

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
-Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-C. Pape -

**Wirkungen von Dimethylarsinsäure auf glutamaterg-synaptische Übertra-
gungsprozesse im Hippokampus der Ratte**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Reppes, Hendrik
aus Willich

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Mußhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Binding

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

- Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-C. Pape -

Referent: Prof. Dr. Ulrich Mußhoff

Koreferent: Prof. Dr. Norbert Binding

ZUSAMMENFASSUNG

Wirkungen von Dimethylarsinsäure auf glutamaterg-synaptische Übertragungsprozesse im Hippokampus der Ratte

Repges, Hendrik

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war die Analyse der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure auf glutamaterge Synapsen des Hippokampus von Ratten. In vorausgegangenen Untersuchungen an heterolog exprimierten Glutamat-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung glutamaterge Synapsen in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Die Wirkungen der Dimethylarsinsäure auf erregende Glutamat-vermittelte synaptische Prozesse wurde an akut isolierten Hirngewebsschnitten detailliert analysiert.

Durch elektrophysiologische Methoden an der Schaffer-kollateral/CA1- Synapse adulter und juveniler Ratten wurde die Wirkung der Substanz auf evozierte postsynaptische Potenziale, auf Langzeitpotenzierung, sowie auf verstärkende Effekte untersucht. Für die Untersuchungen wurden insgesamt 13 adulte und juvenile Ratten (12 männlich, 6 adult) verwendet. Die Ergebnisse der adulten sowie juvenilen Tiere zeigten, dass durch die verwendeten Stoffe in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich von 100 µmol/l keine Beeinflussung der synaptischen Potenziale beobachtet wurde und somit an diesen Stellen keine neurotoxischen Wirkungen zu erwarten sind.

Die tierexperimentelle Arbeit wurde vom Regierungspräsidenten Münster mit dem Schreiben vom 19.12.2002, Aktenzeichen: 50.0835.1.0. (G 79/2002) genehmigt (siehe Anhang).

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.06 2008

In Liebe meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition der Neurotoxizität.....	1
1.2	Neurotoxizität von Schwermetallen.....	1
1.3	Toxizität und Ursprung metallorganischer Verbindungen.....	2
1.3.1	Metallorganische Verbindungen biogenen und anthropogenen Ursprungs.....	2
1.3.2	Toxizität von metallorganischen Verbindungen.....	3
1.3.3	Neurotoxizität von metallorganischen Verbindungen.....	3
1.4	Arsenverbindungen.....	4
1.4.1	Entstehung und Vorkommen des anorganischen Arsens.....	4
1.4.2	Toxizität von anorganischen Arsenverbindungen.....	4
1.4.3	Neurotoxizität von anorganischen Arsenverbindungen.....	5
1.4.4	Entstehung und Vorkommen von organischen Arsenverbindungen.....	5
1.4.5	Toxizität von organischen Arsenverbindungen.....	6
1.5	Fehlfunktion neuronaler Rezeptorkanäle in Folge von Neurotoxizität.....	7
1.5.1	Funktion neuronaler Ionenkanäle.....	7
1.5.2	Einteilung neuronaler Rezeptorkanäle.....	8
1.5.3	Bedeutung und Physiologie des AMPA-Rezeptorkanals.....	8
1.5.4	Bedeutung und Physiologie des NMDA-Rezeptorkanals.....	9
1.5.5	Bedeutung und Physiologie des Hippokampus.....	10
1.6	Fragestellung.....	11
2	Material und Methode.....	12
2.2	Erfassung der bioelektrischen Aktivität.....	12
2.2.1	Präparation der Hippokampus-Gewebeschnitte.....	12
2.2.3	Evozierte Feldpotenzialableitungen.....	13
2.2.4	Versuchsprotokolle.....	14
2.2.5	Kontrollversuche.....	15
2.2.6	Auswirkung von DMA ^V auf evozierte Feldpotenziale (fEPSP).....	15
2.2.7	Auswirkung von DMA ^V auf Doppelreiz-Verstärkung (paired-pulse-facilitation, PPF).....	16
2.2.8	Auswirkung von DMA ^V auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP).....	16
2.3	Applikation von Substanzen.....	17
2.4	Statistische Auswertung der Versuchsdaten.....	17
2.5	Lösungen.....	18
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Untersuchungen zur Wirkung von DMA ^V auf evozierte Feldpotenziale (fEPSP).....	19
3.1.1	Kontrollversuche:.....	20
3.1.2	Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA ^V , 100µM) auf fEPSP:.....	24
3.2	Untersuchungen zur Wirkung von DMA ^V auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP).....	31
3.2.1	Kontrollversuche:.....	31

3.2.2 Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA ^V , 100µM) auf LTP:.....	36
3.3 Untersuchungen zur Wirkung von DMA ^V auf Doppelreizverstärkung (Paired - Pulse Fascilitation, PPF)	43
3.3.1 Kontrollversuche:	43
4 Diskussion	46
4.1 Diskussion der verwendeten Untersuchungsmethoden	46
4.1.1 Versuchstiere	46
4.1.2 Untersuchungen an der Schaffer-kollateral/CA1-Synapse	46
4.1.3 Das Hippokampus-Schnittpräparat.....	47
4.1.4 Feldpotenzial-Ableitmethoden	47
4.1.5 Verwendete Substanzen	47
4.2 Ergebnis- und Funktionsdiskussion.....	49
5 Zusammenfassung	53
6 Literaturverzeichnis.....	54
7 Curriculum Vitae	62
8 Anhang.....	I
8.1 Abbildungsverzeichnis	I
8.2 Tabellenverzeichnis	VI
8.3 Abkürzungsverzeichnis	VII

1 Einleitung

1.1 Definition der Neurotoxizität

Neurotoxizität bezeichnet die Schädigung von Nervenzellgewebe durch chemische Stoffe, in deren Folge es zur Störung komplex vernetzter Nervenzell- und Gliazellverbände und damit zu Störungen in peripheren oder zentralen Teilbereichen des Nervensystems kommt. Schäden der Gliazellen des Nervengewebes können indirekt zu Neurotoxizität führen, beispielsweise durch Veränderungen der Extrazellulärflüssigkeit. Eine direkte Neurotoxizität entsteht dagegen durch Schädigung der Nervenzellen selbst. Substanzen, die das Nervengewebe bezeichnet man als Neurotoxine. Eine funktionelle Störung kann beispielsweise durch die Beeinflussung von Ionenkanälen hervorgerufen werden (Mußhoff et al., 1995). Änderungen der Zellmorphologie können dagegen strukturelle Defekte bzw. die Zelle funktionell oder strukturell stören können, bedingen. Beide Arten von Störungen können die Zelle in ihrer Aktivität bzw. Vitalität derart beeinflussen, dass letztendlich der Zelltod erfolgt. Beispiele für exogene Neurotoxinstoffklassen sind Halogenkohlenwasserstoffe, Schwermetalle, Dioxine und Chlorphenole. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl endogener, d.h. vom Körper produzierter, potenziell neurotoxischer Substanzen, welche nur bei geregelter Um- und Abbau bzw. ihrer Elimination zu keiner Schädigung des Organismus führen.

1.2 Neurotoxizität von Schwermetallen

Neurotoxische Störungen entstehen häufig aus Vergiftungen durch anorganische Metalle. Blei kann beispielsweise zu einer verzögerten Leitgeschwindigkeit peripherer Nerven oder gar zu einer vollständigen Unterbrechung der Nervenleitung sowie zu Ausfallerscheinungen im Versorgungsgebiet des entsprechenden Nervs führen (Binding et al., 1991 und 1992). Des Weiteren wurden bei bleiexponierten Erwachsenen Demenz und Enzephalopathie beobachtet, sowie bei Kindern mit chronischer Bleivergiftung Entwicklungsstörungen (Needleman et al., 1979, Needleman/Bellinger 1991; Pocock et al., 1994). Ein ebenfalls neurotoxisch wirkendes Metall ist u. a. Quecksilber, das Konzentrationsschwäche, Schlaflosigkeit und diffuse motorische Störungen verursachen kann. Anorgani-

sches Arsen verursacht schmerzhafte Parästhesien und Taubheitsgefühl in den Extremitäten, also Ausfälle im sensorischen Bereich (Mazumder et al., 1992; Luong/Nguyen, 1999). Nach Intoxikation mit Schwermetallen sind die Pathomechanismen, die zu diesen Symptomen führen, oft unklar und Hinweise auf die Ursache eines neurologischen Symptomkomplexes selten. Einige Schwermetalle bewirken durch den Angriff auf Ionenkanäle ihre Neurotoxizität. So reduziert z. B. Blei den Calciumstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle sehr stark (Büsselberg et al., 1991) und beeinflusst zudem die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Madeja et al., 1995). Die AMPA-Rezeptorkanäle (Mußhoff et al., 1995) sowie die NMDA-Rezeptorkanäle (Alkondon et al., 1990; Uteshev et al., 1993) können ebenfalls durch Blei blockiert werden.

1.3 Toxizität und Ursprung metallorganischer Verbindungen

1.3.1 Metallorganische Verbindungen biogenen und anthropogenen Ursprungs

Viele Produkte, die im Rahmen von verschiedenen industriellen Herstellungsverfahren gefertigt werden, enthalten metallorganische Verbindungen *anthropogenen* Ursprungs, das früher benutzte „verbleite“ Benzin sowie heute verwendete Zusätze in PVC, Holzimprägnierungsmitteln, Farben und Pestiziden (Thayer 1995; Appel et al., 2000). Da der Abbau vieler dieser Schadstoffe in der Regel Jahre bis Jahrzehnte dauert, sind in Erdablagerungen häufig metallorganische Altlasten zu finden, die noch auf den Einsatz von chemischen Kampfstoffen und Giftgasen (z. B. Diphenylaminchlorarsen) aus den beiden Weltkriegen zurückzuführen sind (Thayer, 1995; Feldmann et al., 1993). Nach starken Regenfällen können Veränderungen in Schichtung und Zusammensetzung des Bodens metallorganische Verbindungen aus den Sedimenten freisetzen. Bei der Flutkatastrophe in Mitteldeutschland im Jahr 2002 wurden zahlreiche Siedlungen, durch mit unzähligen Schadstoffen „kontaminierter“ Ackererde überschwemmt (Umwelt Forschungszentrum 2002; Greenpeace 2002).

Durch Stoffwechselprodukte in Mikroorganismen, besonders in Algen, Pilzen und Bakterien, entstehen metallorganische Verbindungen *biogenen* Ursprungs (Biomethylierung). Insbesondere Mülldeponien und Klärwerke weisen optimale

Bedingungen für die Biomethylierung auf (Hirner et al., 1994; Feldmann/Hirner, 1995). Die Anwesenheit eines Metallgruppendonators ist Voraussetzung für die enzymatisch ablaufende Metallmethylierung (Choi/Bartha 1993; Thayer 1995; Pongartz/Heumann 1998; Turpeinen et al., 1999; Craig et al, 1999). Die Mikroorganismen speichern die entstandenen metallorganischen Verbindungen oder geben diese an die Umwelt ab.

1.3.2 Toxizität von metallorganischen Verbindungen

Die Haut und Schleimhaut hoch entwickelter Lebewesen resorbiert organische Metallverbindungen aufgrund ihrer Lipophilie besser als anorganische Verbindungen. Die vom Organismus aufgenommenen metallorganischen Verbindungen werden zu monovalenten Kationen umgewandelt. Da diese Kationen sowohl in polarer als auch in unpolarer Materie löslich sind, wird die Toxikokinetik durch die Umwandlung beeinflusst und biologische Membranen können leicht überwunden werden. Intrazellulär können Schwermetallkationen Stickstoff-, Schwefel- und Sauerstoffliganden an aktive Zentren von Enzymen wie Cytochrom p450 und an Proteinen wie Hämoglobin binden und diese so blockieren (Craig 1986; Cheung/Verity 1985; Denny et al., 1993; Komulainen et al., 1995). Störungen des Immunsystems und der Proteinbiosynthese sowie Schäden an der DNA konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Cheung/Verity 1985; Kutznetsov/Richter 1987).

1.3.3 Neurotoxizität von metallorganischen Verbindungen

Das vielfach beobachtete neurotoxische Potenzial metallorganischer Verbindungen ist der erhöhten Lipophilie und dem damit leichteren Überwinden der Bluthirnschranke zuzuschreiben (Craig 1985). Ein gutes Beispiel dafür ist Methylquecksilberchlorid.

Das Methylquecksilberchlorid ist eine metallorganische Verbindung, die 1950 in der japanischen Küstenstadt Minamata bekannt wurde: Durch kontaminierten Fisch kam es zu einer epidemischen Vergiftung der Bevölkerung. Die Erkrankten litten an Hör- und Sehstörungen, Tremor, Ataxien, Psychosen, emotionalen Veränderungen und Parästhesien, wobei einige Ausfälle irreversibler Natur

waren (Takeuchi 1982 und 1986). Genauere nachfolgende Untersuchungen zur Klärung des Pathomechanismus ließen Läsionen im Kleinhirn, im Bereich des visuellen Kortex, sowie im Spinalganglion der Radices dorsales erkennen (Takeuchi 1982). Als Angriffsort des Methylquecksilberchlorids sind u. a. ligandengesteuerte Ionenkanäle, d.h. Rezeptorkanäle von Nervenzellen, zu nennen. Es konnte im Hippokampus eine gehemmte Erregungsübertragung an GABA-Rezeptorkanälen nachgewiesen werden (Yuan/Atichson 1997). Neben dem Methylquecksilberchlorid sind noch weitere potenziell neurotoxische metallorganische Verbindungen bekannt, beispielsweise Blei, Zinn und Arsen. So wurden bei accidentiellen Trimethylzinn-Vergiftungen komplexe Anfallsleiden, Affektstörungen, räumliche Desorientiertheit, persistierende Gedächtnisstörungen und kognitive Fehlfunktionen beschrieben (Feldmann et al., 1993). Aufgrund der hohen Komplexität der Hirnstruktur konnten die Pathomechanismen für viele Substanzen mit erheblichem neurotoxischem Potenzial noch nicht vollständig geklärt werden, oder sind noch gänzlich unbekannt. Diesen Substanzen zugehörig sind die metallorganischen Arsenverbindungen.

1.4 Arsenverbindungen

1.4.1 Entstehung und Vorkommen des anorganischen Arsens

Beim Schmelzprozess und der Legierung von Blei und Kupfer entstehen anorganische Arsenverbindungen anthropogen als Nebenprodukt. In der industriellen Produktion finden sie eine weite Verbreitung z. B. bei der Herstellung von Glas, Halbleitern und Farbpigmenten oder als Zusatz in Pestiziden (Hathaway et al., 1991). Ein geogenes Vorkommen von Arsenverbindungen in diversen Mineralien, wie z. B. Erz und Arsenpyrit wird ebenfalls beschrieben (Hindmarsh 1986; WHO 1981; Nadakavukaren et al., 1984). Bei Verwitterung des Gesteins kann das Arsen freigesetzt werden (Boyle/Jonasson 1973).

1.4.2 Toxizität von anorganischen Arsenverbindungen

Gastrointestinale Symptome wie Diarrhö und Emesis, Muskelschmerzen und Muskelkrämpfe, Taubheit der Extremitäten, Schwäche und Flushs wurden bei akuten Intoxikationen mit anorganischem Arsen beobachtet. Nach etwa einem

Monat können u.a. Verlangsamungen im motorischen und sensorischen Bereich, palmoplantare Hyperkeratosen und brennende Parästhesien auftreten (Murphy et al., 1981; Wesbey/Kunis 1981; Fennell/Stacy 1981). Eine chronische Arsenexposition äußert sich in Hautläsionen oder diversen Krebserkrankungen (Haut-, Lungen-, Leber-, Nieren- und Blasenkrebs) (Tseng 1977). Des Weiteren wurden periphere Neuropathien und periphere vaskuläre Erkrankungen beschrieben (Chen et al., 1992 und 1998; U.S. Environmental Protection Agency 1988).

1.4.3 Neurotoxizität von anorganischen Arsenverbindungen

Neurotoxische Zeichen nach einer Intoxikation durch anorganisches Arsen traten z. B. in Kalkutta auf, wo nach chronischer Exposition durch kontaminiertes Trinkwasser periphere Neuropathien auftraten (Mazumder et al., 1992). Nach häufigem Verzehr von arsenverschmutzten Vogelnestern klagten die Patienten über Taubheitsgefühl, Parästhesien in den Fingerspitzen und Füßen, sowie verminderte Muskelkraft (Luong/Nguyen 1999). In einer chinesischen Studie wiederum werden das Auftreten von Gehörlosigkeit, der Verlust des Geschmackssinns, eine Taubheit der Extremitäten und Halluzinationen nach Arsenvergiftung beschrieben. Bei anschließenden in vitro-Experimenten wurde Apoptose nach Applikation von anorganischem Arsen beobachtet (Nangung/Xia 2000; Chattopadhyay et al., 2002). Allerdings ist der exakte Pathomechanismus nach Arsenexposition noch nicht geklärt.

1.4.4 Entstehung und Vorkommen von organischen Arsenverbindungen

Ebenso wie die anorganischen, sind die organischen Arsenverbindungen größtenteils anthropogenen Ursprungs. Sie werden als Zusätze in Holzschutzmitteln und Bioziden, als Kraftstoffadditive und Stabilisatoren in Kunststoffen verwendet (Thayer 1995; Broome et al., 1988; Appel et al., 2000).

Ebenfalls neurotoxische Symptome wurden für Arsen und seine organischen Verbindungen beschrieben, wobei jene von Delirium und Enzephalopathie bei beruflicher Arsenbelastung (Morton/Caron 1989) über subklinischen Nervenschäden bei schwedischen Kupferschmelzern (Lagerkvist/ Zetterlund 1994) bis

hin zu peripheren Neuropathien bei chronischer Exposition gegenüber arsenbelastetem Trinkwasser (Mazumder et al., 1992) reichen. Die so genannte Biomethylierung spielt bei der Entstehung von organischen aus anorganischen Arsenverbindungen eine entscheidende Rolle.

1971 wurde zum ersten Mal durch McBride und Wolfe die bakterielle Methylierung von Arsen dokumentiert, die aus dem Methanobakterium MoH Dimethylarsenhydrid extrahierten (McBride/Wolfe 1971). Seitdem sind viele Mikroorganismen, die anorganisches Arsen methylieren, entdeckt worden. Bekannte Pilzkulturen, die Arsen unter anaeroben Bedingungen methylieren sind u.a. *Scopulariopsis brevicaulis* (Gosio 1892; Challenger 1945) und *Candida humicola*. Besonders umfassend sind die Methylierungsprozesse sowohl in Algen (Klumpp/Peterson 1981; Francesconi/Edmonds 1997) als auch in Fischen und Säugetieren (Kurowa et al., 1994, Vahter 1981) erforscht. Endprodukte der Methylierung von anorganischem Arsen sind überwiegend Monomethylarsen-, Dimethylarsen- und/oder Trimethylarsensäuren (Vahter 1983; Mozier 1990). Thiole wie Glutathion sind bei Menschen am Methylierungsprozess beteiligt. Das anorganische Arsen wird aus der Atemluft über die Alveolen oder durch den Gastro-Intestinal resorbiert und daraufhin in der Leber methyliert. Aus diesem Methylierungsprozess entsteht beim Menschen zumeist Dimethylarsensäure als Endprodukt, welches mit dem Urin ausgeschieden wird (Hopenhayn-Rich et al., 1993 und 1996). Die Kontamination von Trink- und Grundwasser stellt neben der teilweise hohen Belastung der Nahrungsmittel z. B. DMA in Fisch und Algen (Shiomi et al., 1992) ein großes Problem dar. In Bangladesch wurde 1993 in Trinkwasserbrunnen stark erhöhte Arsenkonzentration festgestellt, wobei es bis heute nicht gelungen ist, die verstärkte Exposition von 20 Mio. Menschen in diesem Gebiet zu beseitigen (Smith et al., 2000).

1.4.5 Toxizität von organischen Arsenverbindungen

In den meisten lebenden Organismen wird die Methylierung von anorganischem Arsen beobachtet und ist daher als Endgiftungsprozess allgemein akzeptiert (Goyer 1996; Fischer et al., 1985; Vahter/Marafante 1983). Neuere Studien ergaben, dass auch organische Arsenverbindungen vermutlich biologische Sys-

teme schädigend beeinflussen (Styblo et al., 2000; Petrick et al., 2000; Vega 2001). Unter Anderem wurde die Zytotoxizität von anorganischen und organischen Arsenverbindungen an humanen Hepatozyten verglichen, wobei das organische trivalente Monomethylarsen die höchste Toxizität aufwies (Petrick 2000). Da der Methylierungsprozess unmittelbar nach Arsenaufnahme beginnt, kann anhand der klinischen Symptome schwer nachvollzogen werden, ob die Arsenintoxikation auf organische oder anorganische Verbindungen zurückzuführen ist.

1.5 Fehlfunktion neuronaler Rezeptorkanäle in Folge von Neurotoxizität

1.5.1 Funktion neuronaler Ionenkanäle

Das Nervensystem ist in der Lage, Informationen aufzunehmen, zu verarbeiten und weiterzuleiten, wobei diese Leistungen größtenteils von Nervenzellen übernommen werden. Durch die Modulation der in der Nervenzellmembran entstehenden bioelektrischen Aktivität werden Informationen codiert im Nervenzellverband weitergeleitet, wobei alle Veränderungsprozesse bioelektrischer Aktivität direkt von Ionenkanälen abhängig sind. Als Ionenkanäle bezeichnet man in die Zellmembran eingelassene Proteine, durch welche ein Transport von Ionen in die und aus der Zelle stattfinden kann. Bereits im Ruhezustand besteht ein unterschiedliches Konzentrationsverhältnis der Ionen im intra- und extrazellulären Raum und damit an der Nervenzellmembran eine elektrische Spannung – das so genannte Membranpotenzial. Die Ionenkanäle beinhalten die Funktionen von Ventilen, welche geöffnet bzw. geschlossen werden und somit über Regulation transmembraner Ionenströme das Membranpotenzial ändern können. Die Membranpotenzialveränderung dient also als Signal einer codierten Information. Die Schwankungen des Membranpotenzials, welche durch die Aktivität der Ionenkanäle entstehen, werden als Aktionspotenzial bezeichnet. Diese dienen der Erregungsweiterleitung entlang einer Nervenzelle. Sie werden von spannungsgesteuerten Ionenkanälen erzeugt, welche sich öffnen, wenn sich das Membranpotenzial verringert. Außerdem sind sie selektiv permeabel für Kalium-, Natrium- und Calciumionen. Die Weiterleitung einer neuronalen Erregung (Aktionspotenzial) von einer Nervenzelle auf eine zweite Nervenzelle geschieht

durch eine chemische Erregungsübertragung. Wenn ein Aktionspotenzial im Nerv bis zum synaptischen Endknopf weitergeleitet worden ist, öffnen sich durch Verschiebungen des Membranpotenzials unter anderem Calciumkanäle. Das in die Zelle einströmende Calcium bewirkt eine Kaskade, an deren Ende die Ausschüttung des exzitatorischen Botenstoffes Glutamat steht. Sobald das Glutamat auf eine Membran der nachfolgenden Nervenzellen trifft, wird wiederum eine zweite Gruppe von Ionenkanälen, die Rezeptorkanäle, aktiviert. Die folgende Öffnung dieser Kanäle führt zum so genannten postsynaptischen Potenzial und somit zur Auslösung eines Aktionspotenzials. Das elektrische Signal der Information ist somit hergestellt. Die Informationsweitergabe ist von jeder einzelnen Nervenzelle, insbesondere von den Ionenkanälen, abhängig.

1.5.2 Einteilung neuronaler Rezeptorkanäle

Die sich in der postsynaptischen Membran befindlichen, ligandengesteuerten Ionenkanäle reagieren mit Öffnung, wenn sich ein Ligand (z.B. Glutamat) an den Ionenkanalrezeptor bindet und diesen so aktiviert. Die ligandengesteuerten Rezeptorkanäle werden in die inhibitorischen GABA-Rezeptorkanäle und in die exzitatorischen Glutamat-Rezeptorkanäle unterteilt, bei denen chemische Signale wieder in Aktionspotenziale umgewandelt werden (und die Zelle depolarisiert wird). Der am häufigsten im Zentralnervensystem auftretende exzitatorische Neurotransmitter ist die Aminosäure Glutamat. Dementsprechend ist in der postsynaptischen Membran eine Vielzahl an Glutamatrezeptorkanälen vorhanden: NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-, Kainat- und AMPA (Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat)-Rezeptorkanäle sowie die metabotropen Glutamatrezeptoren.

1.5.3 Bedeutung und Physiologie des AMPA-Rezeptorkanals

Die an vielen erregenden Nervenzellen und besonders häufig im Neokortex und Hippokampus (Boulter et al., 1990; Keinanen et al., 1990) vorkommenden AMPA-Rezeptorkanäle sind, im Gegensatz zu den NMDA-Rezeptorkanälen, direkt durch den erregenden Transmitter Glutamat aktivierbar und bilden somit die erste Phase des postsynaptischen Potenzials. Sie sind für Natrium- und Kalium-

Ionen permeabel, wobei der verstärkte Einstrom von Natriumionen zu einer Verringerung des Membranpotenzials und somit zur Depolarisation der Zelle führt. Nur durch diese Depolarisation ist es möglich, dass auch Glutamat an den NMDA-Rezeptoren wirken kann. Daher kommt den AMPA-Rezeptoren eine generelle Bedeutung für schnelle synaptische Übertragungen zu.

1.5.4 Bedeutung und Physiologie des NMDA-Rezeptorkanals

Die durch N-Methyl-D-Aspartat aktivierbaren NMDA-Rezeptorkanäle sind besonders in den Nervenzellen des Kortex und im Hippokampus lokalisiert (Monyer 1994) und nach ihrer Aktivierung für Natrium-, Calcium- und Kalium-Ionen permeabel. Das einströmende Calcium besitzt eine Schlüsselfunktion in der Entstehung kognitiver Prozesse und setzt Kaskaden in Gang, welche die Erstellung von Langzeitpotenzierung (Long Term Potention, LTP) und Langzeitdepression (Long Term Depression, LTD) ermöglichen. (Larkman/Jack 1995). Als LTP bezeichnet man die Fähigkeit bestimmter hippokampaler Synapsen, auf eine experimentell induzierte elektrische, hochfrequente Reizung afferenter Nervenbahnen mit einer lang anhaltenden Steigerung der synaptischen Aktivität zu antworten. Die LTP hat sich seit ihrer Entdeckung, als zelluläres (in-vitro-) Modell für Lern- und Gedächtnisprozesse etabliert (Bliss/Lomo 1973). Diese experimentelle LTP steht in engem Zusammenhang mit den beim natürlichen Lernen ablaufenden Prozessen: es konnte gezeigt werden, dass bei Lernprozessen im Hippokampus von Tieren ähnliche LTP-Veränderungen stattfinden (Frey/Morris 1998). In den meisten Fällen sind die hippokampalen LTP-Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke in der NMDA-Rezeptor-Aktivierung begründet. (Bliss/Collingridge 1993). Daher führen genetische oder pharmakologische Veränderungen der NMDA-Rezeptorfunktion zu einer Störung in der Entstehung von LTP und somit zu einer Verschlechterung räumlicher Gedächtnisleistungen. Ebenfalls unerlässlich für die normale neuronale Entwicklung sind NMDA-Rezeptoren (Cull-Candy et al., 2001). Im Verlauf der frühen Ontogenese kommt es zu deutlichen und schwerwiegenden Veränderungen in Zahl und Zusammensetzung der heteromeren NMDA-Rezeptoren, welche sich in persistierenden Veränderungen in der weiteren kognitiven Ent-

wicklung äußern. So wird beispielsweise beschrieben, dass die frühe postnatale Applikation von Toxinen (z.B. Blei, Ethanol) eine deutlich stärkere Störung kognitiver Leistungen zur Folge hatte, als sie in adulten Stadien der Fall war (Needleman et al., 1990; White et al., 2004). Diese ausgeprägte Toxizität der frühen Entwicklungsphase kann u. a. durch die im frühen postnatalen Entwicklungsstadium besonders stark ausgeprägte Genexpression und die Funktion der glutamatergen Rezeptoren im Hippokampus, vor allem der NMDA-Rezeptoren, erklärt werden. Jene ist deutlichen Umbauprozessen unterworfen und wird somit durch die Giftstoffe beeinträchtigt. Besonders hervorzuheben in der Beschreibung dieses Ionenkanals ist der spannungsabhängige Magnesiumblock, der unter physiologischen Bedingungen zu einer Unerregbarkeit des Rezeptors durch Glutamat führt. (Nowak et al., 1984). Erst bei Depolarisation der Zelle mit einem Membranpotential von -30 mV wird das Magnesiumion aus der Ionophore entfernt, wodurch ein positives Feedback entsteht: Mit steigender Anzahl offener NMDA-Rezeptoren nimmt die Depolarisation der Zelle zu, was wiederum zur weiteren Öffnung von NMDA-Rezeptorkanälen führt. Jene Rezeptorkanäle spielen für Lern- und Gedächtnisprozesse (Maren/Baudry 1995; Asztely/Gustafsson 1996) sowie für weitere kognitive Fähigkeiten eine entscheidende Rolle. Ebenso stark beteiligt ist der Rezeptor bei der Pathogenese diverser neurologischer und neurotoxischer Erkrankungen, wie z.B. Epilepsie, Demenz und zerebralem Insult. Durch Daueraktivierung der NMDA-Rezeptorkanäle konnte epileptische Aktivität induziert werden (Collins/Olney 1982). Ein wirksamer Antagonist dieses Kanals ist Ethanol - die Symptome einer Alkoholvergiftung charakterisieren die Ausfälle bei Blockade eines NMDA-Rezeptorkanals: Stupor, Ataxie, Benommenheit, Störungen im visuellen, auditiven und propriozeptiven Bereich, Halluzinationen und reduzierte Schmerzempfindung (Tsai et al., 1998; Fraser 1996; Hargreaves/Chain 1992; Löscher/Hönack 1991; Meldrum 1995; Rogawski 1992).

1.5.5 Bedeutung und Physiologie des Hippokampus

Der Hippokampus spielt eine wesentliche Rolle bei der Verarbeitung von Kontextinformationen (Maren/Fanselow 1997) und von komplexen Informationen

(Jeffrey/Morris 1993). In experimentellen Tierversuchen wurde gezeigt, dass der Hippokampus an konfiguralen und deklarativen Lernversuche essentiell beteiligt ist, prozedurales Lernen jedoch vom Hippokampus unabhängig abläuft (Squire 1992). Die Rolle des Hippokampus ist besonders eingehend bei Nagetieren untersucht worden. Altemus/Almj (1997) kamen zu dem Ergebnis, dass hippokampale Läsionen zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens führen, wobei die Größe der Läsion mit dem Grad der Beeinträchtigung korreliert.

So führen teilweise oder vollständige Hippokampusläsionen, z. B. bei einer Temporallappen-Epilepsie, zu Beeinträchtigung im Erlernen neuer Gedächtnisinhalte, während das Abrufen von Gedächtnisinhalten aus dem Langzeitspeicher weitestgehend unbeeinträchtigt bleibt (Miller et al., 1993).

1.6 Fragestellung

Für eine Reihe von Metallen und ihre Metaboliten wurde eine neurotoxische Wirkung beschrieben und nachgewiesen. Die Pathogenese der neurologischen Symptomatik ist aber nur bei den wenigsten geklärt. Dies gilt gerade für (an-)organisches Arsen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Reaktion glutamaterger NMDA-Rezeptoren im Hippokampus von Ratten auf organische, pentavalente Dimethylarsinsäure zu untersuchen. Dabei gilt es insbesondere zu klären, ob die Säure, welche an AMPA- und NMDA-Rezeptoren von Oozyten eine nachgewiesene signifikante Hemmung hervorruft, ebenfalls an hippokampalen Rezeptoren, insbesondere an der Schaffer-Kollateral/CA1-Synapse, durch eine Störung des Nervenzellverbands schädigenden Einfluss nehmen kann. Die Rolle des neurotoxischen Potenzials der Arsensäure ist für die Zielsetzung der Arbeit eine entscheidende: Es soll geklärt werden, inwieweit jenes Potenzial über Glutamatrezeptoren vermittelt werden kann und über welche Mechanismen eine mögliche Toxizität entfaltet wird

2 Material und Methode

2.1 Versuchstierhaltung und Präparationstechnik

Bei den Versuchstieren handelte es sich um adulte (2 bis 4 Monate alte) und juvenile (14 bis 21 Tage alte) Ratten, die dem institutseigenen Inzuchtstamm (Wistar) entnommen wurden und somit im Tierstall aufwuchsen. Sie wurden in Käfigen von 55cm Länge, 32cm Breite und 19cm Höhe untergebracht und mit Nahrung sowie Wasser ad libitum versorgt. Die Raumtemperatur schwankte zwischen 21 und 25°C, wobei sich Abweichungen während eines Tages auf eine Spanne von 0,5°C beschränkten. Für die Versuche wurden insgesamt 13 Ratten (12 männliche, 6 adult), deren Gewicht zwischen 220 und 300g – in Ausnahmefällen bis zu 340g – schwankte, verwendet. Sie unterlagen einem Hell- Dunkel- Rhythmus von jeweils 12h.

2.2 Erfassung der bioelektrischen Aktivität

2.2.1 Präparation der Hippokampus-Gewebeschnitte

Primäres Untersuchungsziel war der Hippokampusbereich der Versuchstiere. Die zu diesem Zweck erforderlichen Hirngewebeschnitte wurden durch vorangehende Narkotisierung der Tiere mit Ether oder 15mg Methohexital-Natrium (Brevimytal[®]-Natrium) sowie anschließender Dekapierung mittels einer Guillotine ermöglicht. Nach der Schädelöffnung wurde das Gehirn in eisgekühlte, mit Carbogen (5% CO₂ in O₂) begaste künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) getaucht, eine halbe Minute später wurde der Hippokampus freipräpariert. Mit Hilfe eines McIlwain Tissue Choppers wurden 500µm dicke Gewebsschnitte parallel zu den Alveusfasern geschnitten. Es wurden Schnitte aus dem ventralen, medialen sowie dem dorsalen Hippokampusbereich verwendet. Vor Beginn der elektrophysiologischen Untersuchungen lagen die Schnittpräparate mindestens 30 Minuten bei 28 °C in Lösung 1, danach wurde die Calciumkonzentration für weitere 30 Minuten von 1 auf 2 mmol/l erhöht (Lösung 2). Die Überführung der Schnitte in die Versuchskammer erfolgte mittels Pasteurpipette. Für die

Tierversuche lag eine Genehmigung des Regierungspräsidenten Münsters vor (Schreiben vom 19.12.2002, Aktenzeichen: 50.0835.1.0. G 79/2002).

2.2.2 Versuchskammer

Für die Versuche wurde eine konventionelle Perfusionskammer des Typs „submerged“ verwendet. Die Gewebeschnitte lagen dem Boden der Kammer auf und wurden mit carbongesättigter ACSF überspült. Die Kammer maß 10 x 40mm und war aus kunststoffbeschichtetem Aluminium gefertigt. Aus einem vorgegebenen Lösungsstand von 3mm resultierte somit ein Badvolumen von ca. 1,0 ml. Eine vorgeschaltete Tropfenfalle wurde zur fortlaufenden Messung der Durchflussrate (Flow) verwendet und auf 70 bis 80 Tropfen pro Minute justiert (Durchflussrate: ca. 4ml/min). Temperatur sowie pH-Wert des Bades wurden kontinuierlich gemessen und konstant auf 32°C bzw. pH 7,4 gehalten.

2.2.3 Evozierte Feldpotenzialableitungen

Zur Registrierung der synaptischen Aktivität aus dem Stratum radiatum der CA1-Region, wurden Feldpotenzial-Ableitungen durchgeführt. Die Stimulation an den Schaffer-Kollateralen erfolgte durch eine bipolare Reizelektrode. Die Registrierung im dendritischen Bereich der CA1-Pyramidenzellen (Stratum radiatum) stellte sich als extrazellulär gemessenes, excitatorisches postsynaptisches Potenzial (field EPSP, fEPSP) dar. Eine mit Kaliumchloridlösung (3mol/l) gefüllte und in der Versuchskammer eingebrachte Glaskapillare wurde als Referenzelektrode verwendet. Die Feldpotenzialelektrode bestand aus Borosilikatglas mit einem Innendurchmesser von 0,87mm, die Spitze der Elektrode wurde mit einer Pinzette auf einen Innendurchmesser von 8 bis 10µm zurückgebrochen (0,5 bis 1,5 MΩ). Für die Versuchsdurchführung wurden die experimentellen Parameter (Reizstärke und Elektrodenplatzierung) so eingestellt, dass fEPSPs registriert wurden, die folgenden Kriterien entsprachen:

1. Das fEPSP sollte keine Aktivität summierter Aktionspotentiale enthalten, die im somatischen Bereich generiert werden. Diese als population-spike (pop-spike) bezeichneten Komponenten stellen keine unmittelbare synaptische Aktivität dar.

- Die Amplitude musste mindestens 0,2 mV betragen. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Versuchsserien wurde die Reizintensität so eingestellt, dass die Reizantwort (fEPSP) die halbmaximale Amplitude erreichte. Die Reizstärke der bipolaren Elektrode war an einem Pol dabei zwischen 0,1 und 0,2 mA festgelegt, die Stromstärke des anderen Pols wurde dann entsprechend variiert. Die Reizstärke lag bei den verschiedenen Experimenten zwischen 0,1 mA und 1,3 mA.
- Es wurden nur Versuche ausgewertet, die keine Latenzverschiebung der Reizantwort im Versuchsverlauf aufwiesen. Eine solche Latenzverschiebung tritt allerdings nicht auf.

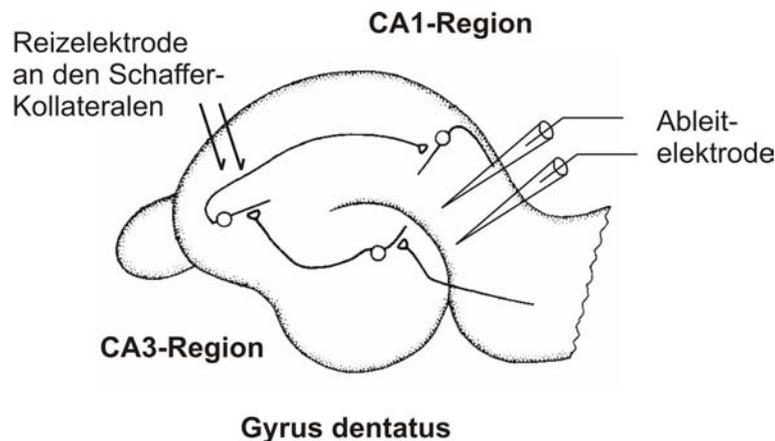


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Elektrodenanordnung zur Ableitung des fEPSP. Die Reizung erfolgt an den Schaffer-Kollateralen, die Ableitung extrazellulär an den CA1-Synapsen. Die Referenzelektrode befindet sich im Bad.

2.2.4 Versuchsprotokolle

Wesentlich für die Sicherstellung der Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche war die Einhaltung eines exakten Zeitrasters: 1. Vorlauf mit anschließender Applikation der Lösung. 2. Die dabei erfolgte die Reizung der Schaffer-Kollateralen alle 30 Sekunden bei gleichzeitiger fEPSP-Registrierung im Stratum radiatum der CA1-Region.

2.2.5 Kontrollversuche

Um die Effekte von DMA^V beurteilen zu können wurden Kontrollversuche ohne Substanzgabe unter gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt.

2.2.6 Auswirkung von DMA^V auf evozierte Feldpotenziale (fEPSP)

Zur Analyse der Wirkung von DMA^V (100µmol/l) auf evozierte Potenziale wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt, die sich wiederum in verschiedene Versuchsphasen unterteilten. Der Einhaltung des Zeitrasters kam eine besondere Bedeutung zu und wurde daher zu jeder Zeit strikt befolgt. Mit einer den Versuchen vorausgehenden 30-minütigen Kontrollphase, innerhalb derer ein stabiles bioelektrisches Signal auftreten musste, wurde eine kontrollierte Versuchsanordnung durchgeführt. Erst danach wurde für 60 Minuten mit der DMA^V-Applikation begonnen. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte in diesem Rahmen reversibel waren, wurde zudem eine weitere, 30-minütige Kontrollphase (Auswaschphase) angeschlossen. (Während der Zugabe des DMA^V wurden wie unter Vorlaufbedingungen alle 30 Sekunden fEPSPs aufgezeichnet). Die aufgezeichneten fEPSPs wurden hinsichtlich Amplitude und Steigung quantifiziert. Aufgrund der weitgehenden Proportionalität beider Parameter, wird in der weiteren Darstellung nun ausschliesslich die Amplitude angegeben. Die während der Giftgabe gewonnenen fEPSP-Amplituden, wurden in Beziehung gesetzt, zu der Durchschnittsamplitude, welche in der Kontrollphase vor Giftapplikation aufgezeichnet wurde.

1. Alle Versuche wurden einzeln analysiert, d.h. die werte der letzten 15 min des Vorlaufs wurden gleich 100% (1) gesetzt und die folgenden Reaktionen darauf normiert.
2. Alle Versuche einer Reihe wurden gemittelt (=Mittelkurve).
3. Die Mittelkurven der Kontrollversuche und der Versuche mit Giftapplikation wurden verglichen.

Zur besseren Vergleichbarkeit werden in allen folgenden Darstellungen relative Daten wiedergegeben. Dazu wurde der Mittelwert der letzten 5 Minuten der

Kontrollphase gebildet und dieser gleich 1 gesetzt. Alle Messwerte werden jetzt auf diesen Mittelwert bezogen.

Zur zusätzlichen statistischen Auswertung wurde von den Versuchen einer Versuchsreihe nach Ausbildung eines Plateaus eine Ausgleichsgerade gebildet. Der mittlere y-Wert dieser Ausgleichsgerade mit Standardabweichung kann mit dem mittleren y-Wert der Kontrollen verglichen werden.

2.2.7 Auswirkung von DMA^V auf Doppelreiz-Verstärkung (paired-pulse-facilitation, PPF)

Auch bei den PPF-Versuchen wurde der zeitliche Ablauf genau festgelegt.

Nach einer 15-minütigen Stabilisierungsphase folgen eine 15-minütige Phase der Substanzapplikation (DMA^V, 100 µmol/l) und eine zweite, 15-minütige Auswaschphase.

Die Schaffer-Kollateralen wurden mit zwei aufeinanderfolgenden Stimuli (mit einem Interwall von 40 ms) in jeweils 30-sekündigem Abstand gereizt und somit f(ield)EPSPs vom stratum radiatum der CA1-Region generiert und aufgezeichnet wurden. Der gewonnene Durchschnitt von sechs aufeinanderfolgenden einzelnen Antworten wurde berechnet, graphisch aufgezeichnet und für weiterführende Analysen festgehalten. Das Ausmaß der Facilitation wurde interpretiert, indem die Durchschnittsamplituden der zweiten fEPSP-Antworten auf Stimulierung, zu den Durchschnittsamplituden der ersten fEPSP-Antworten in Beziehung gesetzt wurden.

2.2.8 Auswirkung von DMA^V auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP)

Es wurde ebenfalls nach einem genauen Zeitschema vorgegangen und die Elektroden wurden entsprechend den evozierten Feldpotenzial-Versuchsreihen positioniert (siehe Kapitel 2.2.5). Die Reizelektrode (0,033 Hz) stimulierte die Schaffer-Kollateralen, wohingegen die Ableitelektrode im Stratum radiatum der CA1-Region platziert war. In einer wiederum 15-minütigen Kontrollphase musste ein stabiles bioelektrisches Signal auftreten, bevor der hochfrequenter Reiz (HFS: High-Frequency-Stimulus) gesetzt wurde. Dieser hatte die Dauer

von einer Sekunde und eine Frequenz von 100 Hz (3 mal 100 HZ, 1s Dauer, 10s Intervall). Um die Versuche fortführen zu können, wurde eine konstante Steigerung der Reizantwort innerhalb der folgenden 30 Minuten vorausgesetzt. DMA wurde in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ 15 Minuten vor Setzen des Stimulus zugegeben und weitere 15 Minuten später ausgewaschen. Die Auswertung dieser Versuche erfolgt genauso wie die Auswertung der Versuche über die Wirkung von DMA auf evozierte Feldpotenziale. Zur besseren Übersichtlichkeit werden jedoch die direkten Reizantworten auf den hochfrequenten tetanischen Reiz nicht dargestellt. Es werden ebenfalls die während der Giftapplikation entstandenen Amplituden, zur Durchschnittsamplitude der Kontrollphase normalisiert.

2.3 Applikation von Substanzen

DMA^V wurde in den verschiedenen Versuchsreihen in der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ getestet. Das DMA^V wurde in einer Stammlösung von 1mmol/l ange-
setzt und jeweils zu den Versuchen auf 100 $\mu\text{mol/l}$ verdünnt.

2.4 Statistische Auswertung der Versuchsdaten

Alle bei den Versuchen entstandenen Reizantworten wurden unter Zuhilfenahme eines Personalcomputers bei Verwendung des LTP-Programms, Version 2.30 D (Anderson und Collingridge,2001) und einem digitalen Oszilloskop aufgezeichnet.

Die zur statistischen Auswertung der Daten gebildeten Mittelwerte, werden im folgenden als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Verschiedene Zeitpunkte wurden ausgewertet (fEPSP: t = 30, 60, 90, 150 min; LTP: t = 15, 30, 45, 60, 90 min; PPF: t = 15, 30, 45 min). Anhand des ungepaarten Student-t-Test wurde bei normal verteilten Daten und mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Test bei nicht normal verteilten Daten geprüft, ob statistisch signifikante Unterschiede bei den Versuchsgruppen vorlagen. Bei $p \leq 0,05$ wurden die Werte als signifikant betrachtet.

2.5 Lösungen

Inhaltsstoffe	Kontroll-Lsg. in mmol/l	DMA-Lsg.in mmol/l
NaCl	124	124
KCl	4	4
NaH ₂ PO ₄	1,24	1,24
MgCl ₄	1,3	1,3
NaHCO ₃	26	22
C ₆ H ₁₂ O ₆	10	10
CaCl ₂	2	2
DMA	0	1

Tab.2.1: Verwendete Lösungen während der Versuche

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche dargestellt. Es galt zu untersuchen, ob DMA^V die synaptische Transmission an der Schaffer-kollateral/CA1-Synapse beeinflusst. Die Substanzen wurden dazu in einer Konzentration von 100µM gemessen. Das Kapitel ist in drei Teile gegliedert:

1. Wirkungen von DMA^V auf evozierte synaptische Potenziale (fEPSP)
2. Wirkungen von DMA^V auf Langzeitpotenzierung (LTP)
3. Wirkungen von DMA^V auf Doppelreizverstärkung (PPF)

3.1 Untersuchungen zur Wirkung von DMA^V auf evozierte Feldpotenziale (fEPSP)

Im Folgenden sind zwei Originalregistrierungen von Feldpotenzialen aus adulten und juvenilen Ratten dargestellt.

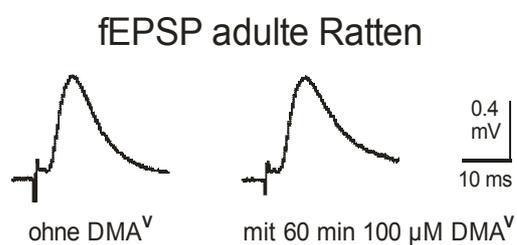


Abb. 3.1: Wirkungen von DMA^V auf fEPSPs adulter Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von 100 µM DMA^V bei adulten Ratten.

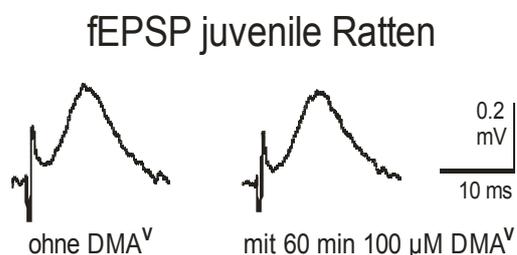


Abb. 3.2: Wirkungen von DMA^V auf fEPSPs juveniler Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von 100 µM DMA^V bei juvenilen Ratten.

3.1.1 Kontrollversuche:

Es wurden Experimente mit sechs adulten und sieben juvenilen Ratten durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob pentavalente Dimethylarsinsäure (DMA^{V} , $100\mu\text{M}$) die Schaffer-kollateral-CA1-Synapsen beeinflusst, wurden die bereits erwähnten, evozierten Feldpotentialableitungen (fEPSPs) unter Kontrollbedingungen (ACSF), d.h. ohne Zugabe von pentavalenter Dimethylarsinsäure gemessen. Unter Kontrollbedingungen blieb der Umfang der fEPSPs, welche über die vollständige Strecke von 90 Minuten verglichen wurden, stabil. In Bezug auf die Nulllinie blieben die Werte sehr einheitlich – sowohl bei den Gewebepräparaten adulter Ratten (*Abb. 3.3*), als auch bei den Gewebepräparaten juveniler Tiere (*Abb. 3.4*). In *Abb. 3.7* sind die Kurven adulter und juveniler Tiere unter Kontrollbedingungen dargestellt. Lediglich im zweiten Kontrollversuch waren bei den adulten Tieren leichte Unregelmäßigkeiten in der 50. und 80. Minute zu erkennen (*Abb. 3.3*, Diagramm 2).

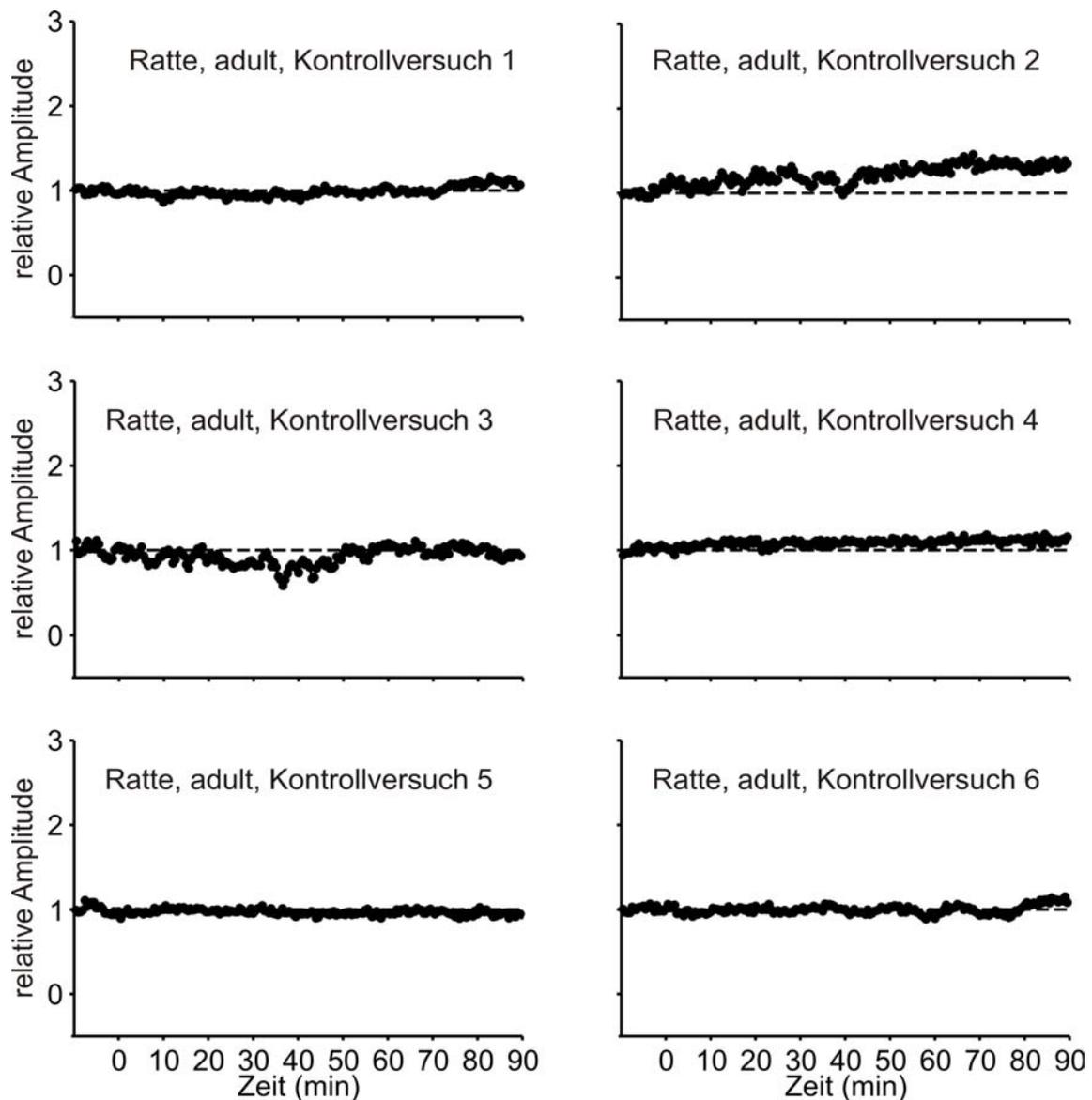


Abb. 3.3: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen.

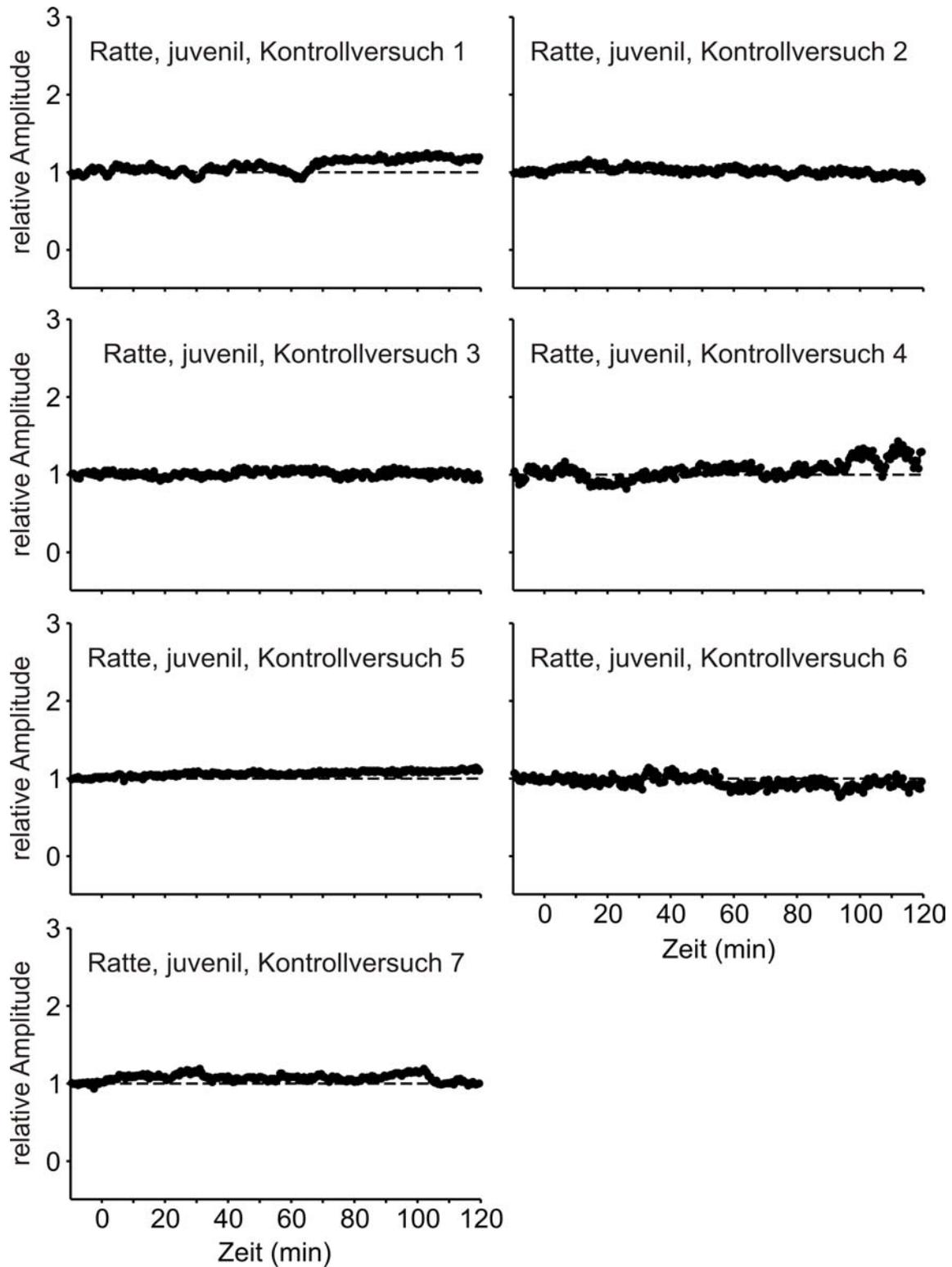


Abb. 3.4: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen

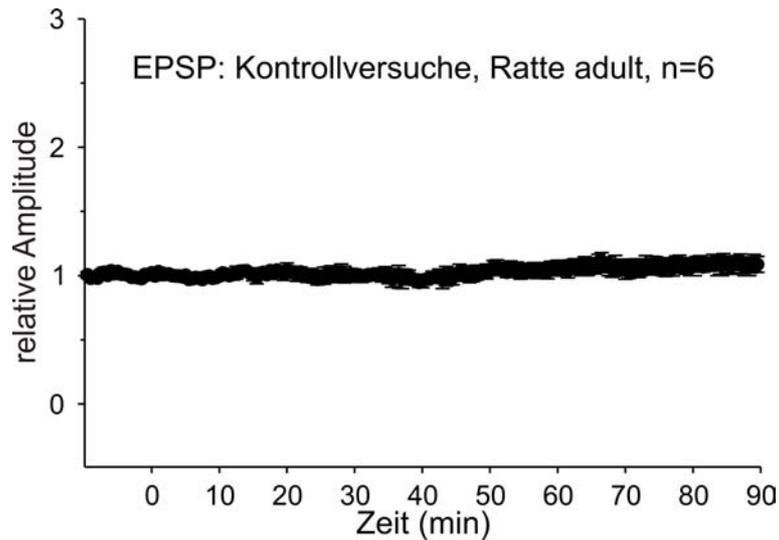


Abb. 3.5: Sechs gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. n=6 = Mittelwert.

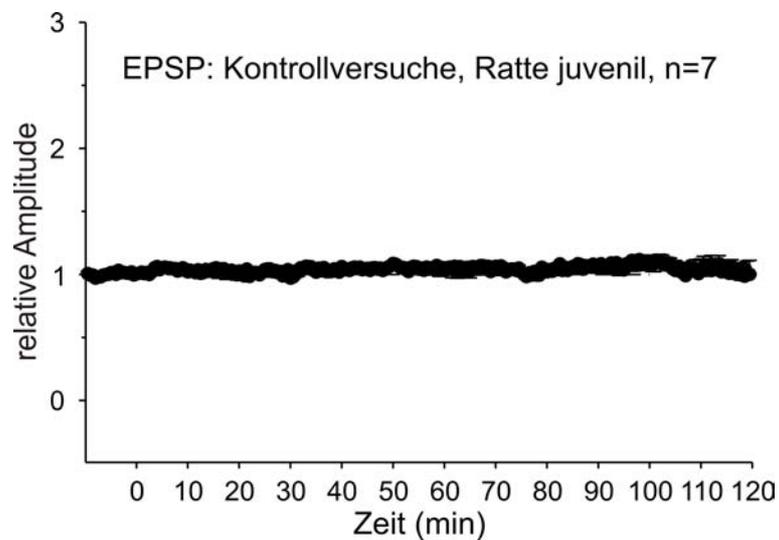


Abb. 3.6: Sieben gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. n=7 = Mittelwert.

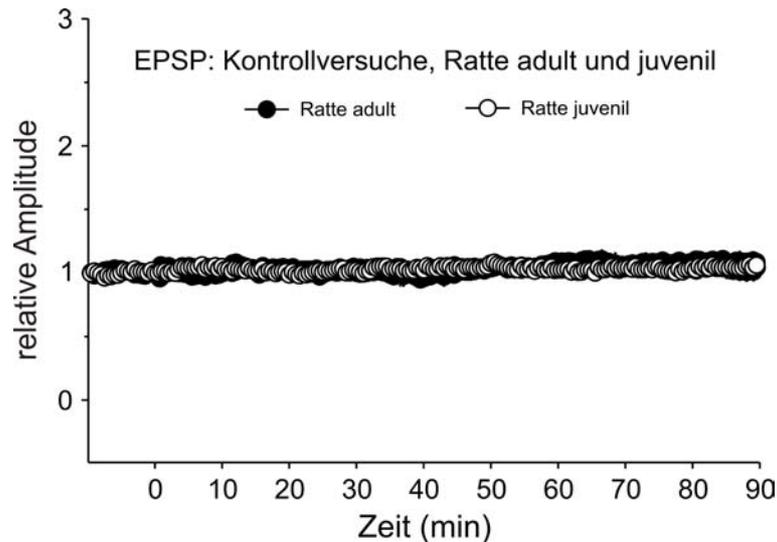


Abb. 3.7: Gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus adulter (n=6) und juveniler Ratten (n=7).

Wie man in Abb. 3.7 deutlich sieht, unterscheiden sich die Ergebnisse der Kontrollversuche bei adulten und juvenilen Ratten nicht.

3.1.2 Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ M) auf fEPSP:

Getestet wurden 13 adulte und juvenile Ratten (6 davon waren adult).

Das Vorgehen bei den Versuchen mit Zugabe des DMA^V war identisch mit den Versuchen unter Kontrollbedingungen. Nach einer 15 minütigen Stabilisierungsphase wurde das Gift (DMA^V, 100 μ M) in die Kontrolllösung (ACSF) geleitet und nach 60 Minuten wieder ausgewaschen. Die sogenannte Badanwendung von 100 μ mol/l DMA^V hatte keinen bedeutenden Effekt auf den Umfang der fEPSPs – weder in den Schnitten junger Ratten (Abb.3.10) noch in denen adulter Ratten (Abb.3.8). Die acht Versuche der juvenilen Tiere und die sechs Versuche der adulten Tiere werden jeweils in einem Mittelwertgraph dargestellt. Dabei bestätigt sich, dass DMA^V keinen signifikanten Effekt hat (3.9 und 3.11). Abb.3.12 zeigt die gemittelten Kurven adulter und juveniler Ratten nach Giftapplikation. Abb.3.13 stellt die Überlagerung des DMA^V und der Kontrolllösung dar. Durchschnittliche Amplituden der fEPSPs sind in Tab. 3.1 dargestellt.

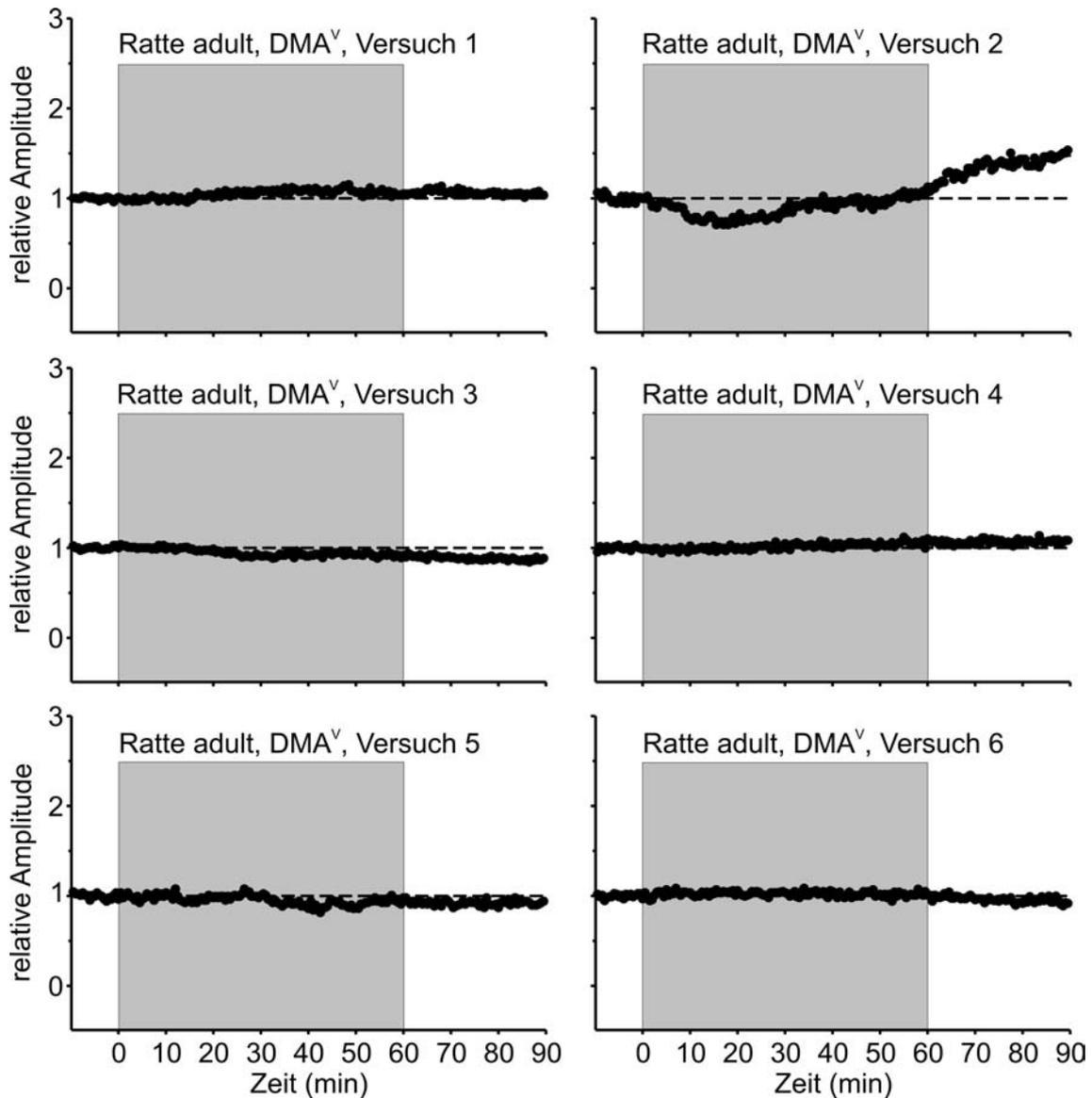


Abb. 3.8: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^{V} , $100 \mu\text{m}$) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^{V} -Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten).

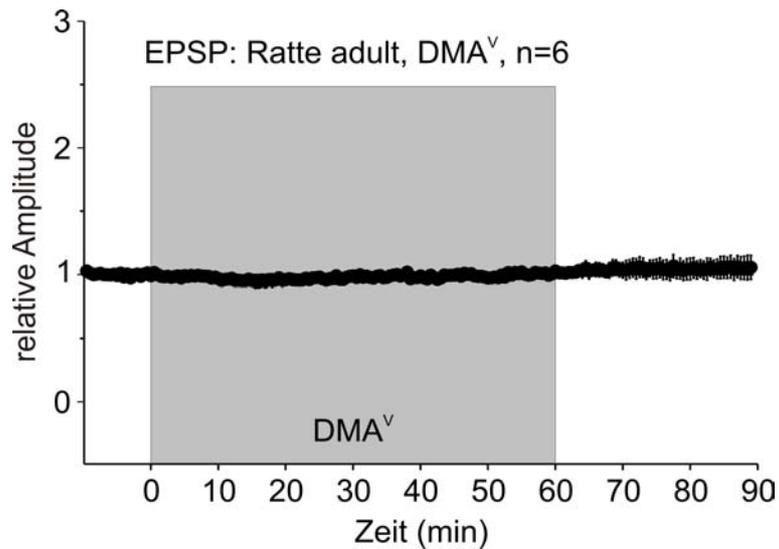


Abb. 3.9: Gemittelte Kurven der sechs Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten).

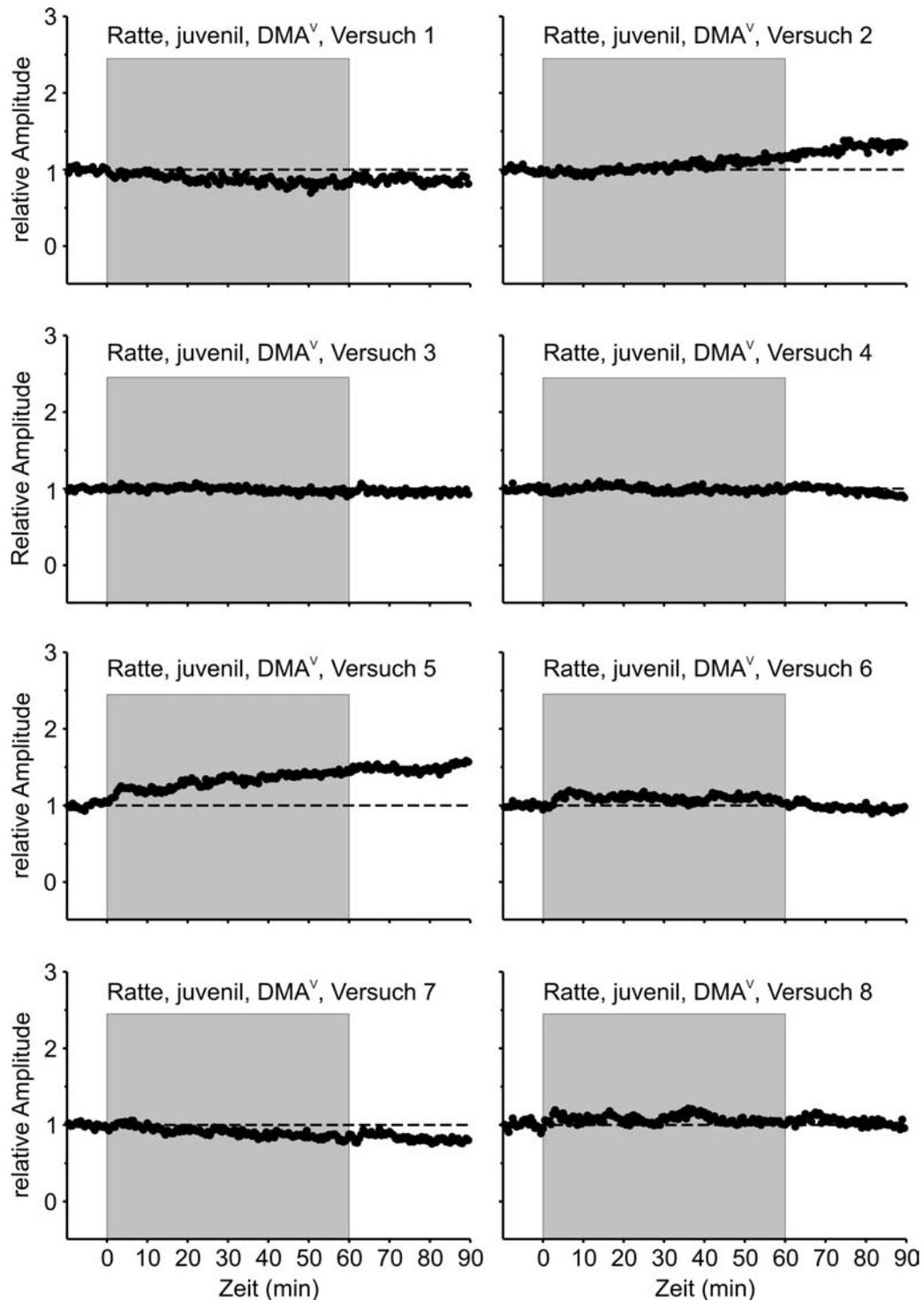


Abb. 3.10: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten).

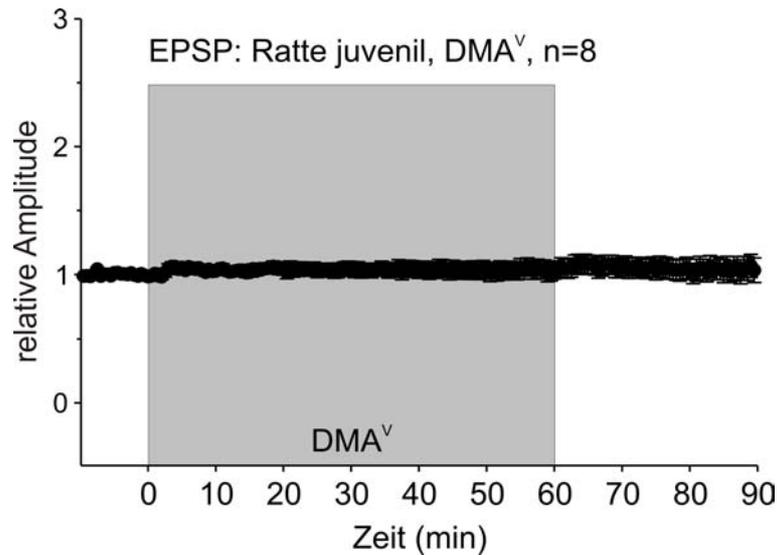


Abb. 3.11: Gemittelte Kurven der acht Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von penta-valenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

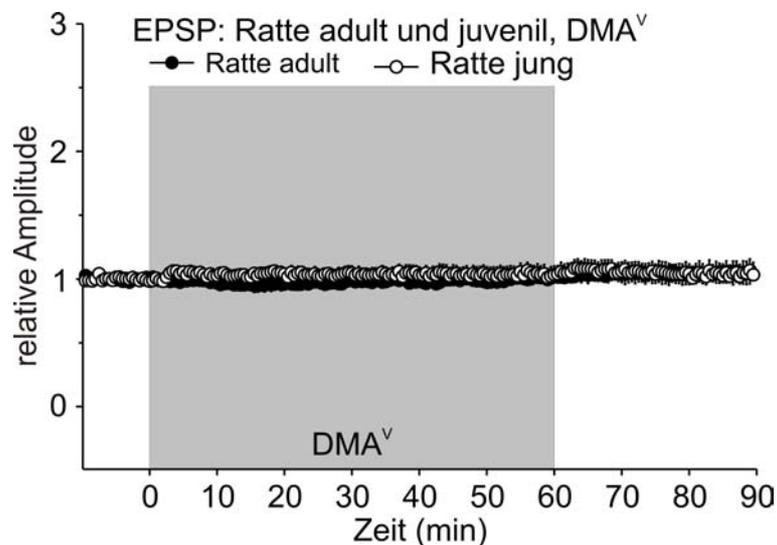


Abb. 3.12: Vergleich der gemittelten Kurven von adulten und juvenilen Ratten zur Wirkung von penta-valenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

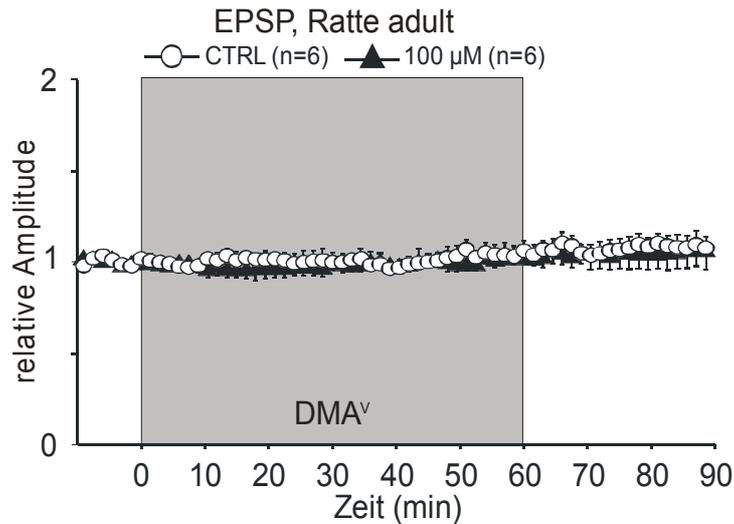


Abb. 3.13: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven adulter Ratten mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µM) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

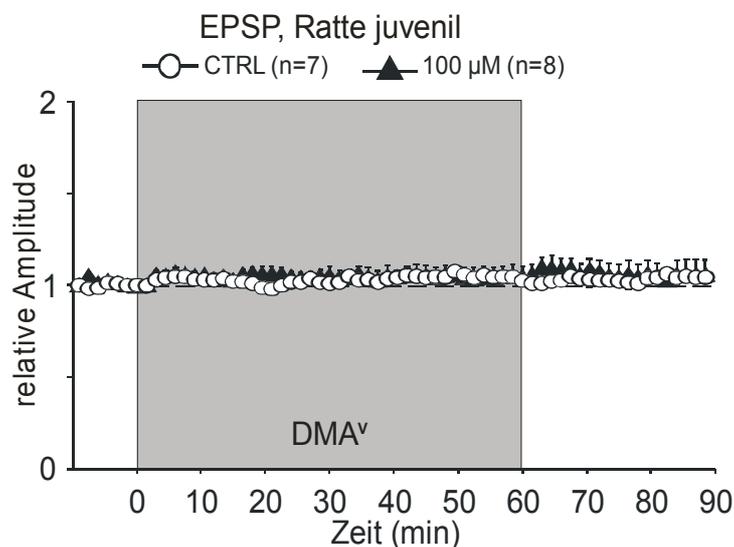


Abb. 3.14: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven juveniler Ratten mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µM) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

fEPSP	juvenile Ratten				
Zeitpunkte	t = 15	t = 30	t = 45	t = 60	t = 90
CTRL	103 ± 2%	100 ± 2%	100 ± 2%	103 ± 2%	105 ± 5%
DMAV	103 ± 3%	104 ± 4%	104 ± 3%	104 ± 5%	105 ± 7%
p	≤ 0,949	≤ 0,489	≤ 0,755	≤ 0,308	≤ 0,341

Tab. 3.1: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden +/- S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, juvenile Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle. Es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

fEPSP	juvenile Ratten				
Zeitpunkte	t = 15	t = 30	t = 45	t = 60	t = 90
CTRL	100 ± 3%	100 ± 3%	100 ± 3%	106 ± 3%	108 ± 5%
DMAV	96 ± 3%	96 ± 3%	96 ± 3%	101 ± 2%	106 ± 7%
p	≤ 0,544	≤ 0,468	≤ 0,435	≤ 0,266	≤ 0,341

Tab. 3.2: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden +/- S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, adulte Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle. Es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

3.2 Untersuchungen zur Wirkung von DMA^V auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP)

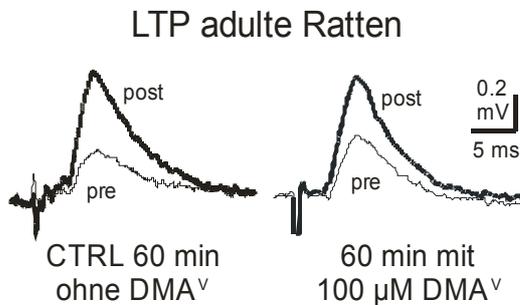


Abb. 3.15: Wirkungen von DMA^V auf LTP-Versuche adulter Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von 100 μM DMA^V bei adulten Ratten.

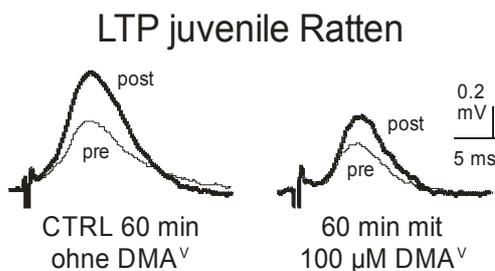


Abb. 3.16: Wirkungen von DMA^V auf LTP-Versuche juveniler Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von 100 μM DMA^V bei juvenilen Ratten.

3.2.1 Kontrollversuche:

Es wurden Experimente mit sechs adulten und sieben juvenilen Ratten durchgeführt. Es konnte weder in den Schnitten juveniler Ratten (3.19) noch in den Schnitten adulter Tiere (3.17) eine signifikante Verstärkung des fEPSP-Umfangs, als Antwort auf HFS, ausgemacht werden. Durchschnittliche fEPSP-Amplituden werden in Tab.3.3 für unterschiedliche Zeitpunkte, direkt nach dem HFS (wird nach zehnminütiger Stabilisierungsphase gesetzt) verzeichnet. Es war eine Steigerung von ungefähr 185% in den Schnitten der adulten Ratten und 170% in denen der juvenilen Tiere zu beobachten. Abb. 3.21 zeigt die gemittelten Kurven von jeweils sechs Versuchen adulter und juveniler Tiere.

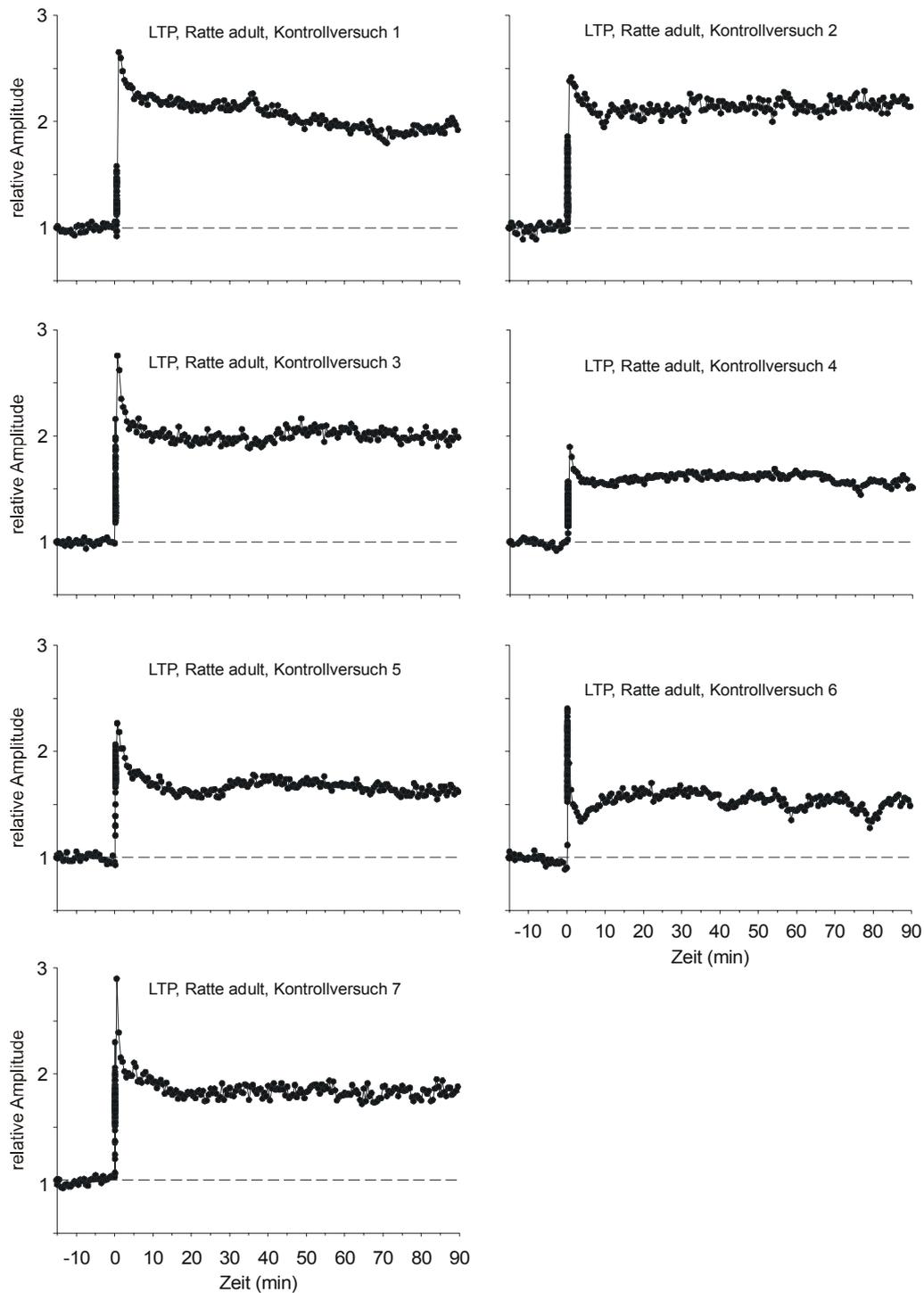


Abb. 3.17: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evoked Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen (in Form der relativen Steigung der fEPSPs)

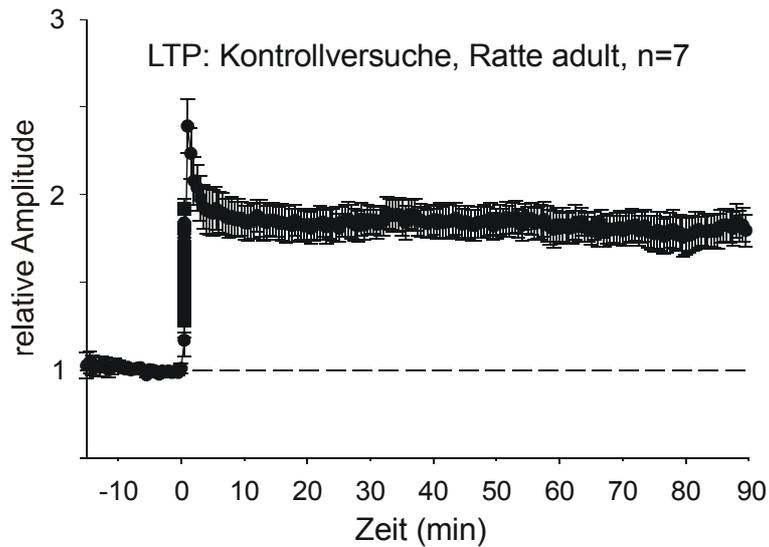


Abb. 3.18: Gemittelte Kurven der sieben Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben. $n=7$ = Mittelwert

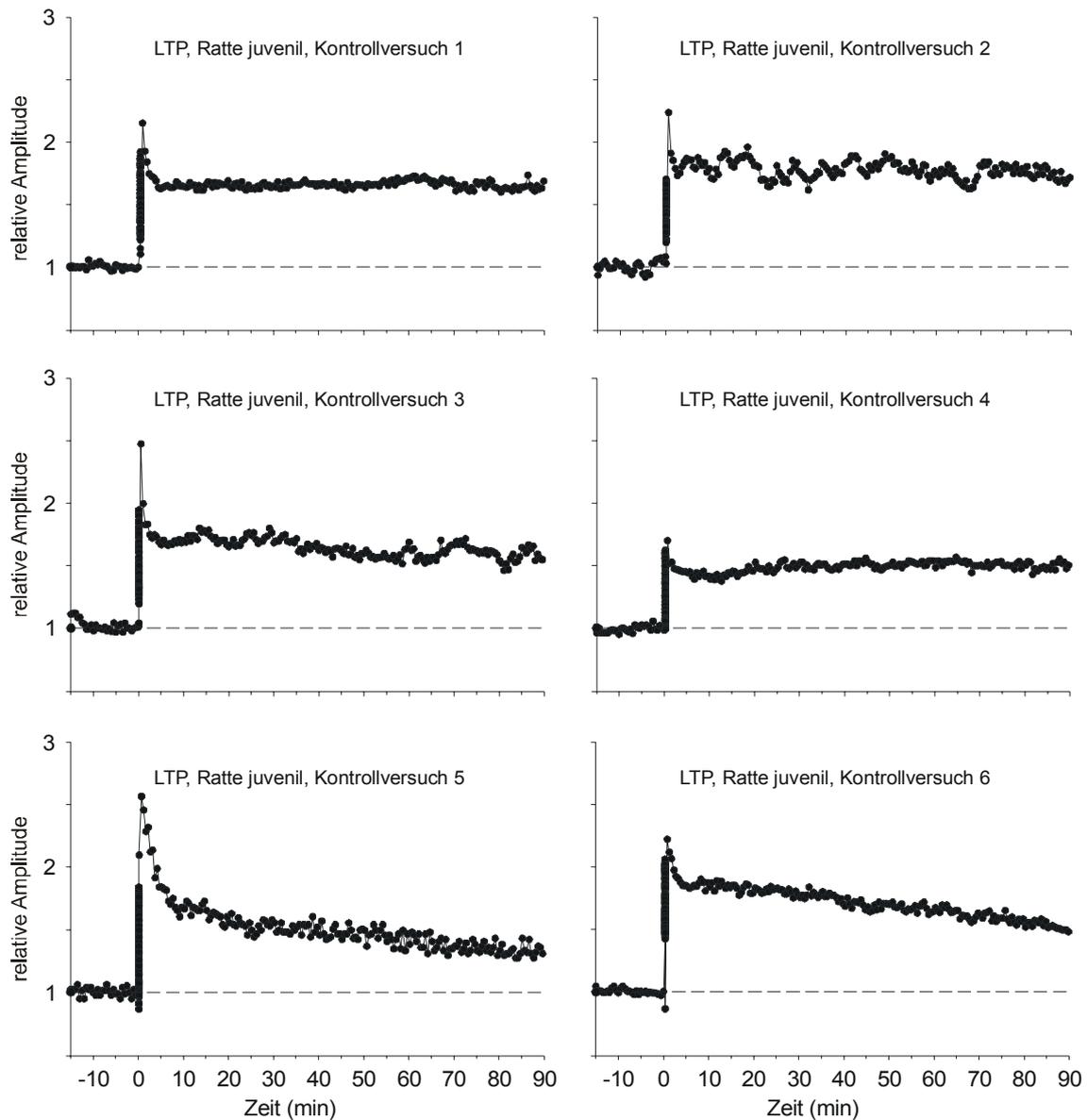


Abb. 3.19: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs).

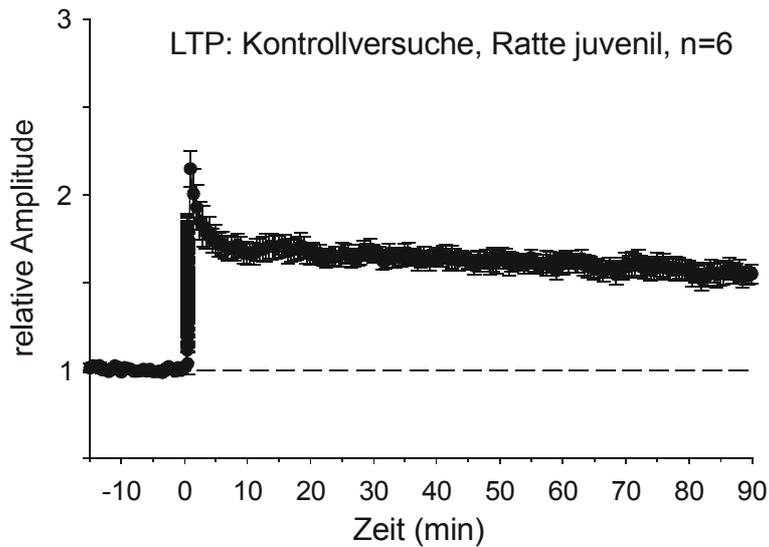


Abb. 3.20: Gemittelte Kurven der sechs Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben. $n=6$ = Mittelwert.

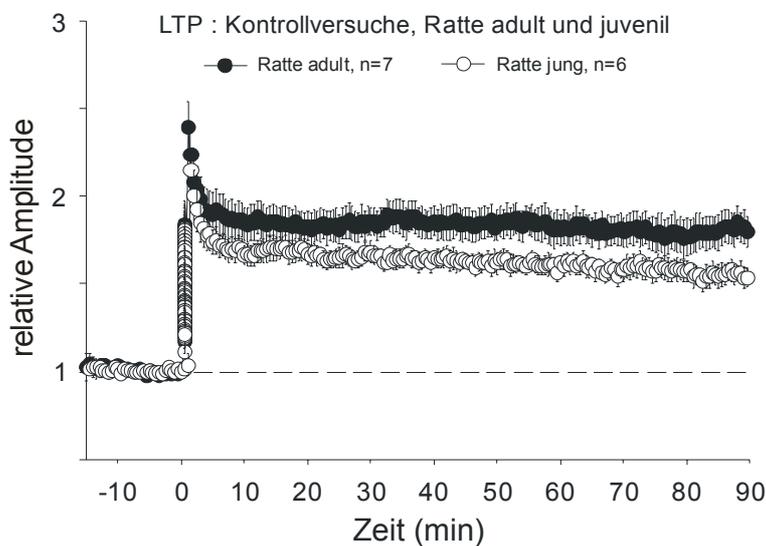


Abb. 3.21: Gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen und adulten Ratte. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben. auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten.

3.2.2 Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100µM) auf LTP:

Getestet wurden 13 adulte und juvenile Ratten (6 davon waren adult). Die neuronalen Strukturen des Hippokampus sind für die Konsolidierung bestehender Gedächtnisinhalte sowie für das Kurzzeitgedächtnis unabdingbar. In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung der pentavalenten Dimethylarsinsäure auf LTP untersucht, da das Auslösen einer LTP ein bewährtes neurophysiologisches Modell darstellt, anhand dessen zelluläre Lernprozesse im Hippokampus beschrieben werden (Bliss et al., 1973).

Um zu prüfen ob DMA^V die Induktion des NMDA-abhängigen Rezeptors an der Schaffer-kollateral-CA1-Synapse beeinflusst, wurde nach 15 Minuten (Kontrollphase), ein hochfrequente Reiz (1s, 100 Hertz) gesetzt und 15 Minuten später 100 µmol/l DMA^V zugegeben. Die Zugabe von 100 µmol/l DMA^V beeinflusste weder den fEPSP- Umfang in den Hippokampusschnitten der juvenilen (Abb. 3.24), noch in den der adulten Tiere (Abb.3.22) erheblich. Es konnte somit keine signifikante Veränderung der Reizantwort festgestellt werden. Die Veränderung der fEPSPs ist somit allein auf die Wirkung der LTP zurückzuführen. Lediglich die Versuche eins und drei (Abb.3.24) zeigten Abweichungen in Bezug auf die restlichen Versuche. Abb.3.27 zeigt die gemittelten, überlagerten (Kontrolllösung und Gift) Kurven der insgesamt 24 Versuche adulter und juveniler Tiere. Dabei bestätigt sich, dass DMA^V nach Auslösung einer LTP keinen weiteren, signifikanten Effekt hat.

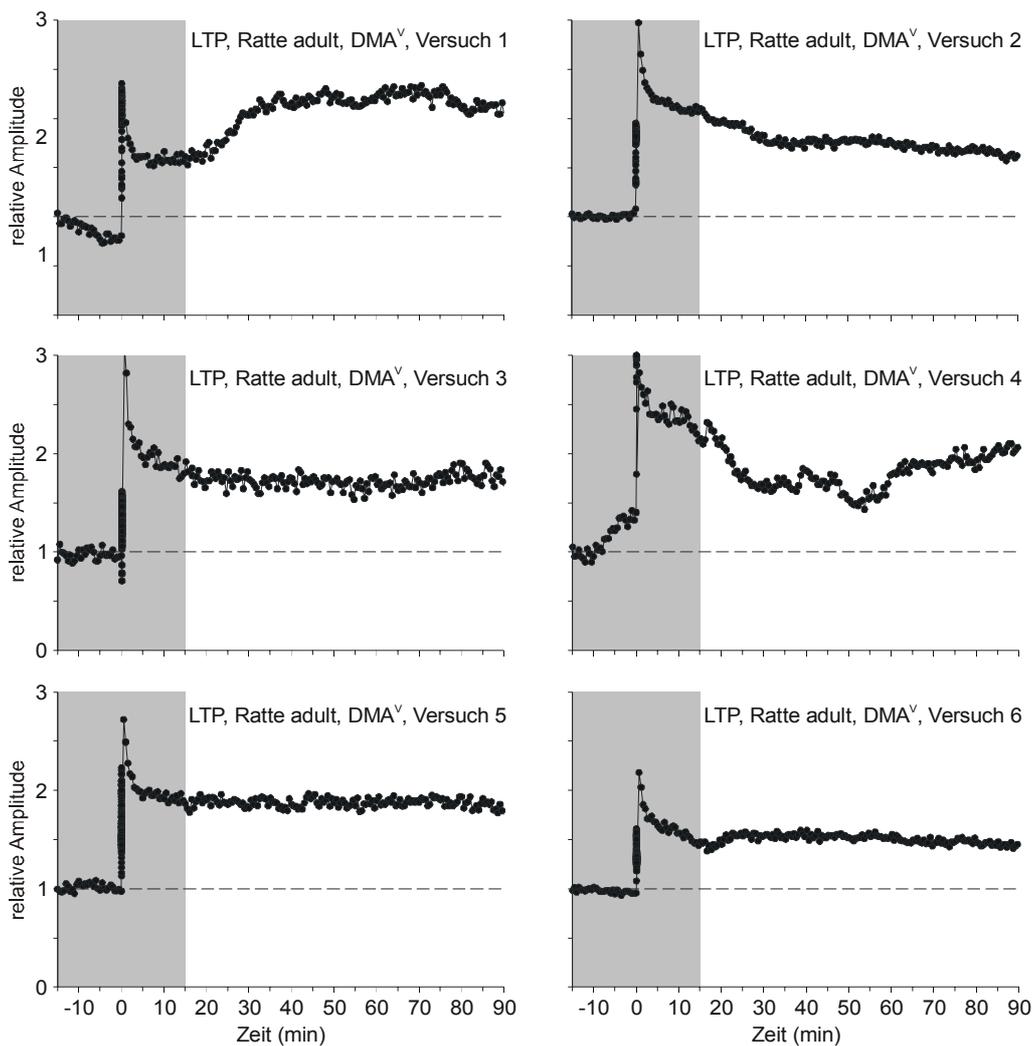


Abb. 3.22: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Beginn des grauen Kastens kennzeichnet das Ende der 15-minütigen Kontrollphase und das Setzen des hochfrequenten Stimulus an. Das Ende des grauen Kastens kennzeichnet die Zugabe des Giftes, 15 Minuten nach Setzen des Stimulus. Dargestellt sind nur die letzten zehn Minuten der Kontrollphase, da diese zur Normierung der Mittelwerte herangezogen werden.

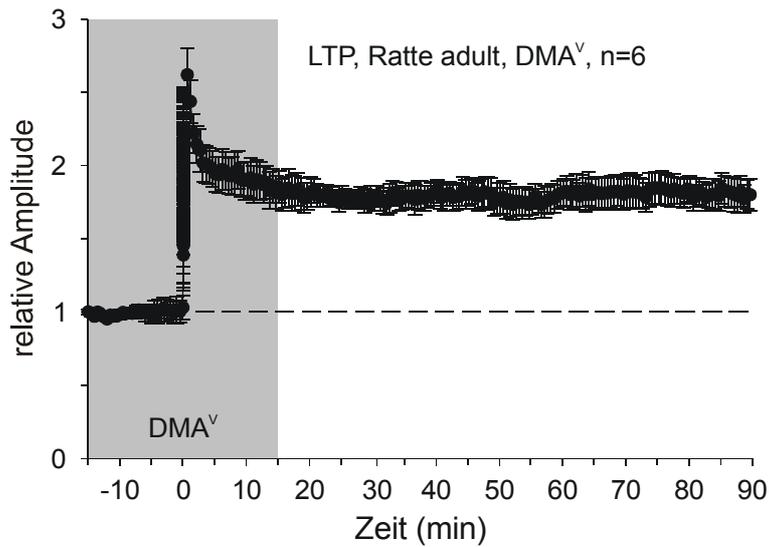


Abb. 3.23: Gemittelte Kurven der sechs Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus adulter Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor pentavalente Dimethylarsinsäure zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

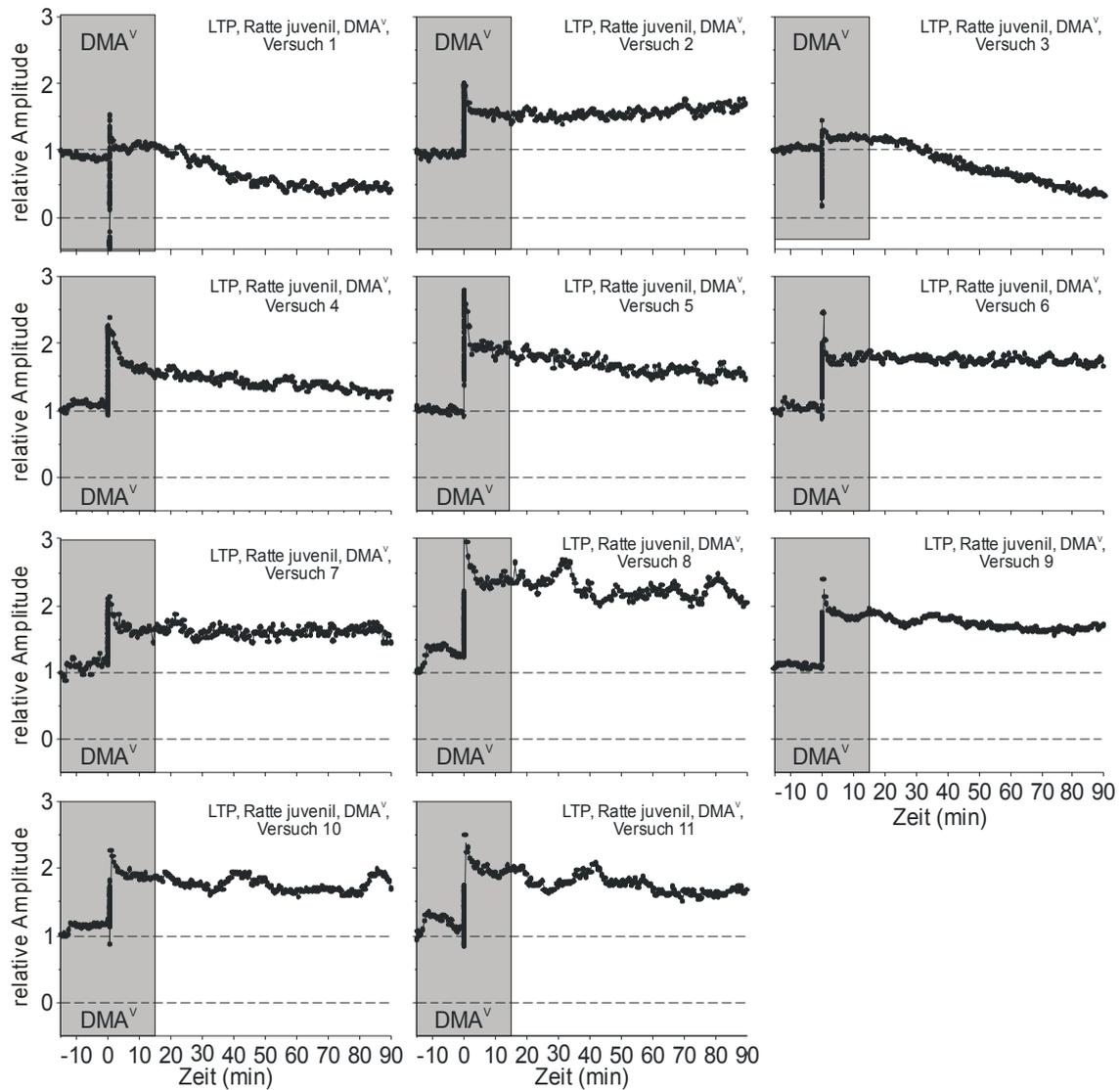


Abb. 3.24: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Beginn des grauen Kastens kennzeichnet das Ende der 15-minütigen Kontrollphase und das Setzen des hochfrequenten Stimulus an. Das Ende des grauen Kastens zeigt die Zugabe des Giftes, 15 Minuten nach Setzen des Stimulus. Dargestellt sind nur die letzten zehn Minuten der Kontrollphase, da diese zur Normierung der Mittelwerte herangezogen werden.

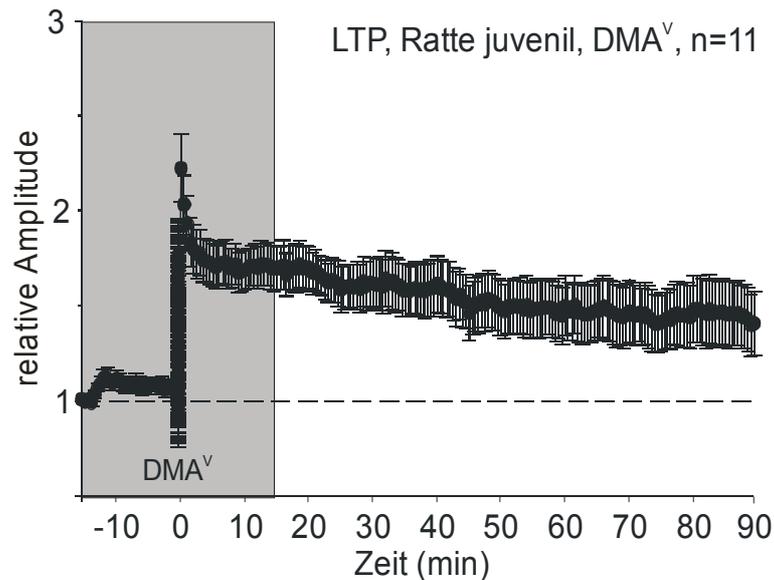


Abb. 3.25: Gemittelte Kurven der elf Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus juveniler Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. $n=11$ = Mittelwert. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor pentavalente Dimethylarsinsäure zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

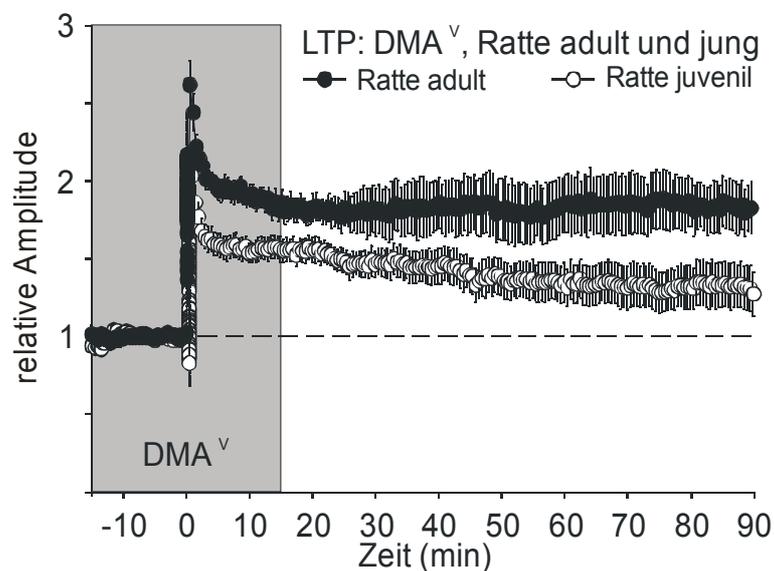


Abb. 3.26: Gemittelte Kurven der Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 μ m) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus juveniler und adulter Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor pentavalente Dimethylarsinsäure zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

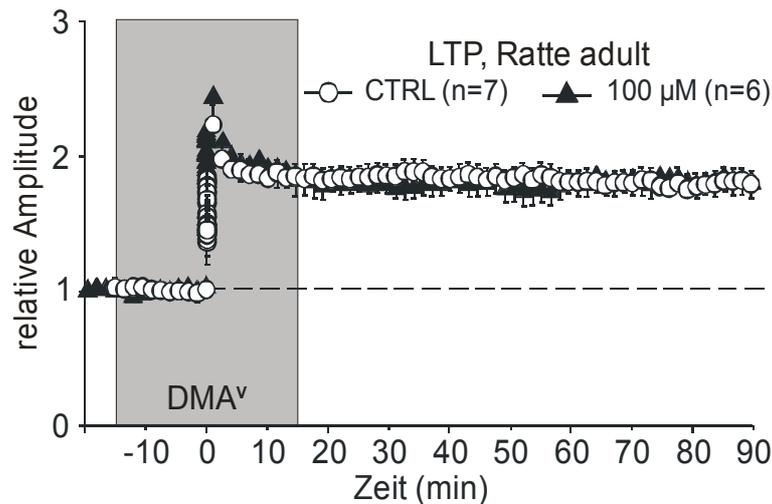


Abb. 3.27: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure ($100 \mu\text{M}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus adulter Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor DMA^{V} zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben,

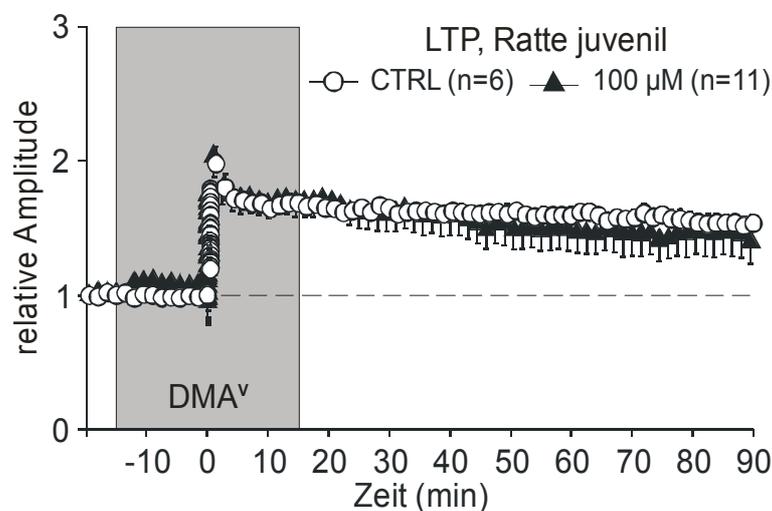


Abb. 3.28: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven der Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure, ($100 \mu\text{M}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus juveniler Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor DMA^{V} zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

LTP	juvenile Ratten				
Zeitpunkte	t = 15	t = 30	t = 45	t = 60	t = 90
CTRL	100 ± 3%	100 ± 3%	100 ± 3%	106 ± 3%	108 ± 5%
DMAV	96 ± 3%	96 ± 3%	96 ± 3%	101 ± 2%	106 ± 7%
p	≤ 0,601	≤ 0,900	≤ 0,787	≤ 0,601	≤ 0,482

Tab. 3.3: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden +/- S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, vor HFS, juvenile Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle, es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

LTP	adulte Ratten				
Zeitpunkte	t = 15	t = 30	t = 45	t = 60	t = 90
CTRL	184 ± 6%	186 ± 5%	100 ± 3%	182 ± 6%	182 ± 7%
DMAV	183 ± 5%	181 ± 11%	96 ± 3%	186 ± 12%	182 ± 10%
p	≤ 0,867	≤ 0,680	≤ 0,435	≤ 0,778	≤ 0,857

Tab. 3.4: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden +/- S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, vor HFS, adulte Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle, es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von DMA^V auf Doppelreizverstärkung (Paired - Pulse Facilitation, PPF)

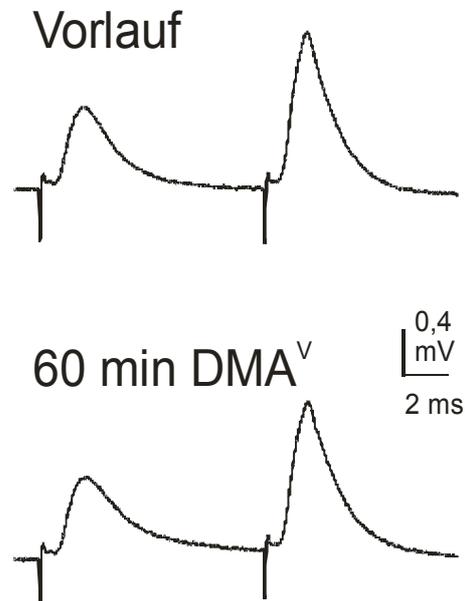
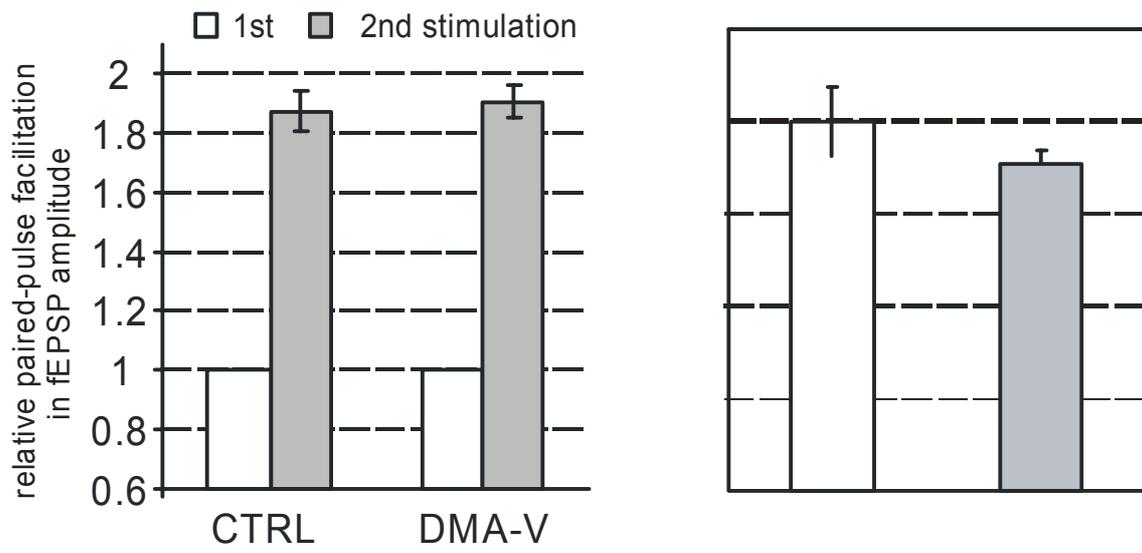


Abb. 3.29: Wirkung von Kontrolllösung und DMA^V (100 μ M) auf PPF, Ratte adult, Originalregistrierungen mit dem Nicolet aufgezeichnet, dargestellt sind die fEPSP-Amplituden nach Gabe des ersten bzw. zweiten Stimulus. mV= Millivolt; ms=Millisekunde

3.3.1 Kontrollversuche:

Getestet wurden 6 adulte Tiere. Weder bei den Versuchen unter Kontrollbedingungen, noch bei Gabe des DMA^V waren signifikante Effekte erkennbar. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die Effekte der Gifte anorganischer Art, an der postsynaptischen Membran sichtbar werden.



PPF, DMA V (100 μ M), Ratte adult

Versuchsdatum		EP1	EP2	Ergebnis
16.11.2004 I	Ctrl	218	340	1,56
	Gift	190	316	1,66
	Ctrl	173	306	1,77
17.11.2004 II	Ctrl	176	359	2,04
	Gift	200	400	2,00
	Ctrl	191	404	2,12
17.11.2004 III	Ctrl	321	624	1,94
	Gift	319	606	1,90
	Ctrl	298	634	2,13
17.11.2004 IV	Ctrl	209	412	1,97
	Gift	280	534	1,91
	Ctrl	265	522	1,97
17.11.2004 V	Ctrl	200	378	1,89
	Gift	218	419	1,92
	Ctrl	220	434	1,97
17.11.2004 VI	Ctrl	114	210	1,84
	Gift	108	221	2,05
	Ctrl	102	206	2,02

Tab. 3.5: Statistische Auswertung der Doppelverstärkungsversuche (Paired-Pulse- Facilitation, PPF). Sechs Versuche sind aufgeführt. Bei allen erhobenen Werten ist keine signifikante Verstärkung auszumachen. EP= evoked Peak.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss der pentavalenten Dimethylarsinsäure auf Gewebepräparate des Hippokampus adulter sowie juveniler Ratten. Die Untersuchungen haben ergeben, dass die Dimethylarsinsäure keine signifikanten Effekte auf glutamaterg synaptische Übertragungsprozesse im Hippokampus von Ratten zeigt.

4.1 Diskussion der verwendeten Untersuchungsmethoden

4.1.1 Versuchstiere

Es wurden für die Versuche adulte sowie juvenile Tiere verwendet, die dem institutseigenem Inzuchtstamm entstammten. Die juvenilen Ratten waren 14 bis 21 Tage, die adulten Tiere zwei bis vier Monate alt. Sie waren beiderlei Geschlechtes. Die Werte von Alter und Gewicht entsprechen dabei Standardwerten (Donaldson, 1924). Die Geschlechterverteilung war zwar unausgeglichen, die getrennte Auswertung der Geschlechterversuche zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied. Die Tiere unterlagen einem Hell-/Dunkel-Rhythmus von 12h. Es wurde darauf geachtet, dass Präparation und Versuche immer zu gleichen Zeitpunkten stattfanden, da auch hippokampale neuronale Aktivität in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus deutliche Unterschiede zeigt (Müßhoff, 1997).

4.1.2 Untersuchungen an der Schaffer-kollateral/CA1-Synapse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen an der Schaffer-kollateral/CA1-Synapse. Der große Vorteil dieses Synapsentyps liegt darin, dass bereits sehr detaillierte morphologische und pharmakologische Kenntnisse vorhanden sind (Shepherd, 1990). Ebenfalls sind die in dieser Arbeit verwendeten, weiterführenden Untersuchungsmethoden, wie das Auslösen einer LTP (Bliss und Lømo, 1973) an dieser Synapse erfolgreich durchgeführt worden.

4.1.3 Das Hippokampus-Schnittpräparat

Das Hippokampus-Schnittpräparat ist ein Standardpräparat in der Neurophysiologie, z.B. zur Untersuchung glutamaterger Synapsen. Der Hippokampus ist hinsichtlich seiner Struktur und Funktion intensiv untersucht, wobei seine synaptischen Umschaltungen genau bekannt sind.

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Schnittpräparate ist gut erprobt und die Verwendung dieser Gewebeschnitte hat sich vielfach bewährt (Dunwiddie et al., 1983). Es handelt sich daher um ein etabliertes, organotypisches Schnittpräparat, welches über Stunden ohne funktionelle Beeinträchtigung überlebensfähig ist. Die in vitro- Ergebnisse stimmen dabei grundsätzlich mit in vivo- Ergebnissen überein (Draguhn et al., 1998). Ein weiterer Vorteil dieser Versuchsanordnungen ist die Möglichkeit, eine zu testende Substanz schnell applizieren zu können, ohne die Grundversorgung des Gewebes zu unterbrechen. Eine sehr geringe Schnittdicke (max. 500µm) gewährleistet die stete Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glucose. Bei Kontrolle dieser Parameter war es bei allen Versuchen möglich, ein stabiles, evoziertes synaptisches Antwortsignal, ohne elektrophysiologische Zeichen einer Unterversorgung des zu testenden Gewebes, auszulösen.

4.1.4 Feldpotenzial-Ableitmethoden

Sämtliche Versuche dieser Arbeit wurden mittels extrazellulärer Ableitmethoden durchgeführt. Das Verwenden dieser Technik hat den entscheidenden Vorteil, den Versuchsaufbau problemlos erweitern zu können, so dass ebenfalls Doppelreizversuche und LTP-Auslösung möglich sind. Des Weiteren kommt es bei dieser Art der Versuchsdurchführung zu einer sicheren und stabilen Registrierung, so dass auch längere Versuchsprotokolle durchführbar sind. (Bliss et al., 1973)

4.1.5 Verwendete Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V) gearbeitet. Die Konzentration der eingesetzten Substanz betrug während sämtlicher Versuche 100 µmol/l. In vorangegangenen Studien wurde die Wirkung

des DMA^V auf heterolog exprimierte Rezeptorkanäle des Glutamat- und GABA-Typs von *Xenopus* Oozyten getestet (Krüger et al., 2006). Bei diesen Studien konnte eine signifikante Hemmung durch DMA^V an diesen Rezeptoren beobachtet werden.

DMA^V zeigte in den vorliegenden Versuchsreihen an Gewebeschnittpräparaten des Hippokampusbereichs von Ratten, genauer gesagt an Rezeptoren des AMPA- und NMDA-Typs keine signifikanten Hemmungseffekte. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen verschiedene Ursachenmöglichkeiten diskutiert werden.

1. Die Substanz ist durch Abbau inaktiviert worden.

Dagegen spricht die Vorsorgemaßnahme der Herstellung einer Stammlösung, die gekühlt und nicht länger als eine Woche gehalten wurde. Aus dieser Stammlösung wurden die Testlösungen jeweils akut zum Versuch hergestellt.

2. Konzentrationsprobleme

Dagegen sprechen die Ergebnisse anderer Versuchsreihen an Gewebepreparaten des Hippokampus, bei denen in geringerer oder gleicher Konzentration gearbeitet wurde und signifikante Effekte erzielt werden konnten. Der Vergleich effektauslösender Konzentrationen dieser Arbeit mit denen von zyto- und genotoxischer Konzentrationen dieser Substanz bei CHO-Zellen (Dopp et al., 2004) zeigt, dass die entsprechenden Konzentrationen im gleichen Bereich sind.

3. Diffusionsprobleme

Für die Wirkung einer Substanz ist es entscheidend, dass die Substanz an die jeweiligen Wirkorte über Diffusion gelangt. In den vorliegenden Experimenten ist dies in Betracht zu ziehen, wenn die Applikationszeit zu gering war. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da andere Substanzen, wie z.B. DMA^{III} relativ rasch im Hippokampuspräparat Wirkungen zeigten (Krüger et al., 2007).

4. Rezeptorzusammensetzung der Untereinheiten

Im heterologen Expressionssystem der Oozyten ist eine genaue Kontrolle der Zusammensetzung der aus mehreren Untereinheiten bestehenden Rezeptorkanalkomplexe nicht möglich.

Es ist durchaus wahrscheinlich, dass diese Zusammensetzung der Rezeptoren in nativen Geweben zum Teil ganz andersartig sein kann und darüber die fehlende Wirkung von DMA^V erklärbar ist.

Deshalb lassen sich die Wirkungen von DMA^V auf diese Rezeptorkanäle nicht wirklich auf molekularer Ebene erklären.

4.2 Ergebnis- und Funktionsdiskussion

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutieren zu können, ist es sinnvoll die Zytotoxizität, d.h. strukturelle Effekte der organischen Arsenverbindungen von funktionellen Effekten der organischen Arsenverbindungen abzugrenzen. Organische und anorganische Arsenverbindungen zeigen einen deutlichen zytotoxischen Effekt, wie viele Untersuchungen und experimentelle Daten belegen. Da Arsenverbindungen die Blut-Hirn-Schranke passieren und so das Gehirn erreichen können (Zheng et al., 1991; Rodriguez et al., 2001), können nach Intoxikation zentrale neurologische Funktionsstörungen, wie z.B. Nervenleiden, Gehirnleiden, Verwirrtheit und Desorientierung auftreten (Franzblau und Lilis, 1989; Ghariani et al., 1991; Luong und Nguyen, 1999). Bezüglich der Toxizität anorganischer Arsenverbindungen und derer trivalenter und besonders pentavalenter metabolischer Zwischenstufen MMA und DMA (Petrick et al., 2000; Styblo et al., 2000; Vega et al., 2001) lässt sich folgern, dass die pentavalent und besonders die trivalent methylierten Arsenverbindungen einen deutlichen Beitrag zur Zytotoxizität anorganischer Arsenverbindungen liefern (Styblo et al., 2000; Vather, 2000).

Durch Versuche an Zelllinien (z.B. Cerebellumneurone) konnte gezeigt werden, dass DMA^V Harnblasenkrebs (Li et al., 1998) induziert und die Lebensfähigkeit der Zellen herabgesetzt wird (Florea et al., 2005).

Es schließt sich die Frage an, ob organische Arsenverbindungen, neben strukturellen, auch funktionelle Beeinträchtigungen nach sich ziehen können. Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass der Ausfall des Hippokampus (Squire, 1986; Zola-Morgan et al., 1986) oder auch nur der CA1-Region (Davies et al., 1986) zu irreversiblen Pathomechanismen in Bezug auf Lernprozesse und Gedächtnisbildung führt.

Die blockierenden Effekte von DMA^{III} stimmen mit diesen Krankheitssymptomen weitgehend überein. Dennoch kann anhand der Schnittpräparat-Versuche kein eindeutiger Beweis geliefert werden. Weiterhin sollte erwähnt werden, dass die während der Experimente verwendeten Arsenverbindungen nur kurzzeitig (20 bis 90 min) appliziert wurden und die daraufhin aufgetretenen Effekte (bei DMA^{III}) als akute neurotoxische Effekte klassifiziert werden sollten. Es ist somit denkbar, dass ebenfalls DMA^V bei chronischer Applikation und bei längerer Wirkungszeit ebenfalls neurotoxische Effekte hervorrufen könnte (DMA^{III} könnte eventuell deutlich ausgeprägtere Ausfallerscheinungen hervorrufen). Um chronische Bedingungen zu schaffen, wären jedoch Versuche am lebenden Tier notwendig, da die in vitro- Gewebepräparate eine zu geringe Lebensdauer besitzen.

Bedauerlicherweise gibt es nur wenige Informationen bezüglich arsenhaltiger Konzentrationen in menschlichem Gewebe. In Bangladesch wurde bei Einwohnern, welche arsenkontaminiertes Wasser tranken, ein Hautgewebewert von annähernd 76 µmol/l berechnet (Chowdhury et al., 1999). Mandal et al. beschreiben in einer Studie aus dem Jahr 2001, dass bei 41 Menschen in West-Bengalen in Indien, nach dem Verzehr kontaminiertem Trinkwassers im Urin (47%), im Haar und Fingernägeln (3%), im Blutplasma (35%) und in Blutzellen (77%), DMA^V nachgewiesen werden konnte (Mandal et al., 2004). Korrelierend mit diesen Ergebnissen wird die Bindung des DMA^V an Hämoglobin (bei Rattenversuchen) beschrieben (Lu et al., 2007). Neuere Untersuchungen belegen, dass DMA^V in menschlichen Zellverbänden, Apoptose induzieren kann (Xie et al., 2004).

Bei Arsenvergiftungen ist der Arsengehalt im Blut auf bis zu 4mg/kg und der Arsengehalt im Gehirn auf bis zu 1,9 mg/kg erhöht (International Agency for

Research on Cancer, 1980). Somit entsprechen die Arsenkonzentrationen der Versuche dieser Arbeit den Normalwerten einer Intoxikation.

Obwohl Arsenverbindungen pathologische Veränderungen an Gehirngeweben in vivo ausgelöst haben, sind Angaben bezüglich Ablagerung und Verhältnis verschiedener Stoffe nicht verfügbar (Fengyuan et al., 2005).

Neben den sehr gut untersuchten zytotoxischen Effekten der organischen Arsenverbindungen, kann durch die Studien rund um diese Arbeit angenommen werden, dass funktionelle Ausfälle der synaptischen Aktivität zu den Symptomen einer neurotoxischen Intoxikation beitragen. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit behandelten DMA^V, löst DMA^{III} hemmende Effekte an den excitatorischen Synapsen aus (Mußhoff et al., 2006) und könnte somit zu einer generellen Minderung und Funktionseinschränkung der neuronalen Aktivität im Hippokampus sowie im gesamten Nervensystem führen. Dies hat bedeutende Verwicklungen in Bezug auf neuronale Funktionen und könnte den Ausfall bzw. die Verminderung von Prozessen erklären, welche mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung stehen. Dies steht im Einklang mit kürzlich erhobenen Studien (Wassermann et al., 2004; Wright et al., 2006), welche eine signifikante Korrelation zwischen dem Intellekt und dem Gedächtnis von Kindern und dem Level von AS beschreibt.

Wenn man die erhaltenen, aktuellen Daten vom Nervengewebe der Ratte mit menschlichen toxikologischen Daten vergleichen will, muss man allerdings berücksichtigen, dass Ratten generell weniger sensitiv auf Arsenverbindungen und ihre Metaboliten reagieren als dies beim Menschen der Fall ist (Odanaka et al., 1980).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DMA^V keinerlei signifikante Effekte auf Übertragungsprozesse an glutamatergen Synapsen hat – DMA^{III} jedoch besitzt ein beträchtlich höheres neurotoxisches Potential unter akuten und möglicherweise auch chronischen Bedingungen, auf welches die Effekte an hippocampalen Synapsen hinweisen. (Krüger et al., 2006).

Das bedeutendste Ergebnis der gesamten Versuchsreihen (fEPSP, LTP und PPF) ist die Beobachtung, dass die pentavalente Dimethylarsinsäure (DMA^V,

100 μM) die excitatorischen Übertragungsprozesse an den untersuchten hippocampalen Schaffer-kollateral-CA1-Synapsen nicht signifikant blockiert.

Die Versuche haben gezeigt, dass weder in Gewebepräparaten juveniler Ratten, noch in denen adulter Ratten eine Blockierung der Übertragungsprozesse stattfindet. Bei den Schnitten juveniler Tiere trat ein stärkerer Blockierungseffekt auf, als bei Schnitten adulter Tiere.

Die Minderung der excitatorischen synaptischen Übertragung an der Schaffer-kollateral-CA1-Synapse zeigt, dass dieser Effekt auf direkte oder indirekte Interaktion dieses Stoffes an der postsynaptischen Membran glutamaterger Rezeptoren zurückzuführen ist. Die pentavalente DMA ist komplett ineffektiv in Bezug auf die hippocampalen Schnitte. Dies ist deshalb erstaunlich, da anderweitig beschrieben wird, dass DMA^V (ebenso wie DMA^{III}) sowohl AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat) als auch NMDA (N-Methyl-D-aspartat)-abhängige Membranströme im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten blockiert (Gruner et al., 2003; Krüger et al., 2006).

Das Ausbleiben der Effekte zeigt, dass das Wirken eines Giftes, welches bei isolierten Zellen zu beobachten ist, keine Rückschlüsse auf komplexere Zusammenhänge des zentralen Nervensystems zulässt. Vergleicht man die Ergebnisse bezüglich der trivalenten und pentavalenten Dimethylarsinsäure mit vorangegangenen Untersuchungen, so zeigt sich auch bei den vorliegenden Versuchen, dass auch hier DMA^{III} einen stärkeren toxischen Effekt als DMA^V besitzt (Cohen et al., 2002; Styblo et al., 2000; Vather et al., 2002).

5 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war die Analyse der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure auf glutamaterge Synapsen des Hippokampus von Ratten. In vorausgegangenen Untersuchungen an heterolog exprimierten Glutamat-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung glutamaterge Synapsen in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Die Wirkungen der Dimethylarsinsäure auf erregende Glutamat-vermittelte synaptische Prozesse wurde an akut isolierten Hirngewebschnitten detailliert analysiert.

Durch elektrophysiologische Methoden an der Schaffer-kollateral/CA1- Synapse adulter und juveniler Ratten wurde die Wirkung der Substanz auf evozierte postsynaptische Potenziale, auf Langzeitpotenzierung, sowie auf verstärkende Effekte untersucht. Für die Untersuchungen wurden insgesamt 13 adulte und juvenile Ratten (12 männlich, 6 adult) verwendet. Die Ergebnisse der adulten sowie juvenilen Tiere zeigten, dass durch die verwendeten Stoffe in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich von 100 $\mu\text{mol/l}$ keine Beeinflussung der synaptischen Potenziale beobachtet wurde und somit an diesen Stellen keine neurotoxischen Wirkungen zu erwarten sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Anderson W.W. and Collingridge, G.L. (2001). The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J. Neurosci Methods* **15**:71-83.
2. Akaike N., Inoe M., Krishtal O.A. (1986). Concentration clamp study of GABA acid-induced chloride current kinetics in frog sensory neurons. *J Physiol (London)* **379**:171-185.
3. Alkondon M., Costa A.C., Radhakrishnan V., Aronstam R.S., Albuquerque E.X. (1990). Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS Lett* **261**:124-30.
4. Altemus K.L., Almlı C.R. (1997). Neonatal hippocampal damage in rats: long term spatial Memory deficits and associations with magnitude of hippocampal damage. *Hippokampus* **7**:403-415.
5. Aposhian H.V., Zheng B., Aposhian M.M., Le X.C., Cebrian M.E., Cullen W., Zakharyan R.A., Ma M., Dart R.C., Cheng Z., Andrewes P., Yip L., O'Malley G.F., Maiorino R.M., Van Voorhies W., Healy S.M., Titcomb A. (2000). *Toxicol Appl Pharmacol* **165**:74.
6. Appel K.E., Böhme C., Platzek T., Schmidt E., Stinchcombe S. (2000). Organozinnverbindungen in verbrauchernahen Produkten und Lebensmitteln. *Umweltmed Forsch Prax* **5**:67-77.
7. Asztely F., Gustafsson B. (1996). Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol Feb* **12(1)**:1-11.
8. Atchinson W.D., Narahasi T. (1982). Methylmercury-induced depression neuromuscular transmission. *Neurotox* **3**:37-50.
9. Barth L.G., Barth L.J. (1959). Differentiation of cells of the rana pipiens gastrula in unconditioned medium. *J Embryol Exp Morph* **7**:210-222.
10. Bates M.N., Smith A.H., Hopenhayn-Rich C. (1992). Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* **135**:462-476.
11. Binding N., Altrup U., Said M.N., Speckmann E.-J., Witting U. (1992). Testing lead neurotoxicity with an in vitro model. *Environmental Hygiene* **3**:33-36.
12. Boyle R.W., Jonasson I.R. (1973). The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element in geochemical prospecting. *J Geochem Explor* **2**:251-297.
13. Bliss T.V.P and Collingridge G.L. (1993). A synaptic model of memory: long term potentiation in the Hippokampus. *Nature* **361**:31-39.

14. Bliss T.V.P. and Lømo H. (1973). Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (London)* **232**:331-356.
15. Broome A.D.J. et al., (1988). The Production and use of Arsenicals in Wood Preservation in Reddy R.G., Hendrix J.L., Queneau P.B. (eds.): *Arsenic Metallurgy Fundamentals and Applications*. The Metallurgical Society, Warrendale, PA: 491-506.
16. Brouwer O.F., Onkenhout W., Edelbroek P.M., De Kom J.F.M., De Wolff F.A., Perters A.C.B. (1992). Increased neurotoxicity of arsenic in methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Clin Neurol Neurosurg* **94**:307-310.
17. Büsselberg D., Evans M.L., Rahmann H., Carpenter D.O. (1991). Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of aplysia neurons. *J Neurophysiology* **65**:786-795.
18. Campbell T.F., Needleman H.L., Riess J.A., Tobin M.J. (2000). Bone lead levels and language processing performance. *Developmental Neuropsychology* **18**:171-186.
19. Chattopadhyay S., Bhaumik S., Chaudhury A.N., Das Gupta S. (2002). Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue cultures. *Toxicol Lett* **128**:73-84.
20. Chen C. J., Chen C.W., Wu M.M., Kuo T.L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br J Cancer* **66**:888-892.
21. Cheung M.K., Verity M.A. (1985). Experimental methyl mercury neurotoxicity: locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis in vivo and in vitro. *J Neurochem* **44**:1799-1808.
22. Choi S.C., Bartha R. (1993). Cobalamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* L.S. *Appl Environ Microbiol* **59**:290-295.
23. Craig P.J. (ed). (1986). General comments on the toxicities of organometallic compounds. In: *Organometallic compounds in the environment*. Longmans Group, Harlow.
24. Craig P.J., Jenkins R.O., Dewick R., Miller D.P. (1999). Trimethylammonium generation by *Scopulariopsis brevicaulis* during aerobic growth. *Sci Total Environ* **229**:83-88.
25. Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**:327-335.
26. Cullen W.R., McBride B.C., Reglinski J. (1984). The reaction of methylarsenicals with thiols: some biological implications. *J Inorg Biochem* **21**:179-194.
27. Chowdhury U.K., Rahman M.M., Sengupta M.K., Lodh D., Chanda C.R., Roy S., Quamruzzaman Q., Togunaka H., Ando M., Chakraborti D. (2003). Pattern of excretion of arsenic compounds (arsenite, arsenate, MMA V, DMAV) in urine of children compared to adults from an arsenic exposed area in Bangladesh. *J Environ Sci Health* **A38**:87-113.

28. Cohen S.M., Arnold L.L., Uzvolgyi E., Cano M., St. John M., Yamamoto S., Lu X., Le X.C. (2002). Possible role of dimethylarsinous acid in dimethylarsinic acid-induced urothelial toxicity and regeneration in the rat. *Chem Res Toxicol* **15**:1150-1157.
29. Dingledine R., McBain C.J., McNamara J.O. (1990). Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* **11**:334-338.
30. Delgado J.M., Dufour L., Grimaldo J.I., Carrizales L., Rodriguez V.M., Jimenez-Capdeville M.E. (2000). Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in mice. *Toxicol Lett* **117**:61-67.
31. Denny M.F., Hare M.F., Atchinson W.D. (1993). Methylmercury alters intrasynaptosomal concentrations of endogenous polyvalent cations. *Toxicol Appl Pharmacol* **122**:222-232.
32. Donaldson H.H. (1924). The rat memories of the Wistar Institute of Anatomy and Biologie.
33. Dopp E., Hartmann L.M., Florea A.M., von Recklinghausen U., Pieper R., Shokouhi B., Rettenmeier A.W., Hirner A.V., Obe G. (2004). Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in chinese hamster ovary (CHO). *Toxicol Appl Pharmacol* **201(2)**:156-165.
34. Dopp E., Hartmann L.M., von Recklinghausen U., Rabieh S., Zimmermann U., Florea A.M., Shokouhi B., Yadav S., Hirner A.V., Rettenmeier A.W. (2005). Forced uptake of trivalent and pentavalent methylated and inorganic arsenic and its cyto-/genotoxicity in fibroblasts and hepatoma cells. *Toxicol Sci* **87**:46-56.
35. Draguhn A., Traub R.D., Schmitz D., Jefferys J.G.R. (1998). Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* **394**:189-192.
36. Florea A.M. und Büsselberg D. (2005). Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Bio metals* (2005) **00**:1-9.
37. Franzblau and Lillies (1989). Acute intoxication from environmental arsenic exposure. *Arch Environ Health* **44**: 385-390.
38. Feldmann J., Hirner A.V. (1995). Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases. *Intern J Environ Anal Chem* **60**:339-359.
39. Feldmann R.G., White R.F., Eriator II. (1993). Trimethyltin encephalopathy. *Arch Neurol* **50**:1320-1324.
40. Francesconi K.A., Edmonds J.S. (1997). *Adv Inorg Chem* **44**:147
41. Frey U., Morris R.G. (1998). Synaptic tagging: implications for the late maintenance of hippocampal long term potentiation. *Trends Neurosci* **21**:181-188.
42. Gong Z., Cullen W.R., Le X.C. (2001). Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *J Anal Atom Spectrom* **16**:1409-1413.
43. Goyer R.A. (1996). Toxic effects of metals. In Casaret and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (C.D. Klaassen, ED.). 696-697. McGraw-Hill, New York.

44. Greenpeace Deutschland: Schadstoffbelastung in Sachsen, Analyse der Bodenproben vom 16.8.2002.
45. Gruner J., Krüger K., Binding N., Madeja m., Mußhoff U. (2003). Effects of organometal(loid) compounds on neuronal ion channels: possible sites for neurotoxicity.
46. Ghariani M., Adrien M.L., Racoules M., Bayle J., Jacomet Y., Grimaud D. (1991). Acute arsenic poisoning. *Ann Fr Anesth Reanim* **10**: 304-307.
47. Hargreaves E.L., Cain D.P. (1992). Hyperactivity, hyper-reactivity, and sensomotoric deficits induced by low doses of the N-methyl-D-aspartate non-competetive channel blocker MK-801. *Behav Brain Res* **47**:23-33.
48. Hindmarsh J.T., McCurdy R.F. (1986). Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity. *CRC critical reviews in clinical laboratory sciences* **23**:315-347.
49. Hirner A.V., Feldmann J., Goguel R., Rapsomanikis S., Fischer R., Andreae O. (1994). Volatile metal and metalloid species in gases from municipal waste deposits. *App Organomet Chem* **8**:65-69.
50. Hirner A.V., Feldmann J., Krupp E., Grumping R., Goguel R., Cullen W.R. (1998). Metal(loid)organic compounds in geothermal gases and waters. *Org Geochem* **29**:1765-1778.
51. Hirner A.V., Emons H. (2002). Organic metal and metalloid species in the environment.
52. Hopenhayn-Rich C., Smith A.H., Goeden H.M. (1993). Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. *Environ Res Feb* **60(2)**:161-177.
53. Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Smith A.H., Kalmann D.A., Moore L.E. (1996). Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* **104**:620-628.
54. Jefferey K.J., Morris R.G. (1993). Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. *Hippokampus* **3**:133-140.
55. Kirson E.D., Schirra C., Konneth A., Yarri Y. (1999). Early postnatal switch in magnesium sensitivity of NMDA receptors in rat CA1 pyramidal cells. *J Physiol* **15**: 99-111.
56. Klumpp D.W., Peterson P.J. (1981). Chemical characteristics of arsenic in a marine food chain. *Mar Biol* **62**:297.
57. Komulainen H., Keränen A., Saano V. (1995). Methylmercury modulates GABA receptor complex differentially in rat cortical and cerebellar membranes in vitro. *Neurochem Res* **10**:659-662.
58. Kutznetsow D.A., Richter V. (1987). Modulation of messenger RNA metabolism in experimental methyl mercury neurotoxicity. *Int J Neurosci* **34**:1-17.

59. Krüger K., Diepgrond V., Ahnefeld M., Wackerbeck C., Madeja M., Binding N., Mußhoff U. (2005). Blockade of glutamatergic and GABAergic receptor channels thrimethyltin chloride. *Brit J Pharmacol* **144**: 283-292.
60. Krüger K., Gruner J., Madeja M., Hartmann L.M., Hirner A.V., Binding N., Mußhoff U. (2006). Blockade and enhancement of glutamate receptor responses in *Xenopus* oocytes by methylated arsenicals. *Arch toxicol molec toxicol* **80**:492-501.
61. Krüger K., Höing T., Bensch W., Diepgrond V., Ahnefeld M., Madeja M., Binding N., Mußhoff U. (2006). Effects of monomethyltin and dimethyltin compounds on heterologously expressed neuronal ion channels (*Xenopus* oocytes) and synaptic transmission (hippocampal slices). *Neurotox* **28**:114-125.
62. Krüger K., Reppes H., Hippler J., Hartmann L.V., Hirner A.V., Straub H. Binding N., Mußhoff U. (2007). Effects of dimethylarsinic and dimethylarsinous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of young and adult rats. *Toxicol and Appl Pharmacol* **225**:40-46.
63. Lagerkvist B.J., Zetterlund B. (1994). Assesment of exposure to arsenic among smelter workers: a 5-year follow-up. *Am J Ind Med* **25**:477-488.
64. Larkman A.U., Jack J.J.B. (1995). Synaptic plasticity: hippokampal LTP. *Curr Opin Neurobiol* **5**:324-334.
65. Le X.C., Lu X., Ma M., Cullen W.R., Aposhian H.V., Zheng B. (2000). *Anal Chem* **72**:5172.
66. Li W., Wanibuchi H., Salim E.I., Yamamoto S., Yoshida K., Endo G., Fukushima S., (1998). Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett.* **134**: 29-36.
67. Lin T.-J., Hung D.-Z., Kao C.-H., Hu W.-H., Yang D.-Y. (1998). Unique cerebral dysfunction following triphenyltin acetate poisoning. *Human Exp Toxicol* **17**:403-405.
68. Liu T.-J., Zheng B., Aposhian H.V., Zhou Y., Chen M.-L., Zhang A., Waalkes M.P. (2002). Chronic arsenic poisoning from burning high-containing coal in Guizhou, China. *Environ Health Perspect* **110**:119-122.
69. Lu M., Wang H., Li X.-F., Arnold L.L., Cohen S.M., Le X.Ch. (2007). Binding of Dimethylarsinous Acid to Cys 13 α of Rat Hemoglobin Is Responsible for the Retention of Arsenic in Rat Blood. *Chem Res. Toxicol.* **20**: 27-37.
70. Luong K.V.Q., Nguyen L.T.H. (1999). Organic arsenic intoxication from birds nest soup. *Am J Med Sci* **317**:269-271.
71. Löscher W., Hönack D. (1991). Anticonvulsant and behavioural effects of two novel competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists.CGP37849 and CGP39551 in the kindling model of epilepsy. Comparison with MK-801 and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* **256**:432-440.

72. Madeja M., Mußhoff U., Speckmann E.-J. (1991). A concentration-clamp system allowing two –electrode voltage-clamp investigations in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Neurosci Methods* **38**:267-269.
73. Mandal B. K., Ogra Y., Suzuki K.T. (2001). Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-effected areas in West Bengal, India. *Chem Res Toxicol* **14**:371-378.
74. Mandal B.K., Ogra Y., Azai K., Suzuki K.T. (2004). Speciation of arsenic in biological. *Toxicol and Appl Pharmacol* **198**:307-318.
75. Marafante E., Vather M., Norin H., Envall J., Sandstroem M., Christakopoulos A., Ryhage R. (1987). *J Appl Toxicol* **7**:111.
76. Maren S., Fanselow M.S. (1997). Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal Hippokampus, or entorhinal produce anterograde deficits in contextual fear conditions in rats. *Neurobiol Learn Mem* **67**:142-149.
77. Mazumder D., Das Gupta J., Chakraborty A.K., Chatterjee A., Das D., Chakraborti D. (1992). Environmental pollution and chronic arsenicosis in south Calcutta. *Bull world Health Org* **70**:481-485.
78. McBride B.C., Wolfe R.S. (1971). *Biochemistry* **10**:4312.
79. Meldrum B., Garthwaite J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 379-387.
80. Miller L.A., Munoz D.G., Finmore M. (1993). Hippokampal sclerosis and human memory. *Arch Neurol* **50**:391-394.
81. Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**:529-540.
82. Morton W.E., Caron G.A. (1989). Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning. *Am J Ind Med* **15**:1-5.
83. Mußhoff U., Binding N., Madeja M., Witting U., Speckmann E.-J. (1995). Lead-induced blockade of kainate-sensitive receptor channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **335**:42-45.
84. Mußhoff U., Riewenherm D., Berger E., Fautek J.-D., Speckmann E.-J. (2002). Melatonin receptors in rat Hippokampus: Molecular and functional investigations. *Hippokampus 2002*; **12(2)**:165-173.
85. Mußhoff U., Fautek J.-D., Speckmann E.-J. (2001). Modulation of neuronal activity in hippocampal slices by melatonin. *Pflügers Arch* **441**, Suppl 6, R221.

86. Nadakavukaren J.J. et al., (1984). Seasonal variation of arsenic concentration in well water in Lane County, Oregon. *Bulletin of environmental contamination and toxicity* **33**:264-269.
87. Namgung U., Xia Z. (2000). Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protei kinase. *J Neurosci* **20**:6442-6451.
88. Needleman H.L., Schell A., Bellinger D., Leviton A., Allred E.N. (1990). The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. *N. Engl J Med* **322**:83-88.
89. Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* **307**:462-465.
90. Odanaka Y., Matano O., Goto S. (1980). Biomethylation of inorganic arsenic by the rat and some laboratory animals. *Bull Environ Contam Toxicol* **24**:452-459.
91. Oyama Y., Akaike N. (1990). Triphenyltin: a potent excitatory neurotoxicant. Its reciprocal effects on voltage-dependent Na and K currents of mammalian brain neuron. *Neurosci Lett* **119**:261-264.
92. Oyama Y., Chikahisa L., Hayashi A., Ueha T., Sato M., Hideki M. (1992). Triphenyltin-induced increase in the intracellular Ca of dissociated mammalian CNS neuron: its independence from voltage-dependent Ca-channels. *Japan J Pharmacol* **58**:467-471.
93. Petrick J.S., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E., Aposhian H.V. (2000). Monomethylarsonous acid (MMA) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **163**:203-207.
94. Pocock S.J., Smith M., Baghurst P. (1994). Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence. *BMJ* **309**:1189-1197.
95. Pongartz R., Heumann K.G. (1998). Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae – a significant source for atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere* **36**:1935-1946.
96. Rodriguez V.M., Carrizales L., Jiminez-Capdeville M.E., Dufour L. and Giordano M. (2001). The effects Of sodium arsenite exposure on behavioural parameters in the rat. *Brain Res Bull* **55**:301-308.
97. Squire L.R. (1992). Memory and the Hippokampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev* **99**:195-231.
98. Squire L.R. (1986). Mechanismus of memory. *Science* **232**:1612-1619.
99. Styblo M., Del Razo L.M., Vega L., Germolec D.R., Lecluyse E.L., Hamilton G.A., Reed W., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J. (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalente inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* **74**:289-299.

100. Thayer J.S. (1995). Environmental chemistry of the heavy elements: hydrido and organo compounds. VCH Verlagsgesellschaft mbH 29-41.
101. Thomas D.J., Walters S.B. and Styblo M. (2004). Elucidating the pathway of arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**:319-326.
102. Tsai S.-Y., Chou H.-Y., The H.-W., Chen C.-M., Chen C.-J. (2003). The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neuro Toxicol* **24**:747-753.
103. Turpeinen R., Pantsar-Kallio M., Häggblom M., Kairesalo T. (1999). Influence of microbes on the mobilization toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Sci Total Environ* **238**:173-180.
104. U.S. Environmental Agency (1988). Special report on inorganic arsenic: skin cancer, nutritional essentiality. EPA 625/3-87/013. U.S. Environmental Protection Agency. Risk Assessment Forum, Washington DC.
105. Uteshev V., Busselberg D., Haas H.L. (1993). Pb modulates the NMDA-receptors-channel complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **347**:209-213.
106. Vather M. and Marafante E. (1983). Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem Biol Interact* **47**:29-44.
107. Vega L., Styblo M., Patterson R., Cullen W., Wang C., Germolec D. (2001). Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**:225-232.
108. Watkins J.C., Olvermann H.J. (1987). Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci (Band 10)*:265-272.
109. Wang C.L., Chuang H.-Y., Ho C.-K., Yang C.-Y., Tsai J.-L., Wu T.-S., Wu T.-N. (2002). Relationship between blood lead concentrations and learning achievement among primary school children in Taiwan. *Environ Res Section A* **89**:12-18.
110. Wassermann G.A., Liu X., Parvez F., Ahsan H., Factor-Litvak P., van Geen A., Slavkovic V., Lolocono N.J., Cheng Z., Hussain I., Monotaj H., Graziano J.H. (2004). Water arsenic exposure and childrens intellectual function in Arahazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* **112**.
111. Wesbey G., Kunis A. (1981). Arsenical neuropathy. *Illinois medical journal* **150**:396-398.
112. Xie Y., Trouba K.J., Liu J., Waalkes M.P., Germolec D.R. 2004. Biokinetic and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.Ac) mice. *Environ Health Perspect* **112**:1255-1263.
113. Yuan Y.K., Atchinson W.D. (1997). Action of methylmercury on GABA(A) receptor mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory synaptic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **282**:64-73.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Hr. Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff für die Überlassung des Themas, die hervorragende und herzliche Betreuung, sowie für die Unterstützung, Anregungen und sein persönliches Engagement bedanken. Mit dem Thema meiner Dissertation wurde mir eine Aufgabe gestellt, die meinen beruflichen und privaten Werdegang sehr positiv beeinflusste und viele wertvolle persönliche Erfahrungen bei der Fertigstellung mit sich brachte.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Dr. rer. nat. Katharina Krüger, die mir bei der Fertigstellung meiner Arbeit sehr geholfen, mir viele hilfreiche Anregungen zum wissenschaftlichen Arbeiten mit auf den Weg gegeben hat und immer für mich da war. Ein großer Dank auch an das gesamte physiologische Institut I für das auffallend nette und angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle jemandem danken, ohne den es mir nicht möglich gewesen wäre, meine Versuchsreihen und technischen Arbeiten in der gewünschten Art und Weise durchzuführen. Deine Kompetenz und Dein überaus sympathisches Wesen haben mir sehr geholfen.

Vielen Dank, Susi!

Nicht zu vergessen sind die Leute um mich herum, durch deren Liebe und Freundschaft die nötige Unterstützung zu jeder Zeit gegeben war:

Mama, Papa, Titti, Lulu, Mücki, Lotti, Oma A., Oma M., Opa, Jan, Marlies, Annie, Micha, Hanno Sander, Klaus, Voigi, Christoph, Stefan, Dani, Hoffi, Oli, Martin, Ulli, Eva und Ralf Richter für die Inspiration.

Danke! Ich liebe euch!

7 Curriculum Vitae

Name: Reppes

Vorname: Hendrik

Geburtsdatum: 03. 12. 1980

Geburtsort: Willich

Eltern: Peter Reppes (Speditionskaufmann)
Agnes Reppes geb. Flören
(Fremdsprachenkorrespondentin)

Geschwister: Philip Reppes (Zahnarzt)
Laura Reppes (Studentin)
Pia Reppes (Schülerin)

Schulbildung:

1986 bis 1990: Grundschule „Sollbrüggen“, Krefeld

!990 bis 2000: Gymnasium „Fabritianum“, Krefeld
Erlangung der Hochschulreife

Hochschulbildung:

04/2002: Immatrikulation an der Westfälischen-
Wilhelms-Universität (Zahnmedizin)

04/2003: naturwissenschaftliche Vorprüfung
(Vorphysikum)

04/2005: zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)

12/2007: Staatsexamen und Erlangung der Approbation

Promotion:

ab 10/2004: Arbeiten am Institut für Physiologie I
der Universitätsklinik Münster zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Elektrodenanordnung zur Ableitung des fEPSP. Die Reizung erfolgt an den Schaffer-Kollateralen, die Ableitung extrazellulär an den CA1-Synapsen. Die Referenzelektrode befindet sich im Bad.

Abb. 3.1: Wirkungen von DMA^V auf fEPSPs adulter Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von 100 µM DMAV bei adulten Ratten.

Abb. 3.2: Wirkungen von DMA^V auf fEPSPs juveniler Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von 100 µM DMA^V bei juvenilen Ratten.

Abb. 3.3: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen.

Abb. 3.4: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen.

Abb. 3.5: Sechs gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. n=6 = Mittelwert.

Abb. 3.6: Sieben gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. n=7 = Mittelwert.

Abb. 3.7: Gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus adulter (n=6) und juveniler Ratten (n=7). Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen.

Abb. 3.8: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µm) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feld-

potenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten).

Abb. 3.9: Gemittelte Kurven der sechs Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µm) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten).

Abb. 3.10: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µm) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten).

Abb. 3.11: Gemittelte Kurven der acht Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µm) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.12: Vergleich der gemittelten Kurven von adulten und juvenilen Ratten zur Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µm) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.13: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven adulter Ratten mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V, 100 µm) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^V-Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.14: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven juveniler Ratten mit Darstellung der Wirkung von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^{V} , $100 \mu\text{m}$) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Anfang des grau unterlegten Kastens kennzeichnet den Beginn der DMA^{V} -Applikation, sein Ende den Zeitpunkt, an dem das Gift wieder ausgewaschen wird (60 Minuten). Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.15: Wirkungen von DMA^{V} auf LTP-Versuche adulter Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von $100 \mu\text{M}$ DMA^{V} bei adulten Ratten.

Abb. 3.16: Wirkungen von DMA^{V} auf LTP-Versuche juveniler Ratten. Typische Originalregistrierungen postsynaptischer Antworten (fEPSPs) der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen, ohne und mit Zugabe von $100 \mu\text{M}$ DMA^{V} bei juvenilen Ratten.

Abb. 3.17: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen (in Form der relativen Steigung der fEPSPs).

Abb. 3.18: Gemittelte Kurven der sieben Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben. $n=7 = \text{Mittelwert}$.

Abb. 3.19: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie entspricht dem Mittelwert der relativen Amplituden der Feldpotenzialableitungen innerhalb der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs).

Abb. 3.20: Gemittelte Kurven der sechs Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Steigung der fEPSPs) von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben. $n=6$ = Mittelwert.

Abb. 3.21: Gemittelte Originalversuche mit Darstellung der Wirkung von Kontrolllösung auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSPs) des Hippokampus von juvenilen und adulten Ratte. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben. auf evozierte Feldpotenzialableitungen (fEPSP) des Hippokampus von adulten Ratten.

Abb. 3.22: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus von adulten Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Beginn des grauen Kastens kennzeichnet das Ende der 15-minütigen Kontrollphase und das Setzen des hochfrequenten Stimulus an. Das Ende des grauen Kastens kennzeichnet die Zugabe des Giftes, 15 Minuten nach Setzen des Stimulus. Dargestellt sind nur die letzten zehn Minuten der Kontrollphase, da diese zur Normierung der Mittelwerte herangezogen werden.

Abb. 3.23: Gemittelte Kurven der sechs Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus adulter Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor pentavalente Dimethylarsinsäure zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.24: Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus von juvenilen Ratten. Die waagerechte Linie

verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Der Beginn des grauen Kastens kennzeichnet das Ende der 15-minütigen Kontrollphase und das Setzen des hochfrequenten Stimulus an. Das Ende des grauen Kastens zeigt die Zugabe des Giftes, 15 Minuten nach Setzen des Stimulus. Dargestellt sind nur die letzten zehn Minuten der Kontrollphase, da diese zur Normierung der Mittelwerte herangezogen werden.

Abb. 3.25: Gemittelte Kurven der elf Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus juveniler Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. $n=11$ = Mittelwert. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor pentavalente Dimethylarsinsäure zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.26: Gemittelte Kurven der Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus juveniler und adulter Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor pentavalente Dimethylarsinsäure zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.27: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplituden der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus adulter Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor DMA^V zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.28: Gemittelte und überlagerte (Kontrolllösung und Gift) Kurven der Originalversuche mit Darstellung der Wirkung (in Form der relativen Amplitude der fEPSPs) von pentavalenter Dimethylarsinsäure (DMA^V , $100 \mu\text{m}$) auf Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP) des Hippokampus juveniler Ratten. Die waagerechte Linie verdeutlicht den Mittelwert der ersten fünf Minuten, auf den sich alle weiteren Messungen beziehen. Nach Auslösung einer LTP folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase, bevor DMA^V zugegeben wurde. Die Zugabe des Giftes bewirkte keine signifikante Veränderung der Reizantwort. Für alle Punkte ist der Standardfehler der Messungen mit angegeben.

Abb. 3.29: Wirkung von Kontrolllösung und DMA^V (100µM) auf PPF, Ratte adult , Originalregistrierungen mit dem Nicolet aufgezeichnet, dargestellt sind die fEPSP-Amplituden nach Gabe des ersten bzw. zweiten Stimulus. mV= Millivolt; ms=Millisekunde.

Abb. 3.30: Graphische Darstellung der sechs PPF-Versuche. Es lässt sich anhand dieser Balkendiagramme, die nur gering unterschiedliche, nicht signifikante Wirkung des DMAV im Verhältnis zur Kontrolllösung erkennen (rechtes Bild). Im linken Bild ist die relative Verstärkung der PPF in Form der fEPSP-Amplituden nach Setzen des ersten und zweiten Stimulus dargestellt. Es ist keine signifikante Verstärkung vorhanden.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab.2.1: Verwendete Lösungen.

Tab. 3.1: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden \pm S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, juvenile Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle. Es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

Tab. 3.2: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden \pm S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, adulte Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle. Es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

Tab.3.3: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden \pm S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, vor HFS, juvenile Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle, es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

Tab.3.4: Durchschnittliche fEPSP-Amplituden \pm S.E.M in Beziehung gesetzt zur Nulllinie zu verschiedenen Zeitpunkten, vor HFS, adulte Ratten, p = Signifikanz in Bezug zur Kontrolle, es sind anhand der p-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten von Kontrolltieren und Schnitten von DMA^V-Tieren auszumachen.

Tab.3.5: Statistische Auswertung der Doppelverstärkungsversuche (Paired-Pulse Facilitation, PPF). Sechs Versuche sind aufgeführt. Bei allen erhobenen Werten ist keine signifikante Verstärkung auszumachen. EP= evoked Peak.

8.3 Abkürzungsverzeichnis

μmol/l:	mikromol pro Liter
μM:	mikromolar
MΩ:	Megaohm
Abb. :	Abbildung
AMPA:	(α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol- <i>acid</i>)
cm:	Zentimeter
DMA:	Dimethylarsen
fE _{psp} :	(field) excitatorisches postsynaptisches Potenzial
g:	Gramm
GABA:	Gamma-amino-butryc-acid
LTP:	Long-Term-Potential
min.:	Minute(n)
mm:	Millimeter
MMA:	Monomethylarsen
NMDA:	N-methy-D-aspartat
PPF:	Paired-pulse-fascilitation
s.:	siehe
Tab.:	Tabelle
vgl.	vergleiche
z.B.:	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Finis coronat opus - Nunc est bibendum.



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle Epilepsie-

forschung-

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude:

Domplatz 1-3

Telefon: (0251) 411-0

Durchwahl: 2110

Telefax: 2115

Raum: 431

Auskunft erteilt:

Frau Möllers

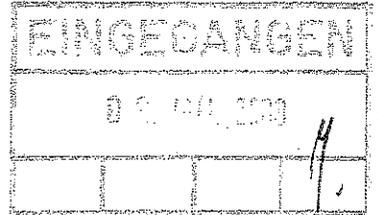
E-Mail:

irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de

Aktenzeichen:

50.0835.1.0 (G 79/2002)

19. Dez. 2002



Tierschutz;

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 10.10.2002, hier eingegangen am 06.11.2002

Genehmigungsbescheid:

Sehr geehrter Herr Professor Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Experimentelle Epilepsieforschung“. (10 Teilprojekte gem. Antrag)

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreter sind:

Herr

Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle

Epilepsieforschung-

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Frau

Prof. Dr. rer. nat. Heidrun Straub

Institut für Physiologie

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de

zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Landeskasse Münster:

Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf: Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis

1/3



Herr
Prof. Dr. med. Ulrich Altrup
Institut für Experimentelle
Epilepsieforschung
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff
Institut für Physiologie
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **31. 12. 2005.**

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

**100 Mäuse,
500 Ratten,
30 Frösche,
500 Landschnecken.**

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder seine Stellvertreter wechseln, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Piontkowski