

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

Einfluss von Magnetstimulation auf die Langzeitdepression durch metabotrope Rezeptoren im Hippocampus

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von
Norman Holl
Rostock, 20.02.2023



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Timo Kirschstein
Universitätsmedizin Rostock
Oscar Langendorff Institut für Physiologie

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Freiman
Universitätsmedizin Rostock
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Niels Focke
Universitätsmedizin Göttingen
Klinik für Neurologie

Tag der Einreichung: 20. Februar 2023

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29. November 2023

Inhalt

Inhalt.....	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
1.1. Informationsprozessierung und Gedächtnis	1
1.2. Mechanistische Grundlagen veränderter synaptischer Effektivität	2
1.2.1. Rolle der Gruppe-I metabotropen Glutamatrezeptoren	7
1.3. Mechanismen der elektrischen und magnetischen Stimulation.....	9
1.4. Zusammenfassende Bemerkungen und Fragestellung	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Versuchstiere und Präparation.....	12
2.1.1. Übersicht der verwendeten Versuchslösungen.....	13
2.1.2. Übersicht der verwendeten Stammlösungen	13
2.2. Datenaufnahme und elektrische Stimulation der Hippocampus-Schnitte	14
2.3. Stimulation der Schnitte mittels HFMS	16
2.4. Versuchsprotokolle.....	18
2.5. Statistik.....	19
3. Ergebnisse	21
3.1. Priming-Effekt.....	21
3.2. Effekt der Orientierung der Schnitte	22
3.3. Effekt des CHPG	24
3.4. Effekt des DHPG.....	25
4. Diskussion	27
4.1. Priming mittels HFMS	28
4.2. HFMS und der Effekt der Orientierung der Schnitte	28
4.3. Regulation der mGlu-Rezeptoren 1 und 5.....	30
5. Zusammenfassung und Ausblick	32
6. Thesen	34
Literatur.....	35
Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artificial corticospinal fluid
HFMS	high frequency magnetic stimulation
DHPG	(S)-3,5-dihydroxyphenylglycine
CHPG	(RS)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
mGluR	Metabotrope Glutamatrezeptoren
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
MCPG	(S)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine
MSOP	(RS)- α -Methylserine-O-phosphate
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridin- hydrochlorid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der LTP-Induktion und der Aufrechterhaltung.....	4
Abbildung 2 : A) Ergebnisse von Tokay et al. (2009) unter Verwendung des in der Box gekennzeichneten Stimulationsprotokolls B) Ergebnisse von Tokay et al. (2014)	6
Abbildung 3: Visualisierung des Wirkprinzips der Metaplastizität (nach Abraham, 2008).	7
Abbildung 4: (A) Schema der Lage des Hippocampus der Ratte (modifiziert nach Cheung et al. 2005). (B) Hippocampale Schnitte in der schematischen Darstellung mit Positionierung der Stimulationselektrode und der extrazellulären Ableit-Elektrode (modifiziert nach Nishikawa & MacIver 2000).	15
Abbildung 5: A: Beispiel der gemessenen Feldpotentiale (fEPSP) und B: des differenzierten Signals und die Bestimmung des maximalen Anstiegs (slope).....	15
Abbildung 6: Prinzipieller Aufbau der Messungen mit Orientierung der Spule in Relation zu den Schnittpräparaten und resultierendem Verlauf der magnetischen Feldlinien während der Stimulation. (modifiziert nach Tokay et al. 2009)	16
Abbildung 7: Stimulationsprotokoll der HFMS	17
Abbildung 8: Orientierung der Schnitte in der Messkammer sowie Positionierung der Messelektroden.....	18
Abbildung 9: Arbeitsschritte in diesen Versuchen.....	19
Abbildung 10: Input-Output-Kurven mit und ohne vorherige HFMS.	21
Abbildung 11: Input-Output-Kurven mit und ohne vorherige HFMS nach getesteter Position.....	23
Abbildung 12: Zeitverlauf des CHPG-Effekts auf Schnitte mit und ohne HFMS..	24
Abbildung 13: Mittelwerte des fEPSP-slope 40 bis 60 Minuten nach Zugabe des CHPG mit (schwarzer Balken) und ohne (grauer Balken) vorherige HFMS.).	25
Abbildung 14: Zeitverlauf des DHPG-Effekts auf Schnitte mit und ohne HFMS	26
Abbildung 15: Mittelwerte des fEPSP-slope 40 bis 60 Minuten nach Zugabe des DHPG mit (schwarzer Balken) und ohne (grauer Balken) vorherige HFMS.....	26

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Versuchslösungen	13
Tabelle 2: Stufen der Input-output-Messungen vor Beginn der Langzeitmessungen	18
Tabelle 3: Aufschlüsselung der Anzahl der Versuche nach Modalität	19
Tabelle 4 Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels des Dunn`s-Test zum Vergleich der Stichproben (HFMS priming vs. Kein HFMS priming) für jedes Level der Input-output-Messungen.....	22
Tabelle 5 Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels des Dunn`s Test zum Vergleich der Stichproben (HFMS priming Position 1 & 2 vs. Kein HFMS priming; abhängige Variable = fEPSP-slope).	24

1. Einleitung

1.1. Informationsprozessierung und Gedächtnis

Das Lernen und die Informationsspeicherung sind bedeutende kognitive Leistungen. Eine Struktur, die in diesem Zusammenhang häufig hervorgehoben wird, ist der Hippocampus. Daher ist er das Ziel intensiver Studien, welche bis in die in die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts zurück reichen. Kandel (2001) benennt grundlegende biologische Voraussetzungen der Gedächtnisformierung: 1) zelluläre und molekulare Strategien für die Formierung des Kurzzeit- und Langzeitgedächtnisses gelten für explizite und implizite Gedächtnisinhalte und 2) die Codierung bestimmter Aspekte/Phasen des Gedächtnisses erfolgt über Änderungen der Stärke der synaptischen Transmission. Insbesondere Letzteres wurde in zahlreichen Studien über die mechanistischen Grundlagen des Gedächtnisses erforscht. Bliss & Collinridge (1993) betonen ihrerseits, dass Informationsspeicherung im Gehirn durch Änderungen der synaptischen Effektivität mitbedingt sei. Die zu speichernde Information ist im Gehirn als räumlich-zeitliches Muster neuronaler Aktivität repräsentiert. Diese Aktivitätsmuster wiederum sind selbst Ursache synaptischer Anpassungsmechanismen (Bliss & Collinridge 1993). In diesem Zusammenhang beschreibt der Begriff der „synaptischen Plastizität“ persistierende, aktivitätsbedingte Änderungen der synaptischen Effektivität und gilt als eine Basis der Informationsspeicherung im Gehirn (Andersen et al., 2007). Als ein dominantes Modell der synaptischen Plastizität gilt die „long-term potentiation“ (LTP), welcher ein wesentlicher Beitrag zur Gedächtnisformierung zugeschrieben wird. Die LTP gilt als überdauernde Erhöhung der Effektivität der synaptischen Transmission und zeigte sich in elektrophysiologischen Studien u.a. darin, dass vergrößerte Feldpotentiale (fEPSP, field excitatory postsynaptic potentials) nachgewiesen werden konnten (u.a. Whitlock et al., 2006). Ähnlich wie Erinnerungen, kann eine LTP schnell generiert werden und wird durch Wiederholung gestärkt. In vielen Studien wurden mechanistische Grundlagen der Langzeitpotenzierung erforscht. So zeigte sich, dass schwache Impulse (die selbst keine LTP auslösen können) durch zeitliche Paarung mit starken Impulsen eine LTP des schwachen Impulses auslösen können. Dieser Effekt konnte im Sinne der klassischen Konditionierung interpretiert werden und galt als zelluläres Analogon des assoziativen Lernens (Malenka, 1994). Weitere Eigenschaften der LTP waren die Kooperativität und die Input-Spezifität. Kooperativität wurde als die Eigenschaft

beschrieben, dass LTP durch eine koinzidente Aktivierung einer kritischen Anzahl von Synapsen induziert werden kann (Citri & Malenka, 2008). Die Input-Spezifität sahen Citri & Malenka (2008) als die Eigenschaft, dass nur aktivierte Synapsen und nicht angrenzende, nicht aktivierte Synapsen eine LTP auslösen. Ein wichtiger Aspekt bei der Charakterisierung der LTP ist, dass auch die Reizarten verschieden sein können. So konnten behaviorale Reize (u.a. van Praag et al., 1999; Whitlock et al., 2006), elektrische Reize *in vitro* (u.a. Malenka, 1994) oder *in vivo* (u.a. Abraham et al., 2001) als auch magnetische Reize (Tokay et al., 2009, 2014) einen LTP-Effekt generieren. Die jeweiligen dem Reiz zugrunde liegenden Stimulationsmuster für die Auslösung einer LTP unterschieden sich jedoch.

Gerade die LTP des bereits eingangs erwähnten Hippocampus ist von besonderem Interesse bei der Frage nach möglichen Einflüssen oder Grundbedingungen bei der Gedächtnisgenerierung oder im Hinblick auf Pathologien mit folgenden Beeinträchtigungen des Erinnerungsvermögens.

1.2. Mechanistische Grundlagen veränderter synaptischer Effektivität

Für die Erhöhung der Effektivität synaptischer Transmissionen an Zellen des Hippocampus, zeigte sich, dass kurze, hochfrequente Stimulationen ausreichend sind. Die Effekte waren über längere Zeit (bis zu Tagen, s. auch Krug et al. 1984) präsent und sind als long-term-potentiation (LTP) bekannt (Citri & Malenka, 2008). Wie bereits eingangs erwähnt, gilt LTP als ein dominantes Modell der aktivitäts-abhängigen synaptischen Plastizität und konnte an allen erregenden Leitungsbahnen im Hippocampus nachgewiesen werden (Bliss & Collinridge 1993). Es muss jedoch hervorgehoben werden, dass in die Zeitspanne der LTP auch andere, weniger zeitungsfassende Effekte fallen. Dazu gehören unter anderem die post-tetanische Potenzierung (post-tetanic potentiation, PTP) sowie Formen anderer Kurzzeitpotenzierungs-Prozesse (z.B. Augmentation, siehe Fioravante & Regehr, 2012). Beispielweise beschreibt die PTP erhöhte synaptische Antworten nach einer Periode hochfrequenter Tetanisierung afferenter Fasern (Lee et al. 2007). Dieser Form der Kurzzeitpotenzierung (im Zeitspektrum von Zehntelsekunden bis zu Minuten, s. auch Fioravante & Regehr, 2011) wird eine wichtige Rolle bei synaptischen Verarbeitungsprozessen zugeschrieben (Abbot & Regehr, 2004) und muss zumindest in der

Anfangsphase einer LTP als mögliche Ursache von Bahnungseffekten gemessener Potentiale berücksichtigt werden.

Die long-term potentiation (LTP) wird u.a. durch NMDA-Rezeptoren vermittelt und wird als zelluläres Substrat des Lernens und Gedächtnisses angesehen (Lüscher & Malenka et al., 2012). Bei der NMDA-abhängigen LTP zwischen CA3-CA1 Synapsen im Hippocampus gilt insbesondere die Postsynapse als Stätte der Induktion und Expression der zellulären Grundlagen dieses Potenzierungseffektes (Lüscher & Malenka et al., 2012). Für die LTP-Induktion ist es jedoch notwendig, Prä- und Postsynapse weitgehend zeitgleich zu aktivieren. Als Effekt der möglichst simultanen Aktivierung werden Signalkaskaden ausgelöst, welche die veränderte synaptische Effektivität ermöglichen und unterhalten. Als grundlegend für den Potenzierungseffekt durch die koinzidente Aktivierung von Prä- und Postsynapse gilt u.a. der Ca^{2+} -Influx durch die NMDA-Rezeptoren, welcher gesteigert/maximal ist, wenn die Postsynapse, in dem Moment der Glutamat-Ausschüttung an der Präsynapse, depolarisiert ist (Lüscher & Malenka et al., 2012). Die Rolle des NMDA-Rezeptors wird daher auch als molekularer „Koinzidenz-Rezeptor“ interpretiert, der den Calcium-Influx erlaubt, wenn die afferente Aktivität in (zeitlicher) Kombination mit einer Depolarisierung der Zielzelle (Postsynapse) auftritt (Malenka, 1994). Die NMDA-Rezeptor-Aktivierung wiederum bewirkt durch den Ca^{2+} -Einstrom metabolische Prozesse, welche zu langanhaltenden Erhöhungen der durch den AMPA-Rezeptor vermittelten Antworten führen (Park et al., 2014). Daher gilt der NMDA-Rezeptor als essenziell für die Induktion einer hippocampalen LTP in vitro (Miyamoto, 2006; s. Abb. 1).

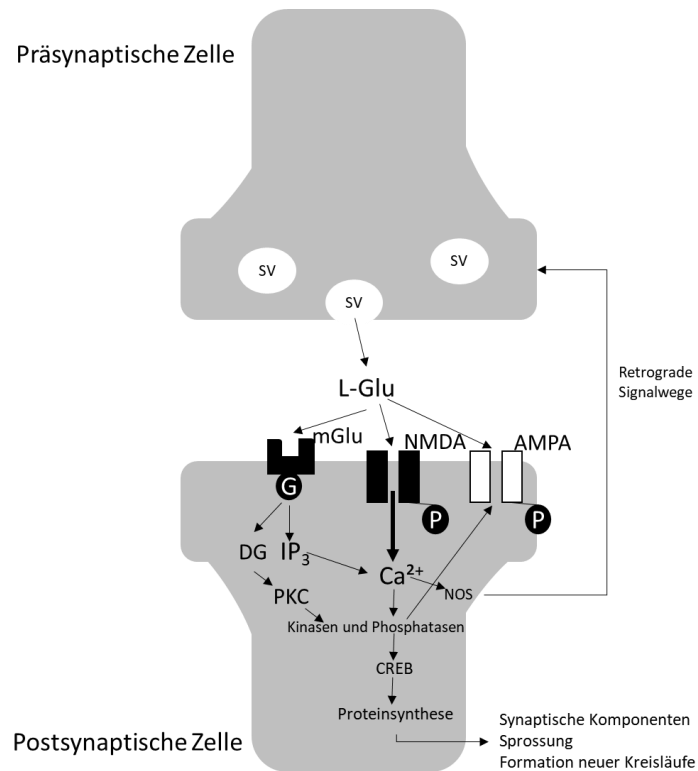


Abbildung 1: Selektive schematische Darstellung möglicher Mechanismen der LTP-Induktion und der Aufrechterhaltung. Grundlegend involviert sind Signal-Transduktions-Kaskaden, welche eine Glutamatausschüttung, Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, Ca²⁺-Influx und Aktivierung von Calmodulin- und MAP-Kinasen beinhaltet. Eine Erhöhung des Ca²⁺-Influxes wird durch Aktivierung von AMPA-Rezeptoren erreicht.

LTP-Effekte konnten auch durch Verwendung repetitiver magnetischer Stimulationen (rMS) ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang wurden die LTP bei Applikation der rMS *in vivo* (Tan et al. 2013) als auch *in vitro* (Tokay et al., 2009, 2014; Ahmed & Wieraszko, 2006) nachgewiesen. In Bezug auf die Wirkung der rMS betonen Tokay et al. (2009), dass ein Nachteil der *in vivo* Exposition und anschließender *in vitro* Messung darin besteht, dass der Hippocampus nicht die einzige neuronale Struktur ist, welche von der rMS stimuliert wird. So könnten auch spezifische neuronale Verbindungen mitstimuliert werden und die Wirkung der rMS beeinflussen. Als mögliche Ursache der über die Stimulationsdauer hinausgehenden Potenzierungs- oder Inhibierungseffekte wurden Mechanismen der synaptischen Plastizität verantwortlich gemacht. Tan et al. (2013) hoben in diesem Zusammenhang hervor, dass auch Alternativmechanismen wie eine veränderte Membranerregbarkeit durch Modifikation von Ionenkanälen, des Ruhemembranpotenzials oder des Schwellenpotenzials für die Aktionspotential-Auslösung berücksichtigt werden müssen. Ahmed & Wieraszko (2006) konnten zusätzlich zeigen, dass die Effekte der rMS

frequenzabhängig waren. Höhere Frequenzen (15Hz, appliziert in vivo, Potenzialmessungen in vitro) zeigten eine Vergrößerung des LTP-Effekts, während bei geringeren Frequenzen (1-8 Hz) keine Beeinflussung der LTP messbar war. Das Frequenzspektrum der rMS für die Auslösung exzitatorischer Effekte benennen Tan et al. (2013) gar mit Wiederholungsraten der magnetischen Stimulationen ab über 2Hz. Es sei jedoch angemerkt, dass dieser Wert aus Daten von Versuchen am Tiermodell als auch an Menschen generiert wurde. Überdies lässt sich jedoch konstatieren, dass höhere Frequenzen der rMS exzitatorische Effekte auf der Basis synaptischer Potenzierungseffekte bedingen.

In Studien unseres Labors konnte gezeigt werden, dass eine HFMS bei in vitro Applikation (an Schnittpräparaten des Hippocampus von Wistar-Ratten) direkt persistierende Änderungen in der synaptischen Aktivität in Form einer LTP, gemessen an Schaffer-Kollateralen-CA1 Synapsen, nach sich zogen (Tokay et al., 2009). Dazu wurden zur Stimulation Frequenzen von 100 Hz verwendet, welche in zwei verschiedenen Stimulationsprotokollen (Protokoll 1: 10 trains á 20 Pulse bei 100 Hz mit 1 Sekunde Interstimulationsintervall bei 5 Wiederholungen mit 10 Sekunden Intervall; Protokoll 2: 3 trains von 100 Pulsen bei 100 Hz mit 20 Sekunden Intervall) getestet wurden. Im Vergleich zeigten beide Protokolle der HFMS einen Anstieg der fEPSPs, wobei im Vergleich bei Protokoll 2 der Anstieg geringer ausfiel. Abbildung 2 illustriert die Ergebnisse unter Verwendung von Protokoll 1. Die Ergebnisse zeigten, dass die HFMS suffizient ist, eine LTP bei Schnittpräparaten des Hippocampus zu induzieren. Versuche mit D-AP5 behandelten Präparaten zeigten ferner, dass bei Blockade der NMDA-Rezeptoren keine LTP ausgelöst wurde (s. Abb. 2). Daher wurde geschlossen, dass der postsynaptische NMDA-Rezeptor zur Erhöhung der synaptischen Transmission infolge einer HFMS (gemäß des jeweils verwendeten Protokolls) beiträgt.

Tokay et al. (2014) gingen in Folgeversuchen der Frage nach, ob die NMDA-Rezeptor-abhängige Form der Stimulation mittels HFMS einen Effekt auf die synaptische Plastizität einer elektrisch induzierten LTP besitzt. Das Konzept, dass die vorhergehenden neuronalen Aktivierungsmuster die Richtung und das Ausmaß der durch einen bestimmten Reiz ausgelösten synaptischen Plastizität beeinflussen, gilt als Metaplastizität. Für das Priming der hippocampalen Schnitte mittels HFMS wurde das Stimulationsprotokoll 1 (siehe oben; Tokay et al., 2009) verwendet. Das sich anschließende Konditionierungsprotokoll der elektrischen Stimulation zur LTP-Induktion bestand aus 10 Bursts (jeweils 1 Sekunde Pause) von 20 Pulsen bei 100 Hz. Vergleichsversuche fanden unter Verwendung von D-AP5

und/oder MCPG (Gruppe I/II metabotroper Glutamaterezeptor-Antagonist) und MSOP (selektiver Gruppe III metabotroper Glutamaterezeptor-Antagonist) statt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine durch die elektrische Stimulation erzeugte LTP bei einem Priming durch die HFMS nicht weiter nachweisbar war (s. auch Abb. 2) und, im Gegenteil zu den Versuchen ohne HFMS, sogar eine signifikante LTD aufwies. In den Experimenten zeigte sich weiterhin, dass mGlu-Rezeptoren während der HFMS aktiviert werden und so zur LTD beitragen können, eine Blockade dieser Rezeptoren (durch MSOP und MCPG) jedoch nicht vollständig die LTP wiederherstellt (Abb. 2 B). Ferner zeigte sich, dass die zusätzliche Applikation von D-AP5 den LTD-bewirkenden priming-Effekt der HFMS ausschaltete und somit die Annahme bestätigt, dass der priming-Effekt NMDA-Rezeptor-abhängig ist (Tokay et al. 2014).

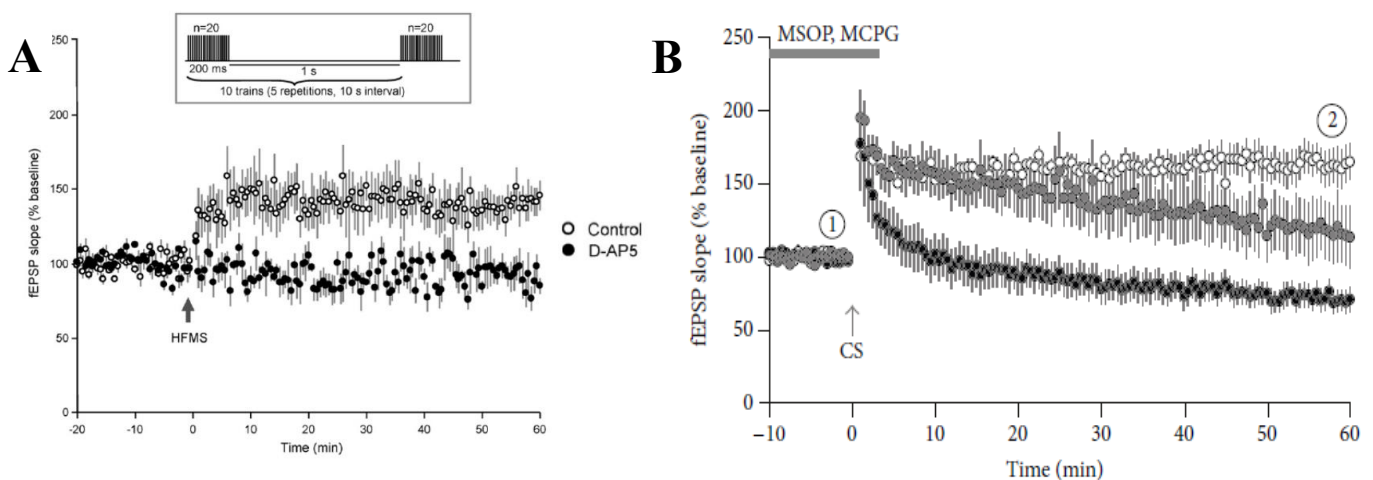


Abbildung 2 : A) Ergebnisse von Tokay et al. (2009) unter Verwendung des in der Box gekennzeichneten Stimulationsprotokolls: In den Kontrollversuchen zeigt sich nach HFMS eine LTP, die in den Versuchen unter Verwendung von D-AP5 nicht nachweisbar war. B) Ergebnisse von Tokay et al. (2014): ohne HFMS-Priming (offene Kreise) zeigte sich im Vergleich zu den Versuchen mit Priming (schwarze Kreise) eine LTP. Die Versuche unter Zugabe von MSOP und MCPG (graue Kreise) während der HFMS zeigten ebenfalls eine LTP.

Grundlegend wird diskutiert, dass Metaplastizität eine synaptische Homöostase bedingt, welche darüber erklärt wird, dass durch diesen Mechanismus Synapsen keiner Sättigung durch Potenzierung oder Inhibierung unterliegen (Tokay et al. 2014; s. Abb. 3). Diese Metaplastizität involviert sowohl NMDA-Rezeptoren als auch mGlu-Rezeptoren und kann durch magnetische Stimulationen (als auch elektrische, pharmakologische und behaviorale Aktivierung) hervorgerufen werden.

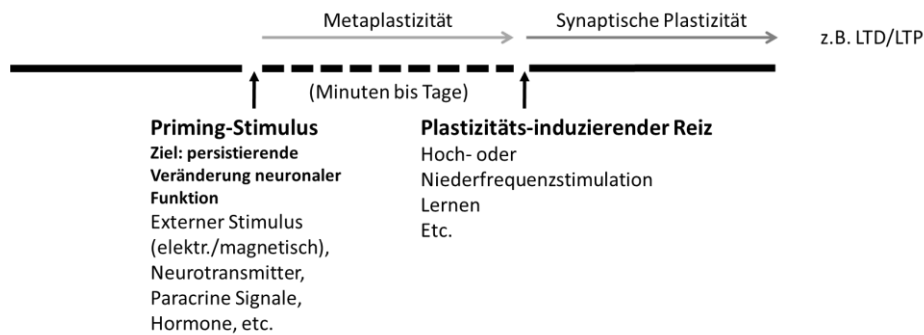


Abbildung 3: Visualisierung des Wirkprinzips der Metaplastizität (modifiziert nach Abraham, 2008) Ein Priming-Stimulus beeinflusst die neuronale Aktivität (gestrichelte Linie) und die Wirkung des Plastizitäts-induzierenden Reizes. Die subsequente synaptische Plastizität kann u.a. als LTD oder LTP gemessen werden.

Bisher wurde hauptsächlich auf die Änderungen der synaptischen Transmission, als grundlegender Mechanismus der LTP-Effekte, eingegangen. Wie jedoch eingangs bereits kurz erwähnt, kann die synaptische Aktivität nach rMS auch durch Änderungen von Ionenkanälen und der subsequent angepassten elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Kanäle beeinflusst werden. Bei Versuchen unter Verwendung längerfristiger rMS (über 14 Tage bei Stimulation in vivo; Protokoll: 20 trains á 20 Pulse bei 1 Hz mit 10 Sekunden inter-train-Intervall mit insgesamt 400 Stimulationspulsen) zeigte sich, dass Mechanismen involviert sind, welche die Auslösung eines Aktionspotenzials (Erhöhung der Spitzenamplitude und des maximalen Slopes, Erniedrigung der Auslöseschwelle) beeinflussen, sowie einen Anstieg des synaptischen Inputs auf CA1-Neurone bedingen (Tan et al., 2013). Als ursächlich für diese Anpassungen an die rMS gelten u.a. Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften von Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Kanälen. Ob und in welchem Ausmaß diese Effekte auch bei der HFMS mit einer sich zeitnah anschließenden Ableitung von Potentialen eine Rolle spielen ist bis dato ungeklärt.

1.2.1. Rolle der Gruppe-I metabotropen Glutamatrezeptoren

Wie bereits hervorgehoben, spielen die metabotropen Glutamat-Rezeptoren eine kritische Rolle in der Regulation der LTP und LTD. Dies wurde an Studien in vivo (Naie & Manahan-Vaughan, 2004; Manahan-Vaughan & Reymann, 1995) als auch in vitro (Tokay et al., 2014; Neyman & Manahan-Vaughan, 2008) demonstriert. Die verschiedenen mGlu-Subtypen

werden in drei Gruppen unterteilt, basierend auf ihrer Kopplung an G-Proteine. Während die Gruppe I-Rezeptoren (mGluR-Subtypen 1 und 5) vorrangig postsynaptisch lokalisiert sind, finden sich die Gruppe II und III Rezeptoren hauptsächlich präsynaptisch (Andersen et al., 2007, S. 216). Auch im Hinblick auf den Einfluss der einzelnen Rezeptor-Typen auf synaptische Transmissionsprozesse zeigen sich Unterschiede. Die Gruppe II- und III-Rezeptoren bewirken bei entsprechender Aktivierung einen Anstieg der LTP-Schwelle und fördern bei LTD-Auslösung eine Depression der synaptischen Transmission im Hippocampus durch präsynaptische Mechanismen (Kamiya et al., 1996; Mukherjee & Manahan-Vaughan, 2013). Die Gruppe-I-Rezeptoren hingegen bewirken bei Aktivierung eine Fazilitierung einer hippocampalen LTP (Mukherjee & Manahan-Vaughan, 2013).

Die Beiträge der einzelnen Subtypen der Gruppe I mGlu-Rezeptoren (mGluR1 und mGluR5) involvieren unterschiedliche Wirkmechanismen. Während mGlu1 hauptsächlich die LTP-Induktion beeinflusst, wirkt mGlu5 sowohl auf die Induktion als auch auf die Aufrechterhaltung einer persistierenden LTP (Mukherjee & Manahan-Vaughan, 2013). Knock-out-Versuche dieses Rezeptortyps an Mäusen zeigten gar eine stark beeinträchtigte LTP in der CA1-Region des Hippocampus als auch Verschlechterungen in räumlichen Gedächtnisleistungen der Versuchstiere (Lu et al. 1997). Analog zu diesen Ergebnissen resultierte eine pharmakologische Blockade der Gruppe-I-mGlu-Rezeptoren in einer Depression der LTP, des Ausmaßes der LTD und behavioraler Effekte wie dem räumlichen Lernen (Naie & Manahan-Vaughan, 2004). Als zugrunde liegende Mechanismen wurden bei einer selektiven Aktivierung von mGlu1 eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, einer direkten Depolarisation von CA1 pyramidalen Neuronen, einer erhöhten Frequenz spontaner IPSPs sowie einer Hemmung der synaptischen Transmission in der hippocampalen CA1-Region gezeigt (Naie & Manahan-Vaughan, 2004). Der mGlu5-Rezeptor wirkte über eine Unterdrückung von Calcium-aktivierten Kalium-Strömen und einer Potenzierung von NMDA-Rezeptor Strömen (Naie & Manahan-Vaughan, 2004).

Die mGlu-Rezeptoren der Gruppe I demonstrieren eine Bedeutung für die LTP und das räumliche Lernen. Die Hemmung der Rezeptoren resultiert auch in einer Hemmung der Induktion und Expression einer LTP sowie der Gedächtnisleistung für räumliche Lernaufgaben in Tierversuchen (Naie & Manahan-Vaughan, 2004; Mukherjee & Manahan-Vaughan, 2013). Es wird daher angenommen, dass diese Rezeptoren eine kritische Rolle bei der Vermittlung zwischen der synaptischen Plastizität und dem Lernen einnehmen.

1.3. Mechanismen der elektrischen und magnetischen Stimulation

Die bisherigen Ausführungen über die Wirkung hochfrequenter Stimulationen auf hippocampale Strukturen stammen sowohl aus Studien unter der Verwendung von magnetischer als auch elektrischer Stimulationsprotokolle. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt ausgeführt, können hochfrequente magnetische Stimulationen eine LTP auslösen. Die bei Tokay et al. (2009; 2014) verwandten Stimulationsprotokolle für die magnetische Stimulation, waren gewählt, da sie bei Versuchen mit elektrischer Stimulation mit vergleichbaren Parametern (z.B. Stimulationsfrequenz) durchgeführt wurden und ebenfalls eine LTP auslösten. Die Prinzipien der Stimulationsarten per se unterscheiden sich jedoch im Vergleich.

Die magnetische Stimulation biologischer Gewebe erzielt ihre Wirkung durch die schnell wechselnden Magnetfelder. Das biologische Gewebe fungiert dabei als sekundärer Stromkreis, in welchem eine elektrische Spannung induziert wird und das Gewebe somit zu einem Träger des induzierten Stroms macht (Hess, 2005). Der Magnetimpuls bewirkt einen transmembranösen Stromfluss im Gewebe, welcher parallel zum Strom der Reizspule verläuft (Siebner & Ziemann, 2007). Wie Tokay et al. (2009) betonen, kann eine pure magnetische Komponente jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dem gegenüber steht die elektrische Stimulation durch Injektion der Ladungsträger am Interface der beiden in die Stimulation involvierten Phasen (Elektrode und biologisches Gewebe/Elektrolytlösung). In der Elektrode wird die Ladung durch die Elektronen getragen, in den biologischen Geweben dann durch die Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^-). Somit besteht der zentrale Prozess am Elektroden/Gewebe-Interface in der Transduktion von Ladungsträgern von Elektronen in Ionen (Merrill et al., 2005). Gemein ist den beiden Stimulationsarten, dass für eine Depolarisation eines Axons die Änderungsrate der Feldstärke entlang einer bestimmten Raumrichtung entscheidend ist (Siebner & Ziemann, 2007). Ist diese Depolarisation überschwellig, entsteht ein Aktionspotential.

Beaulieu & Schneider (2015) weisen überdies darauf hin, dass im Vergleich elektrischer und magnetischer Stimulation ein Unterschied in der Konformation/Bildung des Pulses und der Dauer anzunehmen ist. Bei in-vivo Versuchen am Menschen ist beispielsweise ein verändertes Rekrutierungsmuster bei Muskelstimulationen oder ein weniger starkes Ansprechen kutaner Nerven bei magnetischer Stimulation nachweisbar (Beaulieu & Schneider 2015). Der zuletzt genannte Fakt wird darauf zurückgeführt, dass dünne,

oberflächlich gelegene Nerven nicht durch die magnetische Stimulation depolarisiert werden. In der Theorie erzeugt die magnetische Stimulation ein elektrisches Feld im gesamten erfassten Gewebe, ein elektrischer Strom fließt jedoch nur in leitenden Strukturen, wie z.B. einem Nerven (Beaulieu & Schneider 2015). Dieses charakteristische Reizansprechen schließt die Möglichkeit ein, dass auch bei in-vitro Stimulationen des Hippocampus eine inhärente Selektivität in den Stimulationsmechanismen bei magnetischer und elektrischer Reizsetzung existiert, welche die Effekte der jeweiligen Stimulationsart mitbeeinflussen kann.

Wie bereits erwähnt, sind bei der LTP-Auslösung der CA1-Region des Hippocampus bei Ratten verschiedene Mechanismen involviert. Für die elektrische Stimulation ist deren mechanistische Grundlage bei der LTP-Auslösung gut dokumentiert. Park et al. (2014) bemerken in Hinblick auf die NMDA-Rezeptor-abhängige Form der LTP, dass mindestens drei verschiedene Plastizitäts-Prozesse, welche zuweilen zeitlich überlappend sind, an der LTP-Auslösung beteiligt sind. Dabei spielt bei der Unterscheidung der verschiedenen LTP-Subformen die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Transmitter-releases durch den entsprechenden Reiz eine entscheidende Rolle. So resultiert eine elektrische hochfrequente Stimulation afferenter Fasern u.a. in einer exzessiven Glutamat-Ausschüttung und folglich einer AMPA-Rezeptor bedingten Depolarisation der postsynaptischen Membran, welcher den Mg^{2+} -Block des NMDA-Rezeptors aufhebt (Park et al. 2014). Ferner weisen die Autoren darauf hin, dass die Effekte auf die LTP Input-spezifisch sind: unterschiedliche Stimulationsmuster bedingen unterschiedliche LTP-Mechanismen. Bei diesen Stimulationsmustern sind zeitliche und räumliche Charakteristiken der Stimulation entscheidend. Über einen solchen Zusammenhang könnten Unterschiede zwischen den Stimulationsarten (magnetisch und elektrisch) begründet sein, da anzunehmen ist, dass durch die Natur der Reizgenerierung (siehe auch weiter oben in diesem Abschnitt) Unterschiede in genau diesen Charakteristiken entstehen können. Der messbare Effekt (die LTP) wäre demnach vergleichbar, die genauen Mechanismen im Vergleich von magnetischer und elektrischer Stimulation jedoch bis dato nicht vollständig geklärt.

Dennoch zeigen sich mechanistische Parallelen. Tokay et al. (2009) konnten unter anderem zeigen, dass bei magnetischer Stimulation, wie auch bei elektrischer Stimulation, eine postsynaptische NMDA-Aktivierung für die LTP-Induktion anzunehmen ist. Ferner konnte die Arbeitsgruppe später zeigen, dass eine Metaplastizität durch Aktivierung von m-Glu-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren durch magnetische Stimulation erzeugt werden konnte

(Tokay et al., 2014). Diese Effekte konnten bei Versuchen mittels elektrischer Stimulation (als auch pharmakologischer und behavioraler Aktivierung spezifischer Transmitter-Rezeptoren) zuvor bereits gezeigt werden (Abraham, 2008). Auch der Beitrag der mGlu-Rezeptoren ließ sich bei elektrischen Reizungen nachweisen (Qi et al., 2012).

1.4. Zusammenfassende Bemerkungen und Fragestellung

In vielen Studien zeigten sich deutliche Korrelationen zwischen den elektrophysiologisch messbaren Einflüssen (Bahnung oder Hemmung) auf die LTP und subsequenten behavioralen Effekten bei geforderten Gedächtnisleistungen der Versuchstiere. Die mechanistischen Grundlagen der LTP sind komplex und es wird angenommen, dass sie die gleichen molekularen Mechanismen involvieren, welche auch für das Lernen und das Gedächtnis benötigt werden. Wie bisher dargestellt, sind die Stimulationscharakteristika als auch die Reizart entscheidende Komponenten des LTP-Effekts. LTP-auslösende Stimulationsprotokolle erwiesen sich sowohl bei elektrischen als auch magnetischen Reizungen bei in vitro-Versuchen als suffizient. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass der LTP-Effekt selbst zwar das äquivalente Resultat dieser Stimulationen darstellt, grundlegende Mechanismen aufgrund der Natur der Reizapplikation jedoch möglich sind. Vorangegangene Studien unseres Labors konnten zeigen, dass magnetische Stimulationen zum einen eine NMDA-Rezeptor abhängige Form der LTP auslösen konnten, und zum anderen, dass sie eine NMDA-abhängige Form der Metaplastizität bedingen.

Aufbauend auf den geschilderten Vorarbeiten sollen in dieser Studie weitere grundlegende Mechanismen von in vitro Stimulationen hippocampaler Schnittpräparate mittels hochfrequenter Magnetstimulation adressiert werden. Die folgenden Fragestellungen sind dabei zentral:

1. Sind die zuvor beschriebenen Effekte einer durch die magnetische Stimulation induzierten Metaplastizität reproduzierbar?
2. Welchen Einfluss hat der Verlauf der Schaffer-Kollateralen relativ zum induzierten magnetischen Feld auf die resultierende neuronale Antwort?
3. Gibt es einen selektiven Einfluss der Gruppe 1 mGlu-Rezeptoren nach hochfrequenter Magnetstimulation auf fEPSPs hippocampaler Neurone der CA1-Region?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Präparation

Die Experimente erfolgten an Schnittpräparaten von 2-3 Monaten alten Wistar-Ratten (Charles-River- Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die Präparation wurde durchgeführt unter Zustimmung des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern sowie unter Beachtung der Richtlinien der Tierschutz-Versuchstierverordnung. Die Tiere wurden zunächst tief anästhetisiert mittels Diethyl-Äther und anschließend nach Prüfung der Narkosetiefe anhand der Halte-, Stell- und Schmerzreflexe dekapiziert. Die Schädelkalotte wurde mit einem vom Foramen magnum aus nach rostral verlaufenden Schnitt sowie zwei von lateral nach kranial führenden Schnitten eröffnet. Das Zerebellum wurde mit einem Skalpell entfernt und das Zerebrum anschließend entnommen und sofort in oxygenierte (95% O₂, 5% CO₂), eisgekühlte Succrose-Lösung (pH 7,4, Osmolarität: 306-314) überführt. Das Gehirn wurde anschließend an der Konvexität mittels Klebstoff auf einem magnetischen Zylinder fixiert, in einer Schnittvorrichtung befestigt und sofort in oxygenierter Succroselösung gebadet. Zur Verhinderung möglicher Hypoxie-Schäden betrug die Präparationszeit maximal eine Minute. Anschließend wurden 400 µm dicke Schnitte in transversaler Ebene (s. Abb. 4) der hippocampalen Formation angefertigt (ca. 8-12 Schnitte pro Präparat). Die Schnitte erfolgten mit einem Schneidegerät Typ Vibratome (Campden Instruments, Loughborough, England) mit einer Frequenz von 100 Hz bei einem Vortrieb von 6-7 µm/s. Nach dem Schneiden wurden die Schnittpräparate in einer Kammer, welche mit oxygenierter Succroselösung gefüllt war, bei Zimmertemperatur aufbewahrt und mindestens für 60 Minuten ruhen gelassen. Die Schnitte wurden permanent mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast.

2.1.1. Übersicht der verwendeten Versuchslösungen

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Versuchslösungen

Lösung	Inhalt	mM	MW (g/mol)	g/l
ACSF	NaCl	124,5	58,44	7,2758
	NaHCO ₃	26	84,01	2,1843
	KCl	3	74,56	0,2237
	NaH ₂ PO ₄	1,25	120	0,1500
	CaCl ₂	2,5	147,02	0,3676
	MgCl ₂	1,3	95,22	0,1238
	Glucose	10	180,16	1,8016
Sucrose	NaCl	87	58,44	5,0843
	NaHCO ₃	25	84,01	2,1002
	KCl	2,5	74,56	0,1864
	NaH ₂ PO ₄	1,25	137,99	0,17249
	CaCl ₂	0,5	147,02	0,0735
	MgCl ₂	7	95,22	0,6665
	Glucose	10	180,16	1,8016
	Sucrose	75	342,3	25,6725

Die Lösungen hatten eine Osmolalität von 308-320 mosmol/kg H₂O. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

2.1.2. Übersicht der verwendeten Stammlösungen

Gabazin (SR 95531 hydrobromide): Vor Beginn der Messversuche wurden die Hippocampus-Schnitte für ca. 30 Minuten mittels Gabazin versetzter ACSF perfundiert (0,5 µM). Gabazin fungiert als selektiver, kompetitiver GABA_A-Rezeptor-Antagonist. Durch die Zugabe von Gabazin war es möglich, die Rolle der GABAergen Hemmung in den Versuchen zu minimieren.

DHPG ((RS)-3,5-DHPG): Ein Teil der Versuche wurde unter Beimischung von DHPG zu ACSF durchgeführt. DHPG ist ein selektiver Gruppe-1 metabotroper Glutamat-Rezeptor-Agonist, welcher mGLU₁ und mGLU₅ aktiviert. In den entsprechenden Versuchen wurden 100 µM zur ACSF hinzugefügt und über 20 Minuten perfundiert.

CHPG: Zur näheren Differenzierung möglicher Funktionsmechanismen der HFMS wurde in einigen Versuchen CHPG verwendet. CHPG ist ein selektiver mGLU₅ metabotroper Rezeptor-Agonist. In den entsprechenden Versuchen wurden 250 µM zur ACSF-Lösung hinzugefügt und die Schnitte mit diesem Gemisch für 20 Minuten perfundiert.

2.2. Datenaufnahme und elektrische Stimulation der Hippocampus-Schnitte

Die Schnitte wurden im Anschluss an die 60-minütige Ruhephase in eine Stimulationskammer (BSC-HAT, Harvard Apparatus, Holliston, USA) transferiert und für ca. 30 Minuten mit vortemperierter, oxygenierter und mit Gabazin versetzter ACSF perfundiert. Die Flussgeschwindigkeit wurde mittels einer Infusionspumpe (MCM-500; MC-Medizintechnik GmbH, Alzenau, Deutschland) bei ca. 2 ml/min konstant gehalten. Die Temperatur der Schnitte in der Stimulationskammer betrug 32 ± 1 °C, was mittels eines Messgerätes (TC-10, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) kontrolliert wurde. Zur Stimulation und Ableitung der Feldpotentiale kamen Glaspipetten aus Borosilikatröhrchen (GB 150-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) zum Einsatz. Die Pipetten selbst wurden für jede Messung individuell unter Nutzung eines Pipettenziehgerätes (PIP5, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) angefertigt. Der Elektrodenwiderstand der Pipetten betrug 2-3 MΩ. Für die Messung der Feldpotentiale wurden die Pipetten mit ACSF gefüllt. Die Messkammer war auf einem vibrationsgedämpften Tisch positioniert, welcher durch einen geerdeten faradayschen Käfig abgeschirmt wurde. In die mittels ACSF-Lösungen befüllten Mess- und Stimulationspipetten wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt, welcher mit dem Verstärker, bzw. dem Stimulationsgerät (Pulsstimulator ISO-STIM 01D npi electronics, Tamm, Deutschland) verbunden wurde. Zur Stimulation der Schnitte sowie zur Ableitung der Feldpotentiale wurden die Pipetten im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus platziert (s. Abb. 4B).

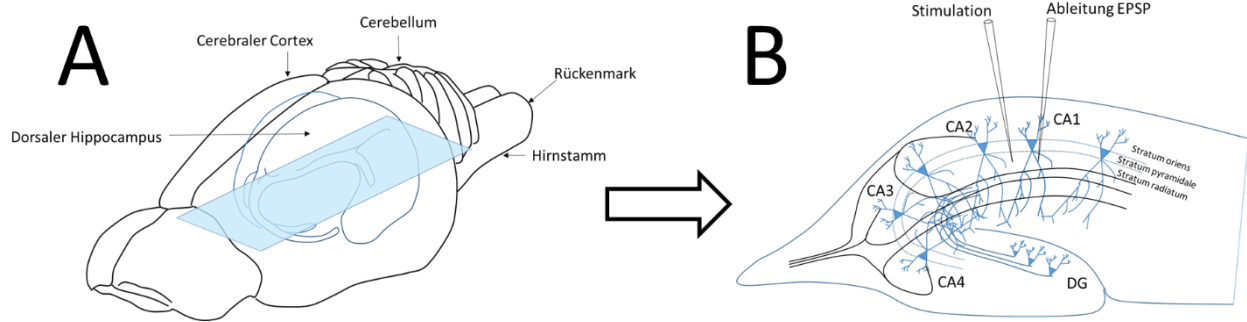


Abbildung 4: (A) Anatomische Schemazeichnung des Rattengehirns und Lage des Hippocampus mit Hervorhebung der in diesen Versuchen gewählten transversal verlaufenden Schnittebene (blau). (B) Hippocampale Schnitte in der schematischen Darstellung mit Positionierung der Stimulationselektrode und der extrazellulären Ableit-Elektrode im Stratum radiatum zur Aufnahme der EPSPs der CA1-Region.

In dieser Arbeit wurden Feldpotentiale (field excitatory postsynaptic potentials; fEPSP) gemessen. Dazu wurde eine Einzelpuls-Stimulation, welche über einen Master-8-Stimulator (A.M.P.I., Jerusalem, Israel) appliziert wurde, genutzt. Nach der Messung der maximalen Amplitude der fEPSP ($fEPSP_{max}$) wurde die Stimulationsstärke zur Messung der Langzeiteffekte der Stimulation auf 40-50% der $fEPSP_{max}$ eingestellt. Die gemessenen Signale wurden vorverstärkt und Tiefpass gefiltert bei 1 kHz. Die analogen Daten wurden digitalisiert durch einen Micro1401 Analog-Digital-Wandler (CED, Cambridge, UK) und für die weitere Verarbeitung gespeichert unter Nutzung der Signal 2.16 Software (CED, Cambridge, UK).

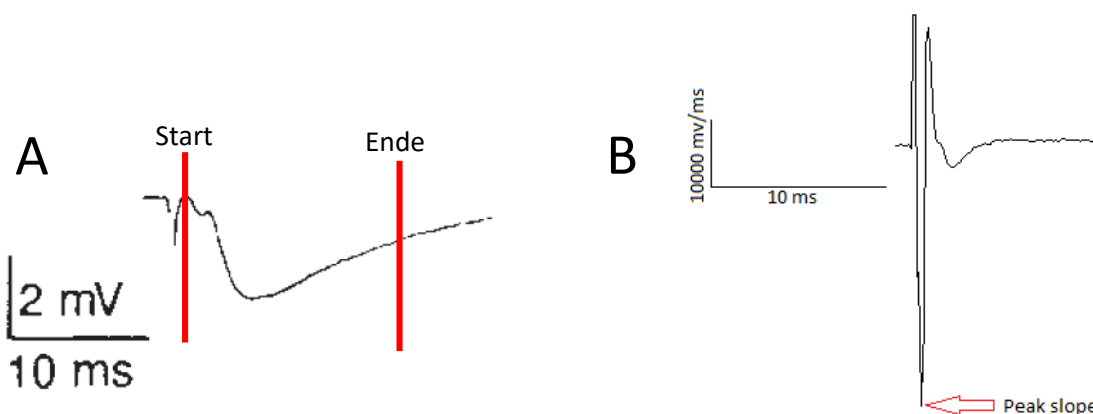


Abbildung 5: A: Beispiel der gemessenen Feldpotentiale (fEPSP) und B: des differenzierten Signals und die Bestimmung des maximalen Anstiegs (slope). Die vertikalen roten Linien in A verdeutlichen den definierten Start sowie das Ende der fEPSPs und somit den Bereich, in welchem der slope bestimmt wurde.

In diesen Versuchen wurde als Messparameter der Anstieg (slope) der Feldpotentiale gemessen. Dazu wurde der Start und das Ende der Messungen bestimmt und in diesem Intervall der maximale Anstieg ermittelt, indem der Maximalwert des differenzierten Signals bestimmt wurde (Abb. 5 verdeutlicht die Vorgehensweise).

2.3. Stimulation der Schnitte mittels HFMS

In dieser Arbeit wurden die Schnittpräparate der Hippocampus-Region mittels high-frequency magnetic stimulation (HFMS) einem Priming vor der Messung der fEPSPs unterzogen. Dazu wurde ein MagPro R100 Stimulator der Firma MagVenture (Dänemark) verwendet. Die Stimulation erfolgte entsprechend eines vordefinierten Protokolls, welches sich bereits in anderen Studien unseres Labors als suffizient erwies, eine LTP in Schnitten des Hippocampus zu evozieren (Tokay et al. 2009, s. Abb. 7). Für die Stimulation wurde eine Rundspule (MC125, MagVenture, Dänemark) verwendet. Das Profil des induzierten Feldes im prinzipiellen Versuchsaufbau ist der Abb. 6c zu entnehmen, Abb. 6 a,b demonstrieren die Ausrichtung des Feldes in Relation zu den Hippocampus-Schnitten nach der Positionierung der Spule über der Messkammer.

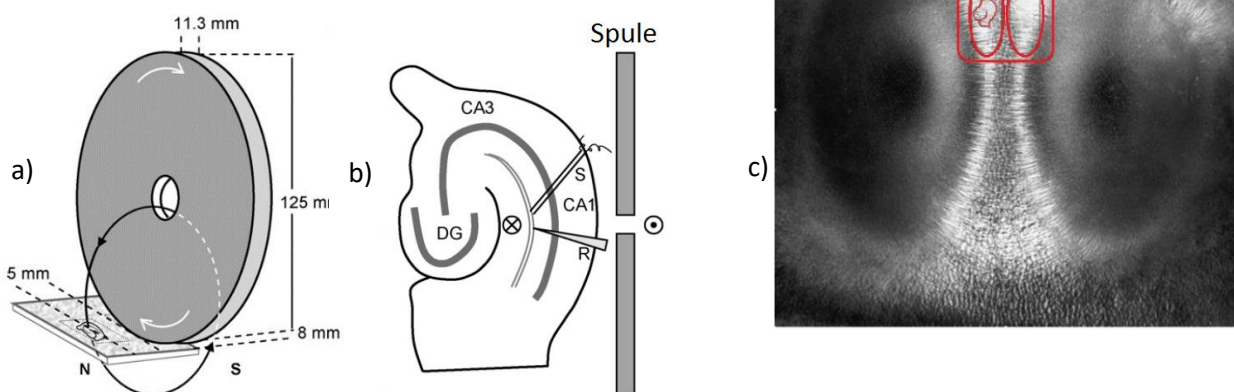


Abbildung 6: Prinzipieller Aufbau der Messungen mit Orientierung der Spule in Relation zu den Schnittpräparaten und resultierendem Verlauf der magnetischen Feldlinien während der Stimulation. (modifiziert nach Tokay et al. 2009)

Das verwendete Stimulationsprotokoll bestand aus 10 Trains á 20 Magnetpulsen mit einer Frequenz von 100 Hz (Tokay et al., 2009, 2014). Der Abstand zwischen den Trains betrug

1 Sekunde. Dieses Schema wurde 5x wiederholt mit einem jeweiligen Abstand von 10 Sekunden. Die Abb. 7 visualisiert das Stimulationsprotokoll.

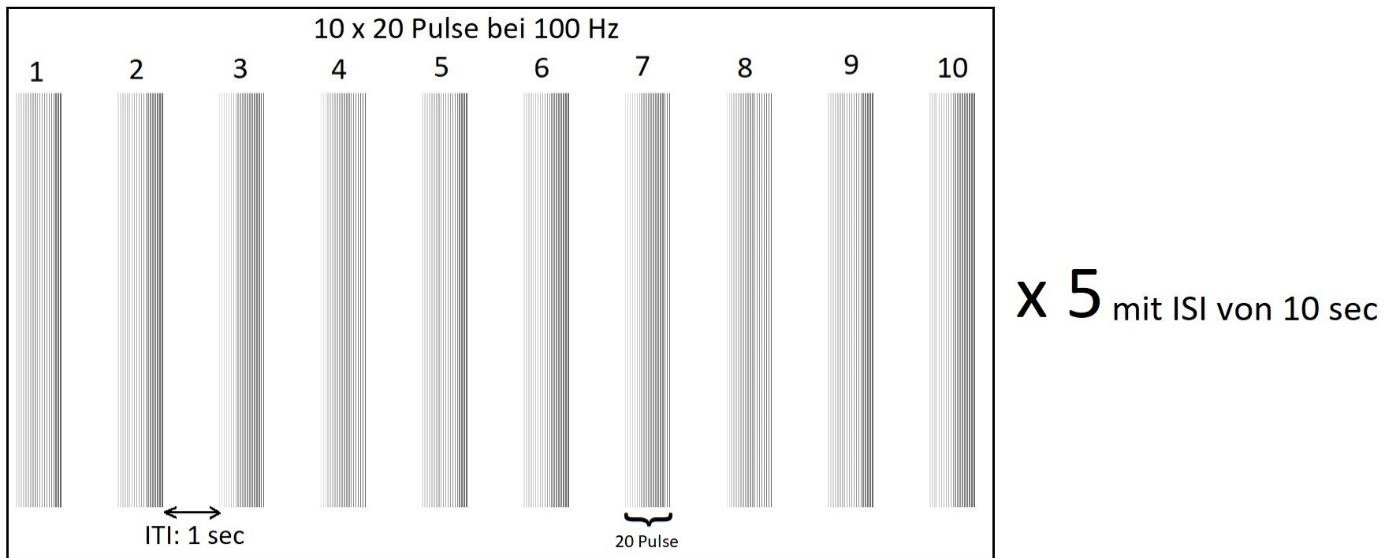


Abbildung 7: Stimulationsprotokoll der HFMS. ISI= Intersequenzintervall, ITI= Intertrainintervall

Die Intensität der Stimulationen betrug 50% der maximalen Stimulatorleistung, was einem Output von ca. 75 mA/s entsprach. Um den Leistungsverlust durch Überhitzung der Spule entgegenzuwirken, wurde die Spule zuvor in einem Eisbad auf eine Temperatur von ca. 16°C herunter gekühlt.

Modifizierend zu den Arbeiten von Tokay et al. (2009, 2014) wurden in diesen Versuchen jeweils zwei Schnittpräparate in entgegengesetzter Orientierung in eine Kammer gelegt. Die Ausrichtung der Schnitte erfolgte so, dass jeweils das Stratum radiatum der CA1-Region möglichst parallel zum Verlauf der Feldlinien ausgerichtet war, bei gleichem Abstand der Präparate zur Spule (s. Abb. 8). Um eine Untersucher-Bias zu reduzieren erfolgte die Wahl der Ausrichtung des „oberen“ oder „unteren“ Schnitts in jedem einzelnen Versuch (ob Position 1 oder Position 2) mittels eines Münzwurfs.

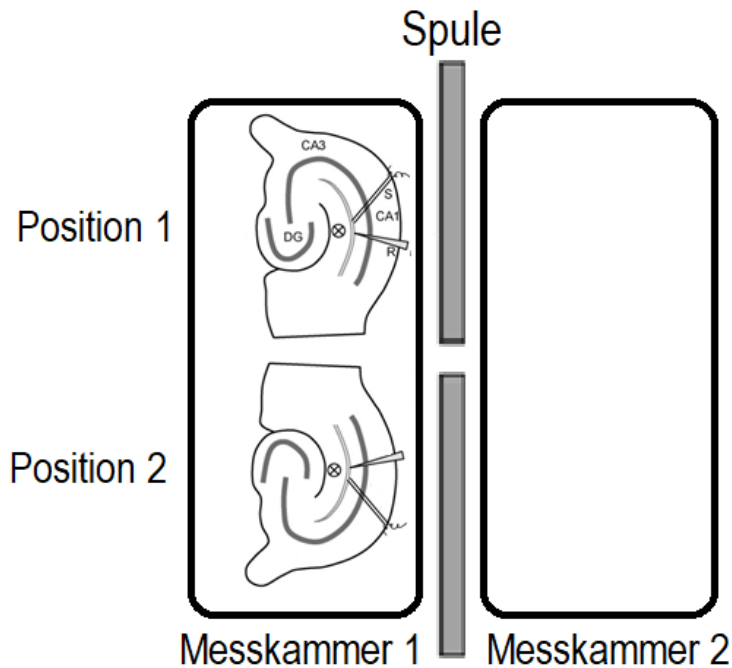


Abbildung 8: Orientierung der Schnitte in der Messkammer sowie Positionierung der Messelektroden.

2.4. Versuchsprotokolle

Vor Ableitung der Potentiale, wurden alle hippocampalen Schnitte mit dem unter Punkt 2.3 beschriebenen Stimulationsprotokoll der HFMS ausgesetzt. Demzufolge fanden alle Versuche unter der Annahme statt, dass durch die HFMS ein Priming-Effekt evoziert wurde (Tokay et al., 2014). Die Versuchsreihen fanden unter Verwendung von CHPG oder DHPG statt, um den möglichen Beitrag der jeweils agonistisch beeinflussten Rezeptortypen differenzieren zu können.

Vor Beginn der Quantifizierung der Langzeiteffekte wurden Input-output-Messungen mittels elektrischer Stimulation der Präparate durchgeführt. Die Messungen erfolgten entsprechend der in Tabelle 1 dargestellten Stufen.

Tabelle 2: Stufen der Input-output-Messungen vor Beginn der Langzeitmessungen

Versuchsnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
mA	5	5	7,5	7,5	10	10	12,5	12,5	15	15	17,5	17,5	20	20

Anschließend wurde die elektrische Stimulationsintensität für die Langzeit-Messungen auf 40-50% (s. auch Punkt 2.2) der maximal gemessenen Amplitude eingestellt. Es folgte eine Baseline-Messung für 30 min an welche sich die Messung der Feldpotentiale für 60 min anschloss. Die Abb. 9 verdeutlicht nochmals die einzelnen Arbeitsschritte dieser Versuche.

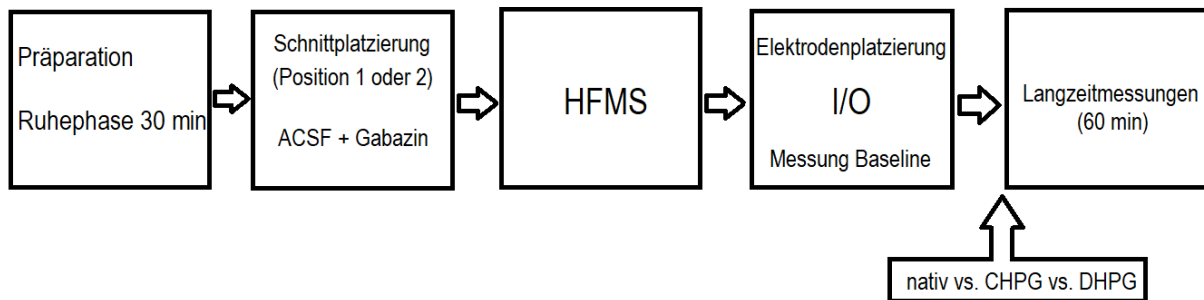


Abbildung 9: Arbeitsschritte in diesen Versuchen.

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Anzahl der getesteten Schnittpräparate in jeder untersuchten Modalität.

Tabelle 3: Aufschlüsselung der Anzahl der Versuche nach Modalität

Testmodalität	Anzahl der untersuchten Schnitte
Ohne HFMS	13
Mit HFMS	34 (davon je 17 in Position 1 und 2)
Mit HFMS, mit CHPG	5
Ohne HFMS, mit CHPG	3
Mit HFMS, mit DHPG	4
Ohne HFMS, mit DHPG	9

2.5. Statistik

Die Datenauswertung und -darstellung erfolgte mit JMP 14 (SAS Institute Inc., USA), sowie Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung oder \pm Standardfehler.

Für die Überprüfung der Normalverteilungsannahme der Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test gewählt. Die konsekutive Auswahl des statistischen Tests zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Stichproben wurde auf der Grundlage des Ergebnisses auf Normalverteilung getätigt.

Die statistische Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede erfolgte für die nicht normalverteilten Daten mittels des Kruskal-Wallis Tests mit Dunn's post hoc Analyse. Im Falle einer Normalverteilung wurden die Gruppenunterschiede mittels des Student-t-Tests für ungepaarte Stichproben getestet. Das Signifikanzniveau lag jeweils bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Priming-Effekt

Grundlage dieser Versuche war u.a. ein Priming der hippocampalen Schnitte mittels HFMS. Dafür wurden die Schnitte des Hippocampus dem Priming mittels HFMS unterzogen, die magnetische Spule entfernt und die elektrophysiologischen Aufnahmen der Schaffer Kollateralen der CA-1-Region durchgeführt. Die Abbildung 10 visualisiert die Input-Output-Beziehung von Schnitten mit und ohne vorheriges Priming.

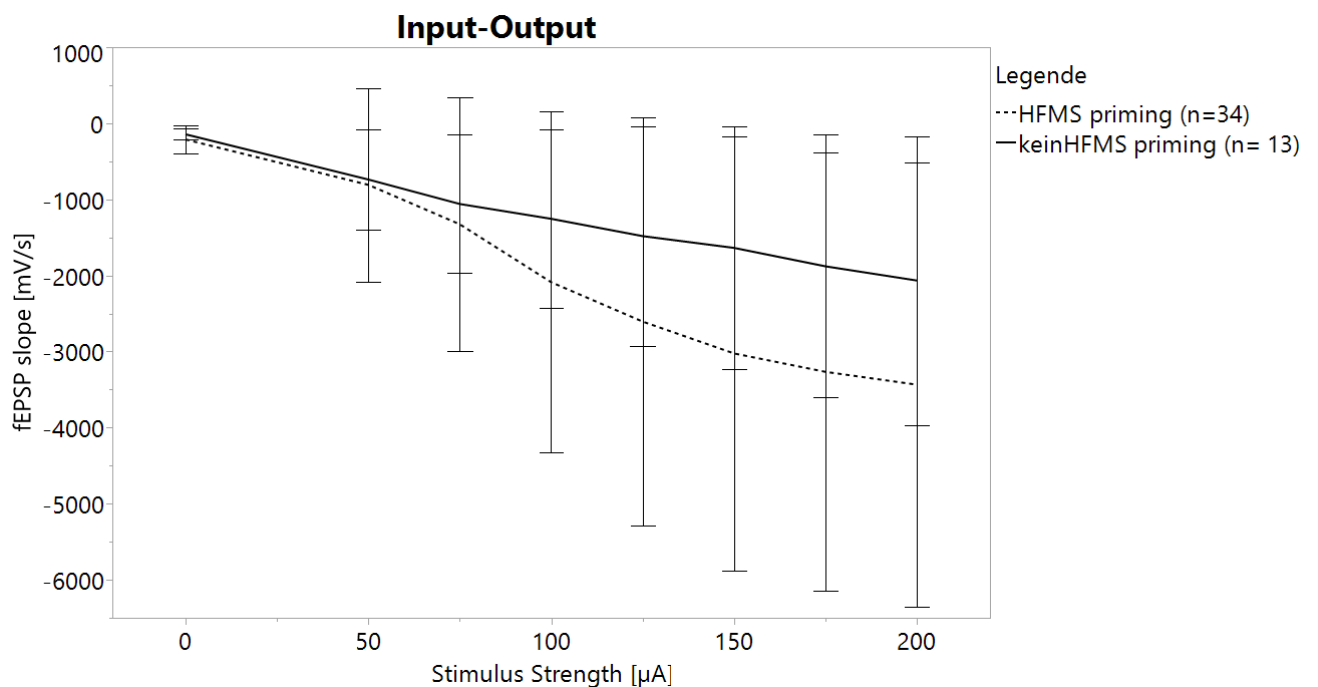


Abbildung 10: Input-Output-Kurven mit und ohne vorherige HFMS (Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, die Kurven basieren auf den Mittelwerten). * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede (t -Test, $p < 0,05$) zwischen den Stichproben (kein HFMS priming vs. HFMS priming; s. Tabelle 4).

Die Abbildung 10 dokumentiert erwartungsgemäß einen Anstieg des fEPSP-slope mit zunehmender Stimulationsstärke. Ferner konnte ein Unterschied zwischen den Versuchen mit und ohne HFMS gezeigt werden. Die Überprüfung auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests zeigten, dass die Daten mit einem p -Wert $< 0,0001$ als nicht normalverteilt gelten. Zur Testung des Einflusses des Parameters HFMS-priming wurde der Kruskal-Wallis-Test für nichtparametrisches Testverfahren angewandt.

Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests demonstrierten einen signifikanten Effekt für den Faktor HFMS-Priming auf die abhängige Variable fEPSP-slope ($p = 0,004$).

Als post hoc Analyse wurde der Dunn's Test durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 4 Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels des Dunn's-Test zum Vergleich der Stichproben (HFMS priming vs. Kein HFMS priming) für jedes Level der Input-output-Messungen

	kein HFMS-priming vs. HFMS-priming							
μA	0	50	75	100	125	150	175	200
p-Wert	0,2297	0,8771	0,8398	0,1790	0,1193	0,0805	0,0984	0,1033

Der Kruskal-Wallis-Test zur Überprüfung der Hypothese, dass das Priming einen Einfluss auf den fEPSP-slope besitzt, zeigt eine signifikante Tendenz. Die Post-hoc-Analyse mittels des Dunn Tests brachte im Vergleich der Gruppen in Abhängigkeit des jeweiligen Input-Output-Levels jedoch keine individuell signifikanten Ergebnisse bei einem α -Niveau von 0,05.

3.2. Effekt der Orientierung der Schnitte

In diesen Versuchen wurden die hippocampalen Schnitte in zwei verschiedenen Ausrichtungen in die Messkammer eingelegt (s. Punkt 2.3.). Beiden Ausrichtungen war gemein, dass die CA1-Region zur Seite der Spule hin orientiert war, sich der Faserverlauf der Schaffer-Collateralen im magnetischen Feld jedoch diametral entgegenstanden. Die Abbildung 11 ist eine sekundäre Analyse der Daten aus Abbildung 10. Im Vergleich zu den Primärdaten wurden die Schnitte mit HFMS-Priming nochmals nach Ihrer Ausrichtung im magnetischen Feld differenziert (Position 1 oder Position 2) und in Bezug zu den Schnitten ohne HFMS-Priming gesetzt.

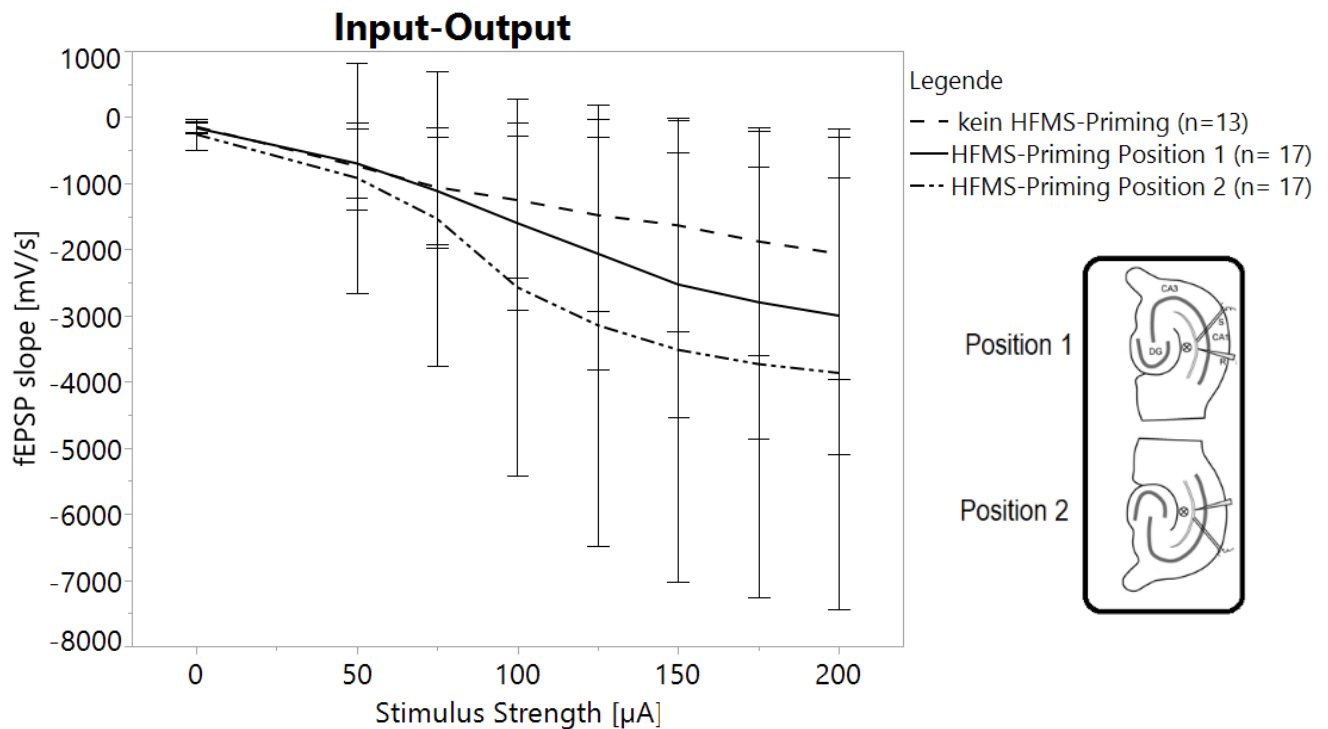


Abbildung 11: Input-Output-Kurven mit und ohne vorherige HFMS nach getesteter Position (Fehlerbalken repräsentieren den Standardabweichung, die Kurven basieren auf den Mittelwerten).

Die Daten der Schnitte mit voran gegangenem HFMS-Priming wurden mittels des Kruskal-Wallis-Test im Hinblick auf den Einfluss der Orientierung der Schnitte (3 Subgruppen: Kein HFMS, Position 1 und Position 2) auf die Variable fEPSP-slope getestet.

Die Daten zeigen eine statistische Signifikanz ($p = 0,015$) für die 3 getesteten Subgruppen. Um den Effekt der Orientierung der Schnitte zu evaluieren, wurde in einem zweiten Schritt eine post-hoc-Testung der drei Subgruppen vorgenommen (s. Tabelle 5). Hier zeigten sich (passend zu den Ergebnissen unter 3.1.) zwar signifikante Unterschiede zwischen den Schnitten mit und ohne HFMS-Priming, der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Orientierungen im Magnetfeld (Position 1 oder Position 2) zeigte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 5 Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels des Dunn's Test zum Vergleich der Stichproben (HFMS priming Position 1 & 2 vs. Kein HFMS priming; abhängige Variable = fEPSP-slope).

	Signifikanz:
Position 1 vs. Position 2	0,605
Position 1 vs. Keine HFMS	0,006*
Position 2 vs. Keine HFMS	0,022*

3.3. Effekt des CHPG

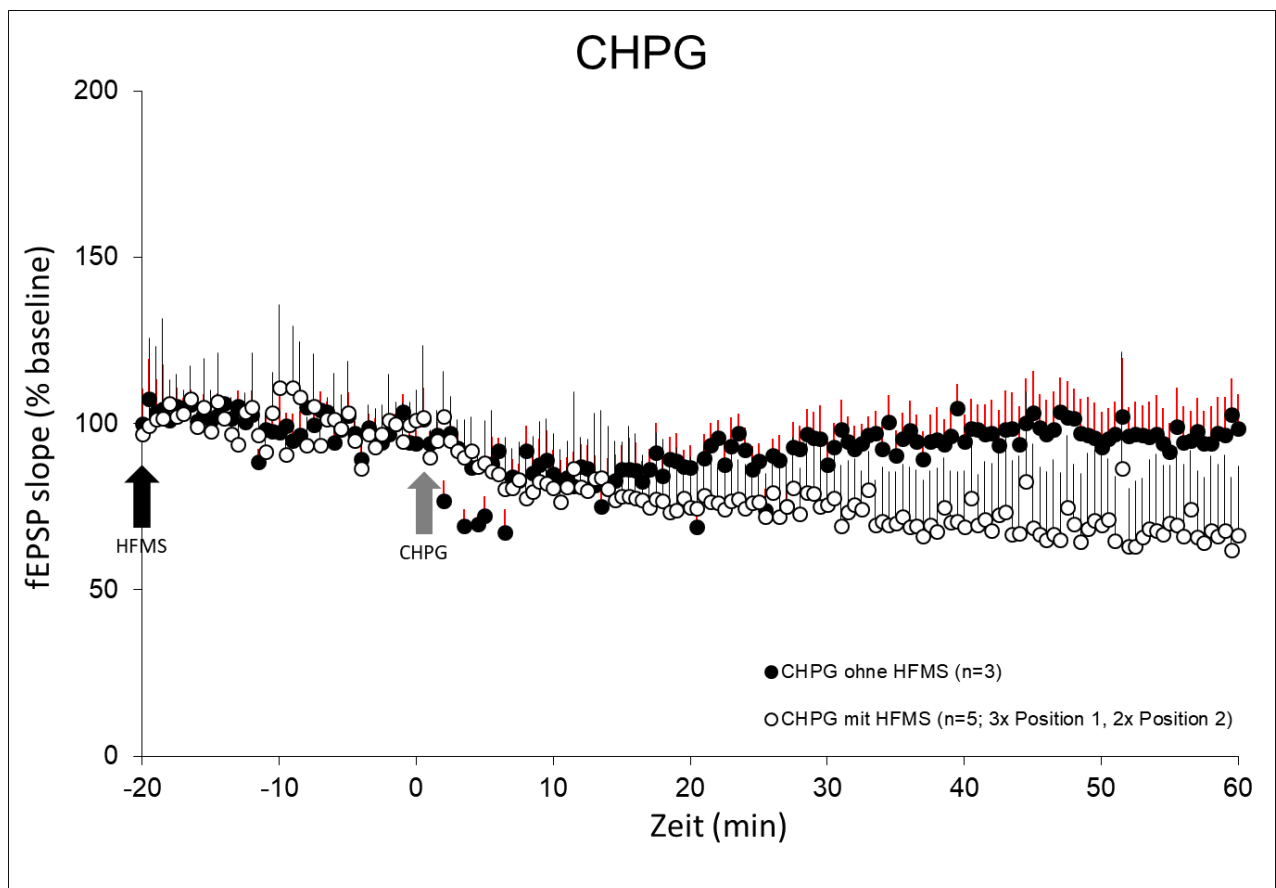


Abbildung 12: Zeitverlauf des CHPG-Effekts auf Schnitte mit und ohne HFMS. Jeder Kreis repräsentiert den Prozentsatz des EPSP-slope relativ zum mittleren Baseline-Wert. Die Zeitpunkte der Zugabe des CHPG zur ACSF-Lösung sowie der Applikation der HFMS sind gekennzeichnet. In den Versuchen mit HFMS wurde 3-mal die Position 1 und 2-mal die Position 2 verwendet.

CHPG ist ein selektiver mGLU₅ metabotroper Rezeptor-Agonist. Um den Effekt des HFMS-primings näher zu untersuchen, wurde CHPG zur ACSF-Lösung hinzugegeben. Die Ergebnisse des Zeitverlaufs sind in Abbildung 12 aufgezeigt. In den Versuchen mit HFMS wurde 3-mal die Position 1 und 2-mal die Position 2 verwendet. Die Abbildung 13 spiegelt anhand dieser Daten die Mittelwerte im Zeitbereich von 40-60 min nach Zugabe des CHPG wieder. Der Effekt der Zugabe des CHPG zeigte sich in einer Depression des fEPSP-slope in den Versuchen mit HFMS, welche sich in der statistischen Analyse als signifikant erwies.

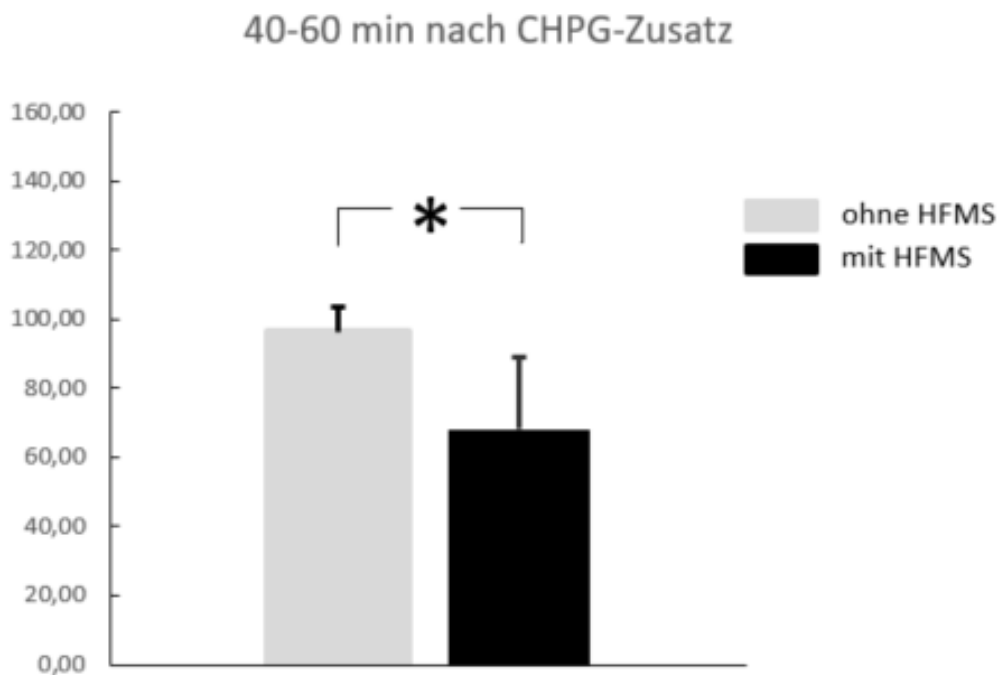


Abbildung 13: Mittelwerte des fEPSP-slope 40 bis 60 Minuten nach Zugabe des CHPG mit (schwarzer Balken) und ohne (grauer Balken) vorherige HFMS. Die Depression des fEPSP-slope im Vergleich erwies sich als signifikant (t -Test: $p < 0,05$).

3.4. Effekt des DHPG

DHPG ist ein selektiver Agonist der Gruppe-1 metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGLU₁ und mGLU₅. Die Ergebnisse des Zeitverlaufs sind in Abbildung 14 aufgezeigt. In den Versuchen mit HFMS wurde 2-mal die Position 1 und 2-mal die Position 2 verwendet. Die Abbildung 15 spiegelt anhand dieser Daten die Mittelwerte im Zeitbereich von 40-60 min nach Zugabe des CHPG wieder. Der Effekt der Zugabe des DHPG zeigte sich in einem

Anstieg des fEPSP-slope nach HFMS, welche sich in der statistischen Analyse als signifikant erwies.

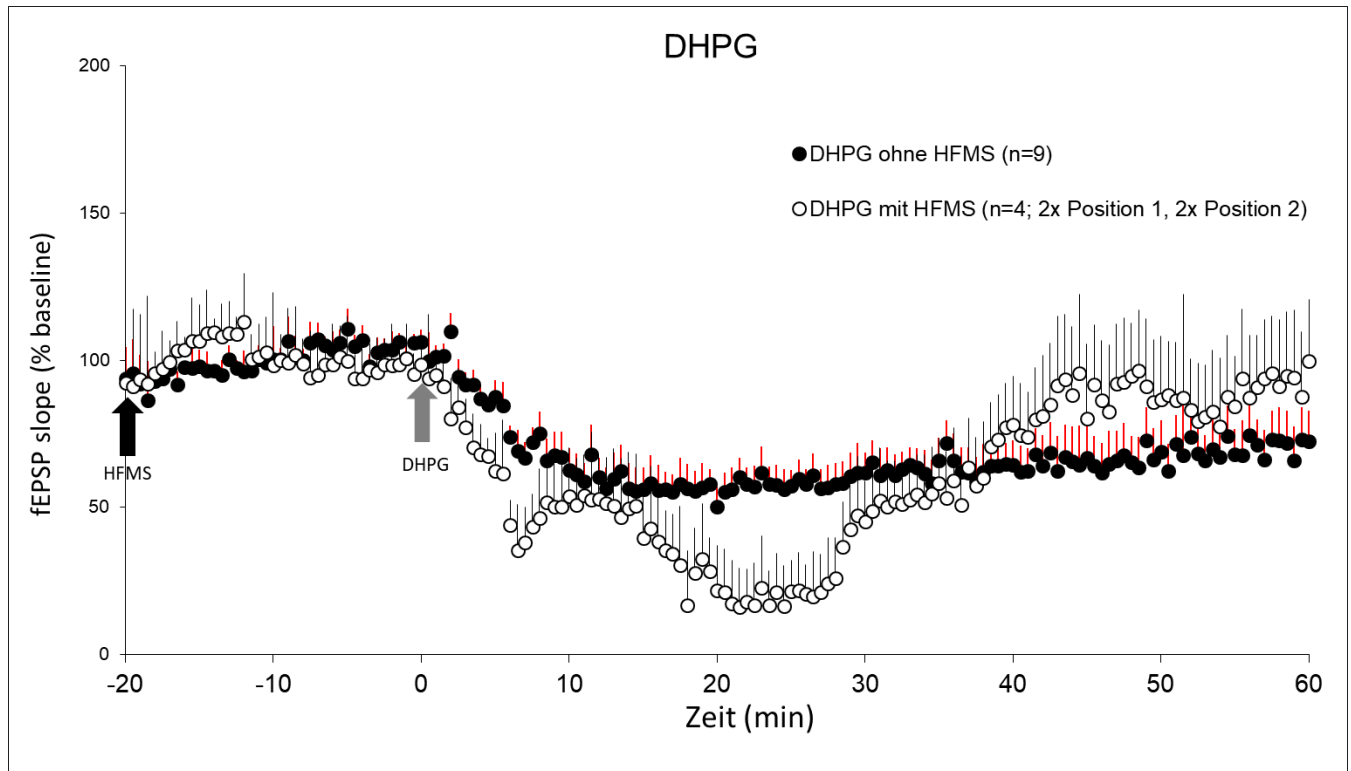


Abbildung 14: Zeitverlauf des DHPG-Effekts auf Schnitte mit und ohne HFMS. Jeder Kreis repräsentiert den Prozentsatz des EPSP-slope relativ zum mittleren Baseline-Wert. Die Zeitpunkte der Zugabe des DHPG zur ACSF-Lösung sowie der Applikation der HFMS sind gekennzeichnet. In den Versuchen mit HFMS wurde 2-mal die Position 1 und 2-mal die Position 2 verwendet.

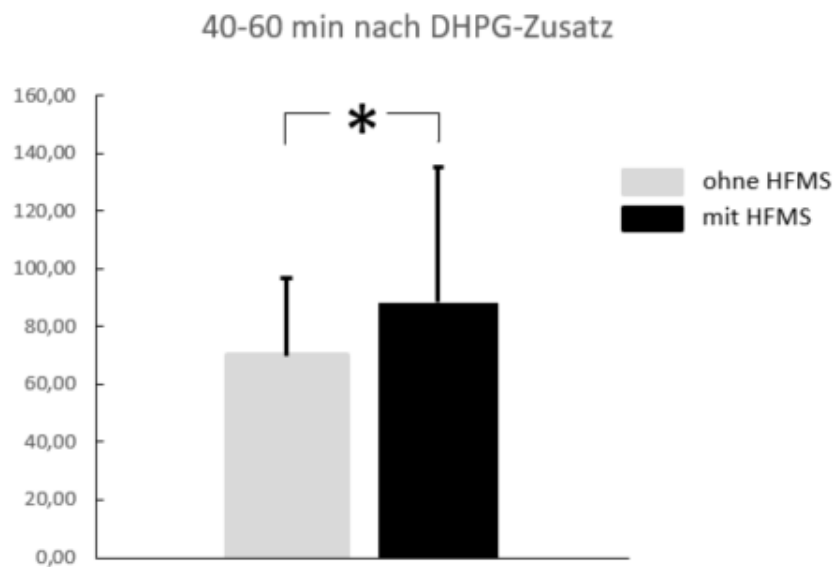


Abbildung 15: Mittelwerte des fEPSP-slope 40 bis 60 Minuten nach Zugabe des DHPG mit (schwarzer Balken) und ohne (grauer Balken) vorherige HFMS. Der Anstieg des fEPSP-slope nach HFMS erwies sich als signifikant (t -Test $p < 0,05$).

4. Diskussion

Die repetitive Magnetstimulation (rTMS) ist eine nicht invasive Stimulationstechnik. Im wissenschaftlichen Kontext findet die rTMS u.a. Anwendung bei der Evaluation der Beteiligung verschiedener Hirnregionen, welche kognitive Prozesse wie Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Sprache oder Wahrnehmung modulieren oder steuern (Beynel et al. 2019). Die grundlegenden Mechanismen des Effekts der rTMS sind jedoch bisher unzureichend aufgeklärt. Gerade bei in-vivo Studien stellt sich beispielsweise das Problem der räumlichen Identifikation des Stimulationsziels (Beynel et al. 2019) oder der Kontrolle des Volumens des stimulierten neuronalen Gewebes. Ersteres kann z.B. durch funktionale Bildgebung (bspw. funktionale MRT) und Neuronavigation gezielt geplant werden. Jedoch kann auch bei zielgenauer Navigation bspw. die Geometrie der Sulci und Gyri einen Einfluss auf das induzierte elektrische Feld der rTMS besitzen (Thielscher et al., 2011). In diesem Zusammenhang ist die Ausrichtung der Stimulationsspule in Relation zum stimulierten neuronalen Gewebe als essentiell anzusehen (Richter et al, 2013; Opitz et al., 2011). Das Magnetfeld bei in vitro Studien erfasst in der Regel das gesamte neuronale Zielgewebe. Auch hierbei kann der Ausrichtung des Gewebes in Relation zu den magnetischen Feldlinien eine entscheidende Funktion in der Ausprägung und Art der neuronalen Antwort auf die Stimulation zukommen. Veränderungen in der Lokalisation oder Ausrichtung der Stimulationstechnik relativ zum neuronalen Zielgewebe kann auch differentielle Effekte auf die synaptische Transmission und die postsynaptische Depolarisation nach sich ziehen (Lenz et al., 2015).

Die Wirkung repetitiver Magnetstimulation auf den Hippocampus war und ist Gegenstand der Forschung. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass diese Art der Stimulation zu persistierenden Änderungen in der kortikalen Erregbarkeit führen kann und, je nach Protokoll, in der Lage ist LTP- als auch LTD-Effekte zu induzieren. In diesem Zusammenhang konnten Tokay et al. (2009, 2014) zeigen, dass hochfrequente repetitive Magnetstimulation (high frequency magnetic Stimulation; HFMS) unter Aktivierung von NMDA-Rezeptoren LTP-Effekte evozieren kann und dieser Prozess postsynaptisch stattfindet. Zusätzlich konnte eine HFMS-induzierte Metaplastizität demonstriert werden, welche mGlu- als auch NMDA-Rezeptoren involviert (Tokay et al., 2014).

4.1. Priming mittels HFMS

Grundlegende Effekte der HFMS wurden in vorangegangenen Studien (Tokay et al. 2009, 2014) unter Nutzung des gleichen Setups bereits initial beschrieben. Aufbauend auf den bisherigen Betrachtungen wurden in dieser Arbeit zunächst Versuche ohne und mit HFMS und subsequenter Ableitung der EPSPs an hippocampalen Schnittpräparaten durchgeführt. Im ersten Teil der Experimente untersuchten wir die Wirkung der HFMS hinsichtlich der Wirkung auf unkonditionierte Schnittpräparate des Hippocampus. Wir konnten zeigen, dass nach HFMS die abgeleiteten fEPSPs signifikant gesteigerte Anstiege bei input/output-Messungen aufwiesen. Diese Ergebnisse sind als konkordant zu den zuvor aufgezeigten LTP-Effekten nach HFMS (Tokay et al., 2009) zu werten. Unter Nutzung des gleichen Stimulations-Protokolls konnten Tokay et al. (2009) bereits einen LTP-Effekt nachweisen und in Folgeuntersuchungen (2014) auch bestätigen. In diesen Versuchen wurde der potenzierende Effekt der HFMS zusätzlich durch die Input-Output-Charakteristik anhand einer größeren Spanne (0- 20 mA) an Stimulationsstärken untersucht und ein signifikanter Haupteffekt für die Anwendung der HFMS nachgewiesen werden. Entsprechend der geschilderten Ergebnisse ist anzunehmen, dass der Effekt der HFMS durch eine erhöhte synaptische Effizienz (input) und eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Auslösung eines Aktionspotentials (output) die Ergebnisse erklären kann. Obwohl in diesen Untersuchungen die grundlegende mechanistische Frage nicht direkt adressiert wurde, kann die HFMS eine Verschiebung der I/O-Beziehung bewirkt haben, sodass eine erhöhte Antwortwahrscheinlichkeit auf synaptische Stimuli resultiert (s. auch Lafon et al., 2016). In den bereits erwähnten Voruntersuchungen konnte die Beteiligung von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren nachgewiesen werden (Tokay et al., 2009).

4.2. HFMS und der Effekt der Orientierung der Schnitte

Die hippocampalen Schnittpräparate wurden in vorangegangenen Studien jeweils einzeln und in gleicher Orientierung mit Verlauf der Schaffer-Kollateralen entlang der magnetischen Feldlinien positioniert (s. Abb. 6). In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen wurden zwei Schnitte in entgegengesetzter Ausrichtung (Position 1 oder 2) in den Messkammern positioniert. Der experimentelle Aufbau als auch die Magnet-Spule (Rundspule MC125, MagVenture, Dänemark) bedingten jeweils eine Stimulation des

gesamten Volumens des Schnittpräparats. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Positionen anhand der gemessenen EPSPs untereinander. Ferner zeigte sich der Effekt der magnetischen Stimulation im Vergleich zu den nativen (nicht stimulierten) Schnittpräparaten in signifikant größeren EPSPs nach Stimulation bei beiden Positionen (siehe auch Abschnitt 4.1.). Die Ergebnisse bestätigen die Resultate anderer Arbeitsgruppen bei Untersuchungen der Effekte magnetischer Stimulation *in vitro* bei ebenfalls gleichsinniger Ausrichtung der Schnitte im magnetischem Feld (z.B. Vlachos et al., 2012; Lenz et al., 2015). Grundlegend wird bei Stimulation neuronaler Gewebe mittels Magnetfeldern nach dem Faraday'schen Gesetz eine Spannung in das Gewebe induziert, wobei das stimulierte Zielgewebe als sekundärer Stromkreis fungiert (Hess, 2005). Studien mittels transkranieller magnetischer Stimulation belegen zusätzlich, dass die Ausrichtung des induzierten Magnetfelds entscheidend für die Auslösung von Aktionspotentialen ist und den Effekt der Stimulation beeinflussen kann. Dazu zeigten beispielsweise Richter et al. (2013) einen deutlichen Effekt auf die motorische Schwelle bei veränderter Ausrichtung der Magnetspule (und damit der Ausrichtung des induzierten Magnetfelds) relativ zum Kortex. Die Untersuchungen in dieser Arbeit waren *in-vitro* Experimente, welche eine gezielte Ausrichtung der Präparate im magnetischen Feld erlaubten. Mögliche Magnetfeld-Inhomogenitäten durch das das Zielgewebe umgebende Gewebe wurden in diesen Versuchen durch das experimentelle Setup minimiert. Dennoch bedingte die entgegengesetzte Ausrichtung der Schnitte, dass auch der Verlauf der Schaffer-Kollateralen relativ zum magnetischen Feld im Vergleich der Positionen entgegengesetzt war. Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass durch die Spule das gesamte Volumen der Schnitte stimuliert wurde. Im Gegensatz dazu nutzen beispielsweise Lee und Fried (2014) fokussierte magnetische Stimulation kortikaler Neurone mittels einer Sub-Millimeter Spule. Die Forscher konnten eine Selektivität der jeweils stimulierten Region (apikaler Dendrit, Soma oder Axonhügel) nachweisen. Diese Selektivität manifestierte sich in einer Heterogenität der abgeleiteten Potentiale nach Stimulation in Abhängigkeit vom Ort der Stimulation. Insbesondere die Region des apikalen Dendriten und des proximalen Axons zeigten sich sensitiv für die repetitive magnetische Stimulation. Auch hier war die Orientierung der Spule (parallel oder senkrecht zur Hauptachse des Neurons) ein entscheidendes Kriterium mit den besten Resultaten bei paralleler Spulenorientierung (Lee und Fried 2014). Gestützt werden diese Ergebnisse durch Lenz et al. (2015) unter Nutzung einer größeren Spule und simultaner Stimulation mehrerer (gleichsinnig ausgerichteter) entorhino-hippocampaler Schnitte. Eine unselektive Stimulation des gesamten Volumens

des neuronalen Gewebes (wie auch in dieser Arbeit erfolgt) kann bedingen, dass nicht alle Strukturen eine gleichsinnige Antwort auf die Stimulation liefern (Lenz et al. 2015). Die Identifikation des Ursprungs der Antwort auf die magnetische Stimulation kann dadurch beeinträchtigt sein (Salvador & Miranda, 2009). Eine entsprechende nähere Aufschlüsselung möglicher differentieller Effekte in Abhängigkeit vom Ort der Stimulation war jedoch nicht Gegenstand der zugrundeliegenden Betrachtungen.

Ergebnisse von Kabakov et al. (2017) belegen zusätzlich, dass die Ausrichtung von Neuronen in einem elektrischen Feld den Effekt einer Stimulation (bei Versuchen mit transcranial direct current stimulation) umkehren oder in der Amplitude modulieren kann. Folglich kann die Orientierung der Schnitte im magnetischen Feld einen entscheidenden Einfluss auf die Reizantwort (in Form der EPSPs) bei in vivo als auch bei in vitro-Versuchen haben. Ferner ist der Effekt der magnetischen Stimulation auf das neuronale Zielgewebe abhängig von der Geometrie und Orientierung der Spule. (Lee und Fried, 2014, Miranda, 2013). Letzteres wurde in diesen Versuchen konstant gehalten, sodass der Einfluss dieser Parameter als gering (wenn auch experimentell hier nicht belegt) anzusehen ist.

In Zusammenschau mit den Studien von Tokay et al. (2009, 2014) stützen die Ergebnisse eine Form der Metaplastizität unter Beteiligung von NMDA- und metabotropen Glutamat-Rezeptoren. Die Effekte waren zudem in beiden getesteten Positionen nachweisbar, sodass in diesen Versuchen bei relativ zum Magnetfeld gleichsinniger Ausrichtung der Schaffer-Kollateralen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren.

4.3. Regulation der mGlu-Rezeptoren 1 und 5

Metabotrope Glutamat-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von Glutamat-abhängigen Antworten in der CA1-Region des Hippocampus (Mannaioni et al., 2001) und gelten als essentiell für die synaptische Plastizität und Lernprozesse in hippocampalen Verschaltungskreisläufen (Gil-Sanz et al., 2008). In diesem Zusammenhang wird diesem Rezeptor-Typ ein wesentlicher Beitrag bei der Induktion und Modulation einer LTD als neuronales Korrelat für regulative hippocampale Prozesse zugeschrieben (u.a. Collingridge et al., 2004). Über diesen Mechanismus (in Zusammenspiel mit anderen neuromodulatorischen Prozessen wie u.a. LTP) können Lernprozesse auf molekularer Ebene reguliert werden. Darüber hinaus konnten Tokay et al. (2014) zeigen, dass die mGlu-

Rezeptoren 1 und 5 (Gruppe 1 mGluRs), zusammen mit NMDA-Rezeptoren, auch bei der Ausprägung einer neuronalen Antwort auf eine elektrische Stimulation nach vorausgegangener HFMS beteiligt sind. Dieser Effekt gilt als Metaplastizität. Eine Inhibition der Gruppe 1/2 mGlu-Rezeptoren führte dabei zu einer signifikanten Hemmung des HFMS-priming Effekts auf eine subsequent induzierte LTP (Tokay et al. 2014). In dieser Studie wurden zur ACSF-Lösung während der Versuche zusätzlich entweder DHPG (Wirkung auf mGluR 1 & 5) oder CHPG (Wirkung auf mGluR5) hinzugegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Charakteristik der elektrophysiologischen Antworten nach HFMS-priming je nach Art der zugegebenen Chemikalie eine entgegengesetzte Ausprägung aufwies: im Falle des CHPG zeigte sich ein signifikante Verringerung des slopes der fEPSPs, während nach Zugabe von DHPG ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war (s. Abb. 13 und 15). Die Daten sind somit grundlegend in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tokay et al. (2009, 2014) und belegen einen Einfluss der Gruppe 1 mGlu-Rezeptoren auf HFMS-induzierte Metaplastizität. Tokay et al. (2014) nutzten in ihren Versuchen einen Blocker für die Gruppe 3 mGlu-Rezeptoren (MSOP) oder einen Blocker für die Gruppe 1/2 (MCPG). Bis dato ungenügend untersucht ist jedoch die Frage, ob es einen selektiven Einfluss der Gruppe 1 mGlu-Rezeptoren nach HFMS-priming gibt. Als grundlegende mechanistische Annahme in diesen als auch den vorangegangenen Versuchen von Tokay et al. gilt dabei, dass nach HFMS prä- und postsynaptische mGlu-Rezeptoren durch vermehrte Glutamat-Ausschüttung als Folge der HFMS aktiviert werden (Tokay et al., 2014).

Die Daten dieser Studie lassen vermuten, dass eine selektive Regulation der mGluR1 und 5 eine entscheidende Rolle spielt. Durch die Nutzung selektiver Antagonisten wäre der priming Effekt der HFMS über die Gruppe 1 mGlu-Rezeptoren vermehrt durch die Wirkung auf den mGluR5 erklärbar (resultierend in einer höheren LTD nach Blockade, s. Abb. 13). Ferner kann im Vergleich der Versuche mit DHPG und CHPG spekuliert werden, dass die synaptische Transmission die mGluR1-Aktivierung involviert, resultierend in einer Antwort-Charakteristik mit einer LTP-ähnlichen Ausprägung gegenüber der Versuche ohne HFMS (s. Abb. 15). Ein grundlegender Mechanismus könnte in diesen Zusammenhang darin bestehen, dass in den Versuchen mit Zusatz von CHPG das extrazelluläre Glutamat nach HFMS erhöht ist bis zu einer Konzentration, an welcher Antagonisten die Transmission reduzieren können. Bei Blockade beider Gruppe 1 mGlu-Rezeptoren durch DHPG wäre dann ein selektiver Einfluss des mGluR1 möglich, resultierend in einer verminderten LTD im Vergleich zu der selektiven mGluR5-Blockade durch CHPG.

Die Annahme einer distinkten Regulation von mGluR1 und mGluR5 in dieser Studie ist in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Studien. Mannaioni et al. (2001) konnten zeigen, dass beide Gruppe 1-Rezeptor-Subtypen separate Funktionen an CA1-Pyramidenzellen erfüllen und u.a. die Erregbarkeit an CA1 hippocampalen Neuronen durch mGluR5-Stimulation moduliert werden kann. Korrespondierend dazu zeigten u.a. Neyman & Manahan-Vaughan (2008), dass mGluR1 und 5 unterschiedliche Funktionen in den initialen und späten Phasen der LTD ausüben.

Aus einer funktionalen Perspektive zeigen diese differenten Regulationsmechanismen u.a. einen Einfluss auf die Gedächtniskonsolidierung und den Abruf von Gedächtnisinformationen im Tiermodell (Gieros et al., 2012).

In Bezug auf den Einfluss der magnetischen Stimulation konnten Lee et al. (2014a) zeigen, dass repetitive hochfrequente Magnetstimulation auch nach einmaliger Anwendung die Transkription von mGluR1 reduziert und subsequent eine Reduktion der LTD bedingt. Somit stützen die Ergebnisse von Lee et al. (2014a) grundlegend die Resultate dieser Studie. Die in diesen Versuchen beobachtete reduzierte LTD im Vergleich der Versuche mit CHPG und DHPG wäre über eine verminderte Transkription des mGluR1 als Folge der HFMS möglich. Es muss in diesem Zusammenhang jedoch auch auf die unterschiedliche Methodik im Vergleich zu Lee et al. verwiesen werden. In diesen Versuchen wurden die Stimulationen *in vitro* gemacht, während Lee et al. *in vivo* stimulierten und erst nach erfolgter Magnetstimulation das Hirngewebe aus dem Schädel entfernten zur weiteren Untersuchung. Obwohl beide Studien ein hochfrequentes Stimulationsprotokoll nutzten (in dieser Studie 100Hz, bei Lee et al. 20Hz) sind Unterschiede in der Rekrutierung der mGluRs durch das jeweils die neuronalen Effekte induzierende Protokoll ebenfalls nicht auszuschließen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Experimente zeigen, dass die *in vitro*-Applikation von HFMS einen potenzierenden Effekt an Schaffer-Kollateralen-CA1 Synapsen besitzt und somit in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten ist. Ferner steht zu vermuten, dass der neuromodulatorische Effekt der HFMS auch differentielle Effekte auf die Regulation von mGluR1 und mGluR5 als mögliche grundlegende mechanistische Basis für eine hippocampale Metaplastizität

besitzt. Ein Effekt der Orientierung der Stimulationsspule in Relation zum Verlauf der Schaffer-Kollateralen konnte nicht nachgewiesen werden.

In diesen Studien erfolgte eine antiparallele Orientierung der Schaffer Kollateralen zum Magnetfeld in den getesteten Positionen und eine konstante Nähe der Schnittpräparate zur Spule. Ein mögliche Ergänzung zu diesen Studien, um zukünftig eine Standardisierung der Nutzung magnetischer Stimulationstechniken bei in vitro Studien zu ermöglichen, wäre die Frage nach dem Effekt eines Versatzes der Schnittpräparate um 90° oder den Einfluss einer Variation des Abstandes zur Spule auch unter Berücksichtigung der Spulengeometrie. Bei den letzten beiden genannten Punkten sind insbesondere die physikalischen Verhältnisse zu beachten. Thielscher und Kammer (2004) konnten hierzu zeigen, dass Fokalität und Effizienz der Stimulationen entscheidend von der Spulengeometrie, den Eigenschaften des dadurch erzeugten Magnetfeldes als auch dem neuronalen Zielgewebe selbst abhängt. Unklar ist ferner, ob die gewählten Positionen optimale Winkel für die Effizienz der HFMS darstellten. In der Literatur finden sich Hinweise auf ein unterschiedliches Ansprechen des stimulierten Zielgewebes bei unterschiedlichen Rotationswinkeln der Spule (Richter et al., 2013).

Die Versuche in diesen Studien wurden als in vitro-Untersuchungen durchgeführt. In den Ausführungen wurde auf die Sensitivität des untersuchten Zielgewebes auf eventuelle Magnetfeldinhomogenitäten, bedingt durch umgebendes Gewebe oder die zugrundliegende Gewebearchitektur und –geometrie reflektiert. Ob und welcher Form in vivo-Versuche diese Experimente belegen können, bleibt bis dato ungeklärt.

6. Thesen

1. Der Hippocampus spielt eine große Rolle für physiologische und pathologische Prozesse in Bezug auf das Lernen und die Gedächtnisformierung, Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Epilepsie.
2. Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität ist eine wichtige neurophysiologische Voraussetzung hippocampaler Synapsen für die Gedächtnisformierung.
3. Die long-term potentiation (LTP) ist Ausdruck einer Erhöhung der Effektivität synaptischer Transmissionen an Zellen des Hippocampus.
4. Die LTP gilt u.a. als zelluläres Substrat des Lernens und des Gedächtnisses und wird durch verschiedene Rezeptortypen an hippocampalen Synapsen vermittelt.
5. Die eine LTP induzierenden Stimuli sind vielfältiger Natur und umfassen bei in vitro Studien vorrangig hochfrequente elektrische oder magnetische (high frequency magnetic stimulation, HFMS) Stimulationsprotokolle.
6. Die Richtung und das Ausmaß der durch einen bestimmten Reiz ausgelösten synaptischen Plastizität können durch entsprechende zuvor applizierte Reize beeinflusst werden. Dies gilt als Metaplastizität.
7. Mittels HFMS können u.a. durch Aktivierung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren LTP-Effekte ausgelöst werden. Eine Metaplastizität kann mittels HFMS über mGlu- und NMDA-Rezeptoren erzeugt werden.
8. Das Priming hippocampaler Schnittpräparate mittels HFMS führt zu signifikant gesteigerten Anstiegen der EPSPs bei input/output-Messungen.
9. Bei der Applikation hochfrequenter magnetischer Stimulationen in vivo hat die parallele oder antiparallele Orientierung der Schaffer-Kollateralen in Relation zu den magnetischen Feldlinien keinen signifikanten Einfluss auf EPSPs.
10. Die mGlu-Rezeptoren der Gruppe 1 (mGlu 1 und mGlu 5) besitzen einen Einfluss auf eine HFMS-vermittelte Metaplastizität.
11. Es ist eine distinkte Regulation von mGlu1 und mGlu5 anzunehmen.
12. Eine selektive Blockade des mGluR5 führt zu LTD-ähnlichen Effekten nach HFMS-Priming.

Literatur

Abbott, L. F., & Regehr, W. G. (2004). Synaptic computation. *Nature*, *431*(7010), 796.

Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(5), 387.

Abraham, W. C., Mason-Parker, S. E., Bear, M. F., Webb, S., & Tate, W. P. (2001). Heterosynaptic metaplasticity in the hippocampus in vivo: a BCM-like modifiable threshold for LTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(19), 10924-10929.

Ahmed, Z., & Wieraszko, A. (2006). Modulation of learning and hippocampal, neuronal plasticity by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Bioelectromagnetics*, *27*(4), 288-294.

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). The hippocampus book: Oxford university press. *New York*.

Beaulieu, L. D., & Schneider, C. (2015). Repetitive peripheral magnetic stimulation to reduce pain or improve sensorimotor impairments: a literature review on parameters of application and afferents recruitment. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, *45*(3), 223-237.

Beynel, L., Appelbaum, L. G., Luber, B., Crowell, C. A., Hilbig, S. A., Lim, W., ... & Lisanby, S. H. (2019). Effects of online repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on cognitive processing: A meta-analysis and recommendations for future studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *107*, 47-58.

Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31.

Cheung, T. H., & Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC neuroscience*, 6(1), 36.

Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18.

Collingridge, G. L., Isaac, J. T., & Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 952-962.

Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 269-274.

Fox PT, Narayana S, Tandon N, Sandoval H, Fox SP, et al. (2004) Column-based model of electric field excitation of cerebral cortex. *Hum Brain Mapp*, 22, 1–14.

Gieros, K., Sobczuk, A., & Salinska, E. (2012). Differential involvement of mGluR1 and mGluR5 in memory reconsolidation and retrieval in a passive avoidance task in 1-day old chicks. *Neurobiology of learning and memory*, 97(1), 165-172.

Gil-Sanz, C., Delgado-García, J. M., Fairén, A., & Gruart, A. (2008). Involvement of the mGluR1 receptor in hippocampal synaptic plasticity and associative learning in behaving mice. *Cerebral cortex*, 18(7), 1653-1663.

Hess C.W. (2005). Motorisch evozierte Potentiale. In Stöhr M., Dichgans J., Diener H.C. & Buettner U.W. *Evozierte Potentiale* (S. 539-597). Berlin, Heidelberg: Springer

Kamiya, H., Shinozaki, H., & Yamamoto, C. (1996). Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *The Journal of Physiology*, 493(2), 447-455.

Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038.

Kole, M. H., Fuchs, E., Ziemann, U., Paulus, W., & Ebert, U. (1999). Changes in 5-HT1A and NMDA binding sites by a single rapid transcranial magnetic stimulation procedure in rats. *Brain Research*, 826(2), 309-312.

Krug, M., Lössner, B., & Ott, T. (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain research bulletin*, 13(1), 39-42.

Lafon, B., Rahman, A., Bikson, M., & Parra, L. C. (2017). Direct current stimulation alters neuronal input/output function. *Brain stimulation*, 10(1), 36-45.

Lee, D., Lee, K. H., Ho, W. K., & Lee, S. H. (2007). Target cell-specific involvement of presynaptic mitochondria in post-tetanic potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 27(50), 13603-13613.

Lee, S. A., Oh, B. M., Kim, S. J., & Paik, N. J. (2014a). The molecular evidence of neural plasticity induced by cerebellar repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat brain: a preliminary report. *Neuroscience letters*, 575, 47-52.

Lee, S. W., & Fried, S. I. (2014b). The response of L5 pyramidal neurons of the PFC to magnetic stimulation from a micro-coil. In *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 6125-6128. IEEE.

Lenz, M., Platschek, S., Priesemann, V., Becker, D., Willems, L. M., Ziemann, U., ... & Vlachos, A. (2015). Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Structure and Function*, 220(6), 3323-3337.

Lu, Y. M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J. T., Gerlai, R., Wojtowicz, J. M., & Roder, J. C. (1997). Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5196-5205.

Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(6), a005710.

Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 78(4), 535-538.

Manahan-Vaughan, D., & Reymann, K. G. (1995). Regional and developmental profile of modulation of hippocampal synaptic transmission and LTP by AP4-sensitive mGluRs in vivo. *Neuropharmacology*, 34(8), 991-1001.

Mannaioni, G., Marino, M. J., Valenti, O., Traynelis, S. F., & Conn, P. J. (2001). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 5925-5934.

Merrill, D. R., Bikson, M., & Jefferys, J. G. (2005). Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *Journal of neuroscience methods*, 141(2), 171-198.

Mills, K. R., Boniface, S. J., & Schubert, M. (1992). Magnetic brain stimulation with a double coil: the importance of coil orientation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, 85(1), 17-21.

Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Journal of pharmacological sciences*, 100(5), 433-442.

Naie, K., & Manahan-Vaughan, D. (2004). Regulation by metabotropic glutamate receptor 5 of LTP in the dentate gyrus of freely moving rats: relevance for learning and memory formation. *Cerebral cortex*, 14(2), 189-198.

Neyman, S., & Manahan-Vaughan, D. (2008). Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 27(6), 1345-1352.

Nishikawa, K. I., & MacIver, M. B. (2000). Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 92(1), 228-228.

Opitz A, Windhoff M, Heidemann RM, Turner R, Thielscher A (2011) How the brain tissue shapes the electric field induced by transcranial magnetic stimulation. *NeuroImage* 58: 849–859.

Park, P., Volianskis, A., Sanderson, T. M., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., Zhuo, M., ... & Collingridge, G. L. (2014). NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1633), 20130131.

Qi, Y., Hu, N. W., & Rowan, M. J. (2012). Switching off LTP: mGlu and NMDA Receptor-Dependent Novelty Exploration-Induced Depotentiation in the Rat Hippocampus. *Cerebral Cortex*, 23(4), 932-939.

Richter, L., Neumann, G., Oung, S., Schweikard, A., & Trillenber, P. (2013). Optimal coil orientation for transcranial magnetic stimulation. *PloS one*, 8(4), e60358.

Rossini, P. M., Burke, D., Chen, R., Cohen, L. G., et al. (2015). Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an IFCN Committee. *Clinical Neurophysiology*, 126(6), 1071-1107.

Salvador, R., & Miranda, P. C. (2009). Transcranial magnetic stimulation of small animals: a modeling study of the influence of coil geometry, size and orientation. In *2009 annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society* (pp. 674-677). IEEE.

Siebner, H.R. & Ziemann, U. (2007). Hirnstimulation- Physiologische Grundlagen. In H.R. Siebner & U. Ziemann (Hrsg.). *Das TMS-Buch* (S. 27-45). Berlin, Heidelberg: Springer

Tan, T., Xie, J., Tong, Z., Liu, T., Chen, X., & Tian, X. (2013). Repetitive transcranial magnetic stimulation increases excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain research*, 1520, 23-35.

Thielscher, A., & Kammer, T. (2004). Electric field properties of two commercial figure-8 coils in TMS: calculation of focality and efficiency. *Clinical neurophysiology*, 115(7), 1697-1708.

Thielscher A, Opitz A, Windhoff M (2011) Impact of the gyral geometry on the electric field induced by transcranial magnetic stimulation. *NeuroImage* 54: 234–243.

Tokay, T., Holl, N., Kirschstein, T., Zschorlich, V., & Köhling, R. (2009). High-frequency magnetic stimulation induces long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters*, 461(2), 150-154.

Tokay, T., Kirschstein, T., Rohde, M., Zschorlich, V., & Köhling, R. (2014). NMDA receptor-dependent metaplasticity by high-frequency magnetic stimulation. *Neural plasticity*, 2014.

Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13427-13431.

Vlachos, A., Müller-Dahlhaus, F., Roskopp, J., Lenz, M., Ziemann, U., & Deller, T. (2012). Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience*, 32(48), 17514-17523.

Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *science*, 313(5790), 1093-1097.