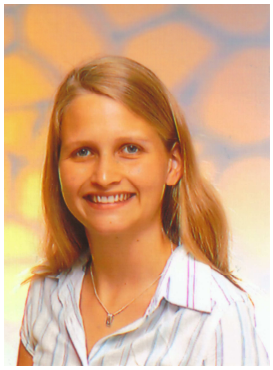
Aus der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Münte

„Einfluss der elektrischen Hochfrequenzstimulation des Nucleus caudatus auf Gedächtnis und Neurotransmittersysteme der Ratte“

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Naturwissenschaften -

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Anett Schumacher
aus Schwedt / Oder
Lübeck 2011



Dipl. biol. Anett Schumacher
Klinik für Neurologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck
Tel: +49451 5002486
Email: anett.schumacher@neuro.uni-luebeck.de

1.Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. A. Moser

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. U. Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.06.2011

"Everyone knows what attention is. It is the taking possession by the mind, in clear and vivid form, of one out of what seem several simultaneously possible objects or trains of thought. Focalization, concentration, of consciousness are of its essence. It implies withdrawal from some things in order to deal effectively with others, and is a condition which has a real opposite in the confused, dazed, scatterbrained state which in French is called distraction, and Zerstreutheit in German."

***WILLIAM JAMES**, PRINCIPLES OF PSYCHOLOGY (1890)*

Inhaltsverzeichnis

Abstract **1**

1. EINLEITUNG ***4***

1.1 Gedächtnis **5**

1.1.1 Definition des Gedächtnis' 5

1.1.2 Gedächtnisforschung I – Von der Theorie des verbalen Lernens bis hin zu dem Modell des multiplen Systems 5

1.1.3 Gedächtnisforschung II – Kognitivismus und Behaviorismus 6

1.1.4 Gedächtnisforschung III – Bewusstes und unbewusstes Lernen werden durch unterschiedliche Hirnareale vermittelt 7

1.1.5 Das Gedächtnis als Mehrspeichermodell 8

1.1.6 Das Langzeitgedächtnis – deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis 10

1.2 Basalganglien **12**

1.2.1 Definition der Basalganglien 12

1.2.2 Die kortiko-subkortikalen Regelkreise 13

1.2.3 Das dorsale Striatum und das prozedurale Gedächtnis 15

1.2.4 Verwendung des Nucleus caudatus als Zielregion für hochfrequente Tiefenhirnstimulation 17

1.3 Die molekulare Ebene des Gedächtnis' **19**

1.3.1 Neuronale Plastizität 19

1.3.2 Eric R. Kandel – die molekularen Grundlagen des Kurz- und Langzeitgedächtnis' 19

1.3.3 Die Beeinflussung der synaptischen Aktivität durch Neurotransmitter 22

1.4 Hochfrequenzstimulation 24
1.4.1 Das Prinzip der elektrischen Stimulation – Faradaysche und Nicht-Faradaysche Reaktionen 24
1.4.2 Ungewollt auftretende Reaktionen währen der Stimulation 28
1.4.3 Darstellung der verschiedenen Elektroden-Arten 29
1.4.4 Darstellung der verschiedenen Elektroden-Materialien 30
1.4.5 Charakteristik der hochfrequenten Stimulation 31
1.4.6 Wirkungsmechanismus der hochfrequenten Stimulation innerhalb des Zentralnervensystems 33
1.4.7 Zelluläre Grundlagen des inhibitorischen Wirkungsmechanismus' der hochfrequenten Stimulation 34

1.5 Neurotransmitter 35
1.5.1 Definition der Neurotransmitter 35
1.5.2 Glutamat und GABA 36
1.5.3 Dopamin, DOPAC und HVA 37
1.5.4 Serotonin und HIAA 38

1.6 Arbeitshypothese 39

2. METHODEN 41

2.1 Versuchsobjekte 42
2.1.1 Motivation zur Verwendung von Ratten als Versuchsobjekte 42
2.1.2 Unterbringung der Ratten 42
2.1.3 Aufteilung der Ratten in verschiedene Tiergruppen 43

2.2 Implantation der Führungskanüle 44

2.3 Verhaltensversuche – Plus Maze und Double H Maze 46

2.4 Hochfrequenzstimulation des linken Nucleus caudatus 47

2.5 Autopsie und Histologie 49

2.6 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) 50
2.6.1 Messprinzip 50
2.6.2 Probenaufarbeitung 52
2.6.3 Standards 53

2.7 Statistische Auswertung der Daten 54

3. STUDIE 1 55

3.1 Charakteristik des Plus Maze 56
3.1.1 Testprinzip des Plus Maze 56
3.1.2 Aufbau des Plus Maze 57
3.1.3 Plus Maze-Protokoll für das prozedurale Gedächtnis 58
3.1.4 Statistische Bewertung der Verhaltensbeobachtungen im Plus Maze 59

3.2 Ergebnisse der ersten Studie 60
3.2.1 Histologische Überprüfung der korrekten Elektroden-Position 60
3.2.2 Lernen und Gedächtnis im Plus Maze 61

3.3 Diskussion 65
3.3.1 HFS des Nucleus caudatus hat keine Auswirkungen auf das Verhalten im Plus Maze 65
3.3.2 HFS des Nucleus caudatus hat keine Auswirkungen auf das prozedurale Lernen im Plus Maze 65
3.3.3 Das Plus Maze – der falsche Verhaltenstest für diese Arbeit? 68

4. STUDIE 2 69

4.1 Charakteristik des Double H Maze 70
4.1.1 Testprinzip des Double H Maze 70
4.1.2 Aufbau des Double H Maze 71

4.1.3 Double H Maze-Protokoll für das prozedurale Gedächtnis 72
4.1.4 Statistische Bewertung der Verhaltensbeobachtungen im Double H Maze 73

4.2 Ergebnisse der zweiten Studie 74
4.2.1 Lernen und Gedächtnis im Double H Maze 74
4.2.2 Striatale NTM-Konzentrationen der im Double H Maze trainierten Ratten..... 77

4.3 Diskussion 80
4.3.1 HFS des Nucleus caudatus hat Auswirkungen auf das prozedurale Gedächtnis im Double H Maze..... 80
4.3.2 HFS des linken Nucleus caudatus erhöht die GABA-Konzentration in Ratten..... 83
4.3.3 HFS-induzierte GABA-Erhöhung im ipsi- und kontralateralen Nucleus caudatus..... 83

5. ZUSAMMENFASSUNG 85

6. AUSBLICK 88

7. ANHANG 90

Literaturverzeichnis 91

Abkürzungsverzeichnis 102

Abbildungsverzeichnis 105

Geräte- und Materialienverzeichnis 110

Danksagung 114

Abstract

Since the work of Ebbinghaus, memory was thought to be just one process of acquisition, storage and transfer of association. But recently several studies could show that memory is characterized as a multiple system, consisting of many processes and at least two different types, conscious and unconscious memory. It could also be demonstrated that both memory types are mediated by different brain areas. Conscious memorization, also called as declarative memory, is induced by hippocampus whereas unconscious memory, also known as non-declarative or procedural memory, is mediated by caudate nucleus. Impairment of memory, existing in various neurological diseases like Parkinson's disease, was treated for a long time just by drugs but since high frequency stimulation (HFS) has become an important therapy for different neurological and psychiatric diseases, different studies are investigating the effects of HFS on memory deficits. In previous *in vitro* and *in vivo* studies, it could be demonstrated that during HFS GABA outflow increased in caudate nucleus of rats. We therefore investigated the effect of striatal HFS application on procedural learning in rats and possible long-term effects of HFS on several neurotransmitter systems in caudate nucleus.

In a first experiment, rats were trained in a plus maze for three days, twice a day, to look for a reward in an alternating but marked maze arm. Therefore, animals were divided into two groups, food deprived (FD) and food ad libitum (AdL) rats, and subdivided in each group into stimulated (STIM) and operated but not stimulated (SHAM) rats. After each training session, unilateral HFS of left caudate nucleus was performed over 4 hours in alternating 20 min periods. Nineteen hours after last HFS and immediately after a probe trial assessing the animals' memory strategy, the rat brain was quickly removed and histological examination of the brain was performed to check the right position of the stimulation electrode in the left caudate nucleus. None of the animals showed a misplacement of the guide cannula and the electrode in the caudate nucleus, suggesting a high reliability of surgery. There was neither a large damage to the neuronal tissue nor an extended gliosis around

the electrode. Furthermore, no significant differences could be observed in plus maze performance between STIM and SHAM rats in and between both rat groups. These results lead us to suggest that HFS of left caudate nucleus has no effect on memory in rats. But since we used just one memory test to investigate possible HFS effects and non-significant differences between both rat groups could be observed, it was not clear whether these results are due to the HFS or to the behavioural task.

Thus, we performed a second experiment containing another behavioural task to clarify the unexpected results of the first experiment. In the second study, rats were trained in a flooded double-H maze for three days, four trials a day, to find an escape platform hidden at a fixed location; the starting place was the same for all trials. After training, HFS of left caudate nucleus was performed over 4 hours in alternating 20 min periods. Nineteen hours after last HFS and immediately after a probe trial assessing the animals' memory strategy, left and right caudate nucleus were quickly removed and neurotransmitter levels were measured by HPLC. Rats trained in double H were divided into stimulated (STIM), operated but not stimulated (SHAM) and not operated (CONT) rats. Stimulated rats did not distinguish from sham-operated and control rats in acquisition performance in double H. However, STIM-rats showed differences during probe trial in double H to SHAM- and CONT-rats. Rats trained in double H showed HFS-dependent distinctions. GABA levels in stimulated rats were significantly increased compared to sham-operated and control rats. Interestingly, increased GABA levels could be observed not only in the stimulated left caudate nucleus, but also in the contralateral caudate nucleus, which had not been stimulated. These results are different to the results of the first experiment leading to the suggestion that HFS of left caudate nucleus has an effect on memory strategy as well as on neurotransmitter levels in rats. Furthermore, it could be assumed that the plus maze is a non-suitable behavioural task to investigate possible memory changes after HFS of caudate nucleus.

Our present results lead us to suggest that HFS of the left caudate nucleus has an impact on the strategy by which the rat is trying to solve the task, even though it does not alter acquisition performance in the Double-H maze. Procedural memory processing seems to be apparently less efficient in stimulated rats than in non-stimulated rats. In addition, HFS has a lasting effect on the GABAergic system by increasing GABA levels in the stimulated as well as the contralateral caudate nucleus. This unilateral HFS-induced increase of GABA levels in the caudate nucleus of both hemispheres might be of some therapeutic interest as it may have an inhibiting effect on striatal or striatum-linked brain regions in patients with neurological diseases affecting the basal ganglia.

1. Einleitung

1.1 Gedächtnis

1.1.1 Definition des Gedächtnis'

Das Gedächtnis beschreibt den Prozess des Verschlüsselns, Speicherns (Konsolidierung) und Abrufens von Informationen. Die dabei gespeicherten Informationen sind das Ergebnis von bewussten und unbewussten Lernprozessen *[1]*. Unter dem Begriff Lernen versteht man einen Prozess, in dessen Verlauf das Verhalten eines Individuums aufgrund früherer und neuer Erfahrungen verändert wird und somit immer wieder neue Kenntnisse, Fähigkeiten und Fertigkeiten erworben werden *[2]*. Für alle Organismen ist das Lernen eine essentielle Fähigkeit, um sich an die Umwelt und Lebensumstände anzupassen und somit das Überleben zu garantieren *[3]*.

1.1.2 Gedächtnisforschung I – Von der Theorie des verbalen Lernens bis hin zu dem Modell des multiplen Systems

Der deutsche Psychologe Hermann Ebbinghaus beschäftigte sich 1885 als Erster mit der experimentellen Erforschung des Gedächtnis' und etablierte das Modell des verbalen Lernens. In diesem Modell beschrieb er den Prozess des Lernens als den Erwerb, das Behalten und den Transfer von Assoziationen zwischen verbalen Einheiten. Die Assoziationen spiegeln dabei Verknüpfungen wieder, die durch das bewusste gemeinsame Auftreten von Gedanken oder Vorstellungen zustande kommen *[4]*. Im Jahre 1890 wurde Ebbinghaus' Theorie durch Arbeiten des US-amerikanischen Psychologen William James erweitert. In seinen Studien konnte James zeigen, dass das Gedächtnis aufgeteilt ist in ein Erst- und ein Zweitgedächtnis. Das Erstgedächtnis besteht aus Erinnerungen, die lediglich für einige Sekunden gespeichert und bewusst wahrgenommen werden. Das Zweitgedächtnis hingegen umfasst Erinnerungen, die unbewusst über einen langen Zeitraum gespeichert werden, bei Bedarf jedoch in das Bewusstsein zurückgeholt werden können *[5]*.

Das Modell des verbalen Lernens war 80 Jahre lang das einzig etablierte System, das das Gedächtnis erklärte, bis 1960 weitere Arbeiten auf diesem Gebiet herausfanden, dass Lernen und Gedächtnis durch Informations-Verarbeitung gekennzeichnet sind *[6]*. So zeigte der US-amerikanische Psychologe Richard C. Atkinson 1968, dass das Gedächtnis aus mehreren Prozessen, dem Kodieren, Lagern und Abrufen von Informationen, besteht *[7]*. Seit 1980 beschäftigen sich Forscher noch intensiver mit der Frage, wodurch das Gedächtnis charakterisiert und durch welche Hirnstrukturen es vermittelt wird. Es entstand die kognitive Neurowissenschaft zur Erforschung des Gedächtnis', die bis heute eine große Anzahl an Forschern zu ihren Anhängern zählt *[6]*.

1.1.3 Gedächtnisforschung II – Kognitivismus und Behaviorismus

Bis vor wenigen Jahrzehnten gab es in der Gedächtnisforschung zwei verschiedene Ansichten, inwieweit sich das Gedächtnis charakterisiert. Auf der einen Seite stand der Kognitivismus, deren wohl populärste Anhänger Jean Piaget und Edward C. Tolman waren. Piaget entwickelte ab 1920 die „genetische Epistemologie", in der er die Entwicklung des Erkennens bei Kindern untersuchte *[8]*. Er stellte die Theorie auf, dass menschliche Erkenntnis durch aktives Handeln und Interagieren mit der Umwelt entsteht und im Alter quantitativ durch das Zunehmen der Intelligenz und qualitativ durch das Denken vom Einfachen zum Komplizierten verändert und dadurch systematischer, flexibler und angepasster wird. Tolman behauptete 1946, dass Handlungen zielgerichtet sind und aktiv durch Informations-Verarbeitungsprozesse gesteuert werden, indem gespeicherte Informationen (Wissen) abgerufen werden *[9]*.

Dem Kognitivismus stand der Behaviorismus gegenüber, der einen Einblick in innere psychische Vorgänge eines Lebewesens verweigerte, stattdessen das Verhalten als Reaktion auf einen Reiz ansah. Diese Reiz-Reaktions-Theorie wurde vor allem durch die Psychologen John B. Watson und Edward L. Thorndike geprägt, die Begriffe wie Bewusstsein, Affekte oder Gefühle

nicht verwendeten. Watson veröffentlichte 1913 sein „*Behavioristisches Manifest*“, in dem er behauptete, dass lediglich das beobachtbare Verhalten eines Individuums Teil der Psychologie ist und alle Gefühle und Fähigkeiten eines Menschen auf konditionierte Reflexe zurückzuführen sind *[10]*. Thorndike bestätigte 1933 die Ansicht Watsons, da er in seiner Arbeit herausfand, dass Tiere durch die Reaktion auf einen Reiz und dessen negativer oder positiver Verstärkung lernen *[11]*.

1.1.4 Gedächtnisforschung III – Bewusstes und unbewusstes Lernen werden durch unterschiedliche Hirnareale vermittelt

Die Theorien des Kognitivismus und des Behaviorismus besitzen eine Gemeinsamkeit: sie stützten sich jeweils auf die Aussage, dass das Gedächtnis nur durch eine bestimmte Form des Lernens geprägt ist. Durch Untersuchungen von Gedächtnisleistungen bei Menschen und Tieren, die Läsionen in bestimmten Hirnbereichen aufwiesen, konnte jedoch gezeigt werden, dass das Gedächtnis weitaus vielschichtiger ist als angenommen *[12-16]*. So konnte in Studien von Aggleton et al. und Reed et al. herausgefunden werden, dass Menschen mit Läsionen des Hippokampus eine Beeinträchtigung im bewussten Erinnern an bestimmte Fakten und Ereignisse aufweisen *[12,13]*. In anderen Experimenten, wie denen von Packard et al., konnte hingegen gezeigt werden, dass Tiere mit Läsionen der Basalganglien eine Beeinträchtigung des unbewussten motorischen Handelns (Automatismus) aufweisen *[14-16]*. Durch diese verschiedenen Studien wurde klar, dass das Gedächtnis ein mehrschichtiges System ist, dass aus mindestens zwei Formen des Lernens besteht. Zusätzlich wurde deutlich, dass die unterschiedlichen Gedächtnisformen von verschiedenen Hirnarealen vermittelt werden.

In weiteren Arbeiten, maßgeblich gekennzeichnet durch den US-amerikanischen Psychologen Mark G. Packard, wurde der Begriff des bewussten Erinnerns durch das „place-learning“, der Begriff des unbewussten Erinnerns durch das „response learning“ ersetzt. Packard

stützte sich dabei auf seine zahlreichen Arbeiten mit Ratten, in denen er durch Untersuchungen mit Labyrinthen feststellen konnte, dass die Tiere, abhängig von der jeweils zerstörten Hirnregion, zwei unterschiedliche Lernformen aufwiesen. Wiesen die Ratten eine Läsion des dorsalen Hippokampus auf, konnten sie sich nicht mehr an den Ort des Ziels im Labyrinth erinnern (place learning). Besaßen die Tiere hingegen eine Läsion in den Basalganglien, wie dem dorsolateralen Nucleus caudatus oder dem dorsolateralen Nucleus putamen, waren sie nicht mehr in der Lage, eine über Tage hinweg einstudierte, unbewusste motorische Handlung zu zeigen (response learning) *[17-19]*. Auch der US-amerikanische Psychologe und Neurowissenschaftler Larry R. Squire beschäftigte sich intensiv mit dem Thema des bewussten und unbewussten Lernens und konnte in seinen Arbeiten zeigen, dass beide Lerntypen nebeneinander existieren, nicht miteinander verbunden sind, jedoch gleichzeitig und parallel ablaufen können *[20,21]*.

1.1.5 Das Gedächtnis als Mehrspeichermodell

Wie bereits im Abschnitt 1.1.2 erwähnt, wurde das Modell des verbalen Lernens durch eine neuere Theorie ersetzt, die von einer Verarbeitung der Informationen, hervorgerufen durch verschiedene Prozesse, ausgeht. Diese Theorie, die 1968 von den Forschern Richard C. Atkinson und Richard Shiffrin eingeführt wurde, wird auch als Mehrspeichermodell bezeichnet und findet noch heute große Anwendung bei der Erklärung des Gedächtnis'. Innerhalb dieses Modells wird das Gedächtnis chronologisch eingeteilt in das sensorische, Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis, je nachdem über welchen Zeitraum die Information gespeichert wird (siehe Abbildung 1). Im Abschnitt 1.3 werden die neuronalen Grundlagen der Speicherung von Erinnerungen innerhalb dieses Modells ausführlich behandelt und sollen daher hier keine weitere Erwähnung finden.

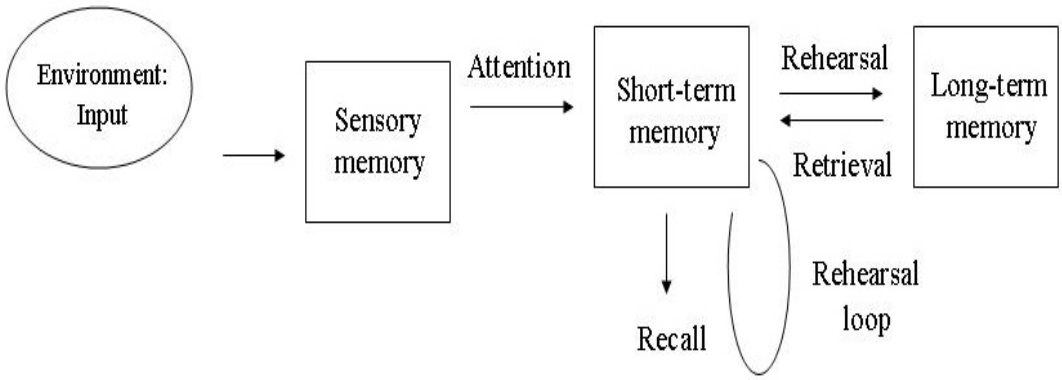


Abbildung 1: Darstellung des Mehrspeichermodells nach Atkinson und Shiffrin [7]. Der auf den Organismus eintreffende Umweltreiz (Input) wird im sensorischen Gedächtnis (sensory memory) gespeichert und bei Anwesenheit von Aufmerksamkeit in das Kurzzeitgedächtnis (Short-term memory) überführt. Durch wiederholtes Aufrufen des Reizes gelangt dieser in das Langzeitgedächtnis (Long-term memory). Bei bewusster Abfrage des Reizes aus dem Langzeitgedächtnis wird dieser wieder in das Kurzzeitgedächtnis überführt und ein Erinnern an den Reiz ist möglich.

Umweltreize werden über unterschiedliche Sinnesorgane aufgenommen und im sensorischen Gedächtnis zwischengespeichert. Das sensorische Gedächtnis ist dabei spezifisch für jede Sinnesmodalität und speichert die Informationen nur für wenige Millisekunden. Werden die einzelnen Reize bewusst und aufmerksam wahrgenommen, werden sie anschließend in das Kurzzeitgedächtnis überführt.

Unter dem Kurzzeitgedächtnis, auch als Arbeitsgedächtnis bezeichnet, versteht man den zeitlich begrenzten Kurzspeicher einer geringen Menge an Informationen, die jederzeit abgerufen werden können. Da die Informationen des Kurzzeitgedächtnis' nur für wenige Minuten gespeichert und anschließend wieder gelöscht werden, müssen wichtige Informationen, die nicht verloren gehen sollen, gelagert werden, indem sie in das Langzeitgedächtnis überführt werden. Das Kurzzeitgedächtnis stellt somit eine Vorstufe des Langzeitgedächtnis' dar, in der über die Wichtigkeit der einzelnen Informationen entschieden wird.

Das Langzeitgedächtnis stellt das dauerhafte Speichersystem für Informationen im Gehirn dar. Dabei werden verschiedene Informationen auf unterschiedlichem Wege gespeichert, sodass das Langzeitgedächtnis weiter eingeteilt werden kann in das deklarative und das nicht-deklarative Gedächtnis. Diese beiden Gedächtnisformen werden hier nur kurz erwähnt, da sie im Abschnitt 1.1.6 ausführlich erläutert werden. Für die Überführung von Informationen in das Langzeitgedächtnis und dessen Speicherung ist das bewusste Abrufen und Zirkulieren im Kurzzeitgedächtnis unerlässlich. Auch die emotionale Bedeutung der Information ist entscheidend für die Verankerung der Information im dauerhaften Speicher des Gehirns *[22]*.

1.1.6 Das Langzeitgedächtnis – deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis

Durch verschiedene Studien, die sich mit Läsionen des Hippokampus' und der Basalganglien in Menschen und Tieren beschäftigten, konnte herausgefunden werden, dass das Gedächtnis aus zwei unterschiedlichen Systemen besteht, dem bewussten und unbewussten Erinnern an Informationen (siehe Abschnitt 1.1.4). In den letzten Jahren haben sich für diese beiden Lernformen zwei Namen etabliert, die in der Forschung immer stärker genutzt werden, das deklarative und nicht-deklarative Gedächtnis. Beide Gedächtnisformen gehören zu dem Langzeitgedächtnis, da Informationen über einen langen Zeitraum hinweg gespeichert und abgerufen werden können. Jedoch unterscheiden sich das deklarative und das nicht-deklarative Gedächtnis maßgeblich. Während das deklarative Gedächtnis das bewusste Erinnern an Fakten und Ereignisse darstellt, wird das nicht-deklarative Gedächtnis als das unbewusste Erinnern an Handlungen angesehen *[23]*.

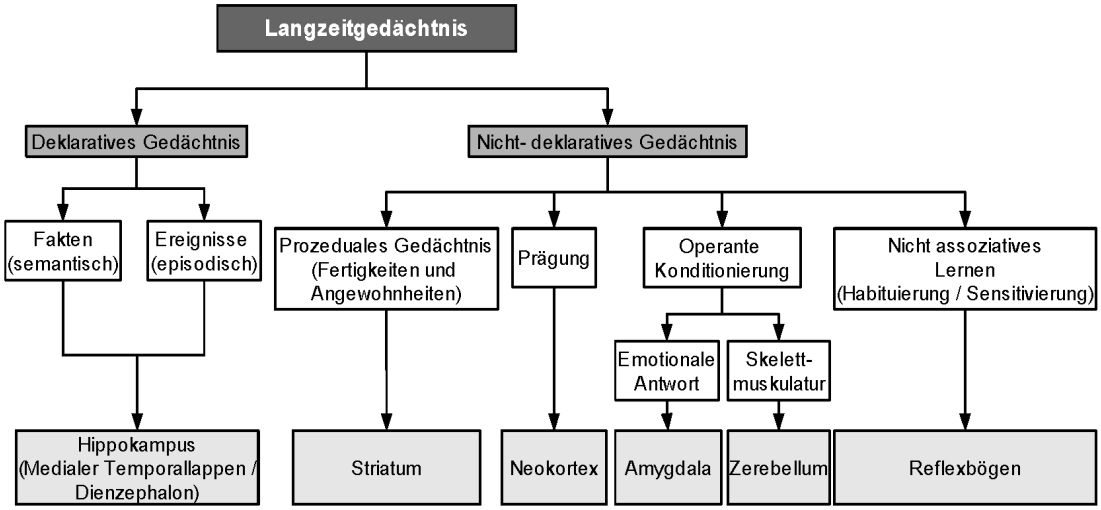


Abbildung 2: Taxonomie des Langzeitgedächtnis' mit neuronalen Korrelaten (modifiziert nach Squire *[20]*). Das Langzeitgedächtnis wird eingeteilt in das deklarative (bewusst) und nicht-deklarative (unbewusst) Erinnern. Das deklarative Gedächtnis wird durch den Hippokampus vermittelt, das prozedurale Gedächtnis, welches einen Teil des unbewussten Erinnerns darstellt, wird von dem Striatum (Nucleus caudatus) vermittelt.

Das deklarative Gedächtnis kann weiter eingeteilt werden in das semantische Gedächtnis, wie das Erinnern an Fakten, und das episodische Gedächtnis, dem Erinnern an Ereignisse. Diese Einteilung, die in Abbildung 2 dargestellt ist, geht auf den Forscher Tulving zurück, der 1972 zeigen konnte, dass neben dem semantischen Gedächtnis eine weitere Form des bewussten Erinnerns, das episodische Gedächtnis, vorliegt *[24]*. In einigen Arbeiten *[17,25]* konnte herausgefunden werden, dass der Hippokampus eine entscheidende Rolle bei deklarativen Lernprozessen spielt.

Auch das nicht-deklarative Gedächtnis kann weiter unterteilt werden in Prägung, operante Konditionierung, nicht assoziatives Lernen (Habituierung) und das für folgende Arbeit wichtige prozedurale Gedächtnis. Das prozedurale Gedächtnis beinhaltet Fertigkeiten und Angewohnheiten, die unbewusst abgerufen und ausgeführt werden. Auch hier konnte in früheren Arbeiten *[14-16,26]* festgestellt werden, dass ein spezieller Hirnbereich, der Nucleus caudatus, das prozedurale Lernen und Gedächtnis vermittelt. Da sich diese Arbeit mit der Hochfrequenzstimulation des Nucleus caudatus befasst, spielte das prozedurale Gedächtnis eine wichtige Rolle in den folgenden Experimenten.

1.2 Basalganglien

1.2.1 Definition der Basalganglien

Thomas Willis entdeckte 1664 erstmals eine Gruppe funktionell zusammengehöriger Kerne, die subkortikal (unter der Großhirnrinde) in der weißen Substanz des Telencephalon lokalisiert sind, und bezeichnete dieses Hirnareal als Corpus Striatum *[27]*. Anfang des 20. Jahrhunderts konnte der britische Neurologe Samuel A.K. Wilson in mehreren Arbeiten zeigen, dass das Corpus Striatum, in seinen Untersuchungen als extrapyramidales System bezeichnet, maßgeblich an motorischen Funktionen beteiligt ist. Er untersuchte mehrere Patienten, die unkontrollierte Bewegungen, Spastiken und psychiatrischen Symptome aufwiesen. Durch eine jeweilig durchgeführte Autopsie wurde deutlich, dass diese Patienten Veränderungen der Basalganglien aufwiesen, die wiederum die motorischen Defizite der Menschen erklärten. Wilson führte für diese Erkrankung den Begriff der progressiven lentikulären Degeneration ein, die später als Morbus Wilson anerkannt wurde *[28,29]*.

In weiteren Arbeiten von Nauta et al. *[30]* wurde die Konnektivität des Corpus Striatums untersucht und der Name Basalganglien eingeführt, der den Nucleus caudatus, den Nucleus putamen, den Globus pallidus internus und das Claustrum beinhaltet.

Heimer et al. konnten 1979 eine weitere Untergliederung der Basalganglien aufstellen, die bis heute große Anwendung findet *[31]*. Demnach setzen sich die Basalganglien zusammen aus dem ventralen Striatum (u.a. Nucleus accumbens), dem dorsalen Striatum (Nucleus caudatus und Nucleus putamen), dem Globus pallidus internus (GPi) und dem Globus pallidus externus (GPe). Da die Substantia nigra (SN), ventrale tegmentale Bereiche und der Nucleus subthalamicus (STN) mit den Basalganglien über beiderseitige Verknüpfungen verbunden sind, werden sie oft mit diesem Bereich des Gehirns in Verbindung gebracht (siehe Abbildung 3).

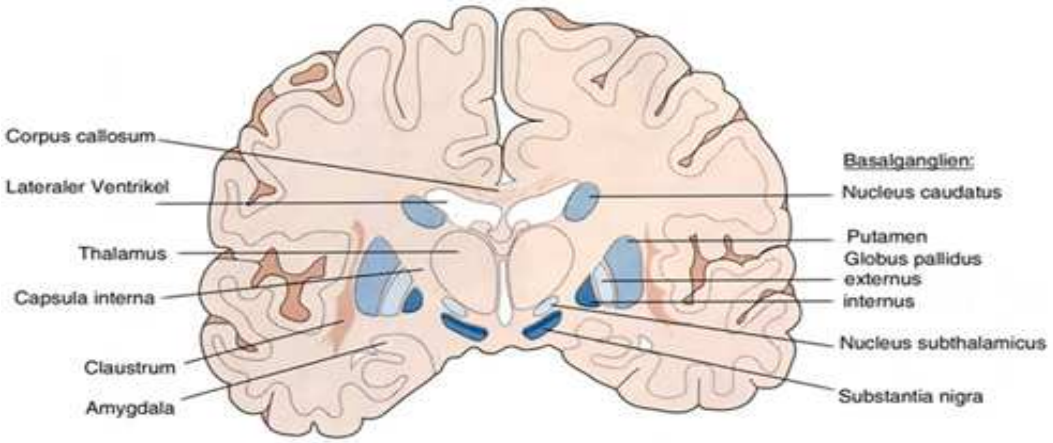


Abbildung 3: Übersicht der Basalganglien [32]. Zu den wichtigsten Kerngebieten der Basalganglien gehören Nucleus caudatus und Nucleus putamen (Putamen), die dem dorsalen Striatum angehören, sowie Globus pallidus internus. Substantia nigra und Nucleus subthalamicus sind eng mit den Kerngebieten der Basalganglien verbunden und werden daher in diesem Bild als Teil der Basalganglien angesehen.

1.2.2 Die kortiko-subkortikalen Regelkreise

Die Basalganglien erhalten Informationen aus allen Bereichen des Kortex. Die Verknüpfungen zwischen diesen Hirnbereichen werden daher auch als kortiko-striatale Bahnen bezeichnet, die für das Zusammenspiel zwischen Basalganglien und Kortex eine wichtige Rolle spielen. Neben dem Kortex sind die Basalganglien außerdem mit dem Thalamus und dem Rückenmark verbunden, sodass sie auch als parallele, eintrittsinvariante kortiko-subkortikale Regelkreise bezeichnet werden können *[33]*.

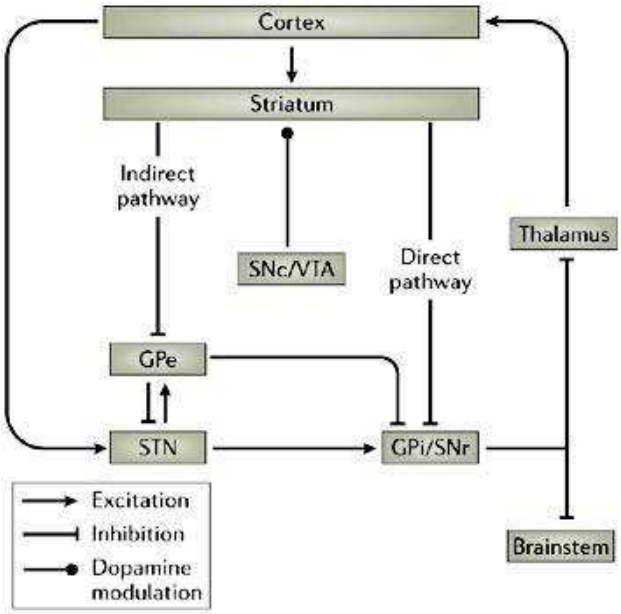


Abbildung 4: Übersicht der kortiko-subkortikalen Regelkreise. Informationen werden aus dem Kortex in das Striatum geleitet, wo sie entweder über den direkten Weg (über Substantia nigra pars reticulata (SNr) oder Globus pallidus internus (GPi)) oder den indirekten Weg (über Globus pallidus externus (GPe) und/oder Nucleus subthalamicus (STN)) an den Thalamus weitergeleitet werden, um anschließend wieder an den Kortex übermittelt zu werden [34].

In Abbildung vier sind die kortiko-subkortikalen Regelkreise dargestellt. Innerhalb dieser Schaltkreise projizieren verschiedene Kortexregionen Eingangssignale in bestimmte Regionen des Striatums. Diese eingehenden Signale werden über glutamaterge und GABAerge (γ-Aminobuttersäure, GABA) Neurone vermittelt und durch modulierende Wirkungen des dopaminergen und cholinergen Systems vom Striatum weitergegeben. Die Informationen werden nun entweder auf dem direkten Wege über den GPi oder dem indirekten Wege vom GPe über den STN und anschließend über den GPi an den Thalamus weitergeleitet. Ein weiterer direkter Weg der Informationsweiterleitung vom Striatum zum Thalamus, dessen Projektionen durch dopaminerge Ausschüttungen vermittelt werden, findet über die Substantia nigra pars reticulata (SNr) statt. Während die Aktivität des Thalamus über die direkte Verschaltung erregt wird, sorgt der indirekte Weg für eine Hemmung der Thalamus-Aktivität. Somit hat das Striatum einen direkten hemmenden oder enthemmenden Einfluss auf den Thalamus und kann durch diese Eigenschaft zwischen wichtigen und weniger relevanten

Informationen entscheiden und diese inhibieren oder weiterleiten. Der Thalamus wiederum ist mit dem Kortex verbunden, sodass die Informationen an die Ursprungsregionen im Kortex zurückprojiziert werden. Bei einer Störung der kortiko-subkortikalen Regelkreise entstehen in den Terminationsgebieten der aus den Basalganglien stammenden Projektionen abnormale Aktivitäts-Muster, die wiederum zur Ausbildung verschiedener neurologischer Erkrankungen, wie dem idiopathischen Parkinsonsyndrom (kurz: Parkinson), führen *[34]*.

1.2.3 Das dorsale Striatum und das prozedurale Gedächtnis

Die Basalganglien besitzen neben ihrer bedeutenden Rolle in motorischen Abläufen jedoch auch bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine wichtige Aufgabe. So konnten Packard et al. in ihren zahlreichen Tierversuchen zeigen, dass die Inhibition des dorsalen Striatums zu einem Verlust des prozeduralen Gedächtnis' führt. Die Forscher setzten bilaterale Läsionen, hervorgerufen durch unterschiedlichste Methoden, im dorsolateralen Nucleus caudatus der Ratte. In den Anfängen ihrer Arbeit nutzten Packard et al. elektrischen Strom mit einer Stärke von 5 mA, um eine bilaterale Schädigung des Nucleus caudatus herbeizuführen *[17]*. In weiteren Arbeiten wurden verschiedene chemische Substanzen, wie Lidocain oder Glutamat, bilateral in das dorsolaterale Striatum der Ratte injiziert. Auch hier konnte eine Beeinträchtigung des Striatums, die der elektrischen Läsion ähnelt, festgestellt werden *[17,18]*. Durch anschließendes Testen des Gedächtnis' der Ratten in einem vier- bzw. achtarmigen Labyrinth wurde erkennbar, dass die Tiere nicht mehr in der Lage waren, eine über Tage hinweg einstudierte, unbewusste motorische Handlung zu zeigen (response learning).

Durch weitere Studien, die sich ganz gezielt mit dem dorsalen Striatum beschäftigten, wurde erkennbar, dass sich die beiden Hauptstrukturen dieses Hirnbereiches, das dorsolaterale und das dorsomediale Striatum, unterscheiden. So führten Veening et al. *[35]* und McGeorge et al. *[36]* Experimente mit Ratten durch, in denen verschiedene Bereiche des dorsalen

Striatums mit der Meerrettich-Peroxidase (englisch: horseradish peroxidase, HRP) markiert wurden. Durch anschließende immunhistochemische Untersuchungen konnten die Forscher nachweisen, dass das dorsolaterale und das dorsomediale Striatum Informationen aus unterschiedlichen Kortex-Regionen erhalten. Während das dorsomediale Striatum hauptsächlich Informationen aus frontalen kortikalen Regionen erhält, wird das dorsolaterale Striatum vorwiegend mit Informationen aus dem somatosensorischen Kortex bedient (siehe Abbildung 5). Die verschiedenen Afferenzen der beiden striatalen Bereiche deuten darauf hin, dass das dorsolaterale und das dorsomediale Striatum unterschiedliche kortikale Informationen verarbeiten und eventuell eine jeweils individuelle Rolle im Prozess des Lernens und Gedächtnis' spielen *[34,37]*.

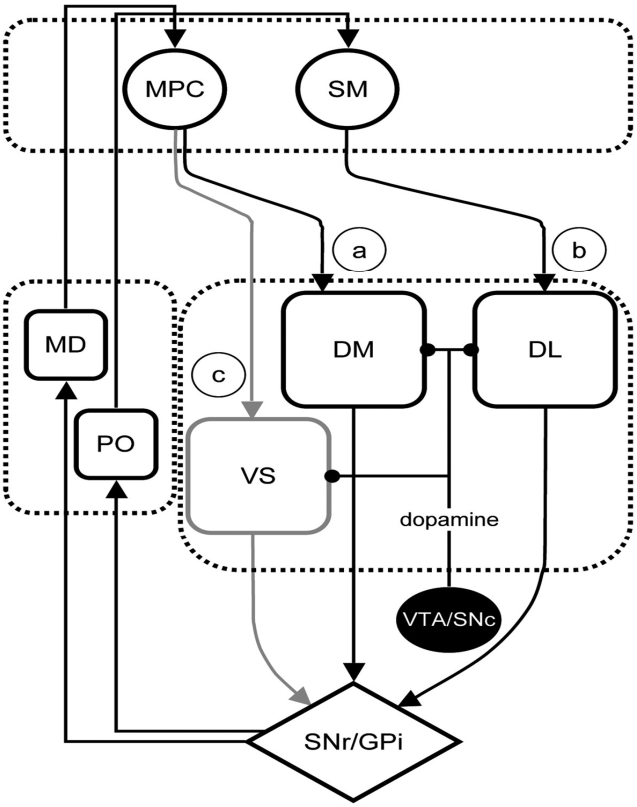


Abbildung 5: Übersicht der Afferenzen der unterschiedlichen Bereiche des Striatums aus dem Kortex. **a)** Das dorsomediale Striatum (DM) erhält Afferenzen, aus dem medialen präfrontalen Kortex (MPC), **b)** das dorsolaterale Striatum (DL) hingegen wird mit Informationen aus dem sensomotorischen Kortex (SM) bedient. **c)** Das ventrale Striatum (VS) erhält Afferenzen, die zum größten Teil aus dem MPC stammen. Die drei Bereiche des Striatums sind durch Efferenzen mit der Substantia nigra pars reticulata (SNr) und dem Globus pallidus internus (GPi) verbunden, über die sie Informationen an den Thalamus weitergeben und schließlich an den Kortex zurückleiten [38].

1.2.4 Verwendung des Nucleus caudatus als Zielregion für hochfrequente Tiefenhirnstimulation

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Striatum eine wichtige Rolle in Lern- und Gedächtnis-Prozessen spielt. So konnten Packard et al. in Tierversuchen zeigen, dass Läsionen des dorsalen Striatums eine Beeinträchtigung des nicht-deklarativen Lernens zur Folge hatten. Da sich die Forscher in ihren Läsions-Experimenten vor allem auf den Nucleus caudatus, der neben dem Nucleus putamen zum dorsalen Striatum gehört, konzentrierten, wurde die wichtige Rolle des Nucleus caudatus im Prozess des prozeduralen Gedächtnis' erkennbar *[14,17,18]*.

Das Gedächtnis wird, wie bereits in Abschnitt 1.2.3 ausführlich dargestellt, über Neurotransmitter reguliert. Diese Regulation kann, wie durch die Gedächtnisstudien von Packard et al. gezeigt, durch Zugabe von hohen Stromstärken oder chemischen Substanzen beeinflusst werden und zu einer Hemmung des Lernprozesses führen *[15]*. Der Ansatz dieser Arbeit war daher die Untersuchung weiterer Methoden der Gedächtnis-Manipulation. Eine solche Methode stellt die elektrische hochfrequente Stimulation einzelner Hirnbereiche dar, die in der Medizin immer stärker als Therapieverfahren neurologischer Erkrankungen eingesetzt wird. Da die Hochfrequenzstimulation im Abschnitt 1.4 ausführlich vorgestellt und diskutiert wird, soll hier lediglich erwähnt werden, dass diese Art von Stimulation durch ihre größtenteils erfolgreiche Anwendung immer mehr an Bedeutung gewinnt. Auch sie stellt eine Form der Strom-Applikation dar, arbeitet jedoch mit weitaus niedrigerer Stromstärke als Packard et al. und ist somit nicht schädlich für das Hirngewebe *[39]*.

Da die Hochfrequenzstimulation immer mehr an Bedeutung in der Medizin gewinnt, ihre Auswirkung auf das Gedächtnis jedoch noch weitgehend unbekannt ist, wurde die Untersuchung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen elektrischer Stimulation und Beeinflussung des Gedächtnis' zum Thema dieser Arbeit. Eine zentrale Rolle nahm dabei der Nucleus caudatus ein, da die Effekte der Stimulation auf das prozedurale Gedächtnis untersucht werden sollten. Für die hier vorliegende Arbeit wurden Tiere als Versuchsobjekte genutzt, da der Zusammenhang zwischen prozedurales Gedächtnis und Hochfrequenzstimulation noch vollkommen unklar war und somit im Bereich der Grundlagenforschung lag. Des Weiteren besitzt der Nucleus caudatus bei Tieren einen großen Umfang und weist zusätzlich eine hohe Dichte an striatalen GABAergen Neuronen auf. Er ist außerdem über dopaminerge und cholinerge Neuronen mit dem STN und GPi verbunden (siehe Abschnitt 1.2.2), sodass mögliche Auswirkungen der hochfrequenten Stimulation des Nucleus caudatus auf diese beiden Regionen in Betracht gezogen werden könnten.

Ein weiteres Motiv, den Nucleus caudatus als Zielregion für diese Arbeit zu nehmen, waren bereits vorangegangene Studien, die einen Einfluss der elektrischen hochfrequenten Stimulation des Nucleus caudatus auf molekularer Ebene zeigten. So fanden Li et al. heraus, dass elektrische Hochfrequenzstimulation von Hirnschnitten des Rattenstriatums *in vitro* eine Erhöhung der extrazellulären GABA-Konzentration bewirkt *[40,41]*. Hiller et al. konnten in *in vivo* Versuchen mit Ratten nachweisen, dass Applikation hochfrequenter Stimulation auf den Nucleus caudatus den lokalen GABA-Gehalt erhöht, weitere Neurotransmittersysteme jedoch nicht beeinflusst *[42]*. Die erhöhte GABA-Konzentration im Nucleus caudatus könnte eventuell Auswirkungen auf motorische Funktionen haben und außerdem prozedurale Lernprozesse beeinträchtigen.

1.3 Die molekulare Ebene des Gedächtnis'

1.3.1 Neuronale Plastizität

Die verschiedenen Gedächtnisformen werden, wie schon erwähnt, durch unterschiedliche Hirnareale vermittelt. Jedoch erfolgt die Gedächtnis-Ausbildung in den einzelnen Hirnbereichen über den gleichen Mechanismus, der neuronalen Plastizität. Unter dem Begriff der neuronalen Plastizität versteht man die Fähigkeit zur Bildung oder Verstärkung neuronaler Verknüpfungen (Synapsen) während einer Aktivität (Aktionspotential) in zwei Neuronen oder einer Neuronengruppe. Das bedeutet, dass während Lernprozessen synaptische Verbindungen zwischen einzelnen oder auch mehreren Neuronen aktiviert und dadurch langfristig strukturell verändert werden. Dies ist jedoch nur möglich, da Synapsen die Fähigkeit besitzen, neu zu entstehen oder abzusterben. Durch diese dynamische Eigenschaft sind die Synapsen in der Lage, die Effizienz der Informations-Übertragung im zentralen Nervensystem für sich und benachbarte Synapsen zu verändern *[43]*.

1.3.2 Eric R. Kandel – die molekularen Grundlagen des Kurz- und Langzeitgedächtnis'

Ein herausragender Wissenschaftler auf dem Gebiet der Gedächtnis-Forschung und seit dem Jahre 2000 außerdem ein Nobelpreisträger ist der US-amerikanische Neurowissenschaftler Eric R. Kandel. Er konnte durch seine Forschung nachweisen, dass die Grundlage des Lernens auf Veränderungen in der Synapsenstärke zurückzuführen sind *[43]*.

Kandel befasste sich bereits 1958 erstmals mit der Frage, auf welchem Wege neuronale Netzwerke des Gehirns durch das Lernen beeinflusst und verändert werden. In seinen ersten Studien untersuchte er die zellulären Eigenschaften des Hippokampus, der wie bereits bekannt eine wichtige Rolle in dem Prozess des vielschichtigen Gedächtnis' spielt. Dabei konzentrierte er sich besonders auf die Pyramidenzellen des Hippokampus, die seiner

Meinung nach die Schlüsselrolle während des Lernprozesses im Hippokampus spielten *[44]*. Kandel und Kollegen konnten zeigen, dass alle Neuronen des Hippokampus', auch die Pyramidenzellen, ähnliche Signal-Eigenschaften besitzen und somit in ihren einzelnen Eigenschaften einen nur geringen Einfluss auf die Arbeitsweise des Hippokampus' ausüben. Kandel nahm an, dass die spezifischen Funktionen des Hippokampus' aus den Mustern und Veränderungen der funktionellen Verbindungen zwischen den Pyramidenzellen, entstehen *[45]*.

Um diese Hypothese stärken und die Frage nach den genauen neuronalen Vorgängen während des Lernens im Hippokampus beantworten zu können, führte Kandel weitere Untersuchungen mit der Schnecke Aplysia durch. Sie stellte für Wissenschaftler ein ideales Untersuchungsobjekt dar, da sie eine geringe Anzahl an Neuronen besitzt, die jedoch wiederum durch eine gigantische Größe und eine einzigartige Identifizierbarkeit gekennzeichnet sind *[46]*. Kandel und Kollegen nutzten in ihren Studien den Kiemen-Rückziehreflex der Schnecke, der durch Reizen des Wasserausstoßrohres (Siphon) hervorgerufen wird. In den Experimenten wurde dieser Reflex durch Sensibilisierung modifiziert. Die Sensibilisierung stellt eine Form des Lernens dar, die als angelernte Angst gegenüber ansonsten harmlosen Reizen bezeichnet werden kann. Durch Applikation eines negativen Reizes (aversiver Reiz), wie einem Schlag auf den Körper der Schnecke, reagierte diese mit dem Kiemen-Rückziehreflex. Bei weiteren, unmittelbar darauffolgenden harmlosen Reizen, wie dem Berühren der Schnecke, erinnerte sich das Tier an den Schlag und reagierte weiterhin mit ihrem Reflex. Die zeitliche Dauer der Erinnerung an den aversiven Reiz war dabei abhängig von der Anzahl der unmittelbar folgenden Wiederholungen des Reizes. Ein einmaliges Anwenden des Schlages führte zu einem kurzzeitigen Erinnern, dass nur wenige Minuten andauerte und keine Synthese neuer Proteine voraussetzte. Mehrere Schläge hintereinander riefen jedoch eine lang anhaltende Erinnerung hervor, die sich über Tage hinweg hielt und eine Synthese neuer Proteine voraussetzte.

Kandel hatte bewiesen, dass sich Kurz- und Langzeitgedächtnis für die Sensibilisierung, ebenso wie bei Säugern, auch bei Wirbellosen durch die Synthese neuer Proteine unterscheiden *[47]*. Die Arbeitsgruppe um den US-Amerikaner zeigte außerdem, dass sich der neuronale Schaltkreis, der dem Rückziehreflex der Schnecke zugrunde liegt, im abdominalen Ganglion befindet und aus 24 Neuronen besteht, die in das Siphon innervieren und sowohl direkt als auch indirekt mit motorischen Zellen der Kiemen verknüpft sind *[48]*. Dabei wurde deutlich, dass der Lernprozess der Schnecke durch Veränderungen der Stärke und der Leistungsfähigkeit bereits bestehender neuronaler Verknüpfungen (Synapsen) im Ganglion charakterisiert ist. Diese Veränderung ist durch die Beeinflussung des exzitatorisch synaptischen Potentials gekennzeichnet *[49]*.

Weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der Gedächtnisforschung folgten, die in einem Review von Kandel im Jahre 2001 zusammengefasst wurden *[50]*. In dieser kritischen Betrachtung zeigte der Neurowissenschaftler, dass die zellulären und molekularen Strategien für die Speicherung von kurzen und lang anhaltenden Erinnerungen, die Aplysia benutzt, auch in höher entwickelten Säugern vorhanden sind. Des Weiteren wurde deutlich, dass das deklarative und das nicht-deklarative Gedächtnis auf derselben molekularen Strategie, der Veränderung in der Synapsenstärke, beruhen.
Allerdings besitzen Kurz- und Langzeitgedächtnis unterschiedliche Prozesse, die zu einer synaptischen Stärkeänderung führen. So werden die synaptischen Änderungen des Kurzzeitgedächtnis' durch Modifikationen bereits existierender Proteine und einer damit verbundenen Modifikation bestehender synaptischer Verknüpfungen hergestellt. Im Gegensatz dazu sind synaptische Änderungen, die dem Langzeitgedächtnis zugrunde liegen, durch die Aktivierung von Genexpression, die Synthese neuer Proteine und die Bildung neuer Verbindungen charakterisiert. Außerdem benötigt die Speicherung von kurzzeitigen Erinnerungen verschiedene Signale, während das lang anhaltende Speichern durch einen spezifischen Signalweg vorgegeben ist.

1.3.3 Die Beeinflussung der synaptischen Aktivität durch Neurotransmitter

In den letzten Jahrzehnten konnten vier verschiedene Wege nachgewiesen werden, die die synaptische Aktivität beeinflussen und auf Neurotransmitter zurückzuführen sind (siehe Abbildung 6). Da die chemischen Botenstoffe des Gehirns, die auch als Neurotransmitter bezeichnet werden, ausführlich im Abschnitt 1.5 erläutert werden, sollen sie hier lediglich erwähnt werden.

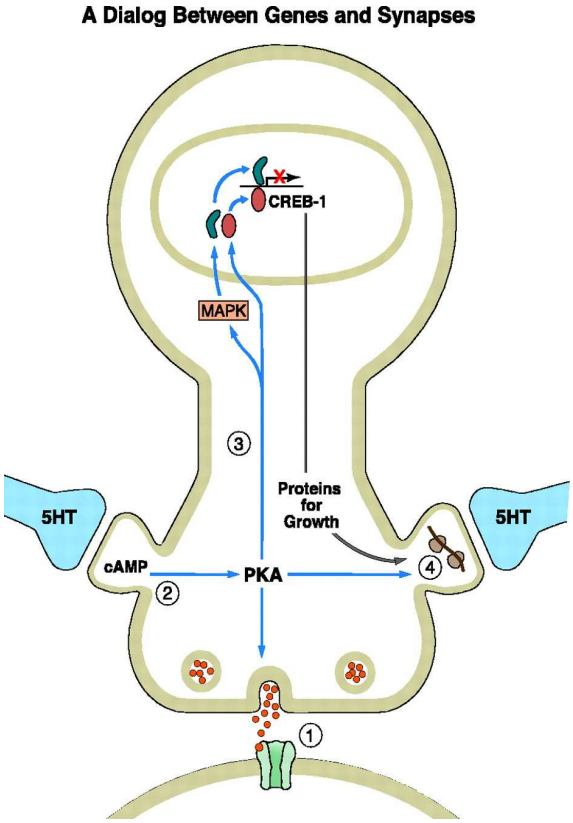


Abbildung 6: Abbildung der vier möglichen Wege der Beeinflussung der synaptischen Aktivität, die durch Neurotransmitter hervorgerufen werden. **1.** Aktivierung eines ligandengesteuerten Ionenkanals durch Transmitter führt zu schneller synaptischer Aktivität, die einige Millisekunden andauert. **2.** Transmitter aktivieren einen Transmembran-Rezeptor, der wiederum eine Kinase für sekundäre Botenstoffe aktiviert und somit eine synaptische Aktivität herbeiführt, die wenige Minuten andauert.**3.** Wiederholte Aktivierung eines Transmembran-Rezeptors durch Transmitter, die zur Verlagerung von Kinasen zum Zellkern führt. Es entstehen neue synaptische Verbindungen, die eine synaptische Aktivität über mehrere Tage hinweg auslösen. **4.** Transmitter aktivieren lokale Proteinsynthesen, die zur Stabilisierung lang anhaltender synaptische Aktivität beitragen *[50]*.

Der erste Signalweg, der eine Beeinflussung der synaptischen Aktivität durch Transmitter darstellt, wurde 1951 durch die Forscher Katz und Fatt nachgewiesen *[51]*. Sie konnten zeigen, dass ionotrope Rezeptoren, die den Ionenfluß durch transmitterregulierte Ionenkanäle überwachen, schnelle synaptische Aktivität produzieren, die lediglich einige Millisekunden andauert. In einem zweiten Signalweg, der von Greengard untersucht wurde, aktivieren Transmitter metabotrope Rezeptoren, die für die Regulierung sekundärer Botenstoffe verantwortlich sind. Es entsteht eine synaptische Aktivität, die wenige Minuten anhält *[52]*. Beide transmitter-regulierten Wege führen zu einer kurzzeitigen Änderung der synaptischen Aktivität und können daher dem Kurzzeitgedächtnis zugeschrieben werden kann.

Kandel und Kollegen konnten zwei weitere Signalwege beschreiben, die dem Langzeitgedächtnis angehören. In einem dritten Weg aktivieren Transmitter Kinasen sekundärer Botenstoffe, die zum Zellkern des Neurons transportiert werden. Diese Kinasen, die für die Phosphorylierung von Substraten verantwortlich sind, initiieren dort weitere Prozesse für das Wachstum neuer synaptischer Verbindungen. Es entsteht eine über Tage andauernde synaptische Aktivität, die für das Langzeitgedächtnis wichtig ist. Das vierte Modell ist durch die Markierung von spezifischen Synapsen durch Transmitter gekennzeichnet. Die markierten Synapsen sind in der Lage, lokale Proteinsynthesen zu regulieren und die neugebildeten Proteine für ihr Wachstum zu nutzen. Dadurch kommt es zu einer lang anhaltenden Veränderung in der Synapsenstärke, die wiederum das Langzeitgedächtnis stabilisiert *[50]*.

1.4 Hochfrequenzstimulation

1.4.1 Das Prinzip der elektrischen Stimulation – Faradaysche und Nicht-Faradaysche Reaktionen

Elektrophysiologische Forschung hat in den letzten Jahrzehnten immer stärker an Bedeutung gewonnen. Besonders in der Bekämpfung von neurologischen Erkrankungen wird die funktionelle elektrische Stimulation von erregbarem Gewebe im menschlichen Körper immer öfter eingesetzt. Hier spielen vor allem Tiefenhirnstimulation, Stimulation von peripheren Nerven und Muskelstimulation eine zentrale Rolle. Während der elektrischen Stimulation wird eine aus Metall bestehende Stimulations-Elektrode in das Gewebe eingeführt. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Elektrode und des Gewebes bewirken nun die Ausbildung einer Schnittstelle an der Injektionsstelle. In Elektroden wird Ladung durch Elektronenleitung transportiert. Gewebe hingegen besteht aus einer ionenleitenden Lösung, die für den Ladungstransport verantwortlich ist und das Gewebe als Elektrolyt erscheinen lässt. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen Metall und Elektrolyt, die wiederum zur Ausbildung einer Kapazität an der Grenzoberfläche führen. Bei Stromfluss ändert sich das elektrische Potential, sodass ein elektrisches Feld zwischen Elektrolyt und Gewebe aufgebaut wird. Es entsteht ein Stromfluss, der durch elektrochemische Reaktionen und somit einem Transport von Ladung gekennzeichnet ist. Dieser Ladungstransport vom Metall in den Elektrolyten kann durch zwei Mechanismen ablaufen, den faradayschen und den nicht-faradayschen Reaktionen *[53]*.

Nicht-Faradaysche Reaktionen

Die nicht-faradayschen Reaktionen können auch als kapazitive Mechanismen zusammengefasst werden, da sich während dieser Reaktionen die Kapazität der Phasen-Schnittstelle verändert, ohne dass es zu einem Ladungsaustausch zwischen den beiden Phasen kommt. Es finden ein Elektronentransport an die Metall-Oberfläche der Elektrode und ein gleichzeitiger Transport der Ionen des Elektrolyts in die Nähe der Metall-Oberfläche statt. Da der Großteil der Ionen von einer Hydrathülle umgeben ist, werden Elektronen und Ionen an der Phasen-Schnittstelle durch eine dielektrische Wasserschicht voneinander getrennt. Diese Schicht, die aus der Metall-Oberfläche und den nahestehenden Ionen besteht, wirkt als Kondensator. An dieser ersten Schicht existiert eine weitere, als Kondensator wirkende Schicht, sodass es zur Ausbildung einer stabilen Doppelschicht an der Phasen-Schnittstelle kommt. Diese Doppelschicht wurde erstmals 1879 durch den Forscher Hermann von Helmholtz entdeckt und bekam daher den Namen Helmholtz-Doppelschicht. In den Jahren 1910 und 1913 wurde die Helmholtz-Doppelschicht-Theorie von den Forschern Louis G. Gouy und David L. Chapman weiterentwickelt. Beide Forscher gingen jedoch davon aus, dass sich die Ionen in einer thermischen Bewegung befinden und somit eine diffuse, über mehrere Moleküllagen ausgedehnte Schicht, die sogenannte Gouy-Chapman-Doppelschicht, bilden. Der Physiker Otto Stern konnte mit seiner im Jahre 1924 aufgestellten Stern-Doppelschicht-Theorie die Ansichten von Helmholtz, Gouy und Chapman vereinigen, indem er zeigte, dass die an der Phasen-Schnittstelle existierende Doppelschicht aus einer sowohl starren als auch diffusen Schicht besteht (siehe Abbildung 7). Der Ladungstransport an diesem Doppelschicht-Kondensator wird durch das Laden und Entladen des Kondensators durchgeführt und ist optimal für den Ladungstransport in das Gewebe, da dafür keine elektrischen Ströme fließen müssen und somit weder Gewebe noch Elektrode zerstört werden können *[54]*.

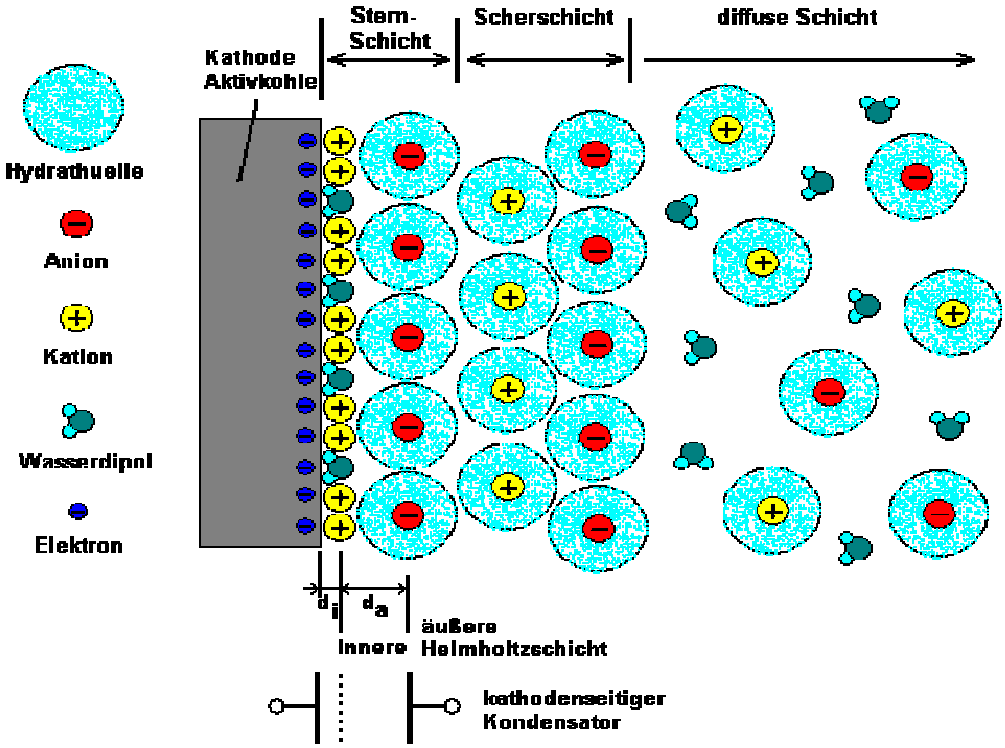


Abbildung 7: Darstellung der Stern-Doppelschicht an einer Kathode, die hier durch Aktivkohle dargestellt ist. An die Stern-Doppelschicht lagern sich weitere, diffuse Schichten aus hydratisierten Ionen an [55].

Faradaysche Reaktionen

Faradaysche Reaktionen hingegen sind durch den Elektronentransport zwischen den beiden Phasen gekennzeichnet. Dabei wird die Ladung der Elektrode durch Redoxreaktionen an das Gewebe weitergegeben. Redoxreaktionen setzen sich zusammen aus Oxidation und Reduktion unterschiedlicher Stoffe. Während die Oxidation durch das Abgeben eines Elektrons charakterisiert ist, beschreibt die Reduktion den Vorgang der Aufnahme eines Elektrons. Faradaysche Reaktionen können reversibel und somit nicht schädlich für Elektrode und Gewebe sein. Allerdings hängt die Reversibilität der Reaktion von dessen Kinetik und Massentransport ab. Bei einer im Vergleich zum Massentransport sehr schnellen Kinetik kann eine Reversibilität gewährleistet werden, während Reaktionen mit einer langsamen Kinetik relativ zum Massentransport als irreversibel eingestuft werden.

In reversiblen Reaktionen, wie der Wasserstoff-Bindung an Platin (siehe Abbildung 8), sind die Reaktions-Partner an die Elektroden-Oberfläche gebunden und können somit nicht in das Gewebe gelangen, um dort neue chemische Verbindungen zu bilden. Reversible faradaysche Reaktionen sind somit nicht schädlich für Gewebe und Elektrode.

$$Pt + H_2O + e^- \longrightarrow Pt\text{-}H + OH^-$$

Abbildung 8: Wasserstoff-Bindung von Platin. Durch Reaktion des Platins der Elektrode mit Wasser des Gewebes entstehen durch Aufnahme eines Elektrons eine Platin- Wasserstoff-Verbindung und ein freiwerdendes Hydroxyl-Ion.

In irreversiblen Reaktionen, wie der Korrosion von Platin (siehe Abbildung 9), werden die Reaktionspartner nicht an die Metall-Oberfläche der Elektrode gebunden. Dadurch können diese Reaktionspartner in das Gewebe diffundieren und dort neue chemische Verbindungen herstellen, die schädlich für das Gewebe und die Elektrode sind. Ein zentrales Ziel der elektrischen Stimulation ist somit die Vermeidung irreversibler faradayscher Reaktionen, um die Zerstörung von Gewebe und Elektrode so gering wie möglich zu halten *[54]*.

$$Pt + 4Cl^- \longrightarrow [Pt\text{-}Cl_4]^{2-} + 2e^-$$

Abbildung 9: Korrosion von Platin. Durch Reaktion des Platins der Elektrode mit Chlorid-Ionen des Gewebes entstehen durch Abgabe von Elektronen Platin(IV)-Chlorid-Ionen.

Um den exakten Gewebebereich charakterisieren zu können, der von der Stimulation betroffen ist, wurden in den letzten Jahren verschiedene Versuche durchgeführt. Dabei konnten McIntyre et al. zeigen, dass das elektrische Feld, das durch eine implantierte Elektrode erzeugt wird, ein dreidimensionales, komplexes Phänomen darstellt, das sich innerhalb des Gehirns ausbreitet *[56]*. In weiteren Untersuchungen konnten Butson et al. zeigen, dass die zweite Ableitung des elektrischen Feldes, das während der Stimulation in das Gewebe induziert wird, als treibende Kraft für die Auslösung einer Membran-Depolarisierung oder –Hyperpolarisierung angesehen werden kann. Je weiter das elektrische Feld im Gewebe verteilt wird, umso schwächer wird es. Diese Erkenntnis wird auch als die „Annahme der zweiten Ableitung“ bezeichnet (englisch: volume of tissue activated, VTA). Der genaue Umfang des Gewebebereiches, der durch die elektrische Stimulation beeinflusst wird, ist jedoch noch immer unklar und wird in vielen weiteren Studien intensiv untersucht *[57]*.

1.4.2 Ungewollt auftretende Reaktionen währen der Stimulation

Die elektrische Stimulation kann, wie bereits kurz erwähnt, unter bestimmten Voraussetzungen schädlich für Elektrode und Gewebe sein. Die Schädigung der Elektrode ist durch signifikante irreversible faradaysche Reaktionen an der Elektroden-Oberfläche, wie der Metall-Oxidation, gekennzeichnet. Diese irreversiblen Reaktionen am Metall wiederum bewirken eine Korrosion der Elektrode. Die Zerstörung des Gewebes durch elektrische Stimulation hingegen kann auf innere biologische Prozesse zurückgeführt werden. So wird angenommen, dass Überstimulation des Gewebes zu einer Hyperaktivität vieler Neuronen führt, sodass sich die chemische Zusammensetzung des Gewebes ändert und somit eine Schädigung des Gewebes eintritt *[53]*. In den Studien von Lilly et al. *[58]* und Mortimer et al. *[59]* konnte herausgefunden werden, dass auch die Bildung toxischer elektrochemischer Reaktionspartner an der Elektroden-Oberfläche während der Stimulation einen Mechanismus der Gewebezerstörung darstellt.

Da Gewebe und Elektrode unterschiedliche Eigenschaften besitzen, kommt es bei einer chronischen Elektroden-Implantation immer wieder zu Reaktionen, die unabhängig von der Stimulation auftreten. Eine erste Reaktion des Gewebes auf die Stimulationselektrode ist die Inflammation, die durch die Entzündung des Gewebes um die Elektrode gekennzeichnet ist. In weiteren, späteren Reaktionen treten sowohl die Hypertrophie (Vergrößerung) von Astrozyten als auch das Eindringen von Mikroglia (inflammatorische Zellen des Zentralnervensystems) und fremden Körperzellen in das Gewebe auf. Es kommt zur Verkapselung der Elektroden-Gewebe-Schnittstelle *[53]*.

1.4.3 Darstellung der verschiedenen Elektroden-Arten

Stimulationselektroden stellen in der elektrischen Stimulation die Schnittstelle zwischen biologischen Strukturen und technischen Systemen dar. Sie werden verwendet, um eine Ladung aus der festen Phase des Metalls in die flüssige Phase des Gewebes zu injizieren. Die Menge der weitergegeben Ladung ist dabei abhängig von der Impedanz der Elektrode, die den Eigenwiderstand der Elektrode gegenüber dem fließenden Strom angibt. Die Elektroden-Impedanz wird von vielen Faktoren beeinflusst, wie der Verbindung zwischen Stimulator und Elektrode, der Elektroden-Oberfläche, der Leitfähigkeit und Dichte der Verkapselung um die Elektrode und der Leitfähigkeit des Gewebes. Um die Funktionalität der Elektrode im Gewebe gewährleisten zu können, ist es wichtig, dass die Elektrode biokompatibel ist. Nur so kann ein Optimum an Stabilität, Wirksamkeit und Sicherheit gewährleistet werden, ohne dass die Elektrode dabei toxisch wirkt *[54]*.

In der elektrophysiologischen Forschung werden Elektroden eingeteilt in polarisierbare und nicht-polarisierbare Elektroden. Eine ideale polarisierbare Elektrode kann auch als reiner Kondensator mit unendlichem Widerstand angesehen werden, da diese Elektrode in der Lage ist, eine große Menge an injizierter Ladung aufzunehmen, bevor diese in faradaysche Reaktionen umgewandelt wird. An der Schnittstelle zwischen Elektrode und Gewebe

findet somit kein Elektronen-Transport statt. Die ideale nicht-polarisierbare Elektrode besitzt keinen Widerstand, was wiederum zu einem ständigen Stromfluss führt. Die injizierte Ladung wird dabei durch faradaysche Reaktionen umgehend in das Gewebe abgegeben *[53]*.

1.4.4 Darstellung der verschiedenen Elektroden-Materialien

Es gibt ein breites Spektrum an Elektrodenmaterialien, die je nach Beschaffenheit, in den unterschiedlichsten Forschungsbereichen eingesetzt werden. Für die elektrische Stimulation werden häufig Elektroden aus Edelmetall, wie Platin, Gold oder Iridium, verwendet, da sie einen natürlichen Korrosionsschutz besitzen und somit eine hohe Sicherheit für Gewebe und Elektrode während der Stimulation garantieren. Die am häufigsten genutzte Elektrode der intrakortikalen Stimulation ist die Platin-Iridium Elektrode, da sie durch Kombination der beiden Edelmetalle mechanisch stabil ist und eine große Speicherkapazität für applizierte Ladung aufweist.

Elektroden aus Nichtedelmetall, wie Edelstahl, Kobalt oder Nickel, sind durch eine dünne Passivierungsschicht auf ihrer Oberfläche charakterisiert, die sie vor Korrosion schützt. Diese passive Schicht wird jedoch bei Erreichen eines zu positiven Elektrodenpotentials abgebaut, sodass die Elektrode angreifbar für Korrosion wird. Das Metall der Elektrode wird dabei irreversibel aufgelöst, sodass sowohl Elektrode als auch Gewebe geschädigt werden. Auch Edelmetall-Elektroden verlieren nach einiger Zeit ihren natürlichen Korrosionsschutz. Allerdings weisen die Edelmetall-Elektroden aufgrund ihrer natürlichen Korrosionsresistenz eine längere Lebenszeit und somit ein längeres, sicheres Wirken der Stimulation auf als Nichtedelmetall- und kapazitive Elektroden.

Elektroden, die durch eine dünne dielektrische Schicht vom Gewebe getrennt sind und Ladung ohne faradaysche Reaktionen in das Gewebe weiterleiten, werden auch als kapazitive Elektroden bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist die Tantal-Tantalpentoxid-Elektrode, die eine sehr hohe Ladungsdichte besitzt.

Im Gegensatz zu den Nichtedelmetall-Elektroden müssen die kapazitiven Elektroden in einem relativ positiven Elektrodenpotential arbeiten, um den Transport von Elektronen über Oxide und somit faradaysche Reaktionen, die zu Korrosion führen können, zu verhindern *[53]*.

1.4.5 Charakteristik der hochfrequenten Stimulation

In der Behandlung von diversen neurologischen Erkrankungen, wie Parkinson oder Epilepsie, findet die elektrische Hochfrequenzstimulation (HFS) einen immer stärkeren Einsatz. Die HFS stellt eine Form der elektrischen Stimulation dar, die insbesondere in subkortikalen Gebieten, wie den Basalganglien oder den thalamischen Kernen, eingesetzt wird. Da diese Zielgebiete der Stimulation in tieferen Regionen des Gehirns liegen, wird die HFS im klinischen Sprachgebrauch auch als Tiefenhirnstimulation (THS) bezeichnet *[60-62]*.

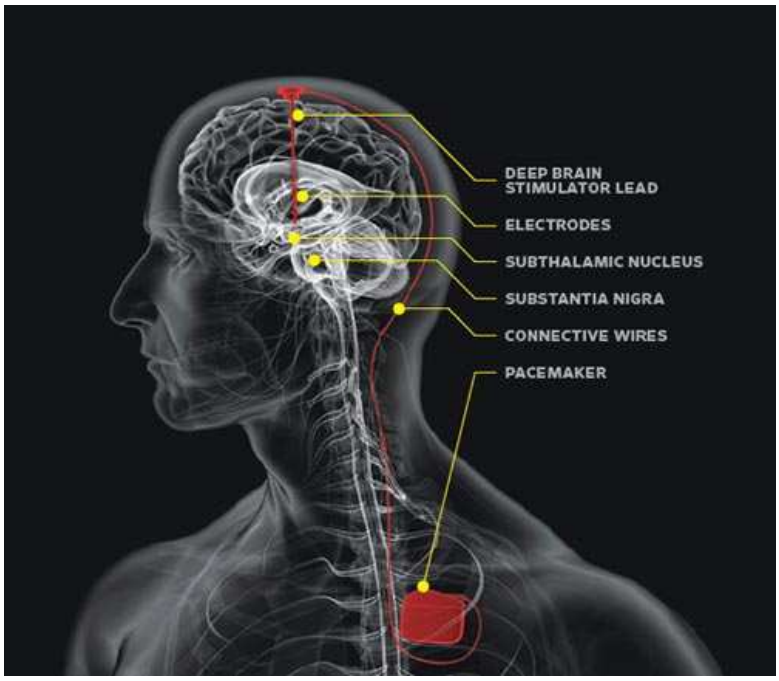


Abbildung 10: Darstellung der HFS zur Behandlung des idiopathischen Parkinson-Syndroms. Eine in das menschliche Gehirn implantierte Stimulations-Elektrode (Electrodes) ist mit einem Impulsgenerator (Pacemaker) verbunden, der die Parameter der Stimulation generiert [63].

Das Prinzip der HFS von tiefen Hirnarealen (siehe Abbildung 10) beruht auf einer kontinuierlichen und langfristigen Applikation von elektrischen Impulsen über eine in das Gehirn implantierte Stimulations-Elektrode. Die Parameter der Stimulation, wie Frequenz oder Pulsweite, werden von einem externen Impulsgenerator generiert und variieren in den einzelnen Untersuchungen. Jedoch weisen die in der Behandlung von neurologischen Erkrankungen eingesetzten THS eine Impulsfrequenz von mehr als 100Hz auf, die weit oberhalb der Eigenfrequenz von Neuronen liegt, sodass sich der Begriff Hochfrequenzstimulation etabliert hat.

Die einzelnen Hirnbereiche werden entweder mono- oder bipolar elektrisch stimuliert. Unter der monopolaren Stimulation versteht man die Stimulation einer größeren Anzahl an Neuronen über ein breit ausgedehntes elektrisches Feld. Dieses Feld wird durch eine große Distanz zwischen Anode (Elektrode mit positivem Potential) und Kathode (Elektrode mit negativem Potential) gewährleistet. Bei der bipolaren Stimulation hingegen liegen Anode und Kathode nah beieinander, sodass das elektrische Feld relativ klein gehalten wird und somit nur eine spezifische Menge an Neuronen stimuliert wird. In den letzten Jahren hat sich in der Therapie neurologischer Erkrankungen jedoch besonders die monopolare Stimulation etabliert, da sie aufgrund ihres günstigeren Verhältnisses von Wirkeffekt und Stimulationsstrom einen Vorteil gegenüber der bipolaren Stimulation aufweist. Im monopolaren Modus wird die Kathode durch entweder einen oder mehrere Kontakte einer in der Regel 4-poligen Stimulations-Elektrode dargestellt, während die Anode aus dem Gehäuse des Impulsgenerators besteht.

Die heutigen Standardparameter für eine optimale THS haben sich im Laufe der Jahre in der medizinischen Anwendung etabliert und setzen sich wie folgt zusammen: monopolare, kathodische Stimulation von 130Hz mit Pulsen von 60-90µs Dauer und einer Spannungs-Amplitude zwischen 1 und 3,5V *[64]*.

1.4.6 Wirkungsmechanismus der hochfrequenten Stimulation innerhalb des Zentralnervensystems

Vor etwa 50 Jahren wurden erstmals Experimente zur Behandlung von Bewegungsstörungen durchgeführt. In verschiedenen Arbeiten, wie der von Taira und Hori, wurden dafür überaktive Bereiche der Basalganglien ausgeschaltet *[65]*. Diese Läsionen wurden entweder durch Radiofrequenz- oder Thermokoagulation vorgenommen und zeigten erste Erfolge in der Therapie von Bewegungsstörungen *[66,67]*. Diese Behandlungsmethode stellte jedoch eine irreversible Lädierung des Gehirns dar, die zu schweren Nebenwirkungen führen konnte. Daher beschäftigten sich Benabid et al. Ende der 80er Jahre intensiv mit der Frage, ob eine Therapie von Bewegungsstörungen auch durch reversible Methoden erzielt werden kann. Sie führten Untersuchungen mit Parkinson-Patienten durch, die einen schweren, teilweise therapie-resistenten Tremor (unwillkürliches Zittern) besaßen. Dabei konnten sie in ersten Versuchen beobachtet, dass die elektrischer Stimulation des Nucleus thalamus intermedius ventralis (Vim) mit 100Hz zu einer Besserung des Tremors führte. *[68,69]*.

Durch Benabids Studien wurde deutlich, dass Läsionen und HFS teilweise ähnliche klinische Wirkungen besitzen. Dies führte wiederum zu der Annahme, dass HFS zu einer funktionellen Inhibition des stimulierten Hirnareals führt. Allerdings stellt die HFS eine reversible Inhibition dar, da sie durch Ausschalten des Stimulationsgenerators beendet werden konnte, während die Läsion eine irreversible Hemmung des Hirnbereiches beinhaltete. Auch konnten die Stimulationsparameter ständig an die klinische Situation des Patienten durch den Generator angepasst werden, was bei Läsionen verschiedener Hirnregionen nicht möglich war.

Die Eigenschaften der Reversibilität und der Anpassung stellen die größten Vorteile der HFS gegenüber dem läsionalen Verfahren dar und begründen, warum die HFS eine immer größere Anwendung in der Behandlung neurologischer Erkrankungen findet *[64]*.

1.4.7 Zelluläre Grundlagen des inhibitorischen Wirkungsmechanismus' der hochfrequenten Stimulation

Die molekularen Mechanismen der neuronalen Inhibitions-Wirkung der HFS sind noch immer nicht vollständig geklärt. So gibt es verschiedene Ansätze, basierend auf tierexperimentellen und human-intraoperativen Versuchen, die sich sehr intensiv mit diesem Thema befassen. Beurrier et al. *[70]* konnten zeigen, dass HFS in Hirnschnitten des Nucleus subthalamicus von Ratten zu einer Inaktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle und einer damit verbundenen Hemmung der STN-Neurone führt. Neben weiteren Arbeiten von Benazzouz et al. *[71,72]* entstand so die Hypothese, dass HFS die neuronale Übertragung durch Depolarisierung blockiert. Ein weiterer Ansatz, der durch Arbeiten mit HFS des GPi *[73]* entstand, ist die synaptische Inhibition der HFS durch Stimulation inhibitorischer Afferenzen des Zielgebietes. Auch die synaptische Hemmung, hervorgerufen durch eine stimulationsinduzierte Erschöpfung von Neurotransmittern *[74]* stellt eine Hypothese dar. Benazzouz et al. *[75]* konnten im Jahre 2000 außerdem demonstrieren, dass eine zumindest teilweise Induktion von Aktions-Potentialen mit der Wirkung von HFS in Verbindung stehen muss.

Neben dem Einfluss auf einzelne Neurone und deren Verknüpfungen, besitzt die hochfrequente Stimulation außerdem einen Effekt auf die chemischen Botenstoffe des Gehirns, die sogenannten Neurotransmitter, die für die Übertragung von Informationen innerhalb des zentralen Nervensystems verantwortlich sind. In vielen Untersuchungen wurde erkennbar, dass der inhibitorisch wirkende Transmitter γ-Aminobuttersäure (GABA) eine nicht zu unterschätzende Rolle während der HFS spielt. So konnte die Forschgruppe um Moser in verschiedenen Arbeiten herausfinden, dass HFS des Striatums der Ratte *in vitro* und *in vivo* zu einer erhöhten GABA-Konzentration führt *[40-42,76]*. Auch Mantovani et al. konnten in Versuchen mit Schnitten des menschlichen Neocortex zeigen, dass hochfrequente Stimulation dieser Schnitte einen lokalen GABA-Anstieg zur Folge hat *[77]*. Feuerstein et al. stellten daher die Annahme auf, dass GABAerge Neuronen eine wichtige Rolle bei der Wirksamkeit der elektrischen Stimulation spielen und die

selektive GABA-Freisetzung einen Grundmechanismus der HFS darstellt *[78]*. In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass auch andere NTM, wie das exzitatorisch wirkende Glutamat oder das inhibitorisch wirkende Serotonin, in den Ablauf und der Wirkungsweise der HFS involviert sind *[79,80]*. Jedoch sind die genauen Prozesse und Mechanismen, wie die verschiedenen NTM während der hochfrequenten Stimulation verstärkt oder gehemmt werden, weiter unklar und werden in zahlreichen Arbeiten intensiv untersucht.

1.5 Neurotransmitter

1.5.1 Definition der Neurotransmitter

Neurotransmitter (NTM) sind chemische Substanzen, die auch als Überträgerstoffe innerhalb des Nervensystems bezeichnet werden. Sie sind klassische Hormone und werden von einem Neuron synthetisiert und in Vesikeln im präsynaptischen Ende der Zelle gelagert. Durch ein eingehendes Aktionspotential wird die Membran der präsynaptischen Zelle depolarisiert, was wiederum zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (Ca^{2+}) führt. Der Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle sorgt dafür, dass die Vesikel an das präsynaptische Ende andocken, mit der Membran verschmelzen und so ein Freisetzen der NTM in den synaptischen Spalt bewirken. Die NTM binden nun an NTM-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran eines neuen Neurons und vermitteln eine erregende (exzitatorische) oder hemmende (inhibitorische) Wirkung auf das Neuron. Die NTM können jedoch auch an anderen Rezeptoren, die präsynaptisch oder dendritisch charakterisiert sind und somit nicht auf der postsynaptischen Membran liegen, andocken. Die Lokalisation der einzelnen NTM-Rezeptoren besitzt eine funktionelle Bedeutung *[1]*.

In dieser Arbeit wurden verschiedene NTM-Systeme betrachtet, um einen großen Überblick über eventuelle zelluläre Langzeiteffekte der striatalen HFS zu bekommen. Eine zentrale Rolle nahm dabei die Untersuchung des NTM GABA ein, da dieser, wie schon in Abschnitt 1.4.7 erwähnt, eine wichtige Rolle in der Wirkung der HFS spielt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen der NTM Glutamat, Dopamin und Serotonin, sowie deren Abbauprodukte 5-Hydroxyindol-Essigsäure (HIAA), 3,4-Dihydroxy-Phenyl-Essigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) untersucht.

1.5.2 Glutamat und GABA

Der NTM Glutamat stellt das Anion der Glutaminsäure dar und ist der dominierende exzitatorische NTM im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugern. Er wirkt erregend auf alle nachgeschalteten Systeme, kann bei einer zu hohen Konzentration jedoch auch inhibitorische Effekte erzeugen und zur Neurodegeneration oder Exzitoxizität der Zelle führen. Glutamat wird mit Gedächtnis- und Lernprozessen in Verbindung gebracht und ist ein wichtiger NTM in motorischen Funktionen. Durch Decarboxylierung des Glutamats mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase (GAD) entsteht, wie in Abbildung 11 zu erkennen, GABA. Der NTM GABA ist der wichtigste Gegenspieler des Glutamats, da er eine hemmende Wirkung im ZNS von Säugern besitzt und somit die Aktivität nachgeschalteter Zellen unterdrückt. GABA besitzt eine angstlösende und in Verbindung mit Serotonin und Melatonin schlaffördernde Wirkung *[81]*.

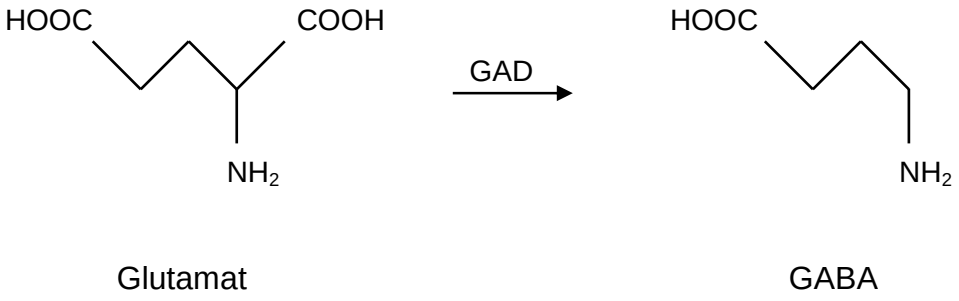


Abbildung 11: Abbau von Glutamat zu GABA.

1.5.3 Dopamin, DOPAC und HVA

Dopamin ist ein Katecholamin, das die Vorstufe des Noradrenalins darstellt und besonders in den Basalganglien hochkonzentriert vorliegt. Darüber hinaus ist Dopamin der wichtigste Botenstoff des Belohnungssystems. Es wird nach der Einnahme von Drogen verstärkt ausgeschüttet und führt so zu dem typischen „High“-Gefühl. Dopamin-Mangel hingegen kann Depressionen auslösen. Abbauprodukte des Dopamins sind, wie in Abbildung 12 dargestellt, DOPAC und HVA. Im ersten Schritt wird das Dopamin mittels der Monoamino-Oxidase (MAO) oxidativ desaminiert und über die Aldehyd-Dehydrogenase (AD), die eine Aldehydgruppe auf das Molekül überträgt, zu DOPAC umgewandelt. Der zweite Schritt beinhaltet die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die Hydroxygruppe des dritten Kohlenstoffs (C)-Atoms des Benzolringes von DOPAC mit Hilfe der Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Wasser wird abgespalten und es entsteht HVA *[81]*.

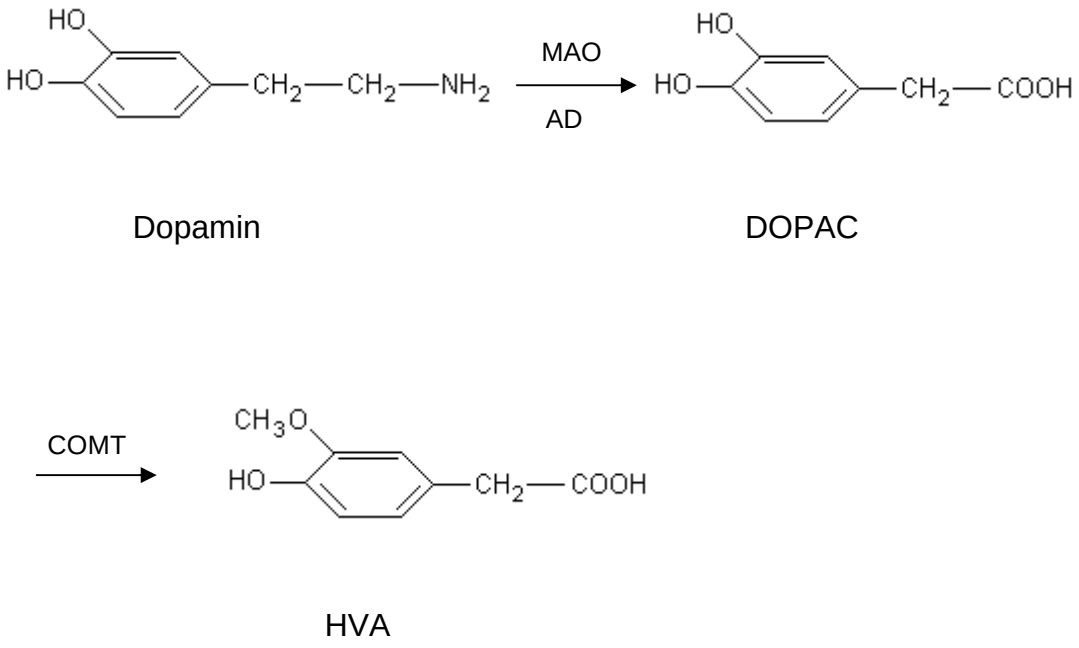


Abbildung 12: Abbau von Dopamin über DOPAC zu HVA.

1.5.4 Serotonin und HIAA

Serotonin ist im Gehirn vor allem in den Raphe-Kernen lokalisiert, die zwischen dem Mesencephalon und der Medulla oblongata liegen. Dieser Neurotransmitter spielt vor allem bei der Schlafregulation und bei der Stimmungskontrolle eine wichtige Rolle, da er stimmungsaufhellend, schlaffördernd und entspannend wirkt. Bei Serotonin-Mangel kann es somit zu Schlafmangel, Angstzuständen und Depressionen kommen, die durch einen Dopamin-Mangel verstärkt werden. Abbauprodukt des Serotonins ist HIAA. Wie in Abbildung 13 dargestellt, wird das Serotonin durch MAO oxidativ desaminiert. Außerdem überträgt AD eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-Methionin auf die Hydroxygruppe des dritten C-Atoms des Benzolringes und es entsteht HIAA *[81]*.

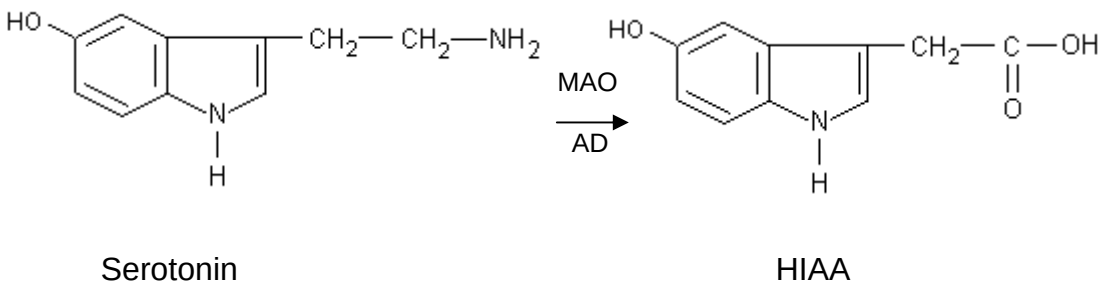


Abbildung 13: Abbau von Serotonin zu HIAA.

1.6 Arbeitshypothese

HFS als Therapieform der neurologischen Medizin

Es gibt zahlreiche Arbeiten, die sich mit dem Thema HFS in verschiedenen Hirnbereichen von Menschen und Tieren auseinandersetzen. In den meisten Studien wird dabei die elektrische Stimulation ganz gezielt als Therapieform neurologischer Bewegungsstörungen betrachtet. So konnten Benabid und Kollegen nachweisen, dass elektrische HFS des Vim bei der Therapie des Parkinson-Syndroms hilft, indem sie den Tremor unterdrückt *[68,69]*. Auch die hochfrequente Stimulation des STN und GPi konnte zu einer Verbesserung der motorischen Defizite des Parkinson-Syndroms beitragen *[82,83]*.

Der Einsatz der HFS in anderen Bereichen der neurologischen Medizin ist noch weitgehend unbekannt. Vor allem der Einfluss der Tiefenhirnstimulation auf das Gedächtnis wurde bisher nur in einzelnen Studien untersucht. So demonstrierten Hälbig et al. *[84]*, dass HFS des STN in Patienten mit Parkinson die Lern-Performance beeinflusst. Während das deklarative Gedächtnis durch die STN-Stimulation beeinträchtigt wurde, konnte eine Verbesserung des nicht-deklarativen Gedächtnis' beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der STN eine spezielle Rolle in der Aktivierung der Lern- und Gedächtnis-Systeme spielen muss und dass diese Funktion des STN durch HFS beeinflusst wird. Funkiewiez und Kollegen *[85]* führten Tests durch, in denen der STN von Parkinson-Patienten bilateral hochfrequent stimuliert wurde. Hier konnten jedoch keine Effekte der HFS auf das Lernverhalten der Patienten beobachtet werden. Hamani et al. *[86]* führten Lernversuche mit Ratten durch und konnten demonstrieren, dass HFS des vorderen Thalamus zu einer Beeinträchtigung des Gedächtnis' führt.

HFS des Nucleus caudatus

Da Untersuchungen möglicher Effekte der HFS auf das Gedächtnis nur in geringer Zahl existieren und teilweise widersprüchlich sind, wurde die genaue Betrachtung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen elektrischer Stimulation und Beeinflussung des Gedächtnis' zum Thema dieser Arbeit. Da diese Studie ein völlig neues Konzept beinhaltet und somit Teil der Grundlagenforschung ist, wurden Ratten als Versuchsobjekte genutzt. Da Ratte und Mensch jedoch ähnliche Genome besitzen, könnten eventuelle Resultate dieser Arbeit als Grundlage für weitere humane Experimente im Bereich striataler HFS bei Gedächtnis-involvierten neurologischen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, genutzt werden.
Eine zentrale Rolle dieser Arbeit nahm der Nucleus caudatus ein. Die Motivation, diesen Kern der Basalganglien als Stimulationsziel zu verwenden, geht dabei auf frühere Arbeiten zurück, in denen der Nucleus caudatus erstmals hochfrequent stimuliert und zelluläre Effekte nachgewiesen werden konnten. So zeigten Li et al. und Hiller et al. in *in vitro* und *in vivo* Versuchen, dass die striatale HFS zu einer lokalen, extrazellulären GABA-Ausschüttung führt *[40-42]*. Da der Nucleus caudatus, wie bereits im Abschnitt 1.2 ausführlich beschrieben, eine wichtige Rolle im Prozess des prozeduralen Gedächtnis' spielt, könnte nun angenommen werden, dass die striatale HFS auch Auswirkungen auf das prozedurale Lernen besitzt.

Arbeitshypothese

In früheren Arbeiten konnte, wie eben erwähnt, nachgewiesen werden, dass striatale HFS eine erhöhte lokale Ausschüttung des inhibitorisch wirkenden NTM GABA hervorruft. Diese Arbeit stellt nun die Hypothese auf, dass die erhöhte GABA-Konzentration im Nucleus caudatus Effekte auf prozedurale Lernprozesse in der Ratte zeigt. Da solch eine Studie mit genau diesen Parametern noch nie zuvor durchgeführt wurde, kann keine Behauptung über eine positive oder negative Beeinflussung des prozeduralen Gedächtnis' durch die striatale HFS aufgestellt werden, lediglich Auswirkungen der HFS auf den prozeduralen Lernprozess angenommen werden.

2. Methoden

2.1 Versuchsobjekte

2.1.1 Motivation zur Verwendung von Ratten als Versuchsobjekte

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen hochfrequenter Stimulation des Nucleus caudatus auf das prozedurale Gedächtnis. Da diese Fragestellung bisher noch nicht untersucht wurde, liegt die Studie im Bereich der Grundlagenforschung. In diesem Bereich der Forschung werden oft Mäuse und Ratten genutzt, um bestimmte Parameter zu erforschen. Die für diese Versuche am besten geeigneten Tiere waren Ratten, da diese eine leichte Haltung und ein einfaches Handling aufweisen, eine hohe Reproduktionsrate haben, ein menschenähnliches Genom besitzen und einen Nucleus caudatus vorweisen, der in seiner Größe ein gutes Ziel darstellt und durch eine hohe Dichte an striatalen GABAergen Neuronen charakterisiert ist. Mäuse hingegen haben aufgrund ihrer Größe einen kleineren Nucleus caudatus und ein schwierigeres Handling, sodass sie für diese Arbeit als nicht geeignet erschienen. In den letzten Jahren haben sich in der Forschung verschiedene Ratten-Stämme etabliert, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. In dieser Arbeit wurden Tiere des Wistar-Stammes verwendet, da sie eine geringe Inzidenz-Rate von Spontan-Tumoren aufweisen, wenig aggressiv in ihrem Verhalten sind und somit ein leichtes Handling ermöglichen *[87]*.

2.1.2 Unterbringung der Ratten

Für diese Arbeit wurden insgesamt 81 Wistar-Ratten verwendet, die ein Gewicht von 300g ± 50g aufwiesen und einzeln in transparenten Makrolon-Käfigen (42cm × 26cm × 15cm) mit einem Tag (Licht)-Nacht (Dunkelheit)-Zyklus von 12-12 Stunden, konstanter Raumtemperatur von 22 ± 1℃, einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5% und Wasser *ad libitum* gehalten wurden. Des Weiteren hatten alle Tiere bis auf eine Versuchsgruppe (futterdeprivierte Ratten) unbegrenzten Zugang zum Futter.

Da sich diese Arbeit aus zwei Studien zusammensetzt, die in unterschiedlichen Ländern durchgeführt wurden, war die Herkunft der Ratten verschieden. Die Versuche, die Verhaltensbeobachtungen im Plus Maze beinhalteten und an der Universität zu Lübeck (Deutschland) durchgeführt wurden, umfassten insgesamt 36 Wistar-Ratten des Züchters Ch. River (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). An der Universität Strasbourg (Frankreich) wurden Verhaltensversuche, die das Double H Maze als Verhaltensmethode beinhalteten, mit insgesamt 45 Ratten des Züchters Janvier (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, France) durchgeführt.

2.1.3 Aufteilung der Ratten in verschiedene Tiergruppen

Da diese Arbeit aus zwei Studien besteht, war auch die Aufteilung der Tiere in verschiedene Gruppen innerhalb dieser Versuche unterschiedlich. In der Studie an der Universität zu Lübeck wurden die Tiere in zwei Hauptgruppen eingeteilt, futterdeprivierten Tiere (FD) und Tiere mit Futter *ad libitum* (AdL). Die AdL-Ratten hatten stets Futter zur Verfügung, während die FD-Ratten pro Tag nur eine Futter-Ration von 14-16g erhielten, um ihr Gewicht auf 85% des Ausgangsgewichtes zu reduzieren und auf diesem Niveau zu halten. Beide Ratten-Gruppen wurden weiter eingeteilt in stimulierte Ratten (STIM), deren linker Nucleus caudatus stimuliert wurde, und Ratten, die ebenso wie die STIM-Ratten operiert wurden und eine Elektrode in den linken Nucleus caudatus gesetzt bekamen, jedoch nicht stimuliert wurden (SHAM). In den Versuchen, die an der Universität Strasbourg durchgeführt wurden, hatten alle Tiere Futter *ad libitum*. Die Ratten wurden hier eingeteilt in stimulierte Ratten (STIM), operierte aber nicht stimulierte Ratten (SHAM) und nicht operierte Ratten (CONT). Die Tierexperimente beider Studien wurden streng nach den deutschen (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein; Projekt V312-72241.122-20), französischen (Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; Projekt 67-215) und internationalen Tierschutzgesetzen und -Richtlinien (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) durchgeführt.

2.2 Implantation der Führungskanüle

Der linke Nucleus caudatus der Ratte wurde in dieser Arbeit hochfrequent stimuliert. Um die richtige Position der Stimulationselektrode garantieren zu können und ein Verschieben der Elektrode im Hirn der Ratte zu vermeiden, wurde dem Tier eine Führungskanüle implantiert. Da diese Implantation eine große Operation darstellt, die die Trepanation des Schädels beinhaltet, wurde die Ratte zunächst anästhesiert. Dazu wurden die Narkose-Mittel Ketamin (82.5mg/kg) und Xylazin (11.0mg/kg) intraperitoneal (*ip*) injiziert und die Wirkung der Anästhesie mittels des Zwischenzehen- und Umdrehreflexes kontrolliert. Um die Körpertemperatur des Tieres konstant (37℃) zu halten, wurde das Tier mit einer Isolierdecke umwickelt. Die Augen wurden mit einer Augencreme bedeckt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Das Kopffell der Ratte wurde entfernt und der Kopf anschließend in einen Stereotaxierahmen gespannt, indem die Interauralstifte in die Gehörgänge der Ratte eingeführt und mittig fixiert wurden. Der Oberkiefer wurde auf dem höhenverstellbaren Schneidezahn-Bügel arretiert, der in seiner Höhe so geändert wurde, dass der Kopf der Ratte in einer flachen Position lag. Die Kopfhaut wurde anschließend mit Sterlon desinfiziert und lokal mit Xylocain betäubt. Nun wurde mit einem Skalpell ein sagittaler Schnitt von der Mitte des Frontalknochens bis zur Interaurallinie durchgeführt, um anschließend die beiden Kreuzungspunkte der Sutura coronalis und Sutura sagittalis, Lambda und Bregma, freizulegen (siehe Abbildung 14).

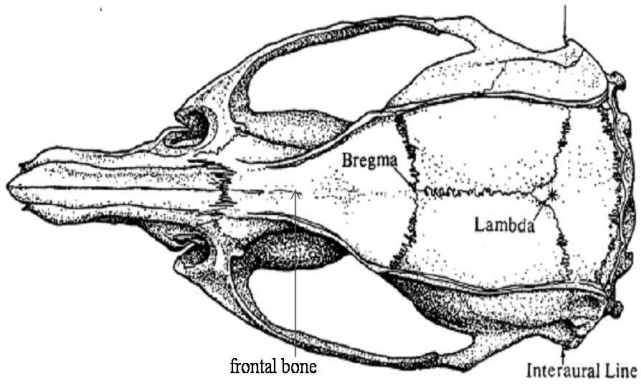


Abbildung 14: In der dorsalen Ansicht des Rattenschädels nach Paxinos und Watson [88] sind Lambda und Bregma, die beiden Kreuzungspunkte der Sutura coronalis und Sutura sagittalis, dargestellt.

Anschließend wurden die Koordinaten für die Führungskanüle oberhalb des linken Nucleus caudatus am Stereotaxierahmen eingestellt. Diese Koordinaten wurden nach dem Ratten-Hirnatlas von Paxinos und Watson *[88]* ermittelt und waren wie folgt: anterior-posterior (AP) -0,26mm und medial-lateral (ML) +3mm relativ zu Bregma sowie dorsal-ventral (DV) -1mm ausgehend von der Schädeldecke. Dieser Trepanationspunkt auf dem Schädel wurde markiert, um anschließend an genau dieser Stelle ein Loch mit einem Durchmesser von 0.7mm für die Führungskanüle zu bohren. Des Weiteren wurden zwei Löcher temporal-dextral und temporal-sinistral von der Trepanationsstelle gebohrt, um dort zwei Fixierschrauben einzusetzen (siehe Abbildung 15). Die unter dem Schädel auf dem Hirn liegende Dura mater wurde mit einer Kanüle durchstochen und die auftretende Blutung gestillt. Im nächsten Schritt wurde die Führungskanüle 1mm ausgehend von der Schädeldecke in das Hirn des Tieres abgesenkt. Die Führungskanüle und beide Fixierschrauben wurden in dieser Position mit kalthärtendem Kunststoff fixiert und die Ratte nach anschließender Aushärtung des Kunststoffes aus dem Stereotaxierahmens entnommen.

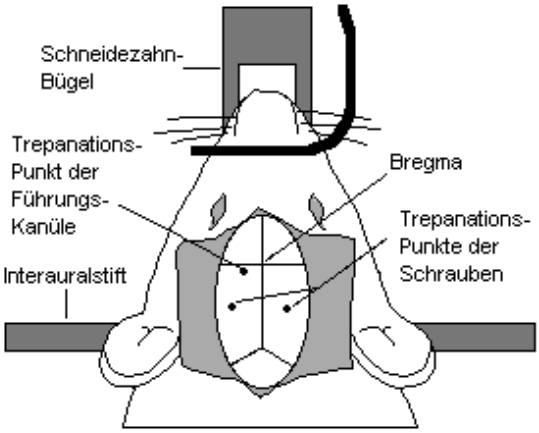


Abbildung 15: Darstellung der Trepanationspunkte der Führungskanüle und der Fixierschrauben auf dem Schädel der Ratte (modifizierte Abbildung von Phebus et al. [89]).

Am Ende der Operation wurde die Ratte in ihren mit Licht erwärmten Käfig gelegt und ihr Zustand bis zum Erwachen ständig überprüft. Dem Tier wurde eine Erholungszeit von der Operation bis zum ersten Experiment-Schritt von 10 Tagen gewährt.

2.3 Verhaltensversuche – Plus Maze und Double H Maze

Eine zentrale Rolle in dieser Arbeit nahm die Beobachtung und Auswertung des Lernverhaltens und Gedächtnis' von Ratten ein, um eventuelle Effekte der striatalen HFS auf das prozedurale Gedächtnis, das durch den Nucleus caudatus gefördert wird, untersuchen zu können.
Zunächst musste der Beobachter eine oder mehrere Methoden auswählen, mit der er das Verhalten der Tiere analysieren will. Es ist dabei von Vorteil, mehrere Methoden für die Verhaltensanalyse einzusetzen, um eventuelle Grenzen eines einzelnen Testes durch einen zweiten zu erweitern. Des Weiteren kann durch zwei unterschiedliche Tests gezeigt werden, dass die Ergebnisse auf das Verhalten und nicht auf die Tests an sich zurückzuführen sind. Die hier verwendeten Methoden waren das Plus Maze und das Double H Maze, da sie sich in bereits früheren Arbeiten für die Untersuchung von Lernverhalten und Gedächtnis genutzt und als geeignete Modelle eingestuft wurden *[90-94]*. Diese Methoden sollen hier nur genannt werden, da sie in den Abschnitten 3 und 4 ausführlich behandelt werden. Das Verhalten der Tiere konnte nun mit Hilfe dieser Tests erfasst und in einzelne Beobachtungen eingeteilt werden. Im letzten Schritt wurden diese Verhaltensbeobachtungen ausgewertet und die Tiere hinsichtlich ihres Verhaltens miteinander verglichen.

Es ist wichtig, dass jede Beobachtung und Auswertung auf dieselbe Art und Weise stattfindet. Dazu sollte man im Voraus bestimmte Parameter, wie zum Beispiel die Uhrzeit des Beobachtens und den Umgang (Handling) mit den Tieren, festlegen und davon auch nicht abweichen, da die Aktivität der Tiere von der Tageszeit abhängig ist und das Verhalten durch den Experimentator beeinflusst werden kann, sodass ein Vergleich zwischen den einzelnen Ratten nicht mehr möglich wäre. In dieser Arbeit wurde stets von 10:00 Uhr bis 11:00 Uhr das Verhalten beobachtet. Das Handling der Tiere wurde stets von ein und derselben Person durchgeführt und auch alle anderen Schritte waren stets dieselben, so dass ein Vergleich der Lernfähigkeit zwischen den Ratten erfolgen konnte *[95]*.

2.4 Hochfrequenzstimulation des linken Nucleus caudatus

In früheren Arbeiten *[40-42]* konnte gezeigt werden, dass hochfrequente Stimulation des Nucleus caudatus der Ratte *in vitro* und *in vivo* zu einem gesteigerten basalen GABA-Ausfluss und einer damit verbundenen sinkenden Dopamin-Konzentration führt. In dieser Arbeit wollten wir die Auswirkungen der striatalen HFS auf das prozedurale Gedächtnis, das durch den Nucleus caudatus geregelt wird, untersuchen. Des Weiteren sollten mögliche Langzeiteffekte der HFS auf die GABA-Konzentration des Nucleus caudatus betrachtet werden. Dazu wurde der linke Nucleus caudatus der Ratte nach jedem Training im Plus Maze bzw. im Double H Maze stimuliert.

In dieser Arbeit wurde eine Stimulationselektrode der Firma FHC (genaue Bezeichnung siehe Anhang/Material- und Geräteverzeichnis) mit einer Platin-Iridium-Legierung genutzt, da diese durch Kombination der beiden Edelmetalle Platin und Iridium, wie bereits in Abschnitt 1.4.4 erwähnt, einen natürlichen Korrosionsschutz, eine hohe Stabilität und eine hohe Speicherkapazität aufwies und somit eine ideale Stimulationselektrode darstellte. Des Weiteren war die hier verwendete Elektrode durch einen konzentrischen, bipolaren Aufbau gekennzeichnet. Da in dieser Arbeit nur ein bestimmter Bereich des Gehirns und somit eine begrenzte Menge an Neuronen stimuliert werden sollte, war es notwenig, die bipolare Stimulation einzusetzen (siehe Abschnitt 1.4.5). Die Kathode befand sich im Innern der Elektrode und besaß einen Durchmesser von 75µm. Die Anode hingegen hatte einen Durchmesser von 250µm und umschloss die Kathode konzentrisch. Die Stimulationselektrode besaß eine Gesamtlänge von 30mm und eine Spitze, die in einem Winkel von 60° abgesc hrägt war (siehe Abbildung 16). Der Vorteil einer abgeschrägten Elektrodenspitze liegt in der relativ großen Fläche der Spitze und der damit verbundenen größeren Ladungskapazität. Des Weiteren wird durch Implantation einer abgeschrägten Elektrode in das Gehirn weniger Gewebe zerstört als bei Einführen einer glatten Elektrodenspitze.

Abbildung 16: Darstellung der Spitze der Stimulations-Elektrode, die einen abgeschrägte Form besitzt und somit weniger schädlich für das Hirngewebe der Ratte ist.

Die Stimulationselektrode war mit einem Signalgenerator der Firma WPI (genaue Bezeichnung siehe Geräte- und Materialienverzeichnis) verbunden, der im Modus „free run“ kontinuierlich positive Rechtecksignale mit einer Pulsfrequenz von 124Hz, einer Pulslänge von 60µs und einem Intervall zwischen den Pulsen von 8ms generierte (siehe Abbildung 17). Die hierbei verwendete Stromstärke lag konstant bei 0.5mA und die Ladung betrug 30nC/Phase. Diese Stimulationsparameter wurden gewählt, da sie in vorangegangenen Untersuchungen *[42]* Auswirkungen auf das umliegende Gewebe zeigten und somit einen Stimulationseffekt auf zellulärer Ebene garantierten. Die Feineinstellung dieser Signale erfolgte durch Kontrolle mit einem Oszilloskop, das über eine Sonde mit dem Signalgenerator verbunden war.

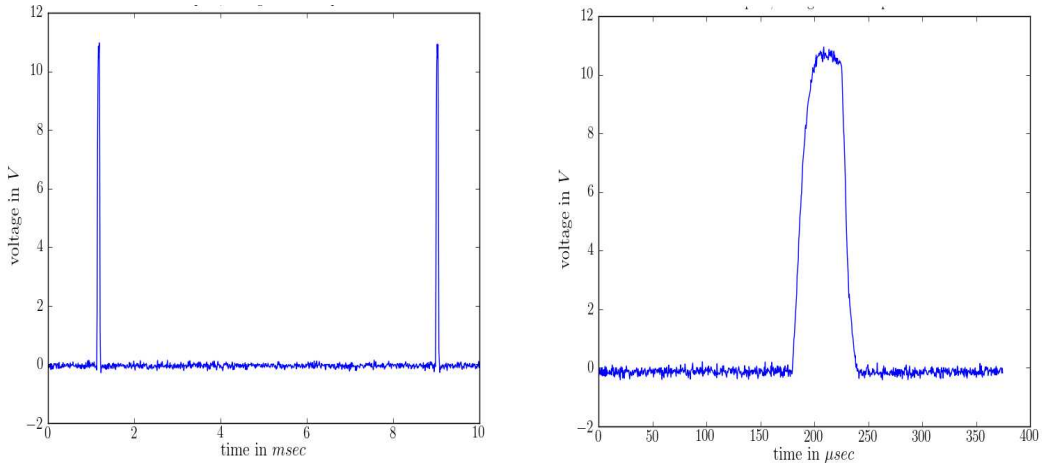


Abbildung 17: Darstellung des Stimulationssignals bei einer konstanten Stromstärke von 0,5 mA und einer Frequenz von 124Hz mit einem Signalintervall von 8ms (linke Abbildung) und einem Puls von 60µs (rechte Abbildung).

Die Stimulationselektrode wurde mittels Führungskanüle an die richtige Position im Nucleus caudatus geleitet (AP -0,26mm und ML +3mm relativ zu Bregma; DV -5mm ausgehend von der Schädeldecke; siehe Abschnitt 2.2), und so befestigt, dass sie während der Stimulation nicht abfiel. Die Stimulation fand an allen drei Trainingstagen jeweils nach dem Training, zwischen 11 und 15 Uhr, statt. Der linke Nucleus caudatus der Ratte wurde pro Tag vier Mal für 20 Minuten hochfrequent stimuliert.

2.5 Autopsie und Histologie

Während der Experimente zu dieser Arbeit wurden zehn Tiere für die Histologie verwendet, um die Position der Elektrode im linken Nucleus caudatus zu kontrollieren. Diese geringe Anzahl an Tieren, die für die Überprüfung genutzt wurde, kam dadurch zustande, dass neben den Auswirkungen von striataler HFS auf das Verhalten auch mögliche Langzeiteffekte der HFS auf Neurotransmitter-Systeme untersucht wurden. Um bei der NTM-Auswertung ein genaues, aussagekräftiges Ergebnis erhalten zu können, wurde dafür der größte Teil der Ratten verwendet, während eine geringere Anzahl an Tieren für die Histologie genügte.
Bei der für die NTM-Analyse (siehe Abschnitt 2.6) notwendigen Autopsie wurde die Ratte mit CO_2 vergiftet und anschließend dekapitiert. Linker und rechter Nucleus caudatus des Tieres wurden entnommen und bis zur NTM-Analyse bei -80°C gelagert. Für die Histologie wurde die Ratte mit 2ml Pentobarbital *ip* euthanasiert und umgehend perfundiert, indem 50ml Formaldehyd durch die Herzaorta in den Körper des Tieres gegeben und das Blut somit aus dem Gehirn gespült wurde. Das Hirn wurde entnommen, zwei Stunden bei 4°C in Formaldehyd gelagert und anschließend für 48 Stunden in Saccharose gelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Hirn mit Hilfe von -40°C kaltem Isopentan für eine Minute schockgefroren und anschließend mit einem Cryostat bei -20°C in 40µm dicke Scheiben geschnitten. Diese Hirnschnitte wurden auf einen Objektträger gegeben und mit der Kresyl-Violett-Färbung markiert. Anschließend konnte die Position der Elektrode im linken Nucleus caudatus unter einem Lichtmikroskop kontrolliert werden.

2.6 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

2.6.1 Messprinzip

Unter dem Begriff der Chromatographie versteht man die Auftrennung eines Substanzgemisches zwischen zwei Phasen in dessen Einzelkomponenten. Ein Verfahren dieser Stofftrennung ist die Hochdruckflüssigchromatographie (kurz HPLC: **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography), die sich aus einer mobilen Phase und einer stationären Phase zusammensetzt. Eine Form der Phasentrennung der HPLC, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die Reversed-Phase-Chromatographie.
Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man Silane, welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden (hier Octadecylsilan, C18), mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt (engl.: "reversed"). Die mobile Phase wird dargestellt durch eine polare Lösung, den sogenannten Eluenten. Da wir in dieser Arbeit verschiedene NTM-Systeme betrachteten, wurden zwei verschiedene Eluenten verwendet. Für die NTM Dopamin, DOPAC, HVA, Serotonin und HIAA wurde der Eluent 4 genutzt, während für die Analyse von GABA und Glutamat der Eluent 5 verwendet wurde. Die genaue Zusammensetzung der Eluenten ist dem Anhang/Material- und Geräteverzeichnis zu entnehmen.

Die mobile Phase trägt während des Trennvorganges die Probe, die unter hohem Druck durch die stationäre Phase transportiert und in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt wird. Die verschiedenen Komponenten der Probe gelangen an die Säule und je nach Affinität verweilen sie für unterschiedliche Zeiten an der stationären Phase. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen der Probe und der Säule, die je nach Polarität der Komponente über einen kurzen oder langen Zeitraum bestehen bleiben. Während Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen (zum Beispiel Hydroxygruppe) schnell von der stationären Phase getrennt werden, verweilen stark hydrophobe Moleküle länger an der Säule. Die Probe wird in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt.

Durch diese Redox-Reaktion entsteht ein Strom, der durch den nachgeschalteten elektrochemischen Detektor erfasst und mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet werden kann. Die chromatographischen Signale der Einzelkomponenten werden im Computer als Kurven, sogenannte Peaks, dargestellt (siehe Abbildung 18). Mit Hilfe der Zeit, die zwischen dem Anfang der Probenanalyse und der Detektion des Peaks vergangen ist, der sogenannten Retentionszeit eines Peaks, kann der Nachweis der jeweiligen Substanz erfolgen. Die Retentionszeit der zu definierenden Komponente wird dabei mit Retentionszeiten bekannter Testsubstanzen, den sogenannten Standards, verglichen und dem jeweiligen Standard zugeordnet. Mit Hilfe der Peakhöhen können die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen in der vorliegenden Probe bestimmt werden *[96]*.

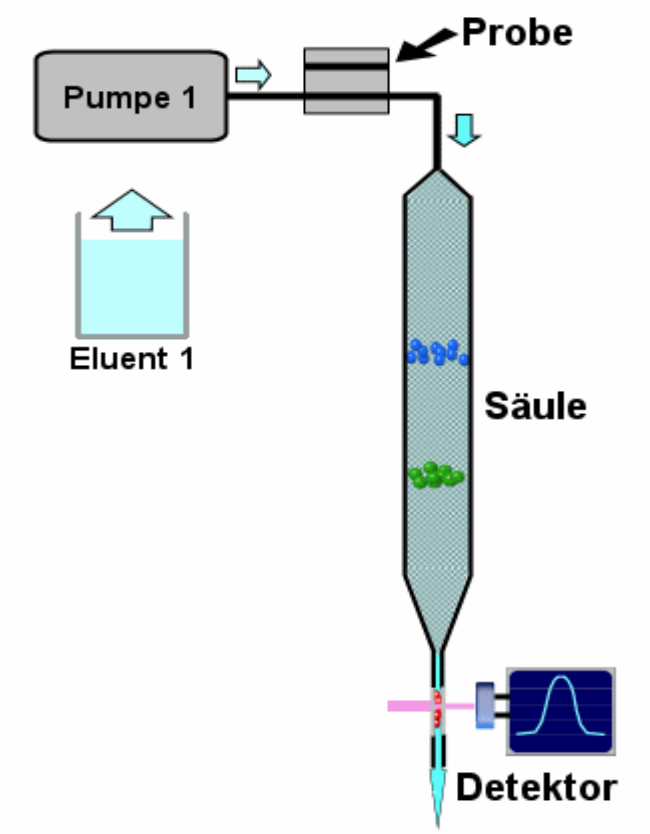


Abbildung 18: Darstellung des Prinzips der HPLC. Die Probe wird an der Säule in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt. Der dabei entstehende Strom wird über einen Detektor erfasst und die chromatographischen Signale der Komponenten als Peaks dargestellt (modifizierte Abbildung von Hübl [97]).

2.6.2 Probenaufarbeitung

Der bis zur Durchführung der HPLC bei -80℃ gelagerte Nucleus caudatus der Ratte wurde in einen gekühlten 1ml-Hand-Homogenisator gegeben, das Gewicht ermittelt und anschließend mit einer 50fachen Menge an Phosphatpuffer und 1/10 der Puffermenge an Perchlorsäure versetzt und eine Minute homogenisiert. Dieses Gemisch wurde 10 Minuten bei 4℃ und 1200xg zentrifugiert und der Überstand, der das Extrakt darstellt, in zwei Eppendorf-Gefäße überführt. Durch Zentrifugation und Zugabe der Perchlorsäure wurden die Neurotransmitter von dem Hirn-Gewebe gelöst und lagen nun in reiner Form im Extrakt vor. Dieses Extrakt wurde direkt in die HPLC-Anlage injiziert, um die Neurotransmitter Dopamin, DOPAC, HVA, Serotonin und HIAA zu messen.

Für die Analyse von Glutamat und GABA musste das Extrakt zunächst derivatisiert werden. GABA und Glutamat sind Aminosäuren, die außerhalb ihres isoelektrischen pH-Wertes in polarer Form vorliegen. Um eine optimale Adsorption an die feste Phase zu erreichen und spätere elektrochemische Detektion zu ermöglichen, ist eine Derivatisierung der Substanzen nötig. Eine stabile und sensitive Derivatisierungsmethode für die Analyse von GABA und Glutamat ist die ortho-Phthaldialdehyd(OPA)-Sulfit-Derivatisierung nach Smith und Sharp *[98]*. Bei dieser Methode wurden 100µl des Extraktes mit 2µl OPA versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte diese so behandelte Lösung in die HPLC-Anlage injiziert werden.

Die einzelnen Neurotransmitter wurden nun elektrochemisch detektiert. Der Computer stellte die Peaks der einzelnen Komponenten dar und mit Hilfe der vorher aufgezeichneten Peaks der Standards konnte jeder Neurotransmitter seinem Peak zugeordnet werden. Durch Vergleiche mit den Standards konnten die Konzentrationen der zu messenden Substanzen ermittelt werden.

2.6.3 Standards

Um den einzelnen Peaks im entstandenen Chromatogramm einen bestimmten Neurotransmitter zuweisen zu können, ist es von Nöten, weitere Substanzen in der HPLC-Anlage laufen zu lassen, deren Peaks bekannt sind (siehe Abbildung 19). Solche Substanzen werden als Standards bezeichnet und ermöglichen den Vergleich und die damit verbundene Auswertung der unbekannten Peaks. Standards werden zum großen Teil in der Industrie hergestellt und können, wie in diesem Fall, von dort erworben werden.

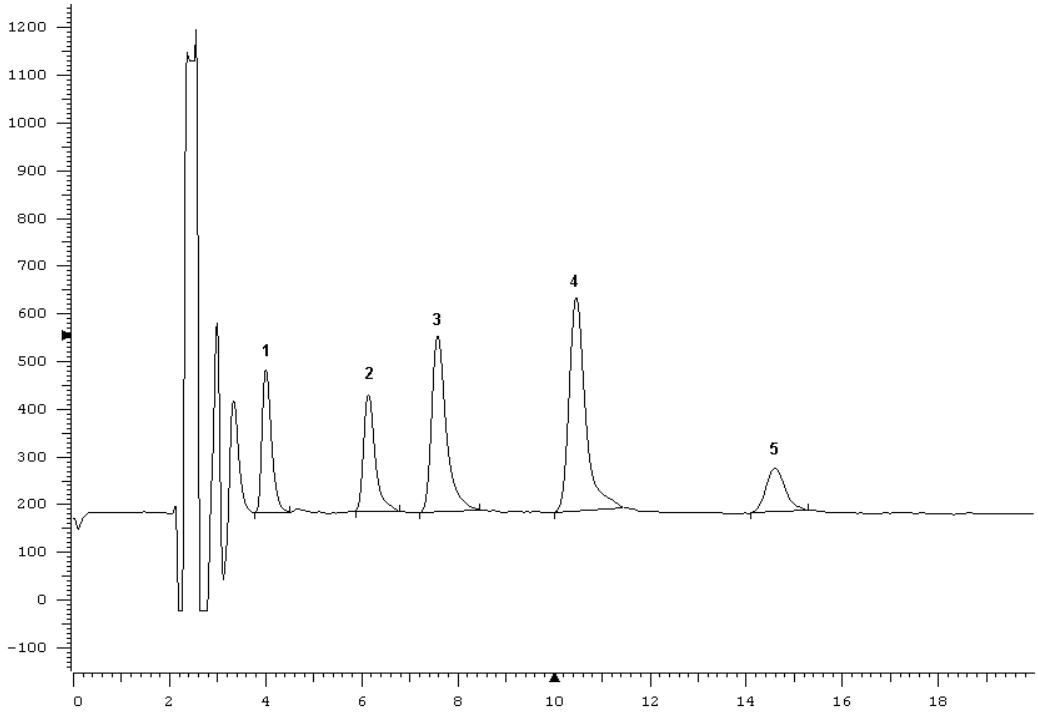


Abbildung 19: Darstellung der einzelnen Peaks für die fünf Standards von Dopamin (1), DOPAC (2), Serotonin (3), HIAA (4) und HVA (5).

In dieser Arbeit wurden die Standards Dopamin, DOPAC, HVA, Serotonin und HIAA mit einer Konzentration von 1µM verwendet, während die Standards Glutamat und GABA eine Konzentration von 0,25µM besaßen. Durch Vergleiche der Peakhöhen der einzelne NTM im Nucleus caudatus mit den Peakhöhen der jeweiligen Standards konnten unter Berücksichtigung der Verdünnung der Probe mit Phosphatpuffer und Perchlorsäure die NTM-Konzentrationen ermittelt werden *[96]*.

2.7 Statistische Auswertung der Daten

Für eine korrekte und signifikante Bewertung der Daten, die durch die Verhaltens- und Neurotransmitter-Analyse gewonnen werden konnten, wurde das Statistik-Programm Statistica (Version 8) der Firma Statsoft genutzt. Um die statistische Bewertung der Daten durchführen und somit Werte vergleichen zu können, mussten zunächst zwei Komponenten festgelegt werden, der feste Faktor und die abhängige Variable. Der feste Faktor für die Daten der Neurotransmitter-Analyse war die Tiergruppe, die abhängige Variable wurde durch den jeweiligen Neurotransmitter dargestellt. Bei statistischer Bewertung der Daten der Verhaltensanalyse wurde der feste Faktor durch die Tiergruppe, die abhängige Variable durch den jeweiligen Versuchstag dargestellt.

Die verschiedenen Tiergruppen wurden zunächst mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianz-Analyse (englisch: analysis of variance, „ANOVA“) hinsichtlich ihrer Neurotransmitter-Werte und Verhaltens-Daten verglichen. Dafür wurden die einzelnen Mittelwerte der Tiere innerhalb und zwischen den einzelnen Gruppen untersucht. Bei Auftreten von Unterschieden zwischen den Mittelwerten wurde als nächstes der post hoc Test nach Newman-Keuls angewendet, um anzuzeigen, zwischen welchen Tieren und Gruppen signifikante Unterschiede vorliegen *[99]*. Dabei wurden die drei folgenden Signifikanz-Niveaus betrachtet und mit einem Symbol (*) gekennzeichnet:

* = $p < 0.05$, d.h. Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 5%

** = $p < 0.01$, d.h. Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 1%

*** = $p < 0.001$, d.h. Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 0,1%.

3. Studie 1

3.1 Charakteristik des Plus Maze

3.1.1 Testprinzip des Plus Maze

In der ersten Studie dieser Arbeit an der Universität zu Lübeck (Deutschland) wurde das Plus Maze als Methode eingesetzt, um Lernen und Gedächtnis der Ratte in Abhängigkeit der striatalen HFS zu untersuchen. Das Plus Maze wird in der Verhaltensforschung genutzt, um prozedurales und deklaratives Lernen sowie den unterschiedlichen Gebrauch dieser Lernformen bei Tieren zu analysieren *[90-92]*. Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Plus Maze-Aufgaben, Single-Lösungs-Aufgaben und Dual-Lösungs-Aufgaben *[93]*. In Single-Lösungs-Aufgaben im Plus Maze ist das Tier gezwungen, eine der beiden Lernstrategien, deklarativ oder prozedural, anzuwenden. Dabei kann der Experimentator die jeweilige Lernstrategie genau analysieren und durch Behandlung des Tieres (Medikamente, Stimulation, etc.) modifizieren. Bei Dual-Lösungs-Aufgaben hingegen kann das Tier zwischen den beiden Lernstrategien entscheiden, so dass ein eventuell unterschiedlicher Einsatz der verschiedenen Lernwege, unter anderem hervorgerufen durch spezielle Behandlungen (Medikamente, Stimulation, etc.), bewertet werden kann.

Das Prinzip des Plus Maze beruht auf einer positiven Verstärkung, der sogenannten Belohnung. Dem Tier wird ein bestimmtes Verhalten antrainiert, indem es eine Belohnung in Form von Nahrung im Plus Maze angeboten bekommt und so die Wahrscheinlichkeit, dass das Tier dieses Verhalten wiederholt, steigt. Dabei wird die Nahrung in einem Arm des Maze (siehe Abschnitt 3.1.3) platziert, das Tier an einer anderen Stelle in das Labyrinth gesetzt (Startposition). Das hier verstärkte Lernverhalten wird durch das Einprägen des Weges von der Startposition zur Nahrung dargestellt *[93]*. Für ein erfolgreiches Lernen im Plus Maze ist eine Diät der Tiere, die das Körpergewicht auf 85% senkt und auf diesem Niveau hält, unerlässlich. Die Tiere sehen den Schokoball im Maze als Belohnung an, da sie über einen längeren Zeitraum hungern und nun endlich Nahrung angeboten bekommen.

Als Kontrolle für die futterdeprivierten Tiere werden Ratten eingesetzt, denen Futter unbegrenzt zur Verfügung steht und den Schokoball als normale Nahrungsquelle wahrnehmen.

3.1.2 Aufbau des Plus Maze

Das Plus Maze ist ein Labyrinth, das etwa 80cm über dem Boden aufgestellt ist und einen kreuzförmigen Aufbau hat (siehe Abbildung 20). Dieses aus Holz gefertigte Kreuz besteht aus einer zentralen 20x20cm großen Plattform, von der vier jeweils 60cm lange Arme strahlenförmig abgehen: Arm Nord (N), Ost (O), Süd (S) und West (W). Da das Labyrinth in seinem Aufbau an ein „Plus“ erinnert, hat sich in der Verhaltensforschung der Name Plus-Labyrinth (englisch: Plus Maze) durchgesetzt *[93]*. Im Unterschied zu dem elevated Plus Maze, das für die Beobachtung und Analyse von Angst-Verhalten eingesetzt wird und aus zwei geschlossenen und zwei offenen Armen besteht *[100,101]*, sind im Plus Maze, das in dieser Arbeit verwendet wurde, alle Arme geschlossen, indem sie von etwa 20cm hohen Wänden umgeben sind.

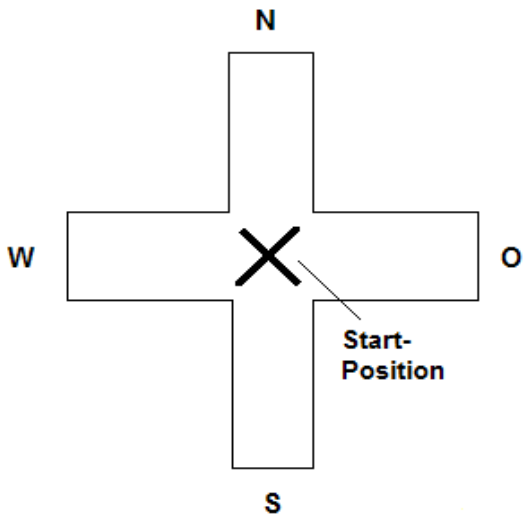


Abbildung 20: Darstellung des Plus Maze. Das Maze besteht aus einen Zentrum, von dem vier von Wänden umgebene (geschlossene) Arme strahlenförmig abgehen: Arm Nord (N), Ost (O), Süd (S) und West (W). Während der Gewöhnung sowie der Lern- und Testphase wird die Ratte in das Zentrum des Maze gesetzt (Startposition), um von dort den heller markierten Zielarm und die darin befindliche Belohnung in Form eines Schokoballes zu finden.

3.1.3 Plus Maze-Protokoll für das prozedurale Gedächtnis

Es ist bekannt, dass der Nucleus caudatus eine wichtige Rolle bei prozeduralen Lernprozessen spielt und an dem prozeduralen Gedächtnis maßgeblich beteiligt ist (siehe Abschnitt 1.2). Da in dieser Arbeit die Auswirkung hochfrequenter Stimulation des Nucleus caudatus der Ratte auf das Gedächtnis untersucht wurde, musste ein Protokoll für die Experimente erstellt werden, das für den Aufbau des prozeduralen Gedächtnis' verantwortlich ist.

Das hier angewandte Protokoll umfasste eine Gewöhnung an das Plus Maze sowie eine Lern- und eine Testphase. Während der Gewöhnung konnte sich die Ratte 10 Minuten frei im Plus Maze bewegen und die Arme des Maze erkunden. Während dieser Gewöhnung befanden sich an den Enden aller vier Arme des Maze kleine Schokobälle, die in unserem Experiment die Belohnung darstellten. Nach zwei Tagen der Gewöhnung erfolgte das Training. Die Ratte wurde während der Lernphase drei Tage in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen im Plus Maze trainiert, die Belohnung in einem bestimmten Arm (Zielarm) zu finden. Dieser Zielarm war durch eine helle Markierung gekennzeichnet und setzte sich so von den anderen drei dunkler markierten Maze-Armen gut erkennbar für die Ratte ab. Außerdem war er alternierend, das heißt, die Markierung des Zielarmes wurde nach jedem Lauf der Ratte aus dem Zielarm genommen und in einen anderen Arm, der vorher nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurde, eingesetzt. Das Tier sollte also lernen, die helle Markierung mit der Belohnung zu verbinden, nicht jedoch einen bestimmten Arm mit der Belohnung zu kombinieren. Die Ratte wurde während der Lernphase in die Mitte des Maze gesetzt (Startposition) und bekam eine Zeitspanne von 5 Minuten, um die Belohnung zu finden. War die Ratte in dieser Zeit erfolgreich, wurde sie nach Fressen des Schokoballes aus dem Maze entnommen. Konnte die Ratte in der vorgegebenen Zeit die Belohnung nicht finden, wurde sie erneut in die Mitte des Maze gesetzt und mit Hilfe des Experimentators in den Zielarm und zu

der Belohnung geführt. Auch hier wurde die Ratte erst nach Auffressen des Schokoballs aus dem Maze genommen.
Am vierten Tag erfolgte die Testphase, die identisch zu der Lernphase war, denn auch hier bekam die Ratte in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen von jeweils maximal 5 Minuten die Aufgabe, die Belohnung im Zielarm zu finden. Jedoch kann die Testphase unabhängig von der Lernphase betrachtet werden, da sie zur endgültigen Analyse des Lernverhaltens und des eventuell aufgebauten prozeduralen Gedächtnis' dient.

3.1.4 Statistische Bewertung der Verhaltensbeobachtungen im Plus Maze

Für eine korrekte Bewertung der Daten, die durch die Beobachtungen des Lernverhaltens der Ratten im Plus Maze gewonnen werden konnten, wurde die ANOVA verwendet. Zunächst wurden die beiden Tiergruppen STIM und SHAM auf Unterschiede innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Gruppen untersucht, indem die Mittelwerte miteinander verglichen wurden. Bei Auftreten von Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurde auch hier der Newman-Keuls-Test genutzt, um anzuzeigen, zwischen welchen Tieren und Gruppen signifikante Unterschiede vorliegen. Da dieser multiple Vergleichstest schon im Abschnitt 2.7 erklärt wurde, soll hier nicht weiter auf diesen Test eingegangen werden. Um den Newman-Keuls-Test korrekt anwenden zu können, wurde in dieser Auswertung die Tiergruppe als fester Faktor und der jeweilige Versuchstag als abhängige Variable festgelegt.

3.2 Ergebnisse der ersten Studie

3.2.1 Histologische Überprüfung der korrekten Elektroden-Position

Wie bereits in Abschnitt 2.5 erwähnt, wurden 10 Ratten verwendet, um die korrekte Position der Elektrode im Hirn der Ratte zu untersuchen. Auch die Überprüfung einer möglichen Gewebe-Schädigung durch die Stimulations-Elektrode konnte durch die Histologie überprüft werden. Um die Experimente optimal durchführen zu können und eventuelle Fehler während der Elektroden-Implantation oder der HFS korrigieren zu können, wurde diese Überprüfung bereits am Anfang der Studie durchgeführt.

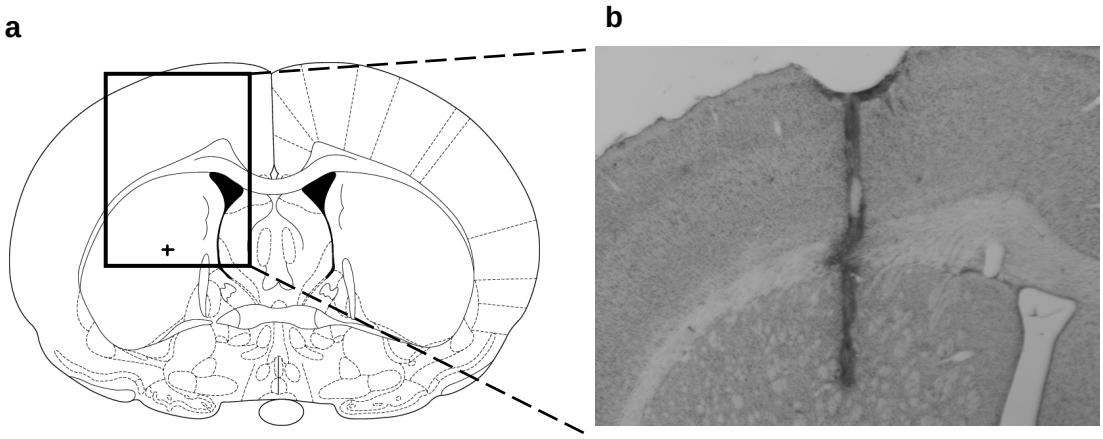


Abbildung 21: Position der HFS Elektrode im Rattenhirn. a) Die stereotaktischen Koordinaten für die HFS Elektrode im Rattenhirn waren AP -0.26mm und ML +3mm relativ zu Bregma, DV -5mm ausgehend von der Schädeldecke (Ermittlung der Koordinaten nach Paxinos and Watson [88]). b) In 9 von 10 Ratten konnte bis auf den Elektroden-Kanal keine Schädigung des umliegenden Gewebes durch die Elektrode und die HFS festgestellt werden. Des Weiteren besaß die HFS Elektrode in 8 von 10 Ratten die angestrebte Position.

Die Hirnschnitte der Ratten zeigten, dass die Elektrode keinen großen Schaden an dem umliegenden Gewebe angerichtet hatte (siehe Abbildung 21b). Bis auf den Elektroden-Kanal, der durch das Ein- und Ausführen der Elektrode entstand, konnte kein weiteres zerstörtes Gewebe ausfindig gemacht werden, denn die Elektrode besaß einen äußeren Durchmesser von 0.25mm, während bei 9 der insgesamt 10 Tiere ein Elektroden-Kanal von durchschnittlich 0.27mm gemessen werden konnte. Lediglich ein Tier, bei dem eine kleine Blutung auftrat, wies einen Elektroden-Kanal von 0.4mm auf.

Außerdem stimmten bei 8 der 10 Tiere die Elektroden-Positionen mit der von uns angestrebten Stelle für die Elektrode überein, die Abweichungen in dieser Region waren sehr gering (siehe Abbildung 21a). Die angestrebte Position im Hirn der Ratte war ap -0.26mm, bei diesen Tieren variierte die Stelle im Nucleus caudatus um +0.3mm und -0,1mm. Nur zwei Tiere wiesen eine Lage der Elektrode auf, die mit -0.7mm stark von der von uns angestrebten Stelle abwich.

3.2.2 Lernen und Gedächtnis im Plus Maze

Die Lernfähigkeit der Ratten im Plus Maze wurde analysiert, indem verschiedene Parameter des Verhaltens der Tiere im Maze während Lern- und Testphase betrachtet und ausgewertet wurden. Ein wichtiger Faktor war die Fehleranzahl, die die Ratte im Maze machte, bis sie den Zielarm und die darin liegende Belohnung fand. Dabei wurde die Anzahl der falsch betretenen Maze-Arme bis zum Eintritt in den richtigen Arm ermittelt (Fehler). Des Weiteren wurde die Zeit gemessen, die die Ratte von ihrer Startposition bis zum Finden der Belohnung im Zielarm benötigte (Latenzzeit). Außerdem wurde während der Lern- und Testphase der Ratte im Maze eine Verhaltens-Objektivierung durchgeführt, um das Verhalten des Tieres einschätzen zu können *[102]*. Hier wurden folgende Verhaltensweisen der Ratte im Plus Maze betrachtet und bewertet: starke Bewegung der Ratte im Maze (Lokomotion), Auf- und Abwippen des Rattenkopfes (Wippen), Drehverhalten der Ratte im Maze (Drehverhalten), unterbrochenes Schnüffeln entlang eines großen Bereiches des Maze (Schnüffeln), Aufstellen der Ratte auf die Hinterbeine (Aufstellen) und freies Bewegen der Ratte im Maze ohne Fixierung auf bestimmte Areale (freies Bewegen). Diese Verhaltensweisen wurden bewertet, indem sie als nicht vorhanden (0), schwach (1) oder stark ausgeprägt (2) eingestuft wurden. Je schwächer die Ausprägung der jeweiligen Verhaltensweise der Ratte im Plus Maze war, desto ruhiger verhielt sich die Ratte, da sie das Maze als gewohnte Umgebung wahrnahm und keine Angst davor zeigte.

Pro Tag wurden zwei Versuche im Plus Maze durchgeführt, aus denen für jede Ratte der Mittelwert gebildet wurde. Die Mittelwerte aller Ratten jeweils einer Gruppe wurden zusammengefasst, erneut ein Mittelwert gebildet und dessen Standardfehler berechnet. Der Standardfehler des Mittelwertes gibt dabei die durchschnittliche Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert an.

Die Ratten zeigten in ihrem Lernverhalten im Plus Maze keine signifikanten Unterschiede, sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 22). Stimulierte und scheinstimulierte futterdeprivierte Ratten (FD-Tiere) zeigten schon am ersten Tag eine sehr geringe Fehlerrate von durchschnittlich einem Fehler bis zum Finden der Belohnung, die jedoch bis zum vierten Tag, dem Testtag, kaum abnahm. Unterschiede zwischen STIM und SHAM traten hier nicht auf. Auch die stimulierten und schein-stimulierten gesättigten Ratten (AdL-Tiere) wiesen in der Fehlerrate keine Unterschiede auf. Beide Gruppen zeigten am ersten Tag etwa fünf Fehleintritte, am letzten Tag nur 2.5 Fehler bis zum Erreichen der Belohnung.

Es fällt auf, dass sich die FD-Ratten von Anfang an auf einem sehr geringen Fehlerniveau befanden, während die AdL-Ratten während des Lernens im Plus Maze ihre Fehlerrate reduzierten. Die Latenzzeit der AdL-Ratten lag mit etwa 120 Sekunden am Anfang des Versuches deutlich höher als bei den FD-Ratten, näherte sich in der Testphase (Tag 4) mit etwa 60 Sekunden an die Zeit der FD-Ratten an, die über die vier Tage des Versuches auf einem konstanten Niveau von etwa 40 Sekunden bis zum Finden der Belohnung blieben. Diese Unterschiede zwischen den Rattengruppen, die besonders während der ersten zwei Lerntage zu beobachten war, können durch fehlende Signifikanz lediglich als Tendenzen angesehen werden.

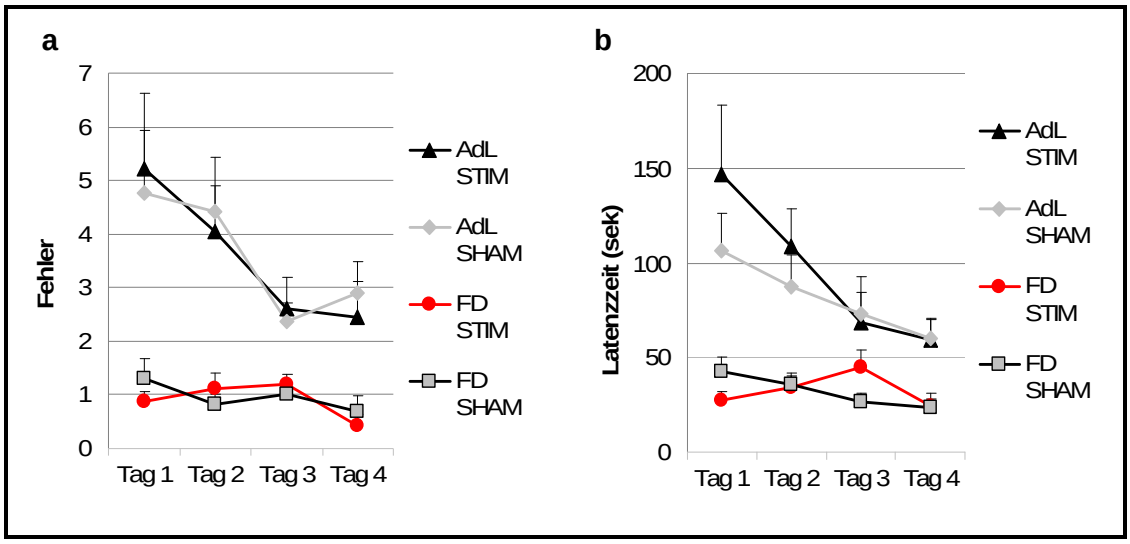


Abbildung 22: Die beiden Verhaltensparameter **a)** Fehler und **b)** Latenzzeit für die Performance der stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL STIM, n=9), der operierten aber nicht stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL SHAM, n=11), der stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD STIM, n=8) und der operierten aber nicht stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD SHAM, n=8) während der Lern- und Testphase im Plus Maze. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM).

Auch bei der Objektivierung konnten, wie in Abbildung 23 zu erkennen, keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen festgestellt werden. In den Verhaltensweisen Lokomotion, Wippen, Drehverhalten und Schnüffeln zeigten alle vier Tiergruppen keine Unterschiede, während die Tiere beim freien Bewegen und Aufstellen leichte Unterschiede aufwiesen, die jedoch nicht signifikant sind. Alle Ratten zeigten eine sehr starke Ausprägung der Verhaltensweisen Lokomotion und Drehverhalten und ein schwaches Auftreten des Kopfwippens und des Schnüffelns, die während der Lern- und Testphase kaum abnahmen. Das freie Bewegen im Plus Maze und das Aufstellen auf die Hinterläufe wurde von den AdL-Ratten etwas öfter ausgeführt als von den FD-Ratten. Jedoch konnte auch hier eine Veränderung der Verhaltensweisen vom ersten Tag bis zum vierten Testtag kaum festgestellt werden.

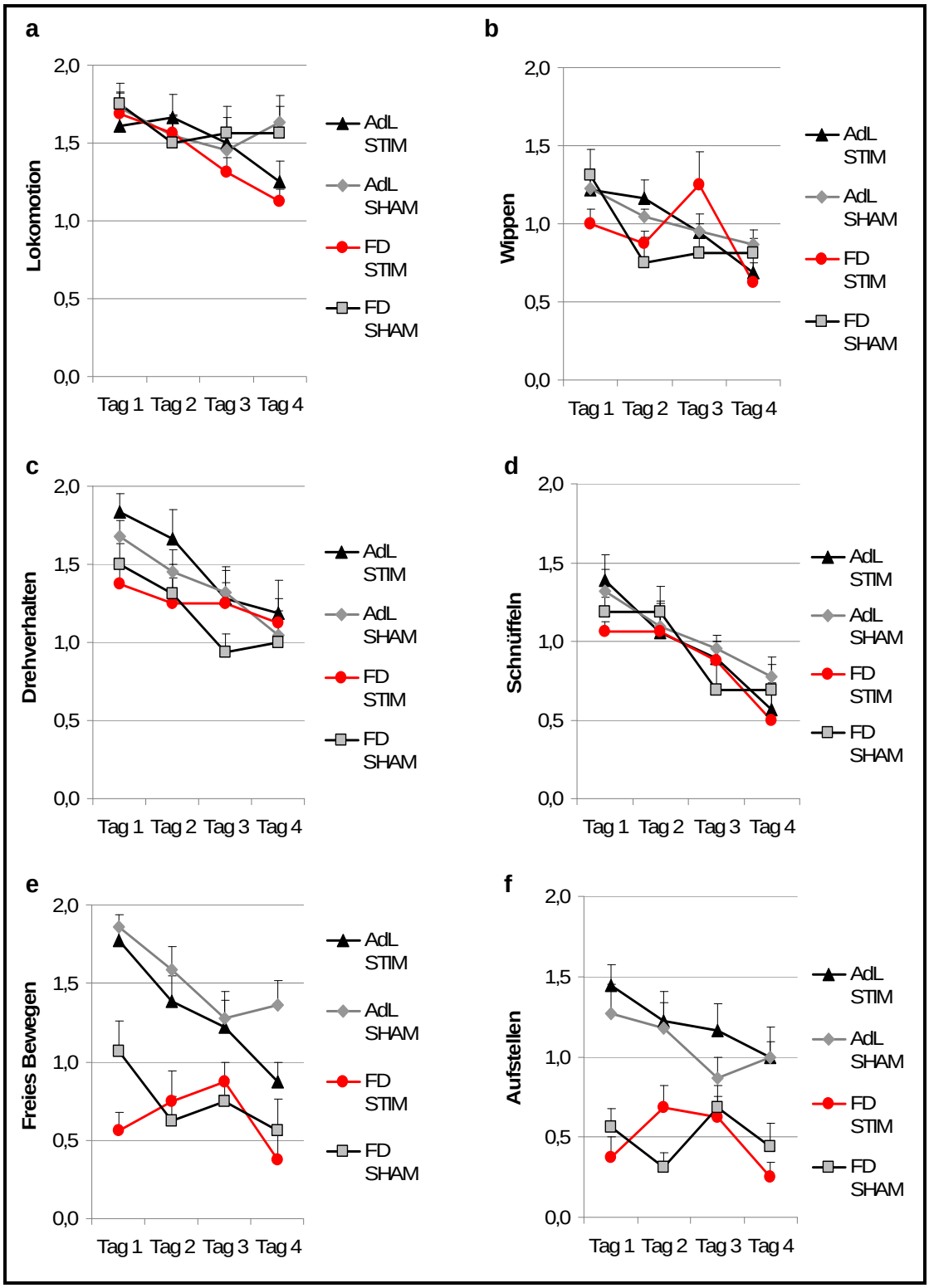


Abbildung 23: Übersicht der einzelnen Parameter der Verhaltensobjektivierung
a) Lokomotion, **b)** Wippen, **c)** Drehverhalten, **d)** Schnüffeln, **e)** freies Bewegen und **f)** Aufstellen der stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL STIM, n=9), der operierten aber nicht stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL SHAM, n=11), der stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD STIM, n=8) und der operierten aber nicht stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD SHAM, n=8) während der Lern- und Testphase im Plus Maze. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM).

3.3 Diskussion

3.3.1 HFS des Nucleus caudatus hat keine Auswirkungen auf das Verhalten im Plus Maze

In den einzelnen Parametern der Verhaltensobjektivierung konnten keine signifikanten Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den beiden Tiergruppen festgestellt werden. Stimulierte und schein-stimulierte AdL- und FD-Ratten wiesen am ersten Trainingstag eine mittlere bis starke Ausprägung der Verhaltensparameter Lokomotion, Drehverhalten, Wippen, Schnüffeln, freies Bewegen und Aufstellen innerhalb des Plus Maze auf. Es könnte also angenommen werden, dass die hochfrequente Stimulation des Nucleus caudatus keine Auswirkung auf das Verhalten der Ratten im Plus Maze hat. Allerdings muß diese Annahme vorsichtig betrachtet werden, da die Ratten aller Versuchsgruppen keine signifikante Verhaltensänderung im Verlauf des Trainings zeigten. Die STIM- und SHAM-Ratten der FD- und AdL-Ratten blieben in den sechs beobachteten Verhaltensweisen vom ersten Lerntag bis zum Testtag auf einem Niveau. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ratten sich schon während der Gewöhnungsphase, also zwei Tage vor dem eigentlichen Training, an das Maze gewöhnten und ein möglicher Effekt der striatalen HFS auf das Verhalten der Tiere nicht betrachtet werden konnte.

3.3.2 HFS des Nucleus caudatus hat keine Auswirkungen auf das prozedurale Lernen im Plus Maze

Innerhalb der futterdeprivierten Ratten wiesen die beiden Tiergruppen STIM und SHAM keinerlei Unterschiede in ihrem Lernverhalten im Plus Maze während Lern- und Testphase auf. Auch in der Gruppe der Ratten, denen uneingeschränkt Futter zur Verfügung stand, wiesen die STIM- und SHAM-Tiere keinerlei Unterschiede im Lernverhalten auf. Es könnte also angenommen werden, dass hochfrequente Stimulation des linken Nucleus caudatus sowohl in futterdeprivierten als auch gesättigten Ratten keinerlei Einfluss auf das prozedurale Lernen und Gedächtnis im Plus Maze hat.

Allerdings muss diese Annahme mit Vorsicht betrachtet werden, da auch ein signifikantes Lernverhalten der AdL- und FD-Tiere im Plus Maze nicht beobachtet werden konnte. Jedoch ist der Lernprozess eine wichtige Vorraussetzung für die Speicherung von Informationen und den Aufbau des Gedächtnis' (siehe Abschnitt 1.1.1). Aufgrund des fehlenden Lernverhaltens ist daher unklar, ob die durch diese Studie gewonnenen Ergebnisse auf die striatale HFS oder die Verhaltensmethode an sich zurückzuführen sind. Diese Fragestellung soll im Folgenden diskutiert werden.

Futterdeprivierte Ratten

Hungernde Ratten wiesen im Plus Maze eine sehr geringe Fehlerzahl und eine niedrige Latenzzeit bis zum Finden der Belohnung auf. Jedoch blieben die Tiere in diesen Parametern während des Trainings und der Testphase auf einem Niveau, sodass ein Lernprozess und eine damit verbundene Gedächtnis-Ausbildung im Hinblick auf den Ort der Belohnung im Maze nicht stattfanden. Dieses Ergebnis korreliert mit der Arbeit von Hughes et al. *[103]*, in der gezeigt werden konnte, dass futterdeprivierte und gesättigte Ratten in ihrem Lern- und Explorationsverhalten keinerlei signifikante Unterschiede aufweisen. Allerdings demonstrieren die meisten Untersuchungen auf dem Gebiet der Futter-Deprivation *[104-107]*, dass nicht gesättigte Ratten ein erhöhtes Lernen im Maze aufweisen, wenn die Belohnung als Nahrung dargstellt wird. Das fehlende Lernen der futterdeprivierten Ratten in unserem Versuch ist somit ein ungewöhnliches Ergebnis und könnte eventuell auf die Stimulations-Elektrode, nicht jedoch auf die HFS des Nucleus caudatus, zurückgeführt werden. Die Tiere beider Gruppen bekamen nach jedem Training die Elektrode eingesetzt, jedoch wurde nur die STIM-Gruppe hochfrequent stimuliert. Da allerdings Tiere der STIM- und SHAM-Gruppe keinerlei Unterschiede zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die HFS keinen Effekt auf den Lernprozess hatte. Jedoch könnte die Elektrode an sich einen größeren Schaden im Nucleus caudatus angerichtet haben, der zu einer Hemmung des Lernens führte. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die HFS-Elektrode keinen schädlichen Einfluss auf das umliegende Gewebe im Nucleus caudatus ausgeübt hatte (siehe Abschnitt

3.2.1). Um diesen Punkt endgültig klären zu können, bedarf es weiterer Experimente mit Ratten, die nicht operiert werden und somit keine Elektrode eingesetzt bekommen. Eine weitere mögliche Erklärung für das fehlende Lernen der FD-Ratten ist das Plus Maze-Protokoll. Eventuell könnte die Aufgabe, die Belohnung in einem speziell markierten Arm zu finden, zu einfach für die Ratten gewesen sein, sodass das Lernen innerhalb der beiden Versuche des ersten Trainings-Tages stattfand und ab dem zweiten Lerntag nur noch das Gedächtnis benutzt wurde. Weitere Untersuchungen mit einem Protokoll, das einen höheren Schwierigkeitsgrad beinhaltet, sind notwendig, um dies herauszufinden.

Gesättigte Ratten

Im Gegensatz zu den futterdeprivierten Ratten zeigten die gesättigten Tiere einen Lernprozess im Plus Maze. Sie wiesen zu Beginn der Experimente eine hohe Fehlerrate und eine hohe Latenzzeit bis zum Finden der Belohnung auf, die innerhalb der vier Tage im Plus Maze abnahm und auf ein ähnliches Niveau wie der der FD-Tiere sank. Allerdings kann dieses Lernverhalten nur angenommen, nicht aber bewiesen werden, da zwischen dem Verhalten der Ratten und den einzelnen Tagen keine Signifikanz vorherrschte. In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nicht nur futterdeprivierte Ratten, sondern auch gesättigte Tiere, die oft als Kontrollen für FD-Ratten genutzt werden, ein Lernen im Maze bei nahrungsgekoppelter Belohnung aufweisen *[107,108]*. Die in dieser Arbeit fehlende Signifikanz des Lernverhaltens könnte durch die geringe Gruppenzahl von 9 bis 11 Tieren erklärt werden. Allerdings werden in den meisten Studien, die sich mit Verhaltenstest befassen, Tiergruppen mit einer Zahl von 10 Tieren genutzt *[100,103,105,107]*, sodass die Anzahl der Tiere pro Gruppe in dieser Arbeit ausreichend sein sollte, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die fehlende Signifikanz könnte jedoch auch durch ein fehlerhaftes Plus Maze Protokoll erklärt werden. Es ist möglich, dass das Protokoll für die Lernversuche im Maze eine zu kurze Lernphase für die Ratten zuließ, sodass die Ratten nicht in der Lage waren, innerhalb von drei Tagen ein prozedurales Gedächtnis aufzubauen. Da jedoch die FD-Ratten keinerlei

Lernen aufwiesen, was eventuell auf den zu geringen Schwierigkeitsgrad des Lernprotokolls zurückzuführen ist, kann auch das Plus Maze an sich die falsche Methode für die Fragestellung dieser Arbeit gewesen sein.

3.3.3 Das Plus Maze – der falsche Verhaltenstest für diese Arbeit?

Die Verhaltensobjektivierung und das Betrachten des Lernverhaltens der Ratten im Plus Maze zeigten, dass die stimulierten und schein-stimulierten Tiere der gesättigten und futterdeprivierten Gruppe keine Unterschiede aufwiesen. Durch vorherige Diskussionen (siehe Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2) konnte bereits ein möglicher Einfluss der striatalen HFS auf diese Ergebnisse ausgeschlossen werden. Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass das Plus Maze mit einem zu geringen Schwierigkeitsgrad die falsche Methode für diese Arbeit darstellte.

Um zu klären, ob das Plus Maze eine zu leichte Aufgabe für die Tiere war und somit den falschen Verhaltenstest in dieser Arbeit darstellte, wurde eine weitere Studie durchgeführt. In dieser zweiten Studie wurde ein neuer Verhaltenstest angewendet, das Double H Maze. Es unterscheidet sich grundlegend vom Plus Maze, da es auf der Aversion der Ratten gegenüber Wasser basiert und die Tiere durch ein Entkommen aus dem Wasser belohnt werden. Das Futter spielte in dieser zweiten Studie somit keine entscheidende Rolle mehr. Des Weiteren wurde in Studie 2 eine dritte Tierversuchsgruppe eingeführt, die nicht operiert wurde und somit unbehandelt blieb. Durch diese dritte Rattengruppe sollte nachgewiesen werden, ob eventuelle Lerndefizite tatsächlich auf die HFS oder die Elektrode an sich zurückzuführen sind. Der genaue Ablauf und die daraus resultierenden Ergebnisse der zweiten Studie sind ausführlich in Kapitel 4 dargestellt und sollen daher hier nur erwähnt werden.

4. Studie 2

4.1 Charakteristik des Double H Maze

4.1.1 Testprinzip des Double H Maze

Nach Abschluss der Studie 1, die das Plus Maze als Verhaltensmethode beinhaltete, wurden weitere Experimente mit einem neuen Verhaltenstest, dem Double H Maze, durchgeführt, um die zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse der ersten Studie bestärken oder auch widerlegen zu können. Versuche zu diesem zweiten Test wurden an der Universität Strasbourg (Frankreich) durchgeführt, da die Apparatur des Double H Maze nur dort vorhanden war. Das Double H Maze wurde von Prof. Jean-Christophe Cassel in dem Institut „Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives" in Strasbourg entwickelt und in einigen Vorversuchen als Test für prozedurales und deklaratives Lernen etabliert.

Das Prinzip des Double H Maze besteht in der Aversion von Nagern gegenüber Wasser mit einer Temperatur von etwa 21℃. Die Tiere versuchen, dem Wasser so schnell wie möglich zu entkommen. Um den Tieren diesen Ausweg bieten zu können und gleichzeitig eine Lernaufgabe damit zu verbinden, um das Gedächtnis der Tiere untersuchen zu können, wird eine Plattform in einen festgelegten Maze-Arm positioniert (siehe Abschnitt 4.1.2). Diese Plattform hat einen Durchmesser von 11cm und wird etwa 1cm unter der Wasseroberfläche an das Ende eines Armes gestellt. Für die Ratte ist die Plattform durch die Kombination der versteckten Plattform und des getrübten Wassers aus anderen Armen des Mazes nicht zu erkennen. Das Tier hat nun die Aufgabe, die Plattform zu finden und sich den Weg von seiner Startposition zu der Plattform zu merken. Der Ratte stehen dafür externe visuelle Markierungen (Spülbecken, Boiler, geometrische Figuren an der Wand, etc.) zur Verfügung, die sich auf den gesamten Versuchsraum, in dem das Maze steht, verteilen.

Die Strecke des Tieres im Double H Maze wird durch die Maze-Arme vorgegeben, sodass Abweichungen von der Idealstrecke minimal gehalten werden und die Arbeitsstrategie des Tieres kontrolliert werden kann. Das Double H Maze zwingt das Tier, das deklarative oder prozedurale Gedächtnis zu nutzen und ermöglicht somit die Bewertung von Lernfähigkeit und spatialem Gedächtnis in einer aversiven Situation *[94]*.

4.1.2 Aufbau des Double H Maze

Das Double H Maze ist ein 160x160 cm großes Wasserlabyrinth, das aus einem horizontalen Arm besteht, der drei vertikale Arme miteinander verbindet, sodass ein Labyrinth aus sechs Armen entsteht (siehe Abbildung 24). Die sechs Maze-Arme sind unterteilt in Nord-West (NW), Nord (N), Nord-Ost (NO), Süd-West (SW), Süd (S) und Süd-Ost (SO). Die Arme des Labyrinths sind je 50cm hoch, 20cm lang und bestehen aus transparentem Plexiglas. Das komplette Maze ist auf eine Höhe von 20cm mit Wasser gefüllt, das durch Zugabe von Milchpulver getrübt wurde.

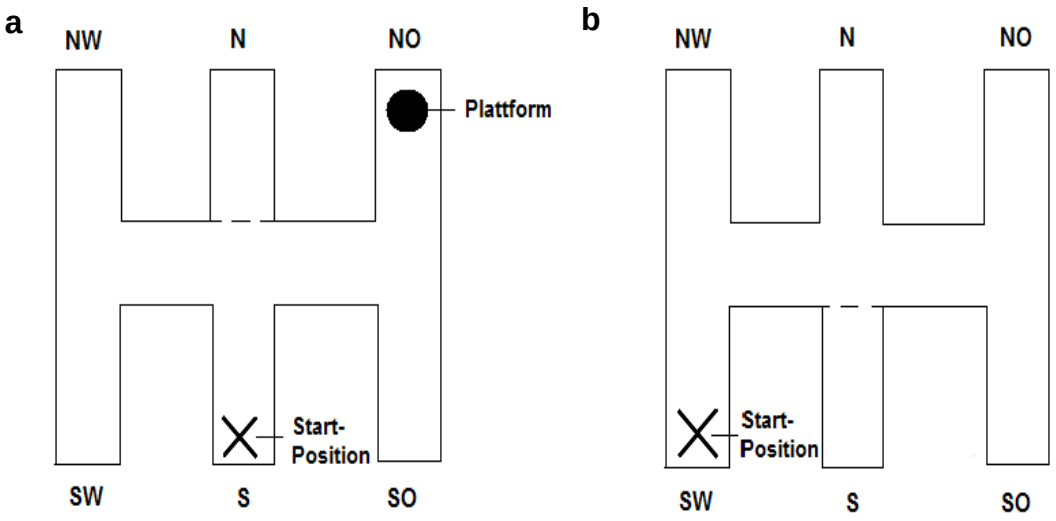


Abbildung 24: Darstellung des Double H Maze. Das Maze besteht aus 3 horizontalen Armen, die durch einen vertikalen Arm in 6 Arme getrennt werden: Nord-West (NW), Nord (N), Nord-Ost (NO), Süd-West (SW), Süd (S) und Süd-Ost (SO). **a)** Während der Lernphase wird Arm N geschlossen, die Plattform in Arm NO gestellt und die Ratte in den Arm S gesetzt. **b)** In der Testphase wird Arm N geöffnet, Arm S geschlossen und die Ratte in Arm SW gesetzt.

4.1.3 Double H Maze-Protokoll für das prozedurale Gedächtnis

Diese Arbeit befasst sich mit der striatalen HFS, die eventuelle Veränderungen in der prozeduralen Lernfähigkeit bewirkt, da der Nucleus caudatus (siehe Abschnitt 1.2) verantwortlich ist für das prozedurale Gedächtnis. Um diese eventuell auftretenden Veränderungen des Lernverhaltens analysieren zu können, wurde ein Protokoll für Versuche im Double H Maze entwickelt, das für den Aufbau eines prozeduralen Gedächtnis' verantwortlich ist.

In diesem Protokoll war das Lerntraining der Ratte unterteilt in eine Lernphase und einer anschließenden Testphase, um die Gedächtnisleistung der Ratte bewerten zu können. Die Lernphase umfasste drei aufeinanderfolgende Tage, an denen die Ratte in jeweils vier Versuchen den Weg von der Startposition zu der versteckten Plattform lernte. Die Ratte wurde am Ende des Armes S in das Maze gesetzt und bekam ein Zeitfenster von 60 Sekunden, um die Plattform zu finden, die sich in Arm NO befand. Der Arm N war während der Lernphase durch eine Tür geschlossen (siehe Abbildung 24a). Schaffte die Ratte es, in der vorgegeben Zeit die Plattform zu finden und auf diese zu klettern, wurden dem Tier 10 Sekunden auf der Plattform gewährt, um sich den Weg und die Umgebung mit den visuellen Markierungen (siehe Abschnitt 4.1.1) einzuprägen. Fand die Ratte die Plattform nicht innerhalb der 60 Sekunden, wurde sie aus dem Maze genommen, erneut an das Ende des S-Armes gesetzt, nun aber mit Hilfe des Experimentators zu der Plattform geleitet. Auch jetzt bekam die Ratte eine Pause auf der Plattform von 10 Sekunden, um den Lern- und Denkprozess zu fördern. Dieser Vorgang wurde pro Tag vier Mal wiederholt, sodass das Tier am Ende des dritten Lerntages in der Lage war, den Weg aus dem Gedächtnis abzurufen.

Am vierten Tag erfolgte die Testphase, die aus einem einzelnen Versuch bestand. Vor Beginn des Versuches wurde die Plattform aus dem Maze entfernt, der Arm N geöffnet und der Arm S geschlossen, damit die Ratte nicht in Arm S schwamm und sich erst dort wieder an den Weg zur Plattform erinnerte (siehe Abbildung 24b). Die Ratte wurde nun am Ende des Armes SW in das Double H Maze gesetzt und bekam 20 Sekunden, um den erlernten Weg zu schwimmen. Ging die Ratte zuerst in den Arm N, hatte sie sich die Start-Plattform-Route auf prozeduralem Wege gemerkt, indem sie sich den genauen Weg (zuerst eine rechte Kurve, anschließend eine linke Kurve) eingeprägte. Schwamm die Ratte dagegen zuerst in Arm NO, hatte das Tier das deklarative Gedächtnis genutzt, um sich den Weg einzuprägen, indem sie sich an den externen visuellen Markierungen (siehe Abschnitt 4.1.1) orientierte. War die Ratte nicht in der Lage, während der Testphase sofort den erlernten Weg abzurufen und zu schwimmen, betrat sie als erstes den Arm NW.

4.1.4 Statistische Bewertung der Verhaltensbeobachtungen im Double H Maze

Die Daten, die durch die Beobachtungen des Lernverhaltens der Ratten im Double H Maze gewonnen werden konnten, wurden mit Hilfe von ANOVA interpretiert. Zuerst wurden die drei Tiergruppen STIM, SHAM und CONT auf Unterschiede innerhalb der Gruppen und zwischen den einzelnen Gruppen untersucht, indem die Mittelwerte miteinander verglichen wurden. Bei Auftreten von Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurde der Newman-Keuls-Test genutzt, um anzuzeigen, zwischen welchen Tieren und Gruppen signifikante Unterschiede vorliegen. Der Newman-Keuls-Test gehört, wie schon im Abschnitt 2.7 erwähnt, zu der Gruppe der post-hoc Tests, die paarweise multiple Vergleiche durchführen, um signifikante Unterschiede darzulegen. Auch hier wurde die Tiergruppe als fester Faktor eingesetzt, während die abhängige Variable durch den jeweiligen Versuchstag dargestellt wird.

4.2 Ergebnisse der zweiten Studie

4.2.1 Lernen und Gedächtnis im Double H Maze

Für die Auswertung des Lernverhaltens der Ratten im Double H Maze wurden verschiedene Verhaltens-Parameter beobachtet und analysiert. Während der Lern- und Testphase wurden die Fehleintritte der Ratte in andere Maze-Arme bis zum Finden des richtigen Armes und der darin enthaltenen versteckten Plattform (Fehler) ermittelt und die von der Ratte benötigte Zeit von der Startposition bis zum Erreichen der Plattform (Latenzzeit) gemessen. In der Testphase wurden außerdem zwei weitere Parameter gemessen, die in der Lernphase nicht in Betracht gezogen werden konnten, da sie dort keine Rolle spielten. Zum Einen wurde die Zeit gemessen, die die Ratte im Zielarm verbrachte (Zeit im Zielarm). Außerdem wurde beobachtet, in welchen Maze-Arm die Ratte sich während der Testphase als erstes begab (erster gewählter Arm). Während der Lernphase wurden pro Tag vier Versuche im Double H Maze durchgeführt, aus denen für jede Ratte der Mittelwert gebildet wurde. Die Mittelwerte aller Ratten jeweils einer Gruppe wurden zusammengefasst, erneut ein Mittelwert gebildet und dessen Standardfehler ausgerechnet.

Während der Lernphase zeigten die STIM-, SHAM- und CONT-Tiere, wie in Abbildung 25 zu erkennen, signifikante Unterschiede in ihrem Verhalten im Double H Maze von Tag 1 bis Tag 3, was wiederum einen Lernprozess der Tiere während der Lernphase erkennen lässt. Am ersten Tag des Trainings zeigten alle Ratten eine mittlere Fehlerrate von 1, die am zweiten Tag auf 0.4 und am dritten Tag schließlich auf unter 0.1 absank [$F(2/84)=45.9$, $p<0.001$]. Die durchschnittliche Latenzzeit der Tiere bis zum Erreichen der Plattform sank von 45 Sekunden am ersten Tag auf 20 Sekunden am zweiten Tag und schließlich auf 10 Sekunden am dritten Tag des Trainings [$F(2/84)=370.8$, $p<0.001$]. Allerdings konnten während der Lernphase keinerlei signifikante Unterschiede in der Fehlerrate und in der Latenzzeit zwischen den einzelnen Tiergruppen gemessen werden.

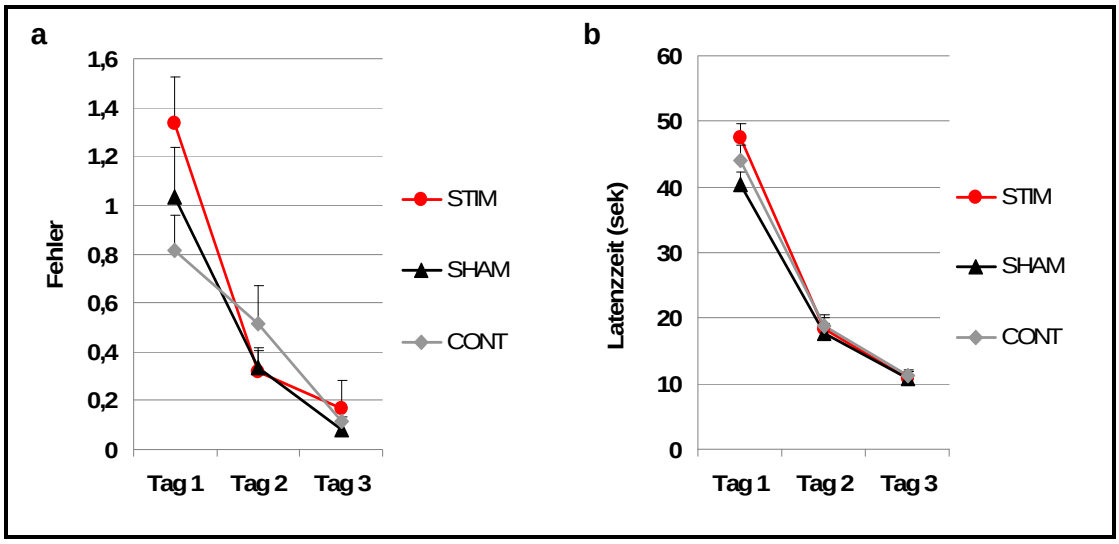


Abbildung 25: Die beiden Verhaltensparameter **a)** Fehler und **b)** Latenzzeit für das Verhalten während der Lernphase im Double H Maze der stimulierten Ratten (STIM, n=15), der operierten aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=15) und der nicht operierten Ratten (CONT, n=15). Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM).

In der Testphase im Double H Maze konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Rattengruppen in der Latenzzeit und der Zeit im Zielarm festgestellt werden (siehe Abbildung 26). Alle Ratten benötigten etwa 11 Sekunden, um in den Arm zu schwimmen, in dem die Plattform während des Trainings lokalisiert war (Zielarm). Außerdem hielten sie sich im Durchschnitt etwa 7 Sekunden und somit 35% der gesamten Testphase im Zielarm auf, was signifikant besser ist als der Zufall (2.9 Sekunden bei 14,5% der Testphase-Dauer; $p<0.01$). Es konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen bei der Anzahl der Fehler und dem ersten gewählten Arm festgestellt werden. So zeigten die STIM-Tiere eine höhere Anzahl an Fehlern (0.6) während der Testphase als die SHAM- und CONT-Tiere (0.2). Jedoch ist nur der Unterschied zwischen STIM- und CONT-Tieren signifikant [$F(2/40)=3.14$, $p<0.05$), während der Unterschied zwischen den STIM- und SHAM-Tieren nicht signifikant und somit nur als Tendenz angesehen werden kann.

Des Weiteren wurde deutlich, dass die STIM-Tiere gegenüber den CONT-Tieren eine unterschiedliche Wahl des Armes hatten, in den sie während der Testphase zuerst schwammen. Stimulierte Ratten schwammen zu 43% zuerst in den N-Arm, zu 14% in den NO-Arm und zu 43% in Arm NW. In der Gruppe der CONT-Ratten wurde zu 64% überwiegend der N-Arm für den ersten Eintritt gewählt, gefolgt von 29% NO-Arm und lediglich 7% NW-Arm. Die SHAM-Ratten wählten zu 67% den N-Arm, zu 13% den NO-Arm und zu 20% den NW-Arm.

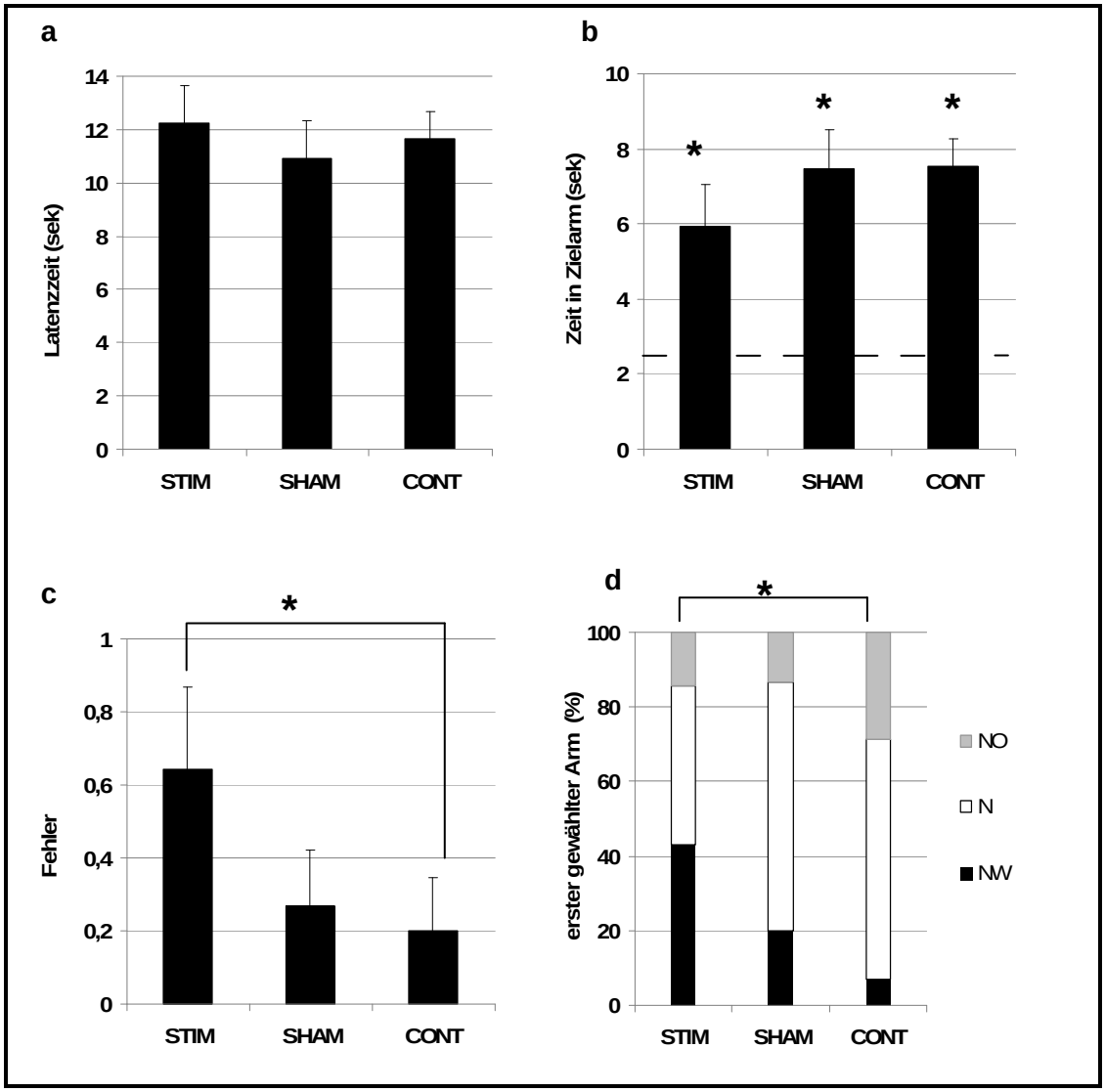


Abbildung 26: Darstellung der Verhaltensparameter a) Latenzzeit, b) Zeit im Zielarm, c) Fehler und d) erster gewählter Arm für das Verhalten während der Testphase im Double H Maze der stimulierten Ratten (STIM, n=15), der operierten, aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=15) und der nicht operierten Ratten (CONT, n=15). Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM). Signifikante Unterschiede wurden durch * gekennzeichnet (* $p<0,05$).

4.2.2 Striatale NTM-Konzentrationen der im Double H Maze trainierten Ratten

Ratten, die im Double H Maze trainiert wurden, wiesen in einigen NTM-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abbildung 27). Dabei beziehen sich die hier angegebenen Konzentrationen der einzelnen Neurotransmitter auf das Feuchtgewicht des linken Nucleus caudatus.

So besaßen alle Ratten eine Dopamin-Konzentration von etwa 40pmol/mg, eine DOPAC-Konzentration von 14pmol/mg und eine HVA-Konzentration von etwa 3pmol/mg. Die Quotienten DOPAC/Dopamin und HVA/Dopamin waren bei allen Tieren auf einem Niveau und zeigten damit, dass das dopaminerge System zwischen den Rattengruppen nicht unterschiedlich aktiv war. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Ratten gleiche Serotonin-Werte von 1.5pmol/mg und gleiche HIAA-Werte von etwa 3pmol/mg besaßen. Durch den gleichen HIAA-Serotonin-Quotienten wurde außerdem ersichtlich, dass sich die serotonergen Systeme der Ratten in dieser Arbeit nicht unterschieden. Auch die Glutamat-Werte der Ratten lagen alle bei etwa 13pmol/mg. Alle Ratten wiesen zudem einen ähnlichen Quotienten aus GABA und Glutamat auf.

Jedoch konnten signifikante Unterschiede in der GABA-Konzentration nachgewiesen werden. Die stimulierten Ratten zeigten gegenüber den SHAM- und CONT-Tieren signifikant höhere GABA-Werte [$F(2/33)=4.45$, $p<0.05$]. Während die STIM-Tiere eine GABA-Konzentration von 3.7pmol/mg aufwiesen, besaßen die SHAM- und CONT-Tiere einen GABA-Wert von 2.7pmol/mg.

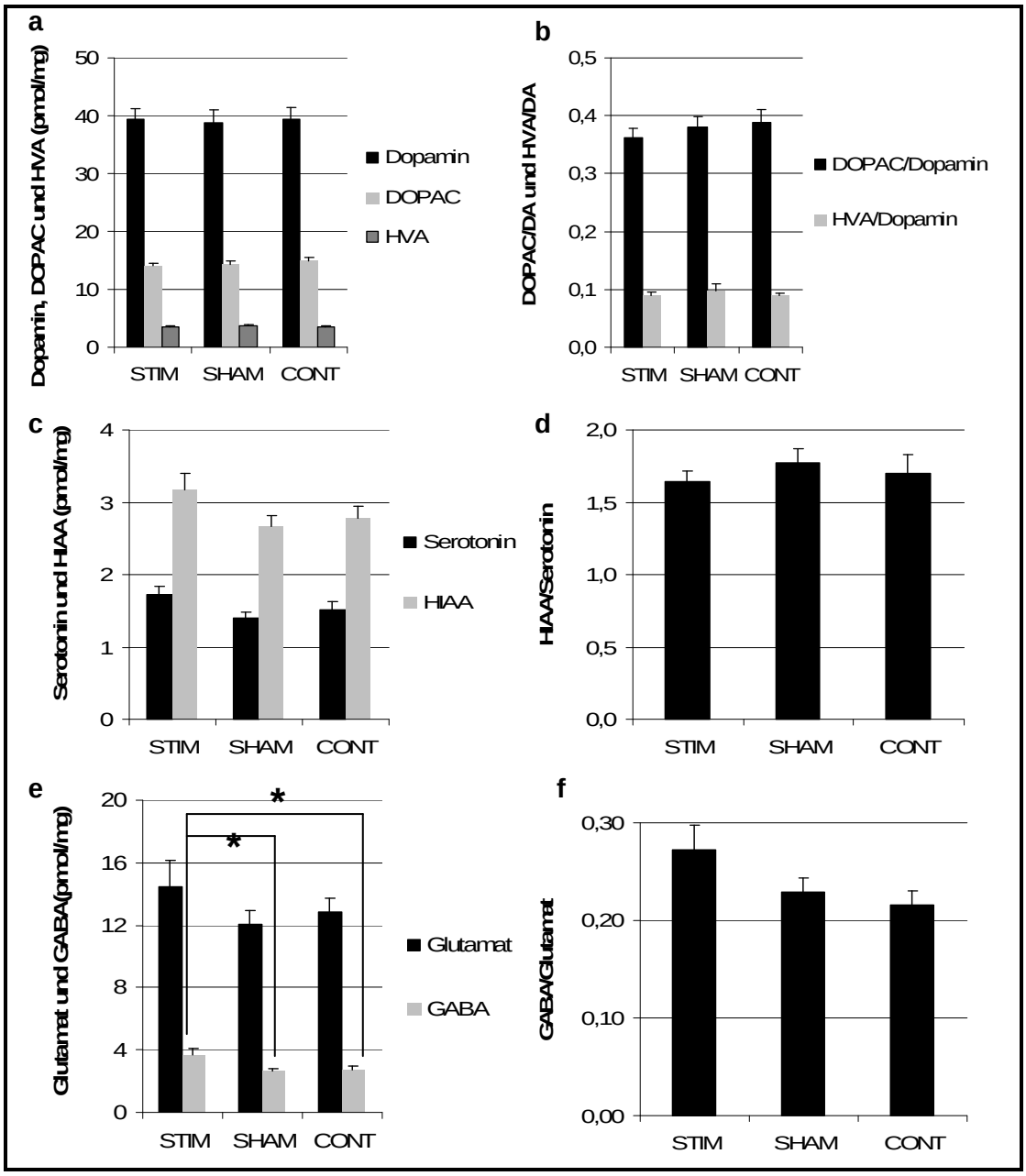


Abbildung 27: Darstellung der einzelnen Neurotransmitter und Quotienten aus Metabolit und dazugehörigem Neurotransmitter: **a)** Dopamin, DOPAC und HVA, **b)** DOPAC/Dopamin und HVA/Dopamin, **c)** Serotonin und HIAA, **d)** HIAA/Serotonin, **e)** Glutamat und GABA und **f)** GABA/Glutamat für die stimulierten Ratten (STIM, n=12), die operierten, aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=12) und die nicht operierten Ratten (CONT, n=12), die im Double H Maze trainiert wurden. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM) in pmol/mg. Signifikante Unterschiede wurden durch * gekennzeichnet (* $p<0,05$).

Des Weiteren konnten zwischen linkem und rechtem Nucleus caudatus der jeweiligen Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen NTM-Konzentrationen festgestellt werden (siehe Abbildung 28). Es wird somit deutlich, dass die erhöhten GABA-Werte der stimulierten Tiere gegenüber den SHAM- und Kontrolltieren nicht nur auf den linken, stimulierten Nucleus caudatus beschränkt sind, sondern auch im rechten, unbehandelten Nucleus caudatus vorliegen.

	STIM (pmol/mg)		**SHAM (pmol/mg)**		**CONT (pmol/mg)**	
	linker Nucleus caudatus	rechter Nucleus caudatus	linker Nucleus caudatus	rechter Nucleus caudatus	linker Nucleus caudatus	rechter Nucleus caudatus
Dopamin	39,38 ± 1,83	41,88 ± 2,92	38,70 ± 2,40	39,71 ± 2,76	39,38 ± 1,96	36,63 ± 2,71
DOPAC	14,02 ± 0,54	15,06 ± 0,84	14,37 ± 0,58	14,07 ± 0,65	14,94 ± 0,62	13,15 ± 0,88
HVA	3,47 ± 0,15	3,42 ± 0,26	3,60 ± 0,36	3,30 ± 0,27	3,42 ± 0,35	3,13 ± 0,29
DOPAC/Dopamin	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,02
HVA/Dopamin	0,09 ± 0,005	0,08 ± 0,006	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,005	0,09 ± 0,006	0,09 ± 0,007
Serotonin	1,73 ± 0,11	1,64 ± 0,10	1,40 ± 0,08	1,50 ± 0,11	1,51 ± 0,11	1,40 ± 0,10
HIAA	3,17 ± 0,23	2,89 ± 0,29	2,66 ± 0,16	2,52 ± 0,14	2,77 ± 0,16	2,54 ± 0,14
HIAA/Serotonin	1,64 ± 0,07	1,59 ± 0,11	1,77 ± 0,1	1,56 ± 0,09	1,7 ± 0,14	1,68 ± 0,11
Glutamat	14,44 ± 1,68	14,34 ± 1,57	12,05 ± 0,85	11,65 ± 0,79	12,88 ± 0,84	12,66 ± 0,80
GABA	3,70 ± 0,37	3,32 ± 0,35	2,67 ± 0,18	2,46 ± 0,15	2,74 ± 0,23	2,49 ± 0,23
GABA/Glutamat	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,2 ± 0,01

Abbildung 28: Tabelle der Neurotransmitter-Konzentrationen und Quotienten aus Metabolit und dazugehörigem Neurotransmitter für den jeweiligen linken und rechten Nucleus caudatus der stimulierten Ratten (STIM, n=12), der operierten, aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=12) und der nicht operierten Ratten (CONT, n=12), die im Double H Maze trainiert wurden. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM) in pmol/mg.

4.3 Diskussion

4.3.1 HFS des Nucleus caudatus hat Auswirkungen auf das prozedurale Gedächtnis im Double H Maze

Die Ratten zeigten zwischen den Gruppen STIM, SHAM und CONT während der Lernphase keinerlei Unterschiede in ihrem Verhalten im Double H Maze. Jedoch wurde innerhalb jeder Gruppe ein Lernverhalten erkennbar, da alle Ratten mit einer sehr hohen Fehlerrate und Latenzzeit am ersten Trainingstag begannen, die über den zweiten bis hin zum dritten Lerntag signifikant abnahmen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ratten im Double H Maze lernten, die HFS des linken Nucleus caudatus jedoch keinen Effekt auf das prozedurale Lernverhalten der Ratten hatte.

Während der Testphase im Double H Maze konnten signifikante Unterschiede zwischen den stimulierten und völlig unbehandelten Ratten festgestellt werden. Über 64% der unbehandelten Ratten erinnerten sich an die Position der Plattform auf prozeduralem Wege, da sie während der 20 Sekunden zuerst in den Arm N schwammen, während lediglich 43% der stimulierten Ratten ein prozedurales Gedächtnis ausbilden konnten. Weitere 29% der unbehandelten Ratten nutzten das deklarative Gedächtnis, um die Position der Plattform zu finden und somit in Arm NO zu schwimmen, während eine sehr geringe Anzahl an stimulierten Tieren, 14%, das deklarative Gedächtnis in Anspruch nahmen. Außerdem konnten sich lediglich 7% der unbehandelten Ratten weder auf dem prozeduralen noch auf dem deklarativen Wege an die Plattform-Position erinnern, während eine hohe Anzahl von 43% der STIM-Tiere die Position vergessen hatten. Auch die scheinstimulierten Tiere unterscheiden sich in den Parametern „Fehler“ und „erster gewählter Arm“ in der Testphase von den stimulierten Tieren. Jedoch kann dieser Unterschied aufgrund fehlender Signifikanz lediglich als Tendenz angesehen werden.

Es wird erkennbar, dass die hochfrequente Stimulation des linken Nucleus caudatus einen unterschiedlichen Gebrauch der einzelnen Gedächtnisformen bis hin zu einem Unterdrücken des Gedächtnis' vermittelt. Nicht behandelte Ratten nutzten zum größten Teil das prozedurale Gedächtnis, was mit der Studie von Packard et al. *[17]* übereinstimmt, in der gezeigt werden konnte, dass Ratten bei längerem Training den prozeduralen Lernprozess anwenden. Stimulierte Ratten hingegen zeigten zu gleichen Teilen ein prozedurales bzw. überhaupt kein Erinnern an die Plattform. Des Weiteren wiesen die stimulierten Tiere eine signifikant höhere Fehlerrate auf als die CONT-Tiere. Dieses Ergebnis korreliert mit dem unterschiedlichen Gebrauch der Gedächtnisformen der Tiere, da die STIM-Tiere sich sehr oft nicht an die Plattform-Position erinnern konnten und daher in den falschen Maze Arm schwammen.

Da das Double H Maze ein neu entworfener und neu eingeführter Verhaltenstest ist und bisher nur eine Arbeit darüber veröffentlicht wurde *[95]*, können hier lediglich Vergleiche mit Arbeiten, die sich mit Verhaltensanalysen im Morris Water Maze beschäftigen, gezogen werden. Das Morris Water Maze (Water Maze) ist, ebenso wie das Double H Maze, ein Wasser-Labyrinth, basiert somit auf der Aversion von Nagern gegenüber kaltem Wasser, besitzt jedoch eine runde Form ohne Arme und Gänge. Allerdings ist auch in diesem Maze eine Plattform vorhanden, die die Belohnung der Ratte darstellt und somit den Lernprozess und Aufbau des Gedächtnis' fördert. In zahlreichen Arbeiten *[109-111]* konnte nachgewiesen werden, dass das Water Maze eine ideale Testmethode für die Erforschung von Lernprozessen und des Gedächtnis' darstellt und sowohl behandelte Tiere (Behandlung durch Medikamente, Stress, etc.) als auch unbehandelte Tiere innerhalb kürzester Zeit in diesem Maze ein Lernverhalten aufweisen. Da auch das Double H Maze auf der Wasser-Aversion von Nagern basiert, ist es nicht überraschend, dass die Tiere während des Trainings ein signifikantes Lernverhalten aufwiesen. Auch schien das Protokoll des Double H Maze einen positiven Effekt auf das Lernen der Tiere gehabt zu haben, da die Ratten in der Lage waren, sich innerhalb von drei Tagen die Position der

Plattform zu merken. Jedoch ist unklar, warum die striatale HFS das Lernverhalten nicht beeinflusste. Eventuell wählten die stimulierten Ratten während der Lernphase immer wieder zwischen prozeduralem und deklarativem Gedächtnis, sodass eine Verschlechterung der Lern-Leistung nicht erkennbar wurde. Nach der Lernphase war das prozedurale Gedächtnis durch die HFS so gehemmt, dass die Ratten diese Gedächtnisform nicht mehr nutzen konnten, und anstatt auf das deklarative Gedächtnis zu wechseln, sich überhaupt nicht mehr an die Position der Plattform erinnerten. Dies sind jedoch Spekulationen, die durch weitere Experimente mit dem Double H Maze intensiv untersucht werden.

Es kann jedoch durch dieses sehr interessante, aussagekräftige Ergebnis angenommen werden, dass HFS des linken Nucleus caudatus zu einer Beeinträchtigung des prozeduralen Gedächtnis' bis hin zu einem völligen Verlust führt, da die stimulierten Ratten je zur Hälfte das prozedurale Gedächtnis oder keinerlei Gedächtnis benutzten, um die Plattform zu finden. Das deklarative Gedächtnis hingegen ist durch die striatale HFS kaum betroffen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das deklarative Gedächtnis, wie schon in Anschnitt 1.1.6 erwähnt, durch den Hippokampus vermittelt wird und somit bei einer striatalen HFS nicht direkt in die Stimulation involviert ist. Auch eine indirekte Anteilnahme an der hochfrequenten Stimulation kann durch diese Ergebnisse ausgeschlossen werden. Diese Arbeit korreliert also mit den viele Untersuchungen *[12-16]*, in denen gezeigt werden konnte, dass das deklarative und prozedurale Gedächtnis unterschiedliche Formen sind, die durch unterschiedliche Hirnareale vermittelt werden.

4.3.2 HFS des linken Nucleus caudatus erhöht die GABA-Konzentration in Ratten

Die Ratten, die im Double H Maze trainiert wurden, zeigten nur in einem Neurotransmitter signifikante Unterschiede. So wiesen die stimulierten Ratten eine signifikant höhere GABA-Konzentration als die SHAM- und CONT-Ratten auf. Das bedeutet, dass die HFS des Nucleus caudatus der Ratten einen steigernden Effekt auf den GABA-Gehalt hat. Dieses Ergebnis korreliert mit anderen Studien *[40-42]*, in denen bereits herausgefunden werden konnte, dass striatale HFS einen erhöhenden Kurzzeiteffekt auf den GABA-Gehalt hat. Da die Analyse der NTM jedoch, wie bereits erwähnt, erst 19 Stunden nach der letzten Stimulation stattfand, können hier lediglich Aussagen über eventuelle Langzeiteffekte der HFS getroffen werden. Es kann also angenommen werden, dass die hochfrequente Stimulation neben ihrem Kurzzeit- auch einen Langzeiteffekt auf das GABAerge System im Nucleus caudatus ausübt und die basale GABA-Konzentration erhöht. Jedoch sollte diese Annahme durch weitere Untersuchungen gestützt werden, die sich ganz gezielt mit dem Thema Langzeitwirkung der hochfrequenten Stimulation des Nucleus caudatus auf das GABAerge System befassen, da sich diese Arbeit nicht mit den molekularen Mechanismen der NTM-Systeme beschäftigt.

4.3.3 HFS-induzierte GABA-Erhöhung im ipsi- und kontralateralen Nucleus caudatus

Ein weiteres, sehr interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist der Anstieg der GABA-Konzentration, sowohl im linken, stimulierten Nucleus caudatus als auch im rechten, unbehandelten Nucleus caudatus in Ratten, die im Double H Maze trainiert wurden. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Nuclei caudati beider Hirn-Hemisphären über bestimmte Hirnregionen und Leitungsbahnen miteinander in Verbindung stehen. Diese Vermutung wird durch weitere Untersuchungen unterstützt. So konnten Carman et al. und Künzle zeigen, dass kortikostriatale Neuronen bilateral in das Striatum projizieren, somit also Informationen an das linke und das rechte Striatum

weitergeben *[112,113]*. Die HFS des Nucleus caudatus könnte also eine antidrome Stimulation dieser kortikostriatalen Fasern auslösen, sodass diese Fasern entgegen ihrer Verlaufsrichtung Informationen weitergeben. In diesem Falle würden die kortikostriatalen Fasern weitere kortikostriatale Fasern aktiveren, die wiederum in GABAerge Neurone des Striatums projizieren. In Studien von Nieoullon et al. und Snider et al. konnte gezeigt werden, dass linker und rechter Nucleus caudatus indirekt über Signalwege miteinander verbunden sind, die ihren Ursprung im Nucleus dentatus und Nucleus interpositus haben und in die Pars compacta der kontralateralen (auf der anderen Hirnhälfte liegenden) SN projizieren [114,115]. Außerdem stellten Chesselet und Kollegen, basierend auf ihren Studien, die Vermutung auf, dass Signale des Striatums, die an die ipsilaterale (auf der gleichen Hirnhälfte liegenden) SN gerichtet sind, durch die Thalamuskerne auch an die kontralaterale SN übermittelt werden *[116]*. Romo et al. bestätigten die Annahme, dass die Thalamuskerne oder –Fasern in die interhemisphärische Signal-Weitergabe involviert sind *[117]*.

Da in dieser Arbeit aufgrund der Fragestellung die molekularen Mechanismen der NTM-Systeme außer Acht gelassen wurden, konnten hier keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden, um den exakten Kommunikationsweg zwischen beiden Nuclei caudati analysieren zu können. Jedoch kann aufgrund der zahlreichen Studien auf diesem Gebiet angenommen werden, dass linker und rechter Nucleus caudatus entweder über die kortikostriatalen Fasern oder über die SN und den Thalamus kommunizieren. Während die interhemisphärische Kommunikation über kortikostriatale Fasern über eine antidrome Stimulation dieser Fasern abläuft, könnte in der zweiten Vermutung der linke, stimulierte Nucleus caudatus Signale über die ipsilaterale SN an die ipsilateralen Thalamuskerne weitergeben, die wiederum über die kontralaterale SN in den rechten, unbehandelten Nucleus caudatus projizieren. Da diese Theorien jedoch spekulativ sind, ist es notwendig, weitere Studien durchzuführen, um letztendlich die Rolle der interhemisphärischen Signalwege im bilateralen Effekt der unilateralen HFS auf die GABA-Konzentration klären zu können.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung des Gedächtnis‘ durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Gedächtnis ein vielschichtiges System ist, dass sich aus mindestens zwei Formen, dem deklarativen und nicht-deklarativen (prozeduralen) Erinnern, zusammensetzt. Beide Gedächtnisformen existieren nebeneinander, können parallel ablaufen, werden aber durch unterschiedliche Hirnbereiche vermittelt. Der Hippokampus spielt dabei eine wichtige Rolle für das deklarative Gedächtnis, während der Nucleus caudatus für das prozedurale Gedächtnis von großer Bedeutung ist *[14,15,17,18,20,21]*. Viele neurologische Erkrankungen beinhalten auch immer ein Defizit des Gedächtnis’, das bis vor wenigen Jahren nur durch Medikamente behandelt wurde *[118,119]*. In neueren Studien wird jedoch auch die hochfrequente Tiefenhirnstimulation, die seit Jahren für die Behandlung neurologischer Erkrankungen eingesetzt wird, genutzt, um Gedächtnis-Defizite zu behandeln *[84-86]*. Auch diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit das Gedächtnis durch elektrische HFS beeinflusst werden kann. Dafür wurde der linke Nucleus caudatus von Ratten hochfrequent stimuliert und mögliche Auswirkungen auf das prozedurale Gedächtnis beobachtet.

Es konnten keinerlei Effekte der HFS auf das Gedächtnis der Ratten, die im Plus Maze trainiert wurden, beobachtet werden. Jedoch wurde auch ein Lernverhalten der Tiere im Plus Maze nicht erkennbar. Um die Frage zu klären, ob die striatale HFS tatsächlich keinen Effekt auf das Verhalten der Ratte ausübte oder aber das Plus Maze an sich aufgrund des fehlenden Lernprozesses die falsche Verhaltensmethode für diese Untersuchung darstellte, wurde eine weitere Studie mit dem Double H Maze durchgeführt. In diesem zweiten Verhaltenstest wurde deutlich, dass die HFS des Nucleus caudatus einen hemmenden Effekt auf das prozedurale Gedächtnis der Ratte besitzt, das vorhandene Lernverhalten des Tieres jedoch unbeeinflusst lässt. Der negative Effekt auf das Gedächtnis, nicht jedoch auf das Lernen, kann dadurch erklärt werden, dass die Ratte während der Lernphase möglicherweise zwischen dem prozeduralen und deklarativen Gedächtnis

wählte und ein möglicher hemmender Effekt der striatalen HFS auf das prozedurale Erinnern nicht angezeigt werden konnte. Während der Testphase konnte dieser unterschiedliche Gebrauch der beiden Gedächtnisformen jedoch erkannt und ein weniger benutztes prozedurales Gedächtnis beobachtet werden. Somit kann also angenommen werden, dass elektrische HFS des linken Nucleus caudatus das prozedurale Gedächtnis in Ratten hemmt. Außerdem wurde durch diese Arbeit deutlich, dass das Plus Maze als Verhaltenstest für die hier vorliegende Fragestellung ungeeignet ist und für weitere Untersuchungen in diesem Forschungsfeld nicht mehr verwendet werden sollte.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte außerdem nachgewiesen werden, dass unilaterale HFS des Nucleus caudatus neben seiner schon bekannten positiven Kurzzeitwirkung auf den NTM GABA, auch einen steigernden Langzeiteffekt auf die GABA-Konzentration im Nucleus caudatus aufweist. Daher kann angenommen werden, dass das GABAerge System eine wichtige Rolle während der HFS des Nucleus caudatus von Ratten spielt. Diese Vermutung korreliert mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Moser, die dem GABAergen System eine entscheidende Rolle während der elektrischen HFS zuweisen *[40-42,76-78]*. Die hier nachgewiesene positive Langzeitwirkung auf das GABAerge System beschränkte sich außerdem nicht nur auf den linken, stimulierten Nucleus caudatus, sondern auch auf den kontralateralen, unbehandelten Nucleus caudatus. Es kann daher angenommen werden, dass linker und rechter Nucleus caudatus durch interhemisphärische Kommunikation miteinander verbunden sind.

6. Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass hochfrequente Stimulation des linken Nucleus caudatus von Ratten zu einer Beeinträchtigung des prozeduralen Gedächtnis' führt und eine verstärkende ipsi- und kontralaterale Langzeitwirkung auf den NTM GABA besitzt.

Da die hier angewandte HFS unilateral durchgeführt wurde, der rechte Nucleus caudatus somit unbehandelt blieb, wäre es von großem Interesse, weitere Untersuchungen durchzuführen, die sowohl eine Stimulation des rechten Nucleus caudatus, als auch eine bilaterale Stimulation und deren mögliche Effekte auf Gedächtnis und NTM-Systeme beinhalten.

Außerdem könnten weitere Studien, die sich ganz gezielt mit der interhemisphärischen Kommunikation zwischen linkem und rechtem Nucleus caudatus beschäftigen, klären, über welche exakten Signalwege diese beiden Hirnkerne miteinander verbunden sind und welche Rolle diese Signalwege bei der ipsi- und kontralateralen Erhöhung des GABA-Levels, hervorgerufen durch die unilaterale HFS, spielen.

Durch diese Arbeit wurde außerdem erkennbar, dass das Plus Maze für weitere Untersuchungen zu diesem Thema kein idealer Verhaltenstest ist und auf andere Tests, wie dem Double H Maze, zurückgegriffen werden sollte.

7. Anhang

Literaturverzeichnis

1. Myers DG (2008) Psychologie. Auflage 2. Berlin: Springer Verlag
2. Kahnt H, Lange KM, Schwachulla W (2001) Meyers Großes Handlexikon A-Z. Auflage 21, Mannheim: Bibliographisches Institut
3. Krech D; Crutchfield RS, Livson N (1992). Grundlagen der Psychologie. Weinheim: BeltzPVU
4. Ebbinghaus H (1992) Über das Gedächtnis: Untersuchungen zur experimentellen Psychologie. Neue, unveränderte und ungekürzte Ausgabe nach der 1. Auflage 1885. Darmstadt: Wissenschaftliche Buchgesellschaft
5. James W (1980) The principles of psychology. New York: Holt
6. Tulving E (1972) Organization of memory: Quo vadis. In Tulving E, Donaldson W, *Organization of memory*. New York: Academic Press
7. Atkinson RC; Shiffrin RM (1968) Human memory: A proposed system and its control processes. In Spence KW, *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory*. Volume 2. New York: Academic Press
8. Piaget J (1980) Abriß der genetischen Epistemologie (frz. L'Epistémologie génétique, Paris, 1970). Übersetzt von Fritz Kubli, Einführung von Fritz Kubli. Stuttgart: Klett-Cotta
9. Tolman EC, Ritchie BF, Kalish D (1946) Studies in spatial learning II. Place versus response learning. *J Exp Psychol* 36(3):221–229
10. Watson JB (1913) Psychology as the behaviorist views it**.** *Psychol Rev* 20(2):158-177
11. Thorndike EL (1933) A proof of the law of effect. *Science* 77:173-175
12. Aggleton JP**,** Shaw C (1996) Amnesia and recognition memory: a re-analysis of psychometric data. *Neuropsychologia* 34(1):51-62
13. Reed JM, Squire LR (1997) Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav Neurosci* 111(4):667-675

14. Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neurosci* 9:1465–1472

15. Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563–593

16. Salmon DP, Butters N (1995) Neurobiology of skill and habit learning. *Curr Opin Neurobiol* 5(2):184-190

17. Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72

18. Packard MG (1999) Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proc Natl Acad Sci* 96(22):12881-12886

19. Compton DM (2004) Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav Processes* 67(3):335-342

20. Squire LR (1998) Memory systems. *C R Acad Sci III* 321:153-6

21. Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82(3):171-177

22. Schermer FJ (2006) Grundriss der Psychologie: Lernen und Gedächtnis: Band 10. Auflage 4. Stuttgart: Kohlhammer Verlag

23. Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (2001) Neurowissenschaft: Vom Molekül zur Kognition. Auflage 2. Berlin: Springer Verlag

24. Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. In Tulving E, Donaldson W. *Organization of memory*. New York: Academic Press

25. Packard, MG, White NM (1987) Differential roles of the hippocampus and caudate nucleus in memory: Selective mediation of ‘‘cognitive’’ and ‘‘associative’’ learning. *Soc for Neurosci Abstr* 13:1005

26. Phillips AG, Carr GD (1987) Cognition and the basal ganglia: a possible substrate for procedural knowledge. *Can. J. Neurol. Sci.* 14:381–385

27. Steiner H, Tseng KY (2010) Handbook of Basal Ganglia Structure and Function. Oxford: Elsevier Science & Technology

28. Wilson SAK (1912) Progressive lenticular degeneration: a familiar nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 34:295–509

29. Wilson SAK (1914) An experimental research into the anatomy of the corpus striatum. *Brain* 36:427–492

30. Nauta WJH, Domesick VB (1979) The anatomy of the extrapyramidal system. In Fuxe K, Calne DB. *Dopaminergic Ergot Derivatives and Motor Function.* Oxford: Pergamon Press

31. Heimer L, van Hoesen G (1979) Ventral striatum. In: Divac J, Oberg RGE. *The neostriatum.* Oxford: Pergamon Press

32. http://www.uni-stuttgart.de/bio/bioinst/tierphys/forschung/hauber/theo_grundlagen3.html

33. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking to basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 9:357–381

34. Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. Nat. Rev. Neurosci. 7(6):464-476

35. Veening JG, Cornelissen FM, Lieven PAJM (1980) The topical organization of the afferents to the caudoputamen of the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 5:1253-1268

36. McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29(3):503-537

37. Kesner RP, Martinez JL (2007) Neurobiology of learning and memory. Auflage 2. San Diego: Academic Press

38. Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O (2007) The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *J. Neurosci.* 27(31):8161-8165

39. Tronnier VM, Fogel W, Krause M, Bonsanto MM, Tronnier J, Heck A, Münkel K, Kunze S (2002) High frequency stimulation of the basal ganglia for the treatment of movement disorders: current status and clinical results. *Minim. Invasive Neurosurg.* 45(2):91-96

40. Li T, Qadri F, Moser A (2004) Neuronal electrical high frequency stimulation modulates presynaptic GABAergic physiology. *Neurosci. Lett.* 371:117–121

41. Li T, Thuemen A, Moser A (2006) Modulation of a neuronal network by electrical high frequency stimulation in striatal slices of the rat in vitro. *Neurochem. Int.* 48:83–86

42. Hiller A, Loeffler S, Haupt C, Litza M, Hofmann U, Moser A (2007) Electrical high frequency stimulation of the caudate nucleus induces local GABA outflow in freely moving rats. *J. Neurosci. Meth.* 159:286–290

43. Schiepek G (2004) Neurobiologie der Psychotherapie. Sonderausgabe. Stuttgart: Schattauer Verlag

44. Kandel ER, Spencer WA (1961) Electrophysiological properties of an archicortical neuron. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94:570-603

45. Kandel ER, Spencer WA (1968) Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol. Rev.* 48(1),65-134

46. Frazier WT, Kandel ER, Kupfermann I, Waziri R, Coggeshall RE (1967) Morphological and functional properties of identified neurons in abdominal ganglion of Aplysia californica. *J. Neurophysiol.* 30:1288–1351

47. Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER (1989) Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of Aplysia. J Neurobiol. 20(1):1-9

48. Hawkins RD, Castellucci VF, Kandel ER (1981) Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in Aplysia. I. Identification and characterization. J. Neurophysiol. 45:304-314

49. Kupfermann I, Castellucci V, Pinsker H, Kandel ER (1970) Neuronal correlates of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia. *Science* 167:1743–1745

50. Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci. Rep.* 24(4-5):475-522

51. Fatt P, Katz B (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J. Physiol.* 115:320-370

52. Greengard P (1976) Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature* 260:101-108

53. Merrill DR, Bikson M, Jefferys JGR (2005) Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J. Neurosci. Meth.* 141:171–198

54. Horch KW, Dhillon GS (2004) Neuroprosthetics. Theory and Practice. Auflage 2. Singapore: World Scientific Publishing

55. http://www.elektroniktutor.de/bauteile/goldcap.html

56. McIntyre CC**,** Mori S**,** Sherman DL**,** Thakor NV**,** Vitek JL (2004) Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Clin Neurophysiol* 115(3):589-595

57. Butson CR**,** Maks CB**,** McIntyre CC (2006) Sources and effects of electrode impedance during deep brain stimulation. *Clin Neurophysiol* 117(2):447-454

58. Lilly JC, Austin GM, Chambers WW (1952) Threshold movements produced by excitation of cerebral cortex and efferent fibers with some parametric regions of rectangular current pulses (cats and monkeys). *J Neurophysiol* 15:319–341

59. Mortimer JT, Kaufman D, Roessmann U (1980) Intramuscular electrical stimulation: tissue damage. *Ann Biomed Eng* 8:235–244

60. Wichmann T, Delong MR (2006) Deep brain stimulation for neurological and neuropsychiatric disorders. *Neuron* 52:197-204

61. Perlmutter JS, Mink JW (2006) Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci* 29:229-257

62. Boëx C, Vulliémoz S, Spinelli L, Pollo C, Seeck M (2007) High and low frequency electrical stimulation in non-lesional temporal lobe epilepsy. *Seizure* 16(8):664-669

63. http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2008_Groups/group07/Parkinsons.html

64. Krauss JK, Volkmann J (2004)Tiefe Hirnstimulation. Auflage 1. Darmstadt: Steinkopff Verlag

65. Taira T, Hori T (2003) Stereotactic ventrooralis thalamotomy for task-specific focal hand dystonia. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 80(1-4):88-91

66. Svennilson E, Torvik A, Lowe R, Leksell L (1960) Treatment of parkinsonism by stereotactic thermolesions in the pallidal region. A clinical review of 81 cases. *Acta. Psychiatr. Scand.* 35:358-377

67. Diederich NJ, Alesch F (1997) Neurochirurgische Verfahren zur Behandlung des Morbus Parkinson. *Nervenarzt* 68:466-476

68. Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the vim thalamic nucleus for bilateral parkinson disease. *Appl Neurophysiol*, 50(1-6):344-346

69. Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Perret JE, de Rougemont J (1991) Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet.* 337(8738):403-406

70. Beurrier C, Bioulac B, Audin J, Hammond C (2001) High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J. Neurophysiol.* 85(4):1351-1356

71. Benazzouz A, Gross C, Féger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur. J. Neurosci.* 5(4):382-389

72. Benazzouz A, Piallat B, Pollak P, Benabid AL (1995) Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neurosci. Lett.* 189(2):77-80

73. Dostrovsky JO, Levy R, Wu JP, Hutchison WD, Tasker RR, Lozano AM (2000) Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus pallidus. *J. Neurophysiol.* 84:570-574

74. Breit S, Schulz JB, Benabid AL (2004) Deep brain stimulation. *Cell Tissue Res.* 318(1):275-288

75. Benazzouz A, Hallett M (2000) Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology* 55(6):13-16

76. Moser A, Gieselberg A, Ro B, Keller C, Qadri F (2003) Deep brain stimulation: response to neuronal high frequency stimulation is mediated through $GABA_A$ receptor activation in rats. *Neurosci. Lett.* 341(1):57-60

77. Mantovani M, Moser A, Haas CA, Zentner J, Feuerstein TJ (2009) $GABA_A$ autoreceptors enhance GABA release from human neocortex: towards a mechanism for high-frequency stimulation (HFS) in brain? *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 380:45–58

78. Feuerstein TJ, Kammerer M, Lücking CH, Moser A (2011) Selective GABA release as a mechanistic basis of high frequency stimulation used for the treatment of neuropsychiatric diseases. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.* (in press)

79. Temel Y, Boothman LJ, Blokland A, Magill PJ, Steinbusch HWM, Visser-Vandewalle V, Sharp T (2007) Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *PNAS* 104:17087–17092

80. Lee KH, Kristic K, van Hoff R, Hitti FL, Blaha C, Harris B, Roberts DW, Leiter JC (2007) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases glutamate in the subthalamic nucleus of rats as demonstrated by in vivo enzyme-linked glutamate sensor. *Brain Res.* 1162 (121-129)

81. Levin ED (2006) Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function. Auflage 1. Basel: Birkhäuser

82. Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, Laurent A, Gentil M, Perret J (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in parkinson's disease. *Stereotact. Funct. Neurosurg.*, 62(1-4):76-84

83. Siegfried J, Lippitz B (1994). Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms. *Neurosurgery* 35(6):1126-1129

84. Hälbig TD, Gruber D, Kopp UA, Scherer P, Schneider GH, Trottenberg T, Arnold G, Kupsch A (2004) Subthalamic stimulation differentially modulates declarative and nondeclarative memory. *Neuroreport* 15(3):539-543

85. Funkiewiez A, Ardouin C, Caputo E, Krack P, Fraix V, Klinger H, Chabardes S, Foote K, Benabid AL, Pollak P (2010) Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75:834-839

86. Hamani C, Dubiela FP, Soares JC, Shin D, Bittencourt S, Covolan L, Carlen PL, Laxton AW, Hodaie M, Stone SS, Ha Y, Hutchison WD, Lozano AM, Mello LE, Oliveira MG (2010) Anterior thalamus deep brain stimulation at high current impairs memory in rats. *Exp. Neurol.* 225(1):154-162

87. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (1999) The Laboratory Rat. Auflage 2. San Diego: Academic Press

88. Paxinos G, Watson C (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press

89. Phebus LA, Johnson KW (2001) Dural inflammation model of migraine pain. *Curr. Protoc. Neurosci.* 9:9.1

90. Thomas JB (1974) Cross-maze avoidance behavior and septal lesions in the rat. *Physiol. Behav.* 12:163-167

91. Cohen J, Bussey K (2003) Rats form cognitive maps from spatial configurations of proximal arm cues in an enclosed 4-arm radial maze. *Learn. Motiv.* 34:168–184

92. Roberts WA, Cruz C, Tremblay J (2007) Rats take correct novel routes and shortcuts in an enclosed maze. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav.* 33(2):79–91

93. Packard MG (2009) Exhumed from thought: Basal ganglia and response learning in the plus-maze. *Behav. Brain. Res.* 199(1):24-31

94. Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav. Brain Res.* 218(1):138-151

95. Pritzel M, Brand M, Markowitsch HJ (2009) Gehirn und Verhalten: Ein Grundkurs der physiologischen Psychologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag

96. Hanai T (1999) HPLC: A Practical Guide. Cambridge: Royal Society of Chemistry

97. http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/chromatographie/lbef_chromatographie_hplc_gc.htm

98. Smith SE, Sharp T (1994) An investigation of the origin of extracellular GABA in rat nucleus accumbens measured in vivo by microdialysis. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 97(2):161-171

99. Broota KD (1989) Experimental design in behavioural research. New Delhi: New Age International

100. Rodgers RJ, Cole JC (1993) Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol Behav* 53(2):383-388

101. Avgustinovich DF, Gorbach OV, Kudryavtseva NN (1997) Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice**.** *Physiol Behav* 61(1):37-43

102. Kron FW (1999) Wissenschaftstheorie für Pädagogen. München: Reinhardt Verlag

103. Hughes RN (1965) Food deprivation and locomotor exploration in the white rat. *Anim. Behav.* 23(1):30–32

104. Woods PJ, Bolles RC (1965) Effects of current hunger and prior eating habits on exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 59:141–143

105. Pierre PJ, Skjoldager P, Bennett AJ, Renner MJ (2001) A behavioral characterization of the effects of food deprivation on food and nonfood object interaction: an investigation of the information-gathering functions of exploratory behavior. *Physiol. Behav.* 72(1-2):189-197

106. DeCoteau WE, Kesner RP, Williams JM (1997) Short-term memory for food reward magnitude: The role of the prefrontal cortex. *Behav. Brain. Res.* 88*(2*):*239-249*

107. Gyger M, Kolly D, Guigoz Y (1992) Aging, modulation of food intake and spatial memory: A longitudinal study. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 15(1):185-195

108. Abrahamsen GC, Berman Y, Carr KD (1995) Curve-shift analysis of self-stimulation in food-restricted rats: relationship between daily meal, plasma corticosterone and reward sensitization. *Brain. Res.* 695(2):186-194

109. Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cogn. Brain Res.* 3(3-4):167-181

110. Vorhees CV, Williams MT (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1(2):848–858

111. Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Tagashira E (1995) Involvement of cholinergic systems in the deficit of place learning in Morris water maze task induced by baclofen in rats. *Brain Res.* 683(2):209-214

112. Carman JB, Cowan WM, Powell TPS, Webster KE (1965) A bilateral corticostriate projection. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 28:71–77

113. Künzle H (1975) Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. *Brain Res.* 88:195-210

114. Nieoullon A, Cheramy A, Glowinski J (1978) Release of dopamine in both caudate nuclei and both substantia nigrae in response to unilateral stimulation of cerebellar nuclei in the cat. *Brain Res.* 148:143-152

115. Snider RS, Maiti A, Snider SR (1976) Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Exp. Neurol.* 53(3):714-728

116. Chesselet MF, Cheramy A, Reisine TD, Lubetzki C, Desban M, Glowinski J (1983) Local and distal effects induced by unilateral striatal application of opiates in the absence or in the presence of naloxone on the release of dopamine in both caudate nuclei and substantiae nigrae of the cat. *Brain Res.* 258:229-242

117. Romo R, Cheramy A, Godeheu G, Glowinski J (1984) Distinct commissural pathways are involved in the enhanced release of dopamine induced in the contralateral caudate nucleus and substantia nigra by unilateral application of GABA in the cat thalamic motor nuclei. *Brain Res.* 308:43-52

118. Possin KL**,** Filoteo JV**,** Song DD**,** Salmon DP (2008) Spatial and object working memory deficits in Parkinson's disease are due to impairment in different underlying processes. *Neuropsychology* 22(5):585-595

119. Butters N, Wolfe J, Martone M, Granholm E, Cermak LS (1985) Memory disorders associated with huntington's disease: Verbal recall, verbal recognition and procedural memory. *Neuropsychologia* 23(6):729-743

Abkürzungsverzeichnis

AD……..Aldehyd-Dehydrogenase

AdL……Ad Libitum- (gesättigte) Ratten

ANOVA……..Varianzanalyse

AP……..Anterior-Posterior

C……....Kohlenstoff

Ca^{2+}……Calcium

CO_2……Kohlenstoff-Dioxid

COMT……Catechol-O-Methyltransferase

CONT……Nicht operierte Ratten

DL……..Dorsolaterales Striatum

DM……..Dorsomediales Striatum

DOPAC……..3,4-Dihydroxy-Phenyl-Essigsäure

DV……..Dorsal-Ventral

EDTA……Ethylendiamin-tetraacetat

FD……...Futterdeprivierte Ratten

GABA……γ-Aminobuttersäure

GAD……...Glutamat-Decarboxylase

GPe……Globus pallidus externus

GPi……Globus pallidus internus

HFS……....Hochfrequenzstimulation

HIAA……...5-Hydroxyindol-Essigsäure

HPLC……Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

HRP……..…Meerrettich-Peroxidase

HVA……..…Homovanillinsäure

ip……Intraperitoneal

MAO……...Monoamino-Oxidase

ML……..Medial-Lateral

MPC……...Medialer präfrontaler Kortex

N……Arm Nord

NO……Arm Nord-Ost

NTM……...Neurotransmitter

NW……Arm Nord-West

O……Arm Ost

OPA……..Ortho-Phthaldialdehyd

S……Arm Süd

SEM……..Standardfehler

SHAM……Operierte aber nicht stimulierte Ratten

SM……..Sensomotorischer Kortex

SN……..Substantia nigra

SNr……Substantia nigra pars reticulata

SO……..…Arm Süd-Ost

STIM……..Operierte und stimulierte Ratten

STN……Nucleus subthalamicus

SW……Arm Süd-West

THS……...Tiefenhirnstimulation

Vim……Nucleus thalamus intermedius ventralis

VS……..Ventrales Striatum

VTA...……Annahme der zweiten Ableitung

W……Arm West

ZNS……Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Mehrspeichermodells nach Atkinson und Shiffrin [7]. Der auf den Organismus eintreffende Umweltreiz (Input) wird im sensorischen Gedächtnis (sensory memory) gespeichert und bei Anwesenheit von Aufmerksamkeit in das Kurzzeitgedächtnis (Short-term memory) überführt. Durch wiederholtes Aufrufen des Reizes gelangt dieser in das Langzeitgedächtnis (Long-term memory). Bei bewusster Abfrage des Reizes aus dem Langzeitgedächtnis wird dieser wieder in das Kurzzeitgedächtnis überführt und ein Erinnern an den Reiz ist möglich. 9

Abbildung 2: Taxonomie des Langzeitgedächtnis' mit neuronalen Korrelaten (modifiziert nach Squire *[20]*). Das Langzeitgedächtnis wird eingeteilt in das deklarative (bewusst) und nicht-deklarative (unbewusst) Erinnern. Das deklarative Gedächtnis wird durch den Hippokampus vermittelt, das prozedurale Gedächtnis, welches einen Teil des unbewussten Erinnerns darstellt, wird von dem Striatum (Nucleus caudatus) vermittelt. 11

Abbildung 3: Übersicht der Basalganglien [32]. Zu den wichtigsten Kerngebieten der Basalganglien gehören Nucleus caudatus und Nucleus putamen (Putamen), die dem dorsalen Striatum angehören, sowie Globus pallidus internus. Substantia nigra und Nucleus subthalamicus sind eng mit den Kerngebieten der Basalganglien verbunden und werden daher in diesem Bild als Teil der Basalganglien angesehen. 13

Abbildung 4: Übersicht der kortiko-subkortikalen Regelkreise. Informationen werden aus dem Kortex in das Striatum geleitet, wo sie entweder über den direkten Weg (über Substantia nigra pars reticulata (SNr) oder Globus pallidus internus (GPi)) oder den indirekten Weg (über Globus pallidus externus (GPe) und/oder Nucleus subthalamicus (STN)) an den Thalamus weitergeleitet werden, um anschließend wieder an den Kortex übermittelt zu werden [34]. 14

Abbildung 5: Übersicht der Afferenzen der unterschiedlichen Bereiche des Striatums aus dem Kortex. a) Das dorsomediale Striatum (DM) erhält Afferenzen, aus dem medialen präfrontalen Kortex (MPC), b) das dorsolaterale Striatum (DL) hingegen wird mit Informationen aus dem sensomotorischen Kortex (SM) bedient. c) Das ventrale Striatum (VS) erhält Afferenzen, die zum größten Teil aus dem MPC stammen. Die drei Bereiche des Striatums sind durch Efferenzen mit der Substantia nigra pars reticulata (SNr) und dem Globus pallidus internus (GPi) verbunden, über die sie Informationen an den Thalamus weitergeben und schließlich an den Kortex zurückleiten [38]. 16

Abbildung 6: Abbildung der vier möglichen Wege der Beeinflussung der synaptischen Aktivität, die durch Neurotransmitter hervorgerufen werden. 1. Aktivierung eines ligandengesteuerten Ionenkanals durch Transmitter führt zu schneller synaptischer Aktivität, die einige Millisekunden andauert. 2. Transmitter aktivieren einen Transmembran-Rezeptor, der wiederum eine Kinase für sekundäre Botenstoffe aktiviert und somit eine synaptische Aktivität herbeiführt, die wenige Minuten andauert.3. Wiederholte Aktivierung eines Transmembran-Rezeptors durch Transmitter, die zur Verlagerung von Kinasen zum Zellkern führt. Es entstehen neue synaptische Verbindungen, die eine synaptische Aktivität über mehrere Tage hinweg auslösen. 4. Transmitter aktivieren lokale Proteinsynthesen, die zur Stabilisierung lang anhaltender synaptische Aktivität beitragen *[50]*. 22

Abbildung 7: Darstellung der Stern-Doppelschicht an einer Kathode, die hier durch Aktivkohle dargestellt ist. An die Stern-Doppelschicht lagern sich weitere, diffuse Schichten aus hydratisierten Ionen an [55]. 26

Abbildung 8: Wasserstoff-Bindung von Platin. Durch Reaktion des Platins der Elektrode mit Wasser des Gewebes entstehen durch Aufnahme eines Elektrons eine Platin-Wasserstoff-Verbindung und ein freiwerdendes Hydroxyl-Ion. 27

Abbildung 9: Korrosion von Platin. Durch Reaktion des Platins der Elektrode mit Chlorid-Ionen des Gewebes entstehen durch Abgabe von Elektronen Platin(IV)-Chlorid-Ionen. 27

Abbildung 10: Darstellung der HFS zur Behandlung des idiopathischen Parkinson-Syndroms. Eine in das menschliche Gehirn implantierte Stimulations-Elektrode (Electrodes) ist mit einem Impulsgenerator (Pacemaker) verbunden, der die Parameter der Stimulation generiert [63]..... 31

Abbildung 11: Abbau von Glutamat zu GABA. 36

Abbildung 12: Abbau von Dopamin über DOPAC zu HVA. 37

Abbildung 13: Abbau von Serotonin zu HIAA. 38

Abbildung 14: In der dorsalen Ansicht des Rattenschädels nach Paxinos und Watson [88] sind Lambda und Bregma, die beiden Kreuzungspunkte der Sutura coronalis und Sutura sagittalis, dargestellt. 44

Abbildung 15: Darstellung der Trepanationspunkte der Führungskanüle und der Fixierschrauben auf dem Schädel der Ratte (modifizierte Abbildung von Phebus et al. [89]). 45

Abbildung 16: Darstellung der Spitze der Stimulations-Elektrode, die einen abgeschrägte Form besitzt und somit weniger schädlich für das Hirngewebe der Ratte ist. 48

Abbildung 17: Darstellung des Stimulationssignals bei einer konstanten Stromstärke von 0,5 mA und einer Frequenz von 124Hz mit einem Signalintervall von 8ms (linke Abbildung) und einem Puls von 60µs (rechte Abbildung). 48

Abbildung 18: Darstellung des Prinzips der HPLC. Die Probe wird an der Säule in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt. Der dabei entstehende Strom wird über einen Detektor erfasst und die chromatographischen Signale der Komponenten als Peaks dargestellt (modifizierte Abbildung von Hübl [97]). 51

Abbildung 19: Darstellung der einzelnen Peaks für die fünf Standards von Dopamin (1), DOPAC (2), Serotonin (3), HIAA (4) und HVA (5). 53

Abbildung 20: Darstellung des Plus Maze. Das Maze besteht aus einen Zentrum, von dem vier von Wänden umgebene (geschlossene) Arme strahlenförmig abgehen: Arm Nord (N), Ost (O), Süd (S) und West (W). Während der Gewöhnung sowie der Lern- und Testphase wird die Ratte in das Zentrum des Maze gesetzt (Startposition), um von dort den heller markierten Zielarm und die darin befindliche Belohnung in Form eines Schokoballes zu finden. 57

Abbildung 21: Position der HFS Elektrode im Rattenhirn. a) Die stereotaktischen Koordinaten für die HFS Elektrode im Rattenhirn waren AP -0.26mm und ML +3mm relativ zu Bregma, DV -5mm ausgehend von der Schädeldecke (Ermittlung der Koordinaten nach Paxinos and Watson [89]). b) In 9 von 10 Ratten konnte bis auf den Elektroden-Kanal keine Schädigung des umliegenden Gewebes durch die Elektrode und die HFS festgestellt werden. Des Weiteren besaß die HFS Elektrode in 8 von 10 Ratten die angestrebte Position. 60

Abbildung 22: Die beiden Verhaltensparameter a) Fehler und b) Latenzzeit für die Performance der stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL STIM, n=9), der operierten aber nicht stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL SHAM, n=11), der stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD STIM, n=8) und der operierten aber nicht stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD SHAM, n=8) während der Lern- und Testphase im Plus Maze. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM). 63

Abbildung 23: Übersicht der einzelnen Parameter der Verhaltensobjektivierung a) Lokomotion, b) Wippen, c) Drehverhalten, d) Schnüffeln, e) freies Bewegen und f) Aufstellen der stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL STIM, n=9), der operierten aber nicht stimulierten Ad Libitum-Ratten (AdL SHAM, n=11), der stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD STIM, n=8) und der operierten aber nicht stimulierten futterdeprivierten Ratten (FD SHAM, n=8) während der Lern- und Testphase im Plus Maze. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM). 64

Abbildung 24: Darstellung des Double H Maze. Das Maze besteht aus 3 horizontalen Armen, die durch einen vertikalen Arm in 6 Arme getrennt werden: Nord-West (NW), Nord (N), Nord-Ost (NO), Süd-West (SW), Süd (S) und Süd-Ost (SO). a) Während der Lernphase wird Arm N geschlossen, die Plattform in Arm NO gestellt und die Ratte in den Arm S gesetzt. b) In der Testphase wird Arm N geöffnet, Arm S geschlossen und die Ratte in Arm SW gesetzt. 71

Abbildung 25: Die beiden Verhaltensparameter a) Fehler und b) Latenzzeit für das Verhalten während der Lernphase im Double H Maze der stimulierten Ratten (STIM, n=15), der operierten aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=15) und der nicht operierten Ratten (CONT, n=15). Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM). 75

Abbildung 26: Darstellung der Verhaltensparameter a) Latenzzeit, b) Zeit im Zielarm, c) Fehler und d) erster gewählter Arm für das Verhalten während der Testphase im Double H Maze der stimulierten Ratten (STIM, n=15), der operierten, aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=15) und der nicht operierten Ratten (CONT, n=15). Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM). Signifikante Unterschiede wurden durch * gekennzeichnet (* p<0,05). 76

Abbildung 27: Darstellung der einzelnen Neurotransmitter und Quotienten aus Metabolit und dazugehörigem Neurotransmitter: a) Dopamin, DOPAC und HVA, b) DOPAC/Dopamin und HVA/Dopamin, c) Serotonin und HIAA, d) HIAA/Serotonin, e) Glutamat und GABA und f) GABA/Glutamat für die stimulierten Ratten (STIM, n=12), die operierten, aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=12) und die nicht operierten Ratten (CONT, n=12), die im Double H Maze trainiert wurden. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM) in pmol/mg. Signifikante Unterschiede wurden durch * gekennzeichnet (* p<0,05). 78

Abbildung 28: Tabelle der Neurotransmitter-Konzentrationen und Quotienten aus Metabolit und dazugehörigem Neurotransmitter für den jeweiligen linken und rechten Nucleus caudatus der stimulierten Ratten (STIM, n=12), der operierten, aber nicht stimulierten Ratten (SHAM, n=12) und der nicht operierten Ratten (CONT, n=12), die im Double H Maze trainiert wurden. Die einzelnen Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler (SEM) in pmol/mg. 79

Geräte- und Materialienverzeichnis

Verwendete Chemikalien und Materialien für die Implantation der Führungskanüle

- Imalgène 500 (Ketamin), 10ml, von Merial (Lot IBD07701E)
- Rompun 2% (Xylazin), 25ml, von Bayer Health Care (Lot KP05GC5)
- Xylocaine (Chlorhydrate de Lidocaine), 20mg/ml, von Astra Zeneca (Lot 9929464)
- Extencilline (Benzathine Benzylpénicilline), 2.4 M.K.I., von Sanofi-aventis France (Lot AE6438)
- Sterlane, 125ml, von Pharma-Development (N°30997 89)
- Lacrigel (Augencreme), 10g, von Europhta (N°3352 113)
- Chloride (Natriumchlorid 0.9%), 10ml, von Aguettant (N°3462959)
- Coton-Tiges (Wattestäbchen), von Beauty Iseree (FAB 208510)
- Kaltpolymerisat (rosa geadert), 500g, von Paladur Heraeus (Lot 010073)
- Autopolymerisat, 50ml, von Paladur Heraeus (Lot 013120)
- Einmalspritzen, 1ml, von Terumo (Lot 0908007)
- Kanülen: 26G x ½ (0.45 x 12mm, Lot 0910039), 23G x 1 (0.60 x 25mm, Lot 4K04258554), von Terumo Neolus
- Lab standard stereotaxic – single (Stereotaxierahmen für Ratten), von Stoelting (N°51600)
- Surgical blades (Skalpellklingen, Größe 23), von Swann-Marton (Lot 1080709)
- High speed micro drill (Bohrer), von Fine Science Instruments, Inc. (Ref.: 18000-17)
- Micro Drill Steel Burrs (Bohraufsatz), von Fine Science Tools, Inc. (Ref 19007-21)
- Self-Tapping Bone Screws (Fixierschrauben), von Fine Science Tools, Inc. (Ref.: 19010-10)
- CMA/11 Guide Cannula (Führungskanüle), von CMA/ Microdialysis AB (N°8309018)

Verwendete Chemikalien und Materialien für die Verhaltensversuche im Plus Maze und Double H Maze

- Lait écremé en poudre (Milchpulver), 750g, von Cora
- Debut video recorder software 1.32 (Software zur Aufnahme und Wiedergabe von Videos), von NCH Software

Verwendete Materialien für die Hochfrequenzstimulation des Nucleus caudatus

- Concentric bipolar electrode (Stimulations-Elektrode), von FHC Frederick Haer & Co (Ref: CBCPG30)
- Isostim A320D (Signalgenerator), von World Precision Instruments
- Two channel digital real time oscilloscope, von Tektronix Inc (TDS210)

Verwendete Chemikalien und Materialien für die Histologie

- Pentobarbital sodique, 100ml, von CEVA santé animale (Lot 138A2)
- Isopentan, 1 Liter, von Rectapur (N°24872298)
- Cryostat HM500M, von Microm
- Lichtmikroskop VANOX AHBT3, von Olympus

<u>Formaldehyd-Lösung</u>

Paraformaldehyd, 80g von ROTH (N°03353)
Natronlauge, 10 Tropfen, von Prolabo VWR (N°31627 290)
Destilliertes Wasser, 1 Liter
200mM Phosphat-Puffer, 1 Liter

<u>Phosphat-Puffer 200mM</u>

Di-sodium hydrogenphosphate 12 H2O, 58g, von ROTH (N°T1062)
Monosodique di-hydrogene phosphate, 5.28g, von Rectapur (N°28013264)
Destilliertes Wasser, 1 Liter

Saccharose-Lösung

D+ Saccharose, 400g, von Rectapur (N°27478296)

Destilliertes Wasser, 1.5 Liter

200mM Phosphat-Puffer, 1 Liter

Kresyl-Violett-Färbung

Crésyl violet acétate, 5g, von Sigma-Aldrich (AcW-27)

Natriumacetat, 60ml, von Normapur (N°27652298)

1M Essigsäure, 340ml, von Sigma-Aldrich (N°33209)

Destilliertes Wasser, 600ml

Verwendete Chemikalien und Materialien für die Neurotransmitter-Analyse

- Hand-Homogenisator, 1ml, von Wheaton
- Multifuge 1 SR, von Heraeus
- 3.3% Perchlorsäure, 500ml, von Ecoline (Lot 60041019)

Phosphatpuffer

Di-Natrium-Hydrogenphosphat, 22.78g, von Merck (Lot 106586)

Natrium-dihydrogenphosphat, 5.46g, von Fluka (BCBB0940)

HPLC-Wasser, 2 Liter, von Baker (Lot 1015100031)

2M Natronlauge (für pH 7.4),1 Liter , von Merck (Lot 1099560001)

Eluent 4

Natriumacetat, 24.61g, von Merck (Lot B0342864907)

Essigsäure(für pH 4.0), 65ml, von Baker (Lot 9926740003)

Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA), 0.028g, von Serva (Lot 060356)

Octansulfonsäure, 0.0432g, von Sigma-Aldrich (Lot 038K0815)

Methanol, 240ml, von Baker (Lot 0902728004)

HPLC-Wasser, 2 Liter, von Baker

Eluent 5

Natrium-dihydrogenphosphat, 24g, von Fluka
Natronlauge (für pH 4.5),1 Liter, von Merck
EDTA, 0.2923g, von Serva
Methanol, 500ml, von Baker

Standards

Dopamine hydrochloride (Dopamin), von Sigma-Aldrich (Lot 115K2501)
3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid (DOPAC), von Sigma-Aldrich (Lot 95H2622)
Homovanillic acid (HVA), von Sigma-Aldrich (Lot 107K5002)
Serotonin hydrochloride (Serotonin), von Sigma-Aldrich (Lot 069K5154)
5-Hydroxyindole-3-acetic acid (HIAA), von Sigma-Aldrich (Lot 0001416659)
L glutamic acid potassium salt monohydrate (Glutamat), von Sigma-Aldrich (Lot 034K0226)
γ-Aminobutyric acid (GABA), von Sigma-Aldrich (Lot 045K00721)

Derivatisierungs-Lösung

o-Phthaldialdehyd, 0.0022g, von Sigma-Aldrich (Lot 075K2614)
1 M Natriumsulfit Lösung, 50µl, von Sigma-Aldrich (Lot 085K0185)
Ethanol absolut, 50µl, von Merck (Lot K36103327622)
0.1 M Di-Natriumtetraboratpuffer, 900µl, von Merck (Lot: B168609646)

HPLC-Anlage

Injektionsspritze, von Knauer (TP5-100-71)
HPLC-Injektionsventil, Knauer (A0263)
C18 Eurospher 100 (Vorsäule: 30 x 4 mm, Hauptsäule 250 x 4 mm), von Knauer
Säulenofen, von Knauer
WellChromHPLC Pumpe, von Knauer (K501)
Waters 460 electrochemical detector, von Millipore
D-7000 Chromatography Data Station HPLC Multi Manager, von Hitachi

Danksagung

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschengeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

Teamarbeit ist ein sehr wichtiger Teil der Forschung, wenn nicht sogar der Wichtigste. So konnte die hier vorliegende Arbeit nur durch Hilfe weiterer Menschen entstehen, die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet und unterstütz haben.

Mein Dank gilt primär meinem Doktorvater Prof. Andreas Moser, der es mir erst ermöglichte, das spannende Thema der Hochfrequenzstimulation zu erforschen. Unsere zahlreichen Gespräche und Diskussionen sowie seine ständige Unterstützung haben im Wesentlichen dazu beigetragen, diese Arbeit in eine erfolgreiche Richtung zu lenken und dabei die Begeisterung an diesem Thema nie aus den Augen zu verlieren.

Auch Herrn Prof. Ulrich Hofmann danke ich sehr für seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in den unterschiedlichsten Bereichen dieser Dissertation. Allein die Wahl der Stimulationselektroden wäre ohne ihn kaum möglich und ein erfolgreiches Durchführen dieser Versuche somit so gut wie aussichtslos gewesen. Auch die Gespräche und zahlreichen Tipps haben in großem Umfang an der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Herrn Prof. Jean-Christophe Cassel und seinem Team des „Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives" an der Universität Strasbourg. Dank dieser Forschergruppe hatte ich die einmalige Möglichkeit, einen neuentwickelten Verhaltenstest kennenzulernen und ihn speziell für meine Arbeit anwenden zu können. Darüber hinaus konnten die unzähligen Diskussionen, die vielen Tipps und vor allem die Denkanstöße dazu beitragen, meinen Wissensstand auf dem Gebiet der Verhaltensforschung maßgeblich zu erweitern und meine Neugier für die Forschung zu stärken.

Auch möchte ich mich bei den vier Damen des Labors für Neurobiochemie bedanken: Frau Schnackenberg, Frau Brunk, Frau Reher und Frau Wiegers. Dank dieser Damen herrschte im Labor für Neurobiochemie stets eine sehr angenehme und inspirierende Atmosphäre, die meinen Laboralltag mit viel Freude und Witz aufheiterte. Ein besonderer Dank geht dabei an Frau Schnackenberg für ihre unzähligen Tipps und Tricks im Umgang mit der eigenwilligen HPLC-Anlage.

Einen großen Dank richte ich außerdem an Sonja Binder und Marlen Lunow, die mich durch ständigen Gedankenaustausch immer wieder neu inspirierten und mich auf neue Ideen brachten. Dank dieser Damen konnte ich jede noch so schwierige Situation meistern und gestärkt daraus hervorgehen.

Den drei wichtigsten Personen in meinem Leben, meinen Eltern und meiner Schwester, möchte ich dafür danken, dass sie mich während der gesamten Zeit meiner Dissertation begleitet, mich immer wieder aufgebaut, meine Stimmungsschwankungen ertragen und mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin.