifikant beeinflusst ($-57,9 \pm 7,1$ mV versus $-59,0 \pm 6,9$ mV (Kontrolle); $n=6$; $p=0,912$). **B** TXA hatte keinen Effekt auf die Stromspannungsbeziehung.

3.2.3 Tranexamsäure verlängert die Deaktivierungszeit der Summenantworten

Entsprechend der Herangehensweise in der Amygdala wurde die basale synaptische Transmission unter Tranexamsäureeinfluss untersucht. Die Amplitude der postsynaptischen Ströme (PSCs) blieb unter dem Einfluss von 1 mM TXA unverändert ($94,0 \pm 5,6\%$ des Kontrollniveaus; $n=7$; $p=0,694$; Abb. 3.2.3 A). Dagegen verlängerte 1 mM TXA die Deaktivierungszeitkonstante signifikant von $17,9 \pm 1,7$ ms unter Kontrollbedingungen auf $22,3 \pm 2,3$ ms ($n=5$; $p=0,043$; Abb. 3.2.3 B). Der Ladungstransfer der Antworten zeigte keine signifikante Änderung unter der Applikation von TXA ($n=5$; $p=0,406$; Abb. 3.2.3 C).

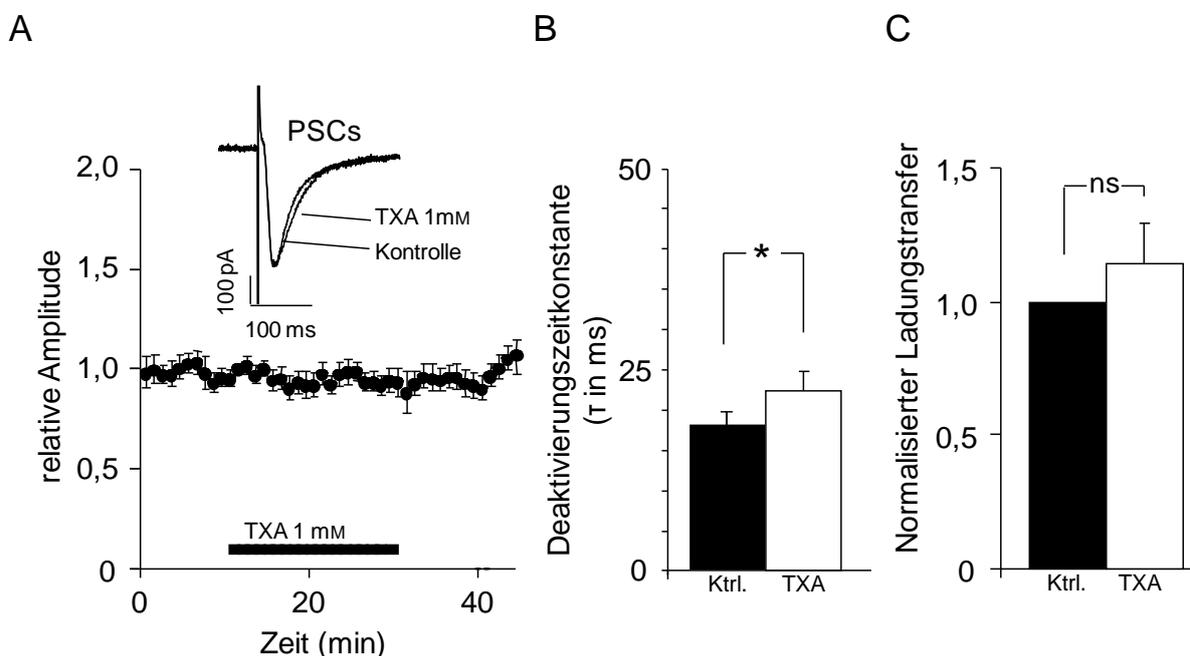


Abb. 3.2.3 Tranexamsäure vergrößert die Deaktivierungszeit der Summenantworten (PSCs) ohne die Amplituden oder den Ladungstransfer zu beeinflussen

Die Einzelzelleableitungen wurden an Neuronen der CA1-Region etabliert und die Antworten mittels elektrischer Stimulation der projizierenden Nervenfasern erzeugt. Die Messungen erfolgten ohne spezifische Rezeptorantagonisten **A** TXA zeigte keinen Effekt auf die Amplituden der PSCs ($94,0 \pm 5,6\%$ des Kontrollniveaus; $n=7$; $p=0,694$) **B** TXA verlängerte die Deaktivierungszeitkonstante von $17,9 \pm 1,7$ ms auf $22,3 \pm 2,3$ ms. **C** Der Ladungstransfer zeigte unter 1 mM TXA die Tendenz zum Anstieg ($114,3 \pm 15,4\%$ versus Kontrolle), diese war jedoch nicht signifikant ($n=5$; $p=0,406$).

3.2.4 Tranexamsäure hat keinen Einfluss auf die glutamaterge synaptische Transmission

Die verlängerte Deaktivierungszeit der Summenströme (PSCs) konnte in der Amygdala nicht durch die Beeinflussung der glutamatergen Transmission erklärt werden. Analog wurden nun an hippocampalen Neuronen glutamaterge Rezeptorsubtypen pharmakologisch isoliert und damit ihr Beitrag an der TXA-induzierten Wirkung auf die Deaktivierungszeit untersucht. Die Ströme wurden elektrisch evoziert und mithilfe von Einzelzelleableitungen der Patch-Clamp-Technik untersucht. TXA (1 mM) hatte keine signifikante Wirkung auf die Amplituden AMPA-Rezeptor-vermittelter Stromantworten ($100,9 \pm 4,6\%$ des Kontrollniveaus; $n=7$; $p=0,748$ Abb. 3.2.4 A). NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden durch 1 mM TXA ebenfalls nicht verändert (Amplitude: $101,8 \pm 7,0\%$ des Kontrollniveaus; $n=7$; $p=0,395$; Abb. 3.2.4 B).

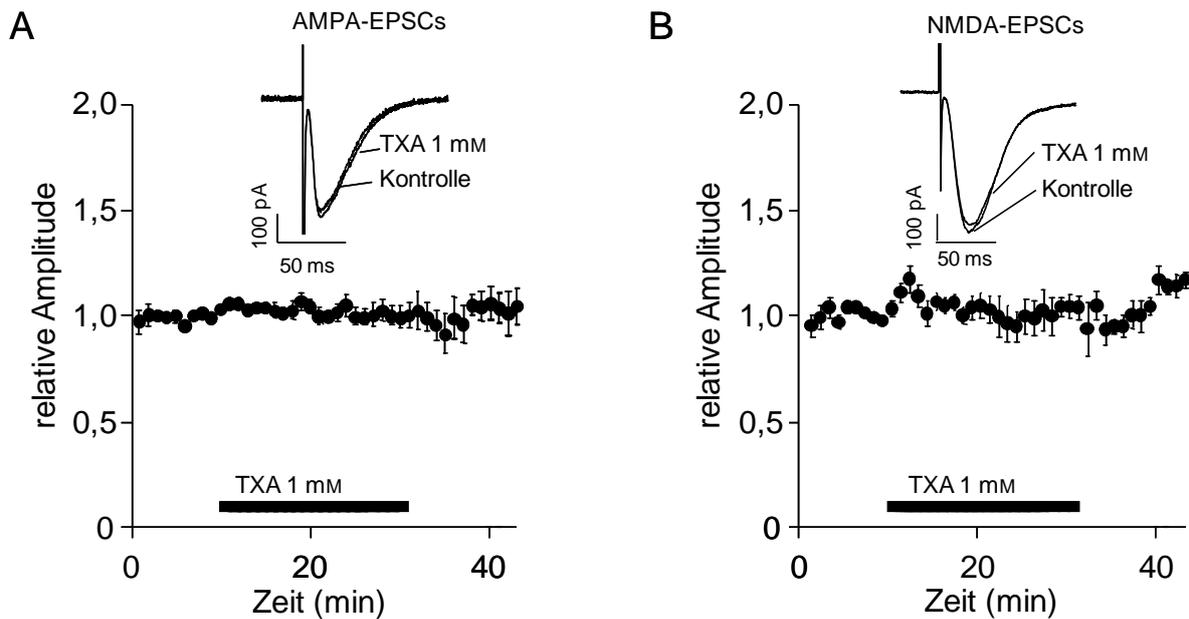


Abb. 3.2.4 Tranexamsäure hat keinen Einfluss auf die Amplituden der glutamaterg-vermittelten Ströme

AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelte Antworten wurden pharmakologisch isoliert und in der CA1-Region mittels elektrischer Stimulation evoziert. **A** Die Amplituden AMPA-Rezeptor-vermittelter Ströme (AMPA-EPSCs) wurden durch 1 mM TXA nicht beeinflusst ($100,9 \pm 4,6\%$ des Kontrollniveaus; $n=7$; $p=0,748$). **B** Auch bei NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen zeigte sich keine Änderung der Amplitude unter 1 mM TXA ($101,8 \pm 7,0\%$ der Kontrolle; $n=7$; $p=0,395$).

3.2.5 Tranexamsäure inhibiert die Amplituden GABA_A-Rezeptor-vermittelter Ströme dosisabhängig

Wie in den Versuchen in der Amygdala wurde der Effekt von TXA auf die GABAerge synaptische Transmission im Hippocampus gemessen. Für die Konzentration von 1 mM zeigte sich eine deutliche Reduktion der elektrisch evozierten Amplituden auf $37,5 \pm 3,1\%$ der Kontrolle ($n=7$; $p<0,001$; Abb. 3.2.5 A). Auch im Hippocampus erwies sich die TXA-bedingte Reduktion der GABA_A-IPSCs als dosisabhängig (Abb. 3.2.5 B). Die ermittelte IC₅₀ liegt für hippocampale Neurone bei 0,47 mM (Hill -0,78) und unterscheidet sich damit nicht signifikant von der in der Amygdala ermittelten mittleren inhibitorischen Wirkkonzentration ($p=0,21$). Die Applikation von Bicucullin (20 μM) am Ende einiger exemplarischer Experimente führte zur kompletten Blockade der Antwort.

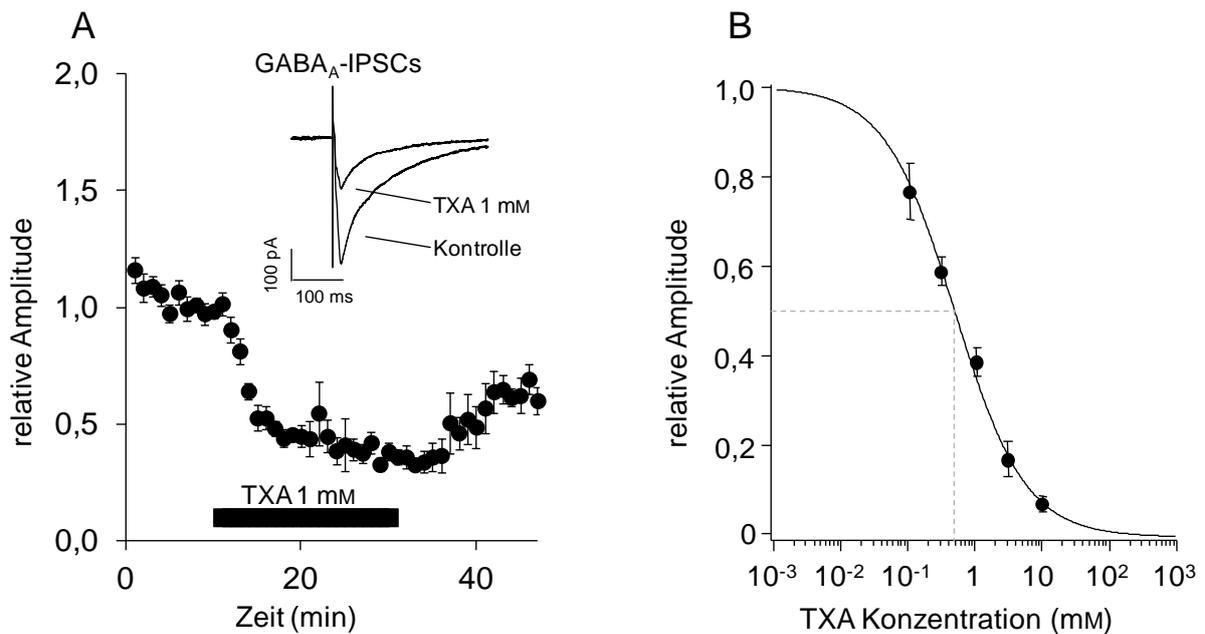


Abb. 3.2.5 Tranexamsäure verringert dosisabhängig die Amplitude der GABA_A-IPSCs

A Abgebildet sind die Amplituden der elektrisch evozierten GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme in der CA1-Region des Hippocampus. Die Ströme der Einzelzelleableitungen im Voltage-Clamp-Modus wurden durch Zugabe der spezifischen Rezeptorantagonisten CGP (200 μM), NBQX (5 μM) und AP5 (50 μM) pharmakologisch isoliert. 1 mM TXA reduzierte die Amplitude der GABA_A-Antworten auf $37,5 \pm 3,1$ % der Kontrolle ($n=7$; $p<0,001$). Oben abgebildet: repräsentative Antworten aus einem Einzelexperiment **B** TXA reduziert GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme dosisabhängig. Dargestellt sind die auf die letzten 5 Minuten der Kontrollantworten normalisierten und aus 5-9 Einzelexperimenten gemittelten Amplituden der Antworten unter verschiedenen TXA-Konzentrationen. Die mittlere inhibitorische Konzentration von TXA (IC_{50}) lag bei 0,47 mM. Damit unterscheidet sie sich nicht signifikant zur IC_{50} in der BLA ($p=0,21$; siehe Abb. 3.1.9).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TXA in vitalen Mäusehirnschnitten die neuronale Erregbarkeit sowohl in der basolateralen Amygdala als auch im Hippocampus erhöht. TXA hatte dabei weder einen Einfluss auf die passiven elektrischen Eigenschaften der Neurone, noch ließen sich Effekte auf die glutamaterge Übertragung feststellen. Stattdessen zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der GABAergen Transmission, wahrscheinlich über einen Antagonismus an postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren.

4.1 Pharmakologischer Wirkmechanismus

Die neuronale Erregbarkeit, also die Voraussetzung für das Generieren von Aktionspotentialen als Reaktion auf Veränderungen des Membranpotentials, wird von unterschiedlichen Ionenkanälen dynamisch reguliert. Ein Eingreifen in dieses Gleichgewicht kann das Auftreten von Aktionspotentialen begünstigen und die Zelle damit anfällig für epileptiforme Entladungen machen. Es wundert also nicht, dass epileptische Krampfanfälle durch eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit gekennzeichnet sind (Chang und Shyu 2014). Der Wirkstoff 4-Aminopyrimidin (4AP) blockiert selektiv spannungsabhängige Kaliumkanäle, die zu einem auswärts gerichtetem Kaliumstrom führen (I_A) (Chang und Shyu 2014; Gean und Shinnick-Gallagher 1989) und führt in vitro (Gean und Shinnick-Gallagher 1989) sowie in vivo (Chang und Shyu 2014) zu epileptiformen neuronalen Entladungen. Gean et al. konnten in der basolateralen Amygdala zeigen, dass 4AP das Schwellenpotential für das Auftreten von Aktionspotentialen erniedrigt und die Aktionspotentiale eine erhöhte Amplitude und Dauer aufweisen. Weiterhin verhindert der Kaliumkanalantagonist die Frequenzadaptation des Neurons unter einer langen (500 ms) depolarisierenden Strominjektion und führt damit zu anhaltenden Entladungssalven oder zu einer erhöhten Frequenz der ersten auftretenden Aktionspotentiale (Gean und Shinnick-Gallagher 1989).

Auch die Blockade von Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen (I_{AHP}), welche mitverantwortlich für die Nachhyperpolarisation des Neurons (Afterhyperpolarisation, AHP) sind, führt über eine reduzierte Frequenzadaptation zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit (Gean und Shinnick-Gallagher 1989).

Da der Einfluss von TXA weder Auswirkungen auf die Aktionspotentialfrequenz, die Amplitude noch das Schwellenpotential hatte, scheint eine Blockade der genannten Kaliumkanäle unwahrscheinlich.

Weitere spannungsunabhängige Kaliumkanäle, die sogenannten Hintergrund-Kaliumkanäle sind mitbeteiligt am Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials. Ihre Aktivität scheint stark mit der zellspezifischen Erregbarkeit assoziiert zu sein, da viele physikalische Einflüsse wie pH und Temperatur durch sie integriert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Kanäle pharmakologisches Ziel z.B. für volatile Anästhetika sind (Lesage 2003). TXA zeigt keine signifikanten Veränderungen des Ruhemembranpotentials, was gegen eine Modulation dieser Kaliumkanäle spricht.

Neurochemisch betrachtet entsprechen epileptische Entladungen einer Imbalance zwischen hemmender und erregender Transmission. Die wichtigsten Vertreter dieser physiologischerweise in Balance stehender Transmittersysteme sind das glutamaterge und GABAerge System (Raol, Lynch et al. 2001). Dementsprechend können mithilfe der GABA-Rezeptorantagonisten Picrotoxin (Cain 1987) oder Bicucullin (Joshi, Rajasekaran et al. 2013) ebenso wie durch die Applikation von Kainsäure, einem Agonisten am glutamatergen System Krampfanfälle generiert werden (Raol, Lynch et al. 2001; Holtkamp und Meierkord 2007). Somit bilden GABA-Rezeptoren bedeutende pharmakologische Ziele sowohl in der Therapie des Status epilepticus (Benzodiazepine, Barbiturate) als auch der Anfallsprophylaxe (Holtkamp und Meierkord 2007). Antagonisten an NMDA-Rezeptoren (Ketamin, MK-801) zeigen im Tiermodell (in vitro) eine starke antiepileptische Wirkung (Holtkamp und Meierkord 2007). Klinisch relevant scheint eine NMDA-Rezeptorblockade bisher nur bei Felbamat und in hohen Dosen bei Propofol (Holtkamp und Meierkord 2007). AMPA-Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle in der Ausbreitung der Krampfanfälle, und Kainatrezeptoren tragen besonders in den für Epilepsie anfälligen limbischen Strukturen zur glutamatergen neuronalen Exzitation bei. Diese ionotropen Rezeptoren werden in hohen Konzentrationen durch das Antiepileptikum Topiramamat antagonisiert. (Zusammenfassend aus Holtkamp und Meierkord 2007.)

Für beide Transmittersysteme wurden in dieser Arbeit die entsprechenden Rezeptortypen pharmakologisch isoliert und die durch sie vermittelten Ströme unter dem Einfluss von TXA untersucht.

TXA scheint keinen Einfluss auf die AMPA-vermittelten Ströme in den hier untersuchten Hirnarealen zu haben, da weder in der Amygdala noch im Hippocampus die Amplitude, die Deaktivierungszeitkonstante oder der Ladungstransfer durch TXA signifikant verändert wurden. Die beobachtete prokonvulsive Wirkung von TXA kann somit nicht durch eine gesteigerte AMPA-Rezeptoraktivität erklärt werden.

Auch die in dieser Arbeit betrachteten Parameter der Stromantworten durch NMDA-Rezeptoren wurden von TXA nicht signifikant verändert. Damit scheinen auch diese nicht

relevant zu den durch TXA ausgelösten Veränderungen in den VSDI-Experimenten und den Summenantworten beizutragen.

Eine Interaktion von TXA mit Kainatrezeptoren lässt sich mit den vorliegenden Experimenten nicht komplett ausschließen. Da Kainatrezeptoren jedoch bei der schnellen exzitatorischen synaptischen Transmission, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, nur von untergeordneter Bedeutung sind (Vignes und Collingridge 1997; Cossart, Epsztein et al. 2002), ist eine solche Interaktion als Ursache für die beobachtete gesteigerte Erregbarkeit unter TXA sehr unwahrscheinlich.

Unter dem Einfluss von TXA zeigte sich bei GABA_A-Rezeptor-vermittelten postsynaptischen Strömen eine signifikante Reduktion der Amplitude und des Ladungstransfers. Die in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte Erregungsausbreitung könnte demnach durch die verringerte hemmende Transmission und dem darausfolgenden Überwiegen exzitatorischer Signale verursacht werden. Ein Antagonismus an GABA_A-Rezeptoren würde analog zur Wirkweise und Klinik von Bicucullin die bei Patienten auftretenden Krampfanfälle nach Hochdosierung von TXA erklären. Der Vergleich der IC₅₀ beider hier untersuchten Hirnarealen (Amygdala: 0,76 mM; Hippocampus: 0,47 mM) ergab keinen signifikanten Unterschied.

Durch die Photolyse wurden ausschließlich GABA-Moleküle als Transmitter freigesetzt und diese erzeugten unter GABA_B-Rezeptorblockade GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme, welche durch TXA verringert wurden. Die komplette Blockade dieser pharmakologisch isolierten GABA_A-Rezeptor-vermittelten Antworten durch Bicucullin am Ende einiger exemplarischer Experimente spricht dafür, dass tatsächlich ausschließlich GABA_A-Rezeptoren zur gemessenen Stromantwort beitragen und damit für den beobachteten TXA-Effekt verantwortlich sind. Jeweils zum Ende des Versuchs und nach pharmakologischer Isolation einer der anderen Rezeptoren wurde in mehreren, hier nicht gezeigten Patch-Clamp-Experimenten der fehlende spezifische Antagonist hinzugefügt und damit eine komplette Blockade der postsynaptischen Antworten verzeichnet. Somit scheinen nur die von uns betrachteten Rezeptortypen (NMDA, AMPA, GABA_A, GABA_B) Anteil an den gemessenen Strömen gehabt zu haben, was in Einklang mit anderen Untersuchungen an der Amygdala steht (Ranft, Kurz et al. 2004).

Dysfunktionen von spannungsabhängigen Natriumkanälen, welche physiologischerweise die Depolarisation eines Aktionspotentials vermitteln, können die Ursache für angeborene Epilepsie und andere vererbte neuronale Übererregbarkeiten sein (Catterall 2014). Die Antiepileptika Phenytoin, Lamotrigin und Carbamazepin wirken vornehmlich über einen Antagonismus an Natriumkanälen (Holtkamp und Meierkord 2007). Ebenso geht die Absence, eine Epilepsieform, mit einer Pathologie an spannungsabhängigen Kalziumkanälen

einher, welche ebenfalls als therapeutisches Ziel einiger Antiepileptika dienen (Holtkamp und Meierkord 2007). Die Wirkung von TXA an Natrium- und Kalziumkanälen, metabotropen Glutamatrezeptoren, ebenso wie auf andere Neurotransmitter und Monoamine wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Ob TXA also mit diesen Strukturen interagiert, und inwiefern eine solche Interaktion unter Umständen an der TXA-bedingten Hyperexzitabilität beteiligt ist muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.2 Zugrundeliegender postsynaptischer Mechanismus der verminderten GABAergen Transmission

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine Interaktion von TXA mit der GABA_A-Rezeptor-vermittelten inhibitorischen synaptischen Transmission. Diese kann prinzipiell über präsynaptische (z.B. Hemmung der GABA-Freisetzung) und/oder postsynaptische Mechanismen (z.B. direkter Antagonismus von TXA am GABA_A-Rezeptor) erfolgen. Zur Differenzierung wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente mit photolytischer Transmitterfreisetzung und Paired Pulse Stimulation durchgeführt.

Durch photolytische Transmitterfreisetzung hervorgerufene Stromantworten sind weitgehend unabhängig von Mechanismen der präsynaptischen Transmitterfreisetzung (Rammes, Eder et al. 2007; Dodt, Eder et al. 1999). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der GABA_A-pCs unter TXA fand daher höchstwahrscheinlich auf postsynaptischer Ebene statt. Zusätzliche präsynaptische Mechanismen von TXA sind durch diesen Befund alleine jedoch noch nicht ausgeschlossen. Erst der quantitative Vergleich dieser Ergebnisse mit der Wirkung von TXA auf elektrisch evozierte GABA_A-IPSCs, welche grundsätzlich über prä- und postsynaptische Mechanismen erfolgen kann, erlaubt hierzu eine Aussage. Da TXA beide Antworttypen in vergleichbarem Ausmaß reduzierte, scheint eine zusätzliche präsynaptische Wirkung von TXA unwahrscheinlich.

Ein weiteres elektrophysiologisches Verfahren, welches Hinweise auf prä- versus postsynaptische Wirkmechanismen liefert, ist die sog. Paired Pulse Stimulation. Eine wiederholte (paired) Stimulation an Synapsen kann zu einer Modulierung der postsynaptischen Ströme führen. Sie stellt damit eine einfache Form kurzzeitiger, neuronaler Plastizität dar, typischerweise mit einer Dauer in der Größenordnung von hundert Millisekunden (Kravchenko, Moskalyuk et al. 2006; Zucker und Regehr 2002). Das Verhältnis der beiden so erworbenen Stromantworten zueinander wird als Paired Pulse Ratio (PPR) bezeichnet. Abhängig von der Wahrscheinlichkeit für die Transmitterfreisetzung einer Synapse spricht man von „low P“ (geringe Wahrscheinlichkeit) bzw. „high P“ (hohe Wahrscheinlichkeit) (Thomson 2000). Ein wiederholter Stimulus führt an „low P“-Synapsen zu einer Vergrößerung der Amplitude der zweiten postsynaptischen Antwort im Vergleich zur

ersten (Facilitation, PPF), während dieser bei einer „high P“-Synapse zu einer Verkleinerung der zweiten Antwort führt (Depression, PPD) (Fortune und Rose 2001; Thomson 2000; Kravchenko, Moskalyuk et al. 2006). Die stärkere zweite Antwort bei der PPF wird dabei auf präsynaptische Effekte, wie das Akkumulieren von freien intrazellulären Kalziumionen und einer erhöhten Transmitterfreisetzung zurückgeführt (Zucker und Regehr 2002). Bei der PPD hingegen kommen unterschiedliche Erklärungen für die reduzierte zweite Antwort in Frage: Zum einen können schon beim ersten Reiz so viele Vesikel ausgeschüttet werden, dass beim Eintreffen des zweiten Aktionspotentials nur noch wenige zur Verfügung stehen. Eine weitere Möglichkeit stellt die negative Rückkopplung durch Aktivierung präsynaptischer Rezeptoren oder eine Desensibilisierung der postsynaptischen Rezeptoren dar (Zucker und Regehr 2002).

Die Ratio bei einer PPD kann also sowohl durch prä- als auch postsynaptische Mechanismen eines Wirkstoffs verändert werden, während eine Substanz-bedingte Veränderung der Ratio bei der PPF für einen reinen präsynaptischen Mechanismus der Substanz spricht (Zucker und Regehr 2002). Im Umkehrschluss lässt im Falle einer PPF eine Wirkstoff-bedingte gleich starke Reduktion beider Antworten, d.h. eine unveränderte Ratio, auf einen postsynaptischen Mechanismus schließen. Eine Reduktion des extrazellulären Kalziums verschiebt die Paired Pulse Modulation in Richtung Facilitation (Kravchenko, Moskalyuk et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die Paired Pulse Experimente daher bei einer niedrigen extrazellulären Ca^{2+} Konzentration (0,5 mM) durchgeführt. Es zeigte sich unter 1 mM TXA eine im Verhältnis unveränderte Reduktion beider Antworten d.h. eine gleichbleibende PPR. Dies kann als weiterer Hinweis für einen postsynaptischen Wirkmechanismus von TXA gewertet werden.

4.3 Vereinbarkeit mit bisherigen Studien

Der hier gezeigte hemmende Effekt von TXA auf die GABAerge synaptische Transmission steht im Einklang mit den Ergebnissen von Furtmüller et al. und Lecker et al., die einen kompetitiven Antagonismus von TXA am GABA_A -Rezeptor beschrieben. Versuche an transfizierten HEK-Zellen lieferten eine mittlere inhibitorische Konzentration von 7,1 mM (Furtmüller, Schlag et al. 2002). Lecker et al. führten ihre Patch-Clamp-Ableitungen an Zellkulturen embryonaler kortikaler und spinaler Neurone durch. In dieser Arbeit wird die IC_{50} von TXA am GABA_A -Rezeptor mit $1,5 \pm 0,1$ mM angegeben (Lecker, Wang et al. 2012). Beide Arbeiten ermittelten also eine höhere IC_{50} verglichen mit den Werten aus den hier beschriebenen Experimenten (Amygdala: 0,76 mM; Hippocampus: 0,42 mM). Diese quantitative Diskrepanz lässt sich am ehesten durch eine unterschiedliche Untereinheiten-zusammensetzung der jeweils untersuchten GABA_A -Rezeptoren erklären. Während Furtmüller et al. an Expressionssystemen mit $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -Rezeptoren gemessen haben, wurden

die hier beschriebenen Experimente in Hirnarealen mit nativer, d.h. verschiedener Untereinheitenzusammensetzung durchgeführt. Experimente im akuten Schnittpräparat spiegeln die Verteilung und Kombinationen der verschiedenen Untereinheiten der in vivo Situation besser wider als künstliche Expressionssysteme. In beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hirnarealen zeigt sich eine starke Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit (Heldt und Ressler 2007). Monosynaptische inhibitorische Ströme in der basolateralen und lateralen Amygdala werden überwiegend, in der zentralen Amygdala beinahe ausschließlich durch $\alpha 2$ -Untereinheiten enthaltende GABA_A-Rezeptoren vermittelt. In der BLA spielen in geringerem Ausmaß auch Rezeptoren mit $\alpha 1$ -Untereinheiten eine Rolle (Marowsky, Fritschy et al. 2004). Dementsprechend sind die in unseren Experimenten abgeleiteten inhibitorischen Ströme wahrscheinlich stärker durch $\alpha 2$ -Untereinheiten enthaltende Rezeptoren vermittelt. Die Untereinheitenzusammensetzung im Kortex, aus dem die Neurone der Studie von Lecker et al. stammten, ist wie in Abb. 4.3.1 gezeigt, durch einen geringeren Anteil an $\alpha 2$ geprägt.

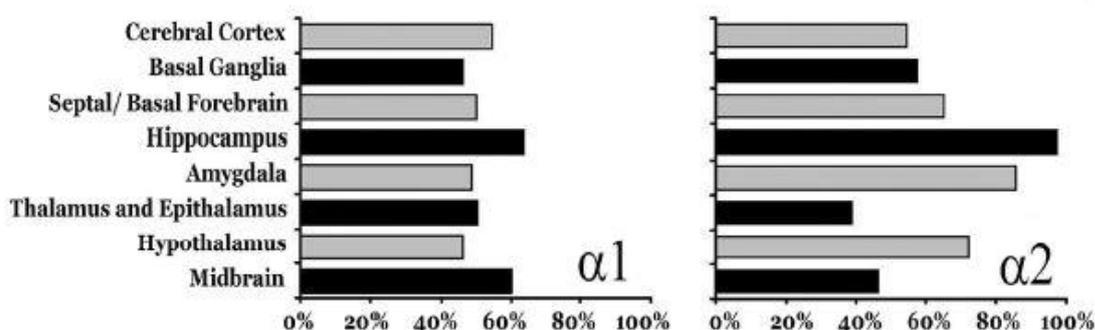


Abb. 4.3.1 Verteilung der beiden GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in verschiedenen Hirnregionen der Maus

Dargestellt werden die prozentualen Anteile der Untereinheiten an der Gesamtsignalstärke in einer mRNA-Hybridisierungsmethode. Abb. aus Heldt und Ressler 2007.

Die Untereinheiten-Zusammensetzung eines Rezeptors hat einen entscheidenden Einfluss auf dessen pharmakologische Eigenschaften. So binden beispielsweise Benzodiazepine hauptsächlich an GABA_A-Rezeptoren mit bestimmten α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) (Sieghart, Ramerstorfer et al. 2012) und zeigen damit eine unterschiedliche Affinität im Vergleich zu den Benzodiazepin-insensitiven Unterheiten $\alpha 4$ und $\alpha 6$ (Rudolph, Crestani et al. 1999). Möglicherweise unterscheiden sich GABA_A-Rezeptoruntereinheiten auch bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber TXA. Um dies zu prüfen, könnten Experimente in der zentralen Amygdala, die einen noch höheren Anteil des $\alpha 2$ -Rezeptorsubtyps aufweist, durchgeführt werden. Eine geringere, als die von uns beschriebene IC₅₀ würde folglich dafür sprechen, dass TXA eine stärkere Affinität zur $\alpha 2$ -Untereinheit hat. Alternativ ließe sich die Affinität auch mithilfe von Ligandenbindungstests untersuchen.

Zusätzlich scheinen die beiden GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ unterschiedlich stark am Entstehen von Krampfanfällen beteiligt zu sein. Tierexperimentell konnte eine Studie an $\alpha 1$ -Knockout Mäusen zeigen, dass diese eine signifikant erniedrigte Schwelle für Bicucullin-induzierte Krampfanfälle verglichen mit dem Wildtyp aufwiesen (Kralic, Korpi et al. 2002). Ratten, die resistent gegenüber Kindling in der Amygdala waren, zeigten eine Hochregulation von $\alpha 1$ -Untereinheiten, während die dafür anfälligen Tiere eine verminderte Expression dieser Untereinheit aufwiesen (Holtkamp und Meierkord 2007). Ein Vergleich der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten von Patienten mit Temporallappenepilepsie auf dem Boden einer Hippocampussklerose mit gesunden Kontrollen konnte zeigen, dass im sklerotischen, epileptischen Hippocampus ein verändertes Expressionsmuster der Untereinheiten vorliegt. Während die Verteilung der $\alpha 2$ -Untereinheiten an den Körnerzellen lokal u.a. durch Hochregulation an den Somata verändert werden, kommt es zu einem massiven Verlust von $\alpha 1$ -exprimierenden Interneuronen (Loup, Wieser et al. 2000). Der anxiolytische Effekt von Diazepam wird durch $\alpha 2$ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren (Low, Crestani et al. 2000) vermittelt, während Rezeptoren vom $\alpha 1$ -Subtyp für die anterograde Amnesie, die sedierende und einen Teil der antiepileptischen Wirkung dieses Medikamentes verantwortlich sind (Rudolph, Crestani et al. 1999). Möglicherweise spielt folglich ein Antagonismus an $\alpha 1$ -GABA_A-Rezeptoren eine bedeutendere Rolle für das Auftreten von Krampfanfällen, wohingegen $\alpha 2$ -enthaltende Rezeptoren eine höhere Affinität für TXA aufweisen könnten.

In der Literatur wird eine im Vergleich mit anderen Hirnregionen hohe Suszeptibilität der limbischen Strukturen Amygdala und Hippocampus für Krampfanfälle (siehe 1.3.2; 1.4) beschrieben. Wenn man eine geringere IC₅₀ als erniedrigte Krampfschwelle interpretieren würde, wären diese beiden Hirnregionen auch unter dem Einfluss von TXA anfälliger für das Generieren von Krampfaktivität als Kortex und Rückenmark. Um diese Annahme zu stützen wären hierzu jedoch letztlich Messungen in den genannten und anderen Hirnregionen unter vergleichbaren Bedingungen nötig.

Um den beschriebenen Antagonismus am Glycinrezeptor (Lecker, Wang et al. 2012) und einen möglichen Effekt auf GABA_B-Rezeptoren zu untersuchen und den Einfluss dieser Interaktionen auf die beobachtete erhöhte Erregungsausbreitung zu quantifizieren, wurde der Effekt von TXA unter dem Einfluss der spezifischen Rezeptorantagonisten Strychnin (Glycin-Rezeptor), CGP (GABA_B-Rezeptor) und Bicucullin (GABA_A-Rezeptor) mit VSDI untersucht. Die Messungen ergaben keinen signifikanten Anstieg der FDS durch TXA unter GABA_A-Rezeptorblockade. Hingegen kam es in Anwesenheit der Rezeptorantagonisten an Glycin- und GABA_B-Rezeptoren zu einem signifikanten Anstieg der FDS durch TXA. Somit scheint die erhöhte Erregungsausbreitung unter TXA hauptsächlich durch einen GABA_A-Rezeptorantagonismus vermittelt zu sein, während GABA_B- und Glycin-Rezeptoren keine

Rolle zu spielen scheinen. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Beitrag der Glycinrezeptoren liefert das regional begrenzte Verteilungsmuster der glycinergen Innervation im Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn. Im Prosencephalon werden ebenfalls Glycinrezeptoren exprimiert, welche möglicherweise durch umgebendes Glycin aktiviert werden (Yevenes und Zeilhofer 2011). Weder Amygdala noch Hippocampus gehören damit zu den Hirnarealen mit starker glycinerner Innervation, bilden jedoch als Teil des Prosencephalon auch Glycinrezeptoren aus. In den Experimenten von Lecker et al. wurde den Neuronen exogen Glycin zugeführt bzw. Saccharose hinzugegeben, um die Glycinfreisetzung zu erhöhen (Lecker, Wang et al. 2012). Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen wurde dies nicht durchgeführt.

4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Um die klinische Relevanz des beobachteten hemmenden Einflusses von TXA auf die GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme beurteilen zu können, muss die in dieser Arbeit ermittelte IC₅₀ im Zusammenhang mit den Plasma- bzw. Liquorkonzentrationen von TXA bei von Krampfanfällen betroffenen Patienten betrachtet werden. In einer Studie von Murkin et al., die einen Zusammenhang von hochdosierter Tranexamsäuregabe und Krampfanfällen bei kardiochirurgischen Eingriffen darstellt, wurde den betroffenen Patienten insgesamt eine Dosis von 61 – 259 mg/kg Körpergewicht intravenös appliziert, bevor sich die Krampfanfälle ereigneten (Murkin, Falter et al. 2010). Nach dem Erscheinen der Studie wurde die Dosierempfehlung des Antifibrinolytikums reduziert (auf die „BART“ Dosis s.u.). In der Folge ging die Quote der postoperativen Krampfanfälle zurück auf das Niveau vor dem Einführen der Hochdosis-TXA-Gabe (Murkin, Falter et al. 2010). In einer anderen Studie wurden bei gefäßchirurgischen Patienten, die mit einem Spinalkanalkatheter überwacht wurden, perioperativ TXA-Liquorkonzentrationen gemessen. Die TXA-Applikation von 30 mg/kg Initialdosis, einem zusätzlichem Bolus von 2 mg/kg zum Start des Herzlungenbypasses und einer Infusion von 16 mg/kg/h führte zu einer Plasmakonzentration von $1,9 \pm 0,4$ mM und zu einer Spitzenkonzentration im Liquor von $220,8 \pm 116,7$ µM. Unter dieser Konzentration kam es bei einem von vier Patienten zum Krampfanfall (Lecker, Wang et al. 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte IC₅₀ von TXA für GABA_A-Rezeptor-vermittelte Antworten liegt sowohl in der basolateralen Amygdala (0,76 mM) als auch in der CA1-Region des Hippocampus (0,47 mM) in dieser Größenordnung.

Unter der beschriebenen Dosis von 30 mg/kg + 16 mg/kg/h Infusion + 2 mg/kg bei Beginn des Herzlungenbypasses wurden in der BART-Studie („The Blood Conservation Using Antifibrinolytics in a Randomized Trial“) keine Krampfanfälle der 770 eingeschlossenen Patienten unter TXA beschrieben, wobei das Auftreten von Krampfanfällen auch kein

festgelegter Endpunkt der Studie war (Fergusson, Hebert et al. 2008). Interessanterweise führte gemäß einer Studie von Manji et al. die Einführung der BART-Dosis von TXA (5,1-5,9 g/Patient) im Jahre 2007 zu einer deutlich erhöhten Inzidenz von Krampfanfällen (1,2-1,7%) verglichen mit 0,0-0,3% in den Jahren zuvor unter 1,4-1,7 g TXA/Patient. Eine Reduktion der applizierten TXA-Dosis führte daraufhin zu einem erneuten Rückgang der Anfälle (Manji, Grocott et al. 2012). Die Diskrepanz zur BART Studie lässt sich entweder dadurch erklären, dass dort aufgetretene Krampfanfälle nicht beschrieben wurden, oder, dass die Höhe der TXA-Dosis nicht die einzige Determinante für diese neurologische Komplikation ist. Dennoch konnten Kalavrouziotis et al. zeigen, dass die Hochdosierung von TXA (definiert als Gesamtdosis ≥ 100 mg/kg) einen unabhängigen Risikofaktor für postoperative Krampfanfälle darstellt (Kalavrouziotis, Voisine et al. 2012). Desweiteren ging im beobachteten Kollektiv die Gabe höherer Dosen TXA mit einem höheren Risiko für Krampfanfälle einher (Kalavrouziotis, Voisine et al. 2012). Die beschriebenen Studien scheinen damit klinisch einerseits auf eine dosisabhängige epileptogene Wirkung von TXA hinzuweisen, andererseits möglicherweise auch auf eine unbedenkliche Dosis. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die einen dosisabhängigen Antagonismus am GABA_A-Rezeptor beschreiben, stehen somit im Einklang mit den klinischen Beobachtungen.

In der Studie von Murkin et al. traten die TXA-induzierten Krampfanfälle postoperativ, im Durchschnitt nach 4,7 Stunden, auf und korrelierten zeitlich mit dem Abdosieren des Hypnotikums Propofol (Murkin, Falter et al. 2010). Propofol ist unter anderem ein bekannter GABA_A-Rezeptoragonist (Zhou, Liu et al. 2012). Eine Konkurrenz von Propofol und TXA am GABA_A-Rezeptor um dieselbe Bindungsstelle könnte erklären, weshalb TXA als GABA_A-Rezeptorantagonist die konvulsive Wirkung erst Stunden nach der Operation - und damit deutlich nach Beendigung der Zufuhr - entfalten kann. Ein weiterer Faktor, der zur verspäteten zerebralen Wirkung von TXA beitragen könnte, ist der in Lecker et al. beschriebene späte Anstieg der TXA-Konzentration im Liquor. Diese wurde verzögert zum Spitzenwert im Serum gemessen und trat erst nach Beendigung der Medikamentenapplikation auf (Lecker, Wang et al. 2012). Eine Studie zur Messung der TXA-Konzentration in Plasma und Liquor an Patienten mit Herzlungenbypassen mithilfe von Chromatographen zeigte weiterhin, dass der Plasmaspiegel nicht automatisch auf den Medikamentspiegel im Liquor rückschließen lässt und neben der Dosierung andere Faktoren Einfluss auf die Überwindung der Bluthirnschranke nehmen müssen (Abou-Diwan, Sniecinski et al. 2011). Anhand tierexperimenteller Versuche wurde gezeigt, dass der Einsatz von extrakorporaler Zirkulation die Barrierefunktion der Bluthirnschranke stört, wobei dieser Effekt nur lokal an bestimmten Hirnregionen auftrat (u.a. Hippocampus, Kortex). Im gesamten Gehirn war dies nur nach einem kompletten Kreislaufstillstand zu verzeichnen

(Cavaglia, Seshadri et al. 2004). Diese Schrankenstörung in verschiedenen Arealen könnte zu regional verschiedenen erhöhten TXA-Konzentrationen im Liquor führen.

Obwohl TXA seit mehr als 30 Jahren in der Kardiochirurgie angewendet wird besteht noch immer kein Konsens über die optimale Dosierung. Eine Studie von Sharma et al. über die Pharmakokinetik von TXA bei kardiochirurgischen Operationen mit Herzlungenbypass belegt, dass die Plasmakonzentration in Patienten nach Applikation von 30 mg/kg + 16mg/kg/h + 2 mg/kg TXA höher liegt als der empfohlene therapeutische Spiegel. Die Autoren weisen auf die Notwendigkeit der Etablierung einer neuen Dosierungsempfehlung mit ausreichend hohen, jedoch sichereren Plasmaspiegeln hin (Sharma, Fan et al. 2012). Möglicherweise wäre die Reduktion der TXA-Dosis, die bisher eventuell unnötig hohe Plasmaspiegel erzeugt, die einfachste und effektivste Prävention der medikamenten-induzierten Krampfanfälle. Um ein neues sicheres, aber wirkungsvolles Dosierregime zu etablieren, bedarf es noch weiterer klinischer Studien.

Eine zusätzliche Möglichkeit der Krampfanfallsprophylaxe bei unumgänglich hohen TXA-Dosen, wäre die postoperative (Weiter-)Gabe von Hypnotika. Lecker et al. zeigten in vitro, dass Isofluran und Propofol die TXA-bedingte Inhibition von Glycinrezeptoren abschwächen (Lecker, Wang et al. 2012). Die von Murkin et al. beschriebene Beobachtung, dass die Krampfanfälle in einigen Fällen während dem Abdosieren von Propofol auftraten unterstützt diese Hypothese (Murkin, Falter et al. 2010).

5 Zusammenfassung

Massive operativ oder traumatisch bedingte Blutungen zwingen als lebensbedrohliche Ereignisse den behandelnden Arzt zum Handeln. Neben der Fremd- und Eigenbluttransfusion, mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen und Komplikationen, gibt es die therapeutische Möglichkeit, die körpereigene Fibrinolyse durch das Lysinanalogon Tranexamsäure (TXA) zu unterbinden und damit die Gerinnung zu stabilisieren. Leider ist auch dieses Medikament nicht frei von Nebenwirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuropharmakologisches Korrelat für die unter TXA-Gabe beschriebene, relevante Nebenwirkung eines Krampfanfalls auf Ebene der zentralen synaptischen Transmission gesucht.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Patch-Clamp-Technik und Voltage Sensitive Dye Imaging an vitalen Mäusehirnschnittpräparaten durchgeführt. Bei diesen Präparaten verbleiben die Neurone innerhalb ihres im Wesentlichen erhaltenen Netzwerkes und exprimieren native Rezeptoren. Untersucht wurden die beiden Epilepsie-relevanten ZNS-Areale Amygdala und Hippocampus.

Unter Gabe einer klinisch relevanten Konzentration von TXA zeigte sich in beiden Hirnregionen eine verstärkte neuronale Erregungsausbreitung, welche nicht auf eine Beeinflussung der biophysikalischen Membraneigenschaften im Sinne einer gesteigerten intrinsischen Erregbarkeit zurückzuführen ist.

Die gesteigerte Erregungsausbreitung lässt sich vielmehr durch eine TXA-bedingte Hemmung der inhibitorischen, GABA_A-Rezeptor-vermittelten synaptischen Transmission erklären. So ließ sich eine dosisabhängige Hemmung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Stromantworten durch TXA in beiden Hirnarealen nachweisen, wobei die Ergebnisse für einen postsynaptischen Mechanismus sprechen. Die glutamaterge, AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission wurde hingegen durch TXA nicht beeinflusst.

Das Entstehen von Krampfanfällen kann grundsätzlich durch eine Imbalance zwischen inhibitorischer und exzitatorischer synaptischer Transmission zugunsten der exzitatorischen Übertragung erklärt werden. Im Falle von TXA scheint eine verminderte inhibitorische Transmission auf dem Boden einer GABA_A-Rezeptorblockade ursächlich für diese Imbalance und damit das Auftreten der Krampfanfälle zu sein.

Literaturverzeichnis

- Abou-Diwan, C., R. M. Sniecinski, F. Szlam, J. C. Ritchie, J. M. Rhea, K. A. Tanaka, R. J. Molinaro. (2011). "Plasma and cerebral spinal fluid tranexamic acid quantitation in cardiopulmonary bypass patients." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **879**(7-8): 553-556.
- Adams, H. P., Jr. (1982). "Current status of antifibrinolytic therapy for treatment of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Stroke **13**(2): 256-259.
- Aroniadou-Anderjaska, V., B. Fritsch, F. Qashu, M. F. Braga. (2008). "Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy." Epilepsy Res **78**(2-3): 102-116.
- Aroniadou-Anderjaska, V., F. Qashu, M. F. Braga. (2007). "Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders." Amino Acids **32**(3): 305-315.
- Barnard, E. A., P. Skolnick, R. W. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A. N. Bateson, S. Z. Langer. (1998). "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." Pharmacol Rev **50**(2): 291-313.
- Beart, P. M. und R. D. O'Shea. (2007). "Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement." Br J Pharmacol **150**(1): 5-17.
- Benarroch, E. E. (2012). "GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications." Neurology **78**(8): 578-584.
- Bernard, C. (2005). "Dogma and dreams: experimental lessons for epilepsy mechanism chasers." Cell Mol Life Sci **62**(11): 1177-1181.
- Bliss, T. V. und G. L. Collingridge. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Butala, B. P., V. R. Shah, G. P. Bhosale, R. B. Shah. (2012). "Medication error: Subarachnoid injection of tranexamic acid." Indian J Anaesth **56**(2): 168-170.

- Cain, D. P. (1987). "Kindling by repeated intraperitoneal or intracerebral injection of picrotoxin transfers to electrical kindling." Exp Neurol **97**(2): 243-254.
- Campagna-Slater, V. und D. F. Weaver. (2007). "Molecular modelling of the GABAA ion channel protein." J Mol Graph Model **25**(5): 721-730.
- Catterall, W. A. (2014). "Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **54**: 317-338.
- Cavaglia, M., S. G. Seshadri, J. E. Marchand, C. L. Ochocki, R. B. Mee, P. M. Bokesch. (2004). "Increased transcription factor expression and permeability of the blood brain barrier associated with cardiopulmonary bypass in lambs." Ann Thorac Surg **78**(4): 1418-1425.
- Chang, W. P. und B. C. Shyu. (2014). "Anterior Cingulate epilepsy: mechanisms and modulation." Front Integr Neurosci **7**: 104.
- Chapman, A. G. (2000). "Glutamate and epilepsy." J Nutr **130**(4S Suppl): 1043S-1045S.
- Chemla, S. und F. Chavane. (2010). "Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models." J Physiol Paris **104**(1-2): 40-50.
- Chen, N., C. Liu, N. Yan, W. Hu, J. G. Zhang, Y. Ge, F. G. Meng. (2013). "A macaque model of mesial temporal lobe epilepsy induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic Acid." PLoS One **8**(8): e72336.
- Contractor, A. und S. F. Heinemann. (2002). "Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity." Sci STKE **2002**(156): re14.
- Contractor, A., C. Mulle, G. T. Swanson. (2011). "Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research." Trends Neurosci **34**(3): 154-163.
- Cossart, R., J. Epsztein, R. Tyzio, H. Becq, J. Hirsch, Y. Ben-Ari, V. Crepel. (2002). "Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons." Neuron **35**(1): 147-159.
- de Leede-van der Maarl, M. G., P. Hilkens, F. Bosch. (1999). "The epileptogenic effect of tranexamic acid." J Neurol **246**(9): 843.

- DeToledo, J. C. (2000). "Lidocaine and seizures." Ther Drug Monit **22**(3): 320-322.
- Dodt, H., M. Eder, A. Frick, W. Zieglgansberger. (1999). "Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation." Science **286**(5437): 110-113.
- Dodt, H. U., M. Eder, A. Schierloh, W. Zieglgansberger. (2002). "Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices." Sci STKE **2002**(120): pl2.
- Dodt, H. U. und W. Zieglgansberger. (1990). "Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy." Brain Res **537**(1-2): 333-336.
- Dodt, H. U. und W. Zieglgansberger. (1994). "Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function." Trends Neurosci **17**(11): 453-458.
- Dodt, H. U. und W. Zieglgansberger. (1998). "Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy." Histochem J **30**(3): 141-152.
- Dunn, C. J. und K. L. Goa. (1999). "Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications." Drugs **57**(6): 1005-1032.
- Dutertre, S., C. M. Becker, H. Betz. (2012). "Inhibitory glycine receptors: an update." J Biol Chem **287**(48): 40216-40223.
- Duvernoy, H. M. (2005). The human hippocampus : functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI. Berlin ; New York, Springer.
- Engel, J., Jr. (1996). "Introduction to temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **26**(1): 141-150.
- Fergusson, D. A., P. C. Hebert, C. D. Mazer, S. Fremes, C. MacAdams, J. M. Murkin, K. Teoh, P. C. Duke, R. Arellano, M. A. Blajchman, J. S. Bussieres, D. Cote, J. Karski, R. Martineau, J. A. Robblee, M. Rodger, G. Wells, J. Clinch, R. Pretorius. (2008). "A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery." N Engl J Med **358**(22): 2319-2331.
- Fortune, E. S. und G. J. Rose. (2001). "Short-term synaptic plasticity as a temporal filter." Trends Neurosci **24**(7): 381-385.

- Furtmuller, R., M. G. Schlag, M. Berger, R. Hopf, S. Huck, W. Sieghart, H. Redl. (2002). "Tranexamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulsions by a gamma-aminobutyric acid(A) receptor antagonistic effect." J Pharmacol Exp Ther **301**(1): 168-173.
- Gadea, A. und A. M. Lopez-Colome. (2001). "Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters." J Neurosci Res **63**(6): 461-468.
- Garcha, P. S., C. V. Mohan, R. M. Sharma. (2007). "Death after an inadvertent intrathecal injection of tranexamic acid." Anesth Analg **104**(1): 241-242.
- Gean, P. W. und P. Shinnick-Gallagher. (1989). "The transient potassium current, the A-current, is involved in spike frequency adaptation in rat amygdala neurons." Brain Res **480**(1-2): 160-169.
- Goodnough, L. T. (2013). "Blood management: transfusion medicine comes of age." Lancet **381**(9880): 1791-1792.
- Grinvald, A. und R. Hildesheim. (2004). "VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics." Nat Rev Neurosci **5**(11): 874-885.
- Haseneder, R., S. Kratzer, E. Kochs, V. S. Eckle, W. Zieglgansberger, G. Rammes. (2008). "Xenon reduces N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala." Anesthesiology **109**(6): 998-1006.
- Heldt, S. A. und K. J. Ressler. (2007). "Forebrain and midbrain distribution of major benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subunits in the adult C57 mouse as assessed with in situ hybridization." Neuroscience **150**(2): 370-385.
- Henry, D. A., P. A. Carless, A. J. Moxey, D. O'Connell, B. J. Stokes, D. A. Fergusson, K. Ker. (2011). "Anti-fibrinolytic use for minimising perioperative allogeneic blood transfusion." Cochrane Database Syst Rev(3): CD001886.
- Henry, D. A., P. A. Carless, A. J. Moxey, D. O'Connell, B. J. Stokes, D. A. Fergusson, K. Ker. (2011). "Anti-fibrinolytic use for minimising perioperative allogeneic blood transfusion." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001886.

- Holtkamp, M. und H. Meierkord. (2007). "Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies." Cell Mol Life Sci **64**(15): 2023-2041.
- Jooma, R., H. S. Yeh, M. D. Privitera, D. Rigrish, M. Gartner .(1995). "Seizure control and extent of mesial temporal resection." Acta Neurochir (Wien) **133**(1-2): 44-49.
- Joshi, S., K. Rajasekaran, J. Kapur. (2013). "GABAergic transmission in temporal lobe epilepsy: the role of neurosteroids." Exp Neurol **244**: 36-42.
- Kairiss, E. W., R. J. Racine, G. K. Smith. (1984). "The development of the interictal spike during kindling in the rat." Brain Res **322**(1): 101-110.
- Kalavrouziotis, D., P. Voisine, S. Mohammadi, S. Dionne, F. Dagenais. (2012). "High-dose tranexamic acid is an independent predictor of early seizure after cardiopulmonary bypass." Ann Thorac Surg **93**(1): 148-154.
- Korpi, E. R., G. Grunder, H. Luddens. (2002). "Drug interactions at GABA(A) receptors." Prog Neurobiol **67**(2): 113-159.
- Kralic, J. E., E. R. Korpi, T. K. O'Buckley, G. E. Homanics, A. L. Morrow. (2002). "Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice." J Pharmacol Exp Ther **302**(3): 1037-1045.
- Kravchenko, M. O., A. O. Moskalyuk, S. A. Fedulova, N. S. Veselovsky. (2006). "Calcium-dependent changes of paired-pulse modulation at single GABAergic synapses." Neurosci Lett **395**(2): 133-137.
- Kumar, J. und M. L. Mayer. (2013). "Functional insights from glutamate receptor ion channel structures." Annu Rev Physiol **75**: 313-337.
- Laupacis, A. und D. Fergusson. (1997). "Drugs to minimize perioperative blood loss in cardiac surgery: meta-analyses using perioperative blood transfusion as the outcome. The International Study of Peri-operative Transfusion (ISPOT) Investigators." Anesth Analg **85**(6): 1258-1267.
- Law, R. H., T. Caradoc-Davies, N. Cowieson, A. J. Horvath, A. J. Quek, J. A. Encarnacao, D. Steer, A. Cowan, Q. Zhang, B. G. Lu, R. N. Pike, A. I. Smith, P. B. Coughlin, J. C.

- Whisstock. (2012). "The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen." Cell Rep **1**(3): 185-190.
- Lecker, I., D. S. Wang, A. D. Romaschin, M. Peterson, C. D. Mazer, B. A. Orser. (2012). "Tranexamic acid concentrations associated with human seizures inhibit glycine receptors." J Clin Invest **122**(12): 4654-4666.
- LeDoux, J. (2007). "The amygdala." Curr Biol **17**(20): R868-874.
- Lesage, F. (2003). "Pharmacology of neuronal background potassium channels." Neuropharmacology **44**(1): 1-7.
- Liu, S. J. und S. G. Cull-Candy. (2002). "Activity-dependent change in AMPA receptor properties in cerebellar stellate cells." J Neurosci **22**(10): 3881-3889.
- Loup, F., H. G. Wieser, Y. Yonekawa, A. Aguzzi, J. M. Fritschy. (2000). "Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy." J Neurosci **20**(14): 5401-5419.
- Low, K., F. Crestani, R. Keist, D. Benke, I. Brunig, J. A. Benson, T. Rulicke, H. Bluethmann, H. Mohler, U. Rudolph. (2000). "Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety." Science **290**(5489): 131-134.
- Lynch, D. R. und R. P. Guttman. (2002). "Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 717-723.
- Makarovsky, I., G. Markel, A. Hoffman, O. Schein, T. Brosh-Nissimov, Z. Tashma, T. Dushnitsky, A. Eisenkraft. (2008). "Strychnine--a killer from the past." Isr Med Assoc J **10**(2): 142-145.
- Malinow, R. und R. C. Malenka. (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **25**: 103-126.
- Manji, R. A., H. P. Grocott, J. Leake, R. E. Ariano, J. S. Manji, A. H. Menkis, E. Jacobsohn. (2012). "Seizures following cardiac surgery: the impact of tranexamic acid and other risk factors." Can J Anaesth **59**(1): 6-13.

- Manno, D., K. Ker, I. Roberts. (2014). "How effective is tranexamic acid for acute gastrointestinal bleeding?" BMJ **348**: g1421.
- Marowsky, A., J. M. Fritschy, K. E. Vogt. (2004). "Functional mapping of GABA A receptor subtypes in the amygdala." Eur J Neurosci **20**(5): 1281-1289.
- Mayer, M. L. und N. Armstrong. (2004). "Structure and function of glutamate receptor ion channels." Annu Rev Physiol **66**: 161-181.
- McKernan, R. M. und P. J. Whiting. (1996). "Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?" Trends Neurosci **19**(4): 139-143.
- Meldrum, B. S. und M. A. Rogawski. (2007). "Molecular targets for antiepileptic drug development." Neurotherapeutics **4**(1): 18-61.
- Mohseni, K., A. Jafari, M. R. Nobahar, A. Arami. (2009). "Polymyoclonus seizure resulting from accidental injection of tranexamic acid in spinal anesthesia." Anesth Analg **108**(6): 1984-1986.
- Molleman, A. (2003). "Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology". Wiley
- Molnar, E. (2011). "Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons." Semin Cell Dev Biol **22**(5): 506-513.
- Murkin, J. M., F. Falter, J. Granton, B. Young, C. Burt, M. Chu. (2010). "High-dose tranexamic Acid is associated with nonischemic clinical seizures in cardiac surgical patients." Anesth Analg **110**(2): 350-353.
- Murphy, G. J., B. C. Reeves, C. A. Rogers, S. I. Rizvi, L. Culliford, G. D. Angelini. (2007). "Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red blood cell transfusion in patients having cardiac surgery." Circulation **116**(22): 2544-2552.
- Olpe, H. R., G. Karlsson, M. F. Pozza, F. Brugger, M. Steinmann, H. Van Riezen, G. Fagg, R. G. Hall, W. Froestl, H. Bittiger. (1990). "CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors." Eur J Pharmacol **187**(1): 27-38.

- Paoletti, P., C. Bellone, Q. Zhou. (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **14**(6): 383-400.
- Pattakos, G., C. G. Koch, M. E. Brizzio, L. H. Batizy, J. F. Sabik, 3rd, E. H. Blackstone, M. S. Lauer. (2012). "Outcome of patients who refuse transfusion after cardiac surgery: a natural experiment with severe blood conservation." Arch Intern Med **172**(15): 1154-1160.
- Pellegrini, A., D. Giaretta, R. Chemello, L. Zanotto, G. Testa. (1982). "Feline generalized epilepsy induced by tranexamic acid (AMCA)." Epilepsia **23**(1): 35-45.
- Pitkanen, A., J. Tuunanen, R. Kalviainen, K. Partanen, T. Salmenpera. (1998). "Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **32**(1-2): 233-253.
- Qian, H. und H. Ripps. (2009). "Focus on molecules: the GABAC receptor." Exp Eye Res **88**(6): 1002-1003.
- Rammes, G., M. Eder, W. Zieglgansberger, H. U. Dodt. (2007). "Infrared-guided laser stimulation as a tool for elucidating the synaptic site of expression of long-term synaptic plasticity." Methods Mol Biol **403**: 113-122.
- Ranft, A., J. Kurz, M. Deuringer, R. Haseneder, H. U. Dodt, W. Zieglgansberger, E. Kochs, M. Eder, G. Hapfelmeier. (2004). "Isoflurane modulates glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the amygdala." Eur J Neurosci **20**(5): 1276-1280.
- Raol, Y. H., D. R. Lynch, A. R. Brooks-Kayal. (2001). "Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **7**(4): 254-260.
- Roberts, I., H. Shakur, K. Ker, T. Coats. (2012). "Antifibrinolytic drugs for acute traumatic injury." Cochrane Database Syst Rev **12**: CD004896.
- Rozental, R., C. Giaume, D. C. Spray. (2000). "Gap junctions in the nervous system." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 11-15.

- Rudolph, U., F. Crestani, D. Benke, I. Brunig, J. A. Benson, J. M. Fritschy, J. R. Martin, H. Bluethmann, H. Mohler. (1999). "Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes." Nature **401**(6755): 796-800.
- Sah, P., E. S. Faber, M. Lopez De Armentia, J. Power. (2003). "The amygdaloid complex: anatomy and physiology." Physiol Rev **83**(3): 803-834.
- Sentilhes, L., S. Lasocki, A. S. Ducloy-Bouthors, P. Deruelle, M. Dreyfus, F. Perrotin, F. Goffinet, C. Deneux-Tharoux. (2015). "Tranexamic acid for the prevention and treatment of postpartum haemorrhage." Br J Anaesth **114**(4): 576-587.
- Shakur, H., I. Roberts, R. Bautista, J. Caballero, T. Coats, Y. Dewan, H. El-Sayed, T. Gogichaishvili, S. Gupta, J. Herrera, B. Hunt, P. Iribhogbe, M. Izurieta, H. Khamis, E. Komolafe, M. A. Marrero, J. Mejia-Mantilla, J. Miranda, C. Morales, O. Olaomi, F. Oлдashi, P. Perel, R. Peto, P.V. Ramana, R. R. Ravi, S. Yutthakasemsunt. (2010). "Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial." Lancet **376**(9734): 23-32.
- Sharma, V., J. Fan, A. Jerath, K. S. Pang, B. Bojko, J. Pawliszyn, J. M. Karski, T. Yau, S. McCluskey, M. Wasowicz. (2012). "Pharmacokinetics of tranexamic acid in patients undergoing cardiac surgery with use of cardiopulmonary bypass." Anaesthesia **67**(11): 1242-1250.
- Sieghart, W., J. Ramerstorfer, I. Sarto-Jackson, Z. Varagic, M. Ernst. (2012). "A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the alpha(+) beta(-) interface." Br J Pharmacol **166**(2): 476-485.
- Smart, T. G. und P. Paoletti. (2012). "Synaptic neurotransmitter-gated receptors." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(3).
- Stepan, J., J. Dine, T. Fenzl, S. A. Polta, G. von Wolff, C. T. Wotjak, M. Eder. (2012). "Entorhinal theta-frequency input to the dentate gyrus trisynaptically evokes hippocampal CA1 LTP." Front Neural Circuits **6**: 64.
- Thomson, A. M. (2000). "Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses." Trends Neurosci **23**(7): 305-312.

- Tominaga, T., Y. Tominaga, H. Yamada, G. Matsumoto, M. Ichikawa. (2000). "Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices." J Neurosci Methods **102**(1): 11-23.
- Tsetlin, V., D. Kuzmin, I. Kasheverov. (2011). "Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors." J Neurochem **116**(5): 734-741.
- Uemura, S. und H. Kimura. (1988). "Amygdaloid kindling with bicuculline methiodide in rats." Exp Neurol **102**(3): 346-353.
- Vignes, M. und G. L. Collingridge. (1997). "The synaptic activation of kainate receptors." Nature **388**(6638): 179-182.
- Yamaura, A., T. Nakamura, H. Makino, Y. Hagihara. (1980). "Cerebral complication of antifibrinolytic therapy in the treatment of ruptured intracranial aneurysm. Animal experiment and a review of literature." Eur Neurol **19**(2): 77-84.
- Yeh, H. M., H. P. Lau, P. L. Lin, W. Z. Sun, M. S. Mok. (2003). "Convulsions and refractory ventricular fibrillation after intrathecal injection of a massive dose of tranexamic acid." Anesthesiology **98**(1): 270-272.
- Yevenes, G. E. und H. U. Zeilhofer. (2011). "Allosteric modulation of glycine receptors." Br J Pharmacol **164**(2): 224-236.
- Zeman, S. und D. Lodge. (1992). "Pharmacological characterization of non-NMDA subtypes of glutamate receptor in the neonatal rat hemisectioned spinal cord in vitro." Br J Pharmacol **106**(2): 367-372.
- Zhou, C., J. Liu, X. D. Chen. (2012). "General anesthesia mediated by effects on ion channels." World J Crit Care Med **1**(3): 80-93.
- Zink, W. und B. M. Graf. (2003). "[Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms]." Anaesthesist **52**(12): 1102-1123.
- Zucker, R. S. und W. G. Regehr. (2002). "Short-term synaptic plasticity." Annu Rev Physiol **64**: 355-405.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (...propionic acid)
AP5	D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
BLA	Basolaterale Amygdala
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca²⁺	Kalziumionen
CGP (35348)	p-(3-Aminopropyl)-P-diethoxymethylphosphinsäure
Cl⁻	Chloridionen
C_M	Spezifische Membrankapazität
CNB	α -Carboxy-2-nitrobenzyl
CO₂	Kohlendioxid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (...current)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	γ -Aminobuttersäure (...acid)
GC	Gradientenkontrast (...contrast)
GluR	Glutamatrezeptor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2ethansulfonsäure
I_{offset}	Potentialerhaltungsstrom
ISI	Interstimulusintervall
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (...current)
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
IR	Infrarot
K⁺	Kaliumionen
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
Na⁺	Natriumionen
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion
NMDA	N-methyl-D-aspartat
O₂	Sauerstoff
pC	Photolytisch evozierter Strom
PPD	Paired Pulse Depression
PPF	Paired Pulse Facilitation
PPR	Paired Pulse Ratio

PSC	Postsynaptischer Strom (...current)
RMP	Ruhemembranpotential
R_M	Spezifischer Membranwiderstand
R_s	Serienwiderstand
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
TXA	trans-4-(Aminomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verwendete Substanzen

Elektrophysiologie

aCSF: pH=7,35 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl ₂	2	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl ₂	1	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO ₃	25	Sigma Aldrich
NaH ₂ PO ₄	1,25	Sigma Aldrich

aCSF-Präparationsmedium: pH=7,35 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl ₂	0,5	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl ₂	6	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO ₃	25	Sigma Aldrich
NaH ₂ PO ₄	1,25	Sigma Aldrich

ACSF-Präparationmedium für VSDI-Messungen: pH=7,4 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl ₂	0,5	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl ₂	7	Sigma Aldrich
NaCl	87	Sigma Aldrich
NaHCO ₃	25	Sigma Aldrich
NaH ₂ PO ₄	1,25	Sigma Aldrich
Saccharose	75	Sigma Aldrich

Intrazellulärmedium – Messung der synaptischen Transmission

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
K-Gluconat	130	Sigma Aldrich
NaCl	5	Sigma Aldrich
MgCl ₂	2	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
EGTA	0,5	Sigma Aldrich
ATP-K	2	Sigma Aldrich
GTP-Na	0,3	Sigma Aldrich
Lidocain-N-Ethyl-Chlorid	5	Sigma Aldrich

Intrazellulärmedium – Messung der GABAergen Transmission

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
Cäsiummethansulfonat	100	Sigma Aldrich
CsCl	60	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
MgCl	1	Sigma Aldrich
EGTA	0,2	Sigma Aldrich

Anhang
Verwendete Substanzen

Kreatinphosphat	20	Sigma Aldrich
Lidocain-N-Ethyl-Chlorid	5	Sigma Aldrich

Weitere Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Bicucullin-Methionid	20 μM	Sigma Aldrich
CGP 35348	200 μM	Novartis Laboratories, Basel, Switzerland
CNB-caged GABA	100 μM	Invitrogen
Di-4-ANEPPS		Sigma Aldrich
D-AP5	50 μM	Sigma Aldrich
NBQX	5 μM	Sigma Aldrich
TXA	0,01-10 mM	Sigma Aldrich
Strychnin	1 μM	Sigma Aldrich

Danksagung

Abschließend möchte ich mich nun noch bei allen bedanken, die mir die Promotion ermöglicht haben und mich während der Zeit unterstützt haben:

Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Dipl.- Phys. Eberhard Kochs für die Möglichkeit der Promotion in der Anaesthesiologie der TU München.

Herrn Prof. Rammes für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie die Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Fragen.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. med. Rainer Haseneder, der seiner Aufgabe als Doktorvater mehr als gerecht wurde. Durch das Schaffen eines sehr angenehmen Rahmens, sowohl menschlich als auch organisatorisch, durch seine stets sofortige Hilfeleistung bei Fragen oder Problemen, sowie seine engmaschige Begleitung der Arbeit fiel es mir als Doktorandin leicht, mich in das Projekt einzuarbeiten.

Für die durchgehend hervorragende Betreuung, seine Geduld bei der Einarbeitung in die Methoden und die Durchsicht meiner Dissertation möchte ich mich außerdem ganz besonders bei Dr. med. Stephan Kratzer bedanken, der ebenfalls immer ein offenes Ohr für Probleme und wissenschaftliche Diskussionen hatte. Aufgrund seiner immer zeitnahen Hilfe und seiner wissenschaftlichen Kompetenz war er ein ausgezeichnete Betreuer für die Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank auch an Corinna Mattusch, die eine wichtige Funktion als Motivationscoach und liebe Kollegin übernommen hat, meine Laserversuche stoisch ertragen hat und schnell ein sehr wichtiger Ansprechpartner in technischen sowie zwischenmenschlichen Belangen der Promotion wurde.

Ein weiterer Dank natürlich auch an Martina und Tati, sowie den anderen Mitarbeitern im Labor für die nette Zusammenarbeit.

Ich danke meiner Familie, vorallem meiner Mama und Franzi, für die Unterstützung, nicht nur während der Promotion sondern auch während des gesamten Studiums.

Zuletzt möchte ich mich noch bei Dominik bedanken, der sich geplante Vorträge hunderte Male geduldig angehört hat und mir viel bei der Korrektur der Dissertation und sämtlichen Computer-bezogenen Problemen geholfen hat.

Lebenslauf

IRL HEDWIG MARIA

PERSÖNLICHE INFORMATION

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: Deutsch
- Geboren 05.02.89
- Geburtsort: Wasserburg a. Inn

AUSBILDUNG

- 1995 – 1999 Grundschule Edling
- 1999 – 2008 Luitpoldgymnasium Wasserburg
- 27.06.2008 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1)
- WS08/09 – SS10 Studium der Medizin an der LMU München
- 17.09.2010 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
- WS10/11 – SS15 Studium der Medizin an der TU München
- 16.06.2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
- 11.06.2015 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

BERUFSERFAHRUNG

- 03/2011 Famulatur in der onkologischen Praxis Dr. Bojko, München
- 12/2011 – 09/2012 Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie der Anästhesiologie am Klinikum rechts der Isar, München
- 08 – 09/2012 Famulatur in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin im Klinikum rechts der Isar, München

- 03/2013 Famulatur in der Klinik für Urologie im Klinikum rechts der Isar, München
- 04 – 05/2013 Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie der Anästhesiologie am Klinikum rechts der Isar, München
- 04/2013 Vortrag am Deutschen Anästhesiecongress: „Tranexamsäure reduziert die GABAerge synaptische Transmission in vitro über postsynaptische Mechanismen“, Nürnberg
- 05 – 09/2014 PJ-Tertial der inneren Medizin in den Abteilungen Gastroenterologie und Rheumatologie des Klinikums Bogenhausen, München
- 09 – 12/2014 PJ-Tertial der Anästhesie (Wahlfach) im Klinikum rechts der Isar, München
- 12/2014 – 04/2015 PJ-Tertial der Chirurgie im Rotkreuzklinikum, München
- Seit August 2011 Doktorandin an der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München (Elektrophysiologie, Patch-Clamp-Technik)
- Seit Oktober 2015 Assistenzärztin für Anästhesie im Klinikum rechts der Isar

SPRACHKENNTNISSE

Englisch (fließend), Italienisch (konversationssicher), Latein (Latinum)

PREISE & AUSZEICHNUNGEN

- 2008 Karl von Frisch-Abiturientenpreis
- 2008 – 2015 Max Weber-Programm des Freistaates Bayern zur Hochbegabtenförderung nach dem Bayrischen Eliteförderungsgesetz
- 2008 – 2015 Online-Stipendium e-fellows.net