

**Modulation inhibitorischer Rezeptorsysteme im
Vorderhorn des Rückenmarks durch Sevofluran**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Hauser, geb. Wagner, Sabrina Simone

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Grasshoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Fretschner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	12
1.1 Immobilität	12
1.1.1 GABA _A -Rezeptoren	15
1.1.2 GABAerge und glycinerge Synapsen	18
1.1.3 Kompetitive Antagonisten an inhibitorischen GABA _A - und Glycin- Rezeptoren: Bicucullin und Strychnin	22
1.2 Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran.....	24
1.3 Fragestellung.....	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Präparation organotypischer Rückenmark-Schnittkulturen.....	29
2.2 Roller-Tube-Technik	34
2.3 Elektrophysiologie.....	34
2.4 Herstellung der chemischen Lösungen und Art der Applikation	35
2.5 Versuchsprotokoll	36
2.6 Datenanalyse.....	38
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Wirkung von Sevofluran auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten..	41
3.2 Effekte von Strychnin auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten..	42

3.3	Einfluss von Strychnin auf die hemmenden Effekte von Sevofluran im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten.....	44
3.4	Effekte von Bicucullin auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten..	46
3.5	Wirkung von Sevofluran auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten in Anwesenheit von Bicucullin	46
3.6	Zusammenfassung der Auswertungen des GABAergen, sowie des glycinergen Anteils an den hemmenden Effekten von Sevofluran auf spinale Vorderhornneurone	49
4	Diskussion	51
4.1	Organotypische Rückenmarksschnitte – Wahl des Modellsystems....	51
4.2	Klinisch relevante Konzentrationen von Sevofluran.....	54
4.3	Wirkmechanismen von Sevofluran im Rückenmark.....	56
4.4	Die Bedeutung von inhibitorischen Rezeptorsystemen für die Unterdrückung der Aktionspotentialaktivität im spinalen Vorderhorn..	58
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Erklärungen zum Eigenanteil.....	74
8	Veröffentlichungen.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekularer Aufbau eines GABA _A -Rezeptors.....	16
Abbildung 2: GABA _A -Rezeptor mit den Bindungsstellen für GABA und weitere Modulatoren.	18
Abbildung 3: GABAerge Synapse und ein dazugehöriges IPSC.....	19
Abbildung 4: Molekulare Struktur des Glycinrezeptors.....	21
Abbildung 5: Schemata zur Verdeutlichung der Hypothesen zur pharmakologischen Isolierung von inhibitorischen Rezeptorsystemen mittels Strychnin oder Bicucullin	24
Abbildung 6: Strukturformel von Sevofluran [Fluormethyl-2,2,2-trifluor-1-(trifluormethyl)äthyl-Äther]	25
Abbildung 7: Abbauprodukte von Sevofluran. Sevofluran wird zu Hexafluorpropanol, anorganischem Fluorid und CO ₂ abgebaut	26
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung von organotypischen Rückenmark-Schnittkulturen von Wildtypmäusen	33
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Spritzenfüllung.....	36
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf des Versuchsprotokolls.....	37
Abbildung 11: Originalaufzeichnungen extrazellulärer Messungen an Rückenmarkschnittkulturen. Separierung von Feld- und Aktionspotentialen mittels Tief- bzw. Hochpassfilter.....	39
Abbildung 12: Quantifizierung der Aktionspotentialaktivität mittels Schwellensetzung	39

Abbildung 13: Spontane neuronale Aktionspotentialaktivität eines spinalen Vorderhornneurons unter Kontrollbedingungen, dargestellt als Rohspur aus den Originalaufzeichnungen.....	40
Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Effekte von Sevofluran auf die Feuerrate von spinalen Vorderhornneuronen.....	41
Abbildung 15: Hemmung der Feuerrate in %	42
Abbildung 16: a) Effekte von Strychnin auf die spontane Aktionspotentialaktivität- Originalaufzeichnung b) Zusammenfassung verschiedener Glycinkonzentrationen	43
Abbildung 17: Einfluss von Strychnin auf die Effekte von Sevofluran.....	45
Abbildung 18: Effekte von Bicucullin auf die spontane Aktionspotentialaktivität.....	47
Abbildung 19: Einfluss von Bicucullin auf die Effekte von Sevofluran	48
Abbildung 20: Gesamtübersicht über die Veränderungen der Feuerraten durch inhibitorische Antagonisten bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen	49
Abbildung 21: Veränderungen des glycinergen und GABAergen Anteils bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen.	49
Abbildung 22: Schematische Darstellung des interneuralen Netzwerkes im Vorderhorn des Rückenmarks zur Modulation von Schmerzreflexen.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Veränderung des durch Glycinrezeptoren vermittelten Anteils an der Hemmung der Aktionspotentiale bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen	44
Tabelle 2: Veränderung des durch GABA _A -Rezeptoren vermittelten Anteils an der Hemmung der Aktionspotentiale bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen.....	47

Abkürzungsverzeichnis

A

α	Alpha
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit; künstlich hergestellter Liquor
AgCl	chemische Summenformel für Silberchlorid
ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor; eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren

B

β	Beta
---------	------

C

CaCl_2	chemische Summenformel für Calciumchlorid
Cl^-	Chlorid, anionische Form von Chlor
CO_2	chemische Summenformel für Kohlenstoffdioxid
CPG	Central-Pattern-Generator; neuronales Netzwerk
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	10^{-2} Meter

D

δ	Delta
----------	-------

E

ϵ	Epsilon
ECD	extrazelluläre Domäne

G

γ	Gamma
g	Gramm
g/mol	molare Masse; Molmasse
GABA	γ -Aminobuttersäure

GABA _A	γ-Aminobuttersäure-Rezeptor Typ _A
H	
h	Stunde
Hz	Hertz; Maßeinheit für die Frequenz
H ₂ O	chemische Summenformel für Wasser
HFIP	Hexafluoroisopropanol
I	
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom
K	
KCl	chemische Summenformel für Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	chemische Summenformel für Kaliumhydrogenphosphat
L	
λ	Lambda
l	Liter
M	
μ	My
M	Mol; Basiseinheit für die Stoffmenge, die in 12 Gramm eines Kohlenstoff-Nuklids ¹² C enthalten ist
MAC	1 MAC = Minimale alveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, bei der 50 % der Probanden auf einen Schmerzreiz nicht reagieren
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	chemische Summenformel für Magnesiumchlorid
MgSO ₄	chemische Summenformel für Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	10 ⁻³ Liter
mm	10 ⁻³ Meter

μM	10^{-6} Mol
mM	10^{-3} Mol
mV	10^{-3} Volt; elektrische Spannung
M Ω	10^6 Ohm; elektrischer Widerstand
μg	10^{-6} Kilogramm
μl	10^{-6} Liter
μm	10^{-6} Meter
MW	Mittelwert

N

NaCl	chemische Summenformel für Natriumchlorid
NaHCO ₃	chemische Summenformel für Natriumbikarbonat
NaH ₂ PO ₄	chemische Summenformel für Natriumhydrogenphosphat
NGF	Nerve Growth Factor- β von der Ratte
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

O

O ₂	Sauerstoff
----------------	------------

P

π	Pi
pH-Wert	potentia hydrogenii; Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung
PC	Personal Computer; ein Einzelplatzrechner
ppm	parts per million; 10^{-6}

R

ρ	Rho
--------	-----

S

SEM	Standard Error of the Mean; Standardfehler
-----	--

T

t Maß für Zeit

θ Theta

U

U Unit

U/h Umdrehungen pro Stunde

Z

ZNS Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Als die Geburtsstunde der modernen Anästhesie wird der 16. Oktober 1846 angesehen. An diesem Datum fand die erste gelungene, öffentliche Demonstration einer Narkose in Boston durch den Zahnarzt William T. G. Morton statt. Die Äthernarkose verbreitete sich innerhalb weniger Jahren in der gesamten Welt und wird heute zu den wichtigsten Entwicklungen in der modernen Medizin gezählt (N Engl J Med. 2000). Die Weiterentwicklung der eingesetzten Substanzen zu unseren heutigen Allgemeinanästhetika hat die chirurgischen Möglichkeiten revolutioniert. Die modernen Allgemeinanästhetika induzieren eine Vollnarkose als eine Kombination unterschiedlicher Einzelkomponenten wie Hypnose, Amnesie, Anxiolyse, Muskelrelaxation oder Immobilität. Vereinfacht dargestellt, werden diese Einzelkomponenten über eine reversible Hemmung unterschiedlicher Regionen des Zentralen Nervensystems sowie des Rückenmarks erreicht (Grasshoff et al. 2005). Der Immobilität kommt dabei besondere Bedeutung zu, denn sie ist einfach zu quantifizieren und diente Eger und Mitarbeitern bereits frühzeitig als Maß zur Einschätzung und Vergleichbarkeit der klinischen Potenz volatiler Anästhetika (Eger et al. 1965a).

1.1 Immobilität

Immobilität bedeutet Bewegungslosigkeit und ist im Rahmen einer Allgemeinanästhesie als die Unterdrückung von gezielten oder ungezielten Abwehrbewegungen als Reaktion auf einen Schmerzreiz definiert (Antognini und Carstens 2002).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl volatile, als auch intravenöse Anästhetika Immobilität über eine Hemmung spinaler Neurone vermitteln. Bereits 1992 konnte Rampil (Rampil und Laster 1992) in Experimenten mit Ratten nachweisen, dass Allgemeinanästhetika zwar Effekte

auf den Cortex, aber keinen Einfluss auf motorische Schmerzreflexe der Tiere hatten. In einer folgenden Serie von Experimenten derselben Arbeitsgruppe führte eine präkollikuläre Dezerebration oder die komplette Durchtrennung des thorakalen Rückenmarks bei Ratten nur zu minimalen Veränderungen in der immobilisierenden Potenz des volatilen Anästhetikums Isofluran (Rampil et al. 1993; Rampil 1994), was dafür spricht, dass Effekte von Anästhetika auf supraspinale Regionen des zentralen Nervensystems bei der Induktion von Immobilität nur eine untergeordnete Rolle spielen.

In weiterführenden Untersuchungen testeten Antognini und Mitarbeiter die Wirkungen des volatilen Anästhetikums Isofluran an Ziegen. Ziegen haben die anatomische Besonderheit, dass die Blutversorgung des Gehirns und des Rückenmarks getrennt ist. Dies eröffnet die Möglichkeit, Anästhetika selektiv dem Gehirn, bzw. dem Rückenmark zuzuführen. Die Autoren fanden, dass bei einer selektiven zerebralen Applikation von Isofluran eine dreifach höhere Dosis zur Erzeugung von Immobilität erforderlich war im Vergleich zu einer systemisch verabreichten Menge des Anästhetikums (Antognini und Schwartz 1993). Auch diese Ergebnisse unterstützen die an Ratten aufgestellte Hypothese, dass vorwiegend die Hemmung spinaler Neurone durch Anästhetika eine Unterdrückung von Schmerzreflexen induziert. Es stellt sich im Folgenden die Frage, durch die Hemmung welcher Populationen von Neuronen im Bereich des Rückenmarks Anästhetika Immobilität induzieren können.

Hier konnten Jinks und Mitarbeiter in verschiedenen Studien zeigen, dass sowohl volatile Anästhetika, als auch intravenöse Anästhetika wie Propofol, Immobilität durch eine Hemmung spinaler Interneurone im Vorderhorn des Rückenmarks hervorrufen (Jinks et al. 2008; Kungys et al. 2009).

Innerhalb des Rückenmarks gibt es drei verschiedene Gruppen von Neuronen, die sich sowohl funktionell, als auch bezüglich ihrer Lokalisation unterteilen lassen. Hierzu gehören die sensorischen Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks, die Interneurone und die Motoneurone.

Das Hinterhorn fungiert als sensomotorische Verarbeitungsstation für eintretende somatoviszzerale Afferenzen. Diese somatoviszzeralen Afferenzen bilden erregende synaptische Verbindungen mit Neuronen des Hinterhorns. Die Aktivität der Hinterhornneurone kann auch über weitere Synapsen gehemmt werden, die somit afferente Informationen modifizieren können. Neurone des Hinterhorns sind über Interneurone mit den Motoneuronen verschaltet (Collins et al. 1995).

Die Motoneurone bilden die gemeinsame Endstrecke aller im Rückenmark ausgehenden Informationen. Die synaptische Übertragung erfolgt am Dendritenbaum des Motoneurons. Auf ein Motoneuron kommen etwa 30 Interneurone. Durch Konvergenz ergibt sich eine Aufsummierung der erregenden und hemmenden Einflüsse aus den Afferenzen und vor allem aus dem interneuronalen Netzwerk. Eine überschwellig erregte Motoneuronenpopulation beinhaltet ein mechanisches Bewegungs- und Tonusmuster, da jedes Aktionspotential im motorischen Axon zu einer Kontraktion aller Muskelfasern der motorischen Einheit führt (Dudel 1997).

Die Neurone des Hinterhorns, sowie die Motoneurone werden funktionell durch ein interneuronales Netzwerk verbunden. In diesem Netzwerk wird eine „Central Pattern Generator“ (CPG) Aktivität erzeugt, über die willkürliche und unwillkürliche Bewegungen von Wirbeltieren kontrolliert werden (Alford et al. 2003; Kiehn 2006). Diese Kontrolle erfolgt zum einen über die Regulation der Erregbarkeit der dazu gehörenden Motoneurone, andererseits über die Modulation der Aktivitätsmuster der Neurone im Hinterhorn (McCrea 2001). Weiterhin ist bekannt, dass Interneurone direkt sensorische Informationen aufnehmen und motorische Neurone beeinflussen können (Burke et al. 2001). Es stellt sich im Folgenden die Frage, welche der genannten Neuronenpopulationen im Rückenmark durch Anästhetika gehemmt werden müssen, damit die Unterdrückung von Schmerzreflexen erfolgt. So konnte Steve Jinks und Mitarbeiter in einer Reihe von Arbeiten an Ziegen und Ratten zeigen, dass das volatile Anästhetikum Isofluran in Peri-MAC-Konzentrationen

(0,9-1,1 MAC) wenig bis gar keinen Effekt auf schmerzinduzierte Reflexantworten im Hinterhorn des Rückenmarks hat (Antognini und Carstens 1999; Jinks et al. 2003a; Jinks et al. 2003b). Dagegen konnte er nachweisen, dass in Peri-MAC-Konzentrationen (0,8-1,2 MAC) sowohl bei Isofluran als auch bei Halothan die Aktivität der Vorderhornneurone deutlich abnimmt (Kim et al. 2007). Weiterhin wurde in einer Studie an dezerebrierten Ratten über die Ausschaltung des Mittelhirns gezeigt, dass sich das Zentrum für die Koordination einer Bewegung (schmerzinduzierter Reflex) im Vorderhorn des Rückenmarks befindet und volatile Anästhetika Immobilität hauptsächlich über die Modulation von Vorderhornneuronen induzieren (Jinks et al. 2008).

Das Gleichgewicht zwischen neuronaler Exzitation und Inhibition determiniert den Aktivitätszustand des ZNS. GABA und Glycin sind die wichtigsten inhibitorischen Transmitter im Rückenmark. Ihre Zielstrukturen, die GABA_A- und Glycinrezeptoren (Moss und Smart 2001; Todd et al. 1996) gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen. Mitglieder dieser Familie sind Heteropentamere. Die Untereinheiten, die diese Heteropentamere bilden, haben die gleiche Grundstruktur. Diese Grundstruktur, wie in Abbildung 1 gezeigt, beinhaltet eine lange extrazelluläre Kette mit einem Aminorest am Ende, vier Transmembransegmente, die durch die Lipidmembran hindurchreichen und eine kleine und große intrazelluläre Schleife, die die Transmembransegmente 1 und 2 als auch 3 und 4 verbinden (Ernst et al. 2003; Unwin 1998).

1.1.1 GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren sind eine wichtige Zielstruktur für Allgemeinanästhetika. Bei diesem Rezeptortyp handelt es sich um Chlorid-Ionenkanäle, die durch den Transmitter γ -Aminobuttersäure aktiviert werden. γ -Aminobuttersäure ist der wichtigste hemmende Transmitter im zentralen Nervensystem (Ernst et al. 2003; Sarto-Jackson und Sieghart 2008).

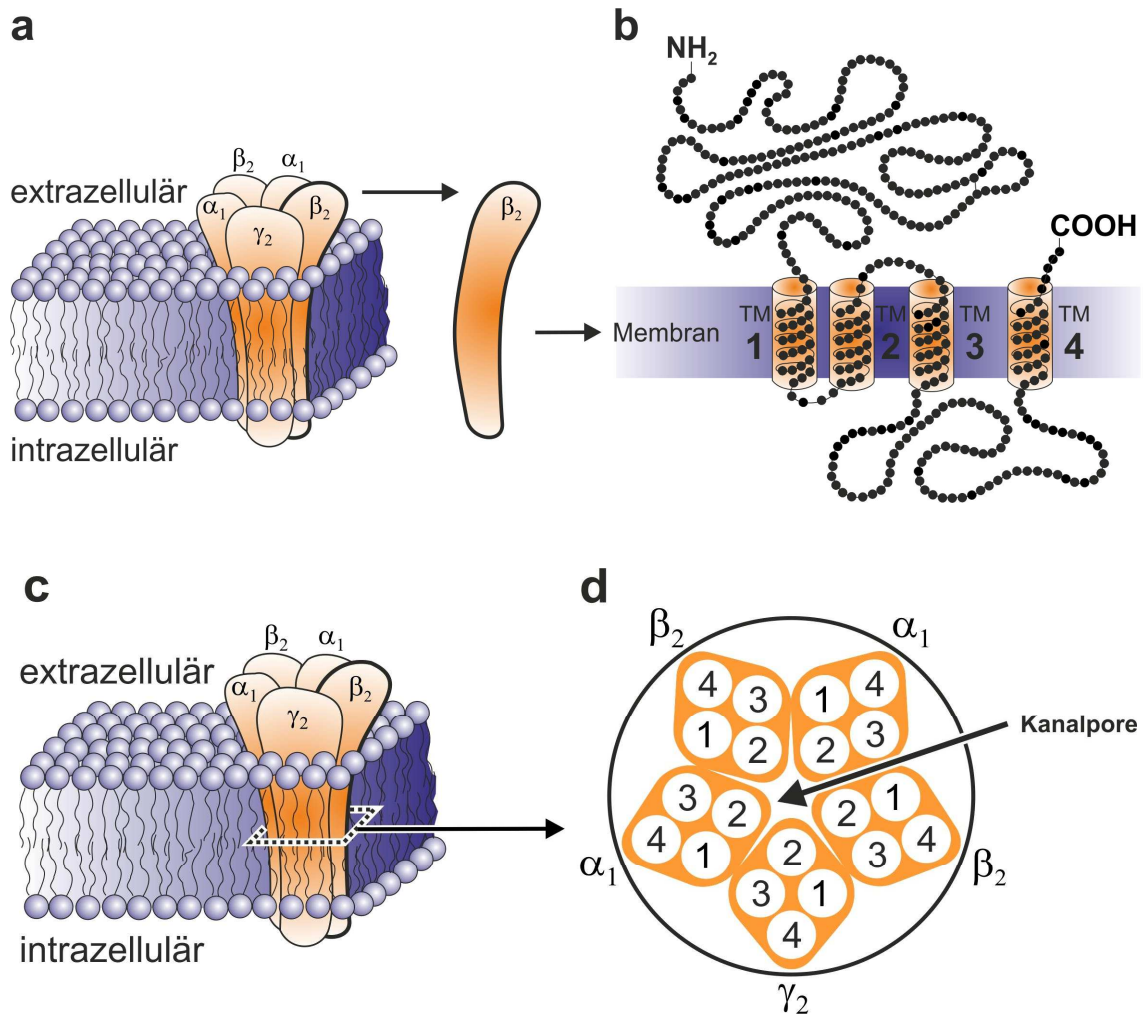


Abbildung 1: Molekularer Aufbau eines GABA_A-Rezeptors

a) Ein GABA_A-Rezeptor besteht aus 5 Untereinheiten b) Hier ist eine Untereinheit mit ihren 4 Transmembransegmenten dargestellt c) Ein GABA_A-Rezeptor in der Plasmamembran d) Querschnitt durch den Rezeptor, die Transmembransegmente 2 der jeweiligen Untereinheiten bilden die Kanalpore. Modifiziert nach Drexler (Drexler et al. 2006a)

Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines GABA_A-Rezeptors. Der Chlorid-Ionenkanal wird aus fünf Proteinuntereinheiten gebildet, die jeweils aus 400 bis 450 Aminosäuren bestehen. Diese Proteinuntereinheiten lagern sich so an, dass sie eine Pore bilden, durch die Chloridionen diffundieren können (Ernst et al. 2003). Im Detail sind an einer einzelnen Proteinuntereinheit eine extrazelluläre Kette mit einem Aminorest und vier α -Helices zu erkennen. Die α -Helices reichen durch die Zellmembran hindurch und bilden intrazellulär

zwischen den Transmembransegmenten 3 und 4 eine große Schleife. Die extrazelluläre Schleife kann, je nach Untereinheit, die Bindungsstelle für Liganden bilden.

GABA_A-Rezeptoren kommen in unterschiedlichen Subtypen vor. Diese Subtypen haben jeweils 5 Proteinuntereinheiten, die in ihrer Zusammensetzung differieren. Man kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt sechs α -, drei β -, drei γ -, eine δ -, eine ϵ -, eine θ -, eine π -, und drei ρ -Untereinheiten unterscheiden. Die drei am häufigsten vorkommenden Varianten ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$) machen ca. 90 % der im zentralen Nervensystem vorkommenden GABA_A-Rezeptoren aus (Whiting 2003). Der für Anästhetika relevante Subtyp weist zwei α_2 -, zwei β_3 - und eine γ_2 -Untereinheit auf (Reynolds et al. 2003).

Die von uns verwendeten Allgemeinanästhetika modulieren GABA_A-Rezeptoren in klinisch relevanten Konzentrationen. Die Bindungsstelle für das Allgemeinanästhetikum, sowie die GABA-Bindungsstelle sind am Rezeptor unterschiedlich lokalisiert. Viele Allgemeinanästhetika modulieren den Rezeptor positiv. Sie verstärken damit die aktivierende Wirkung des Transmitters GABA, indem sie die durch den physiologischen Agonisten induzierte Öffnungszeit des Kanals verlängern (Belelli et al. 1999). Abbildung 2 zeigt einen Schnitt durch einen GABA_A-Rezeptor mit den jeweiligen Bindungsstellen für GABA und verschiedene Modulatoren. Die Bindungsstelle für volatile und intravenöse Anästhetika ist wahrscheinlich nicht deckungsgleich. Wo genau die Bindungsstellen für Anästhetika liegen, konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden. Während die Bindungsstelle für intravenöse Anästhetika im Bereich der β -Untereinheiten liegt, scheinen bei den volatilen Anästhetika sowohl die α -, als auch die β -Untereinheiten eine Rolle zu spielen (Ernst et al. 2003).

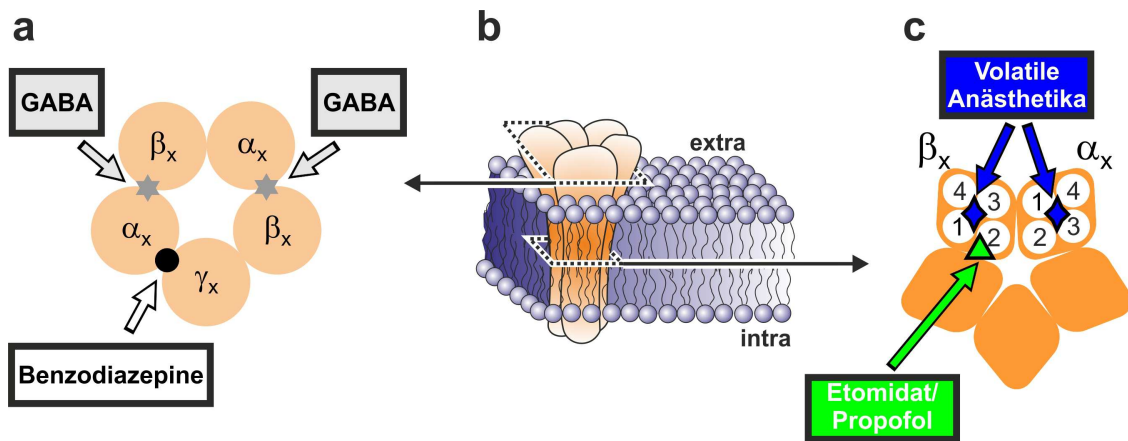


Abbildung 2: GABA_A-Rezeptor mit den Bindungsstellen für GABA und weitere Modulatoren.

Wichtig sind die unterschiedlichen Lokalisationen für verschiedene Anästhetika und GABA. Modifiziert nach Drexler (Drexler et al. 2006a)

1.1.2 GABAerge und glycinerge Synapsen

Ein wichtiger Wirkort für Anästhetika sind die Synapsen, an denen die hemmend wirkenden Transmitter GABA und Glycin ausgeschüttet werden. In Abbildung 3 wird kurz die Elektrophysiologie einer nervalen Erregung dargestellt.

Wenn ein Neuron ein Aktionspotential generiert, wird dies zur Präsynapse weitergeleitet. Hier öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle und es kommt zu einem Calciumeinstrom. Dieser bewirkt, dass sich Vesikel, gefüllt mit dem Transmitter, in diesem Beispiel GABA, der präsynaptischen Membran annähern und mit dieser verschmelzen. Dabei wird GABA in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und kann sich an Rezeptoren anlagern, die sich auf der postsynaptischen Membran befinden. Durch das Anlagern von GABA wird der Rezeptor mittels einer Konformitätsänderung aktiviert, und es können negativ geladene Chloridionen durch den Ionenkanal in die postsynaptische Zelle diffundieren und damit die Zellmembran hyperpolarisieren. Durch die Hyperpolarisation ist die postsynaptische Zelle weniger erregbar.

Die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt fällt bereits nach 1 ms auf den Ruhewert ab. Die Konzentration der GABA-Moleküle an den Bindungsstellen des Rezeptors bleibt deutlich länger erhöht.

Die Halbwertszeit von GABA am Rezeptor beträgt je nach Rezeptorsubtyp zwischen 10 und 100 ms. Daher klingt der postsynaptische Strom vergleichsweise langsam ab. In der Abbildung ist der Zeitverlauf dieses Stromes als blaue Kurve erkennbar. Rot stellt den postsynaptischen Strom unter Einfluss von Anästhetika dar. Diese Abbildung verdeutlicht das Wirkprinzip von Anästhetika. Allgemeinanaesthetika sind positive Modulatoren des GABA_A-Rezeptors, die als Koagonisten die Öffnungsdauer des Rezeptors erhöhen und den Effekt des Neurotransmitters GABA verstärken. Der postsynaptische Strom klingt langsamer ab (Drexler et al. 2006a; Mody und Pearce 2004), und die Fläche unter der Kurve als Surrogatparameter für den Ladungstransfer nimmt zu.

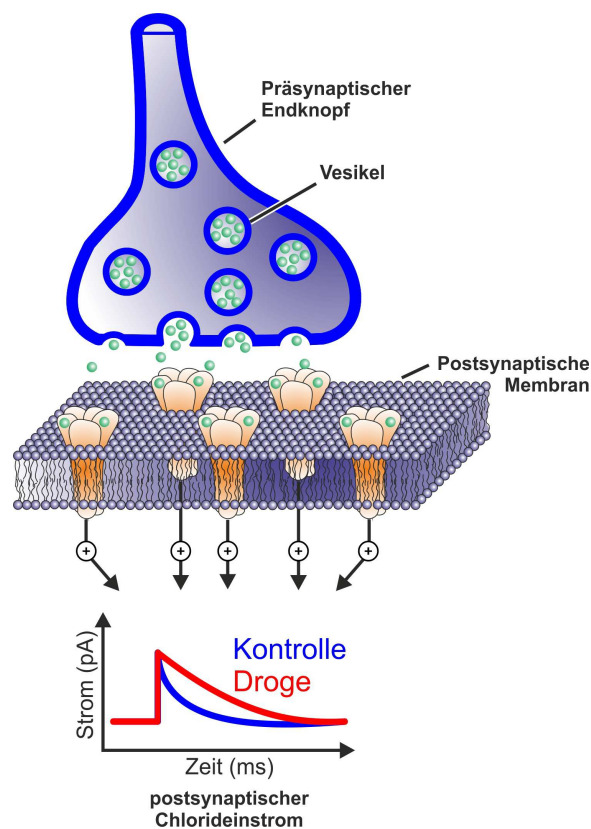


Abbildung 3: GABAerge Synapse und ein dazugehöriges IPSC

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch positive Modulation des GABA_A-Rezeptors die Erregbarkeit und Aktivität der Neurone des zentralen Nervensystems vermindert werden.

Glycinrezeptoren gehören ebenfalls zu der Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (Moss und Smart 2001). Während GABA in fast allen Körperregionen auch außerhalb des ZNS vorkommt, ist Glycin vor allem im Rückenmark und im Stammhirn ein wichtiger inhibitorischer Transmitter. Die Aminosäure Glycin kann zwei Klassen von Rezeptoren aktivieren. Zum einen den inhibitorisch wirkenden Glycinrezeptor und zum anderen den exzitatorisch wirkenden NMDA-Rezeptor aus der Familie der Glutamatrezeptoren. Dabei wirkt Glycin als Co-Aktivator, da die Anwesenheit der Aminosäure Voraussetzung für die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch Glutamat ist. (Cull-Candy et al. 2001; Grutter und Changeux 2001). Glycinerg vermittelte Inhibition im Rückenmark und im Hirnstamm spielt eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung und Kontrolle von Bewegungsabläufen, spinalen Reflexbögen und der Verarbeitung sensorischer Informationen (Harvey et al. 2004; Legendre 2001).

Wie in Abbildung 4 dargestellt, wird der Rezeptor aus 5 Proteinuntereinheiten gebildet. Durch diese Proteinuntereinheiten, die zusammengelagert ein Pentamer um einen Ionenkanal bilden, können bei einer Rezeptoraktivierung Chloridionen diffundieren. Durch diesen Chloridioneneinstrom wird das postsynaptische Neuron hyperpolarisiert und damit gehemmt (Betz und Laube 2006; Kirsch 2006).

Der Glycinrezeptor war der erste Neurotransmitter-Rezeptor, der im Säugetier-ZNS isoliert werden konnte. Durch Versuche mit Strychnin konnten zwei verschiedene Untereinheiten, α und β , isoliert werden (Pfeiffer et al. 1982).

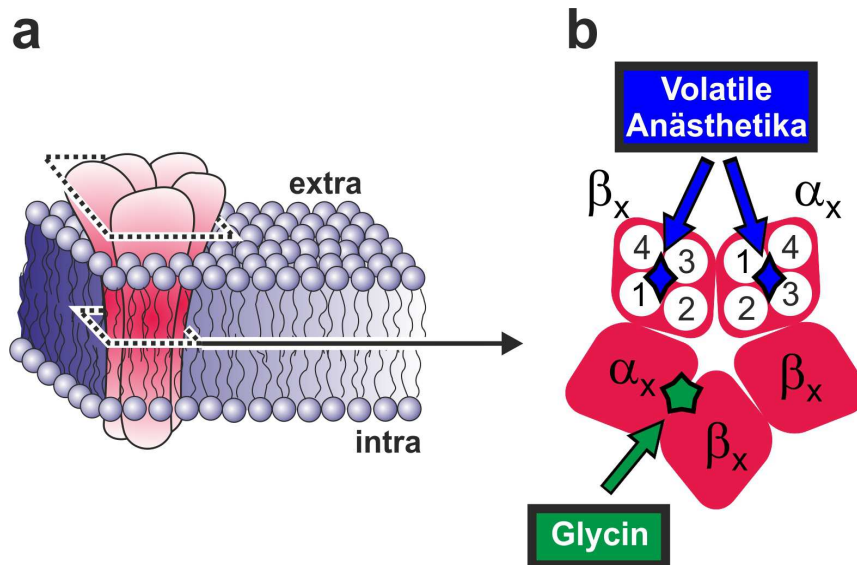


Abbildung 4: Molekulare Struktur des Glycinrezeptors

a) Schnitt durch den Glycinrezeptor b) Die Bindungsstelle für den Transmitter Glycin liegt zwischen der α - und β -Einheit

Später konnten verschiedene Isoformen der Glycinrezeptoruntereinheiten verifiziert werden (Kuhse et al. 1991). Es ist bekannt, dass diese Untereinheiten durch getrennte, aber verwandte Gene kodiert werden. Es gibt vier verschiedene Gene für die α -Untereinheiten (α_{1-4}) und ein Gen, das die β -Untereinheit kodiert.

Die Stöchiometrie der adulten Glycinrezeptoren beträgt $2\alpha : 3\beta$ (Grudzinska et al. 2005), wobei der häufigste heteromere Glycinrezeptor die $\alpha_1\beta$ -Variante ist (Lynch 2009). Eine Proteinuntereinheit beinhaltet eine große N-terminale extrazelluläre Domäne (ECD) und vier Transmembranproteine, (M1-M4) die so genannten α -Helices. Im Bereich der ECD ist auch die Bindungsstelle für Agonisten anzutreffen. Die Bindungsstelle für Glycin befindet sich zwischen zwei angrenzenden Transmembranproteinen. Die Transmembranproteine sind über eine extrazelluläre Schleife und zwei intrazelluläre Schleifen verbunden. Die große Schleife zwischen Transmembranprotein 3 und 4 der β -Untereinheit beinhaltet noch die Bindungsstelle für ein intrazelluläres Protein, das sogenannte Gephyrin. Gephyrin ist ein Protein, das den Rezeptor über

Tubulinfilamente an der postsynaptischen Membran fixiert. Während die α_1 - und α_3 -Proteinuntereinheiten in Kombination mit der β -Untereinheit bei adulten Säugetieren auftreten, kommen ausschließlich homomere α_2 -Proteinuntereinheiten bei embryonalen, beziehungsweise neonatalen Säugetieren, in einem Zeitraum bis etwa zwei Wochen nach der Geburt vor (Lynch 2009).

1.1.3 Kompetitive Antagonisten an inhibitorischen GABA_A- und Glycin-Rezeptoren: Bicucullin und Strychnin

Strychnin ist ein giftiges Alkaloid und wurde 1818 zum ersten Mal aus den Samen der gewöhnlichen Brechnuss isoliert. Es blockiert kompetitiv den Glycinrezeptor. Die klinischen Vergiftungszeichen sind Atemnot, Zittern der Muskulatur und schwere Muskelkrämpfe (Makarovsky et al. 2008).

Bicucullin ist ein lichtempfindlicher kompetitiver GABA_A-Rezeptorantagonist. Er konnte erstmals 1932 als Alkaloid aus diversen Pflanzen isoliert werden. Bicucullin selbst ist bei physiologischem pH instabil (Olsen et al. 1976) und in wässrigen Lösungen nur schlecht löslich. Daher werden hauptsächlich Bicucullinsalze für Experimente eingesetzt. Bicucullin blockiert den GABA_A-Rezeptor an dessen GABA-Bindungsstelle (Starke 2005). Da Bicucullin das wichtigste inhibitorische Rezeptorsystem des ZNS blockiert, ähnelt dessen Wirkung im Tiermodell der Epilepsie und wird deshalb weltweit in der Epilepsieforschung als Modellsubstanz *in vitro* eingesetzt. Antkowiak konnte zeigen, dass in kultivierten Cortexschnitten eine 20 μ Molare Bicucullinlösung nur bis zu 70 % der GABA_A-Rezeptoren hemmen kann (Antkowiak 1999). Um eine Hemmung aller GABA_A-Rezeptoren in einem kultivierten Hirnschnitt zu erreichen habe ich mich in meinen Experimenten dafür entschieden, eine 100 μ Molare Bicucullinlösung zu verwenden.

Experimenten mit Antagonisten liegt der Gedanke zugrunde, dass eine herabgesetzte Wirksamkeit eines Allgemeinanästhetikums, in Anwesenheit von einem spezifischen Antagonisten, für eine Modulation des entsprechenden Rezeptors spricht (Grasshoff und Antkowiak 2004; Sonner et al. 2003).

Für die Co-Applikation mit dem von mir getesteten Anästhetikum Sevofluran gilt, dass es potentiell drei Möglichkeiten gibt, wie ein spezifischer Antagonist die hemmende Wirkung des Anästhetikums auf die Aktionspotentialaktivität beeinflussen kann. Zum besseren Verständnis habe ich in Abbildung 5 diese drei Möglichkeiten veranschaulicht. In Abbildung 5 a sieht man als hellgrauen Balken aufgetragen eine angenommene „neuronale Restaktivität“ unter Einfluss einer definierten Konzentration des Anästhetikums (1 MAC). In diesem Beispiel sind es 20 %. Wenn sich unter Zugabe eines Rezeptorantagonisten an dieser Restaktivität nichts ändert (dunkelgrau-schraffierter Balken in Abbildung 5 a, so ist davon auszugehen, dass Sevofluran nicht über den zu isolierenden Rezeptortyp wirkt, sondern seine hemmenden Effekte über andere Rezeptorsysteme vermittelt werden. In Abbildung 5 b ist, wieder in hellgrau, das zweite hypothetische Ergebnis aufgetragen: die Applikation des Antagonisten hebt die Aktivität wieder auf 100 %. Dieses Ergebnis ist dahingehend zu interpretieren, dass Sevofluran ausschließlich über dieses Rezeptorsystem seine hemmende Wirkung vermittelt. In Abbildung 5 c ist das dritte hypothetische Ergebnis dargestellt: nach Zugabe des Rezeptorantagonisten steigt die neuronale Aktivität nicht auf 100 % an, sondern auf einen Wert zwischen 20 und 100 %. Dies impliziert, dass Sevofluran nur partiell über das untersuchte Rezeptorsystem wirkt und auch andere molekulare Zielstrukturen an der Vermittlung der hemmenden Wirkung beteiligt sind.

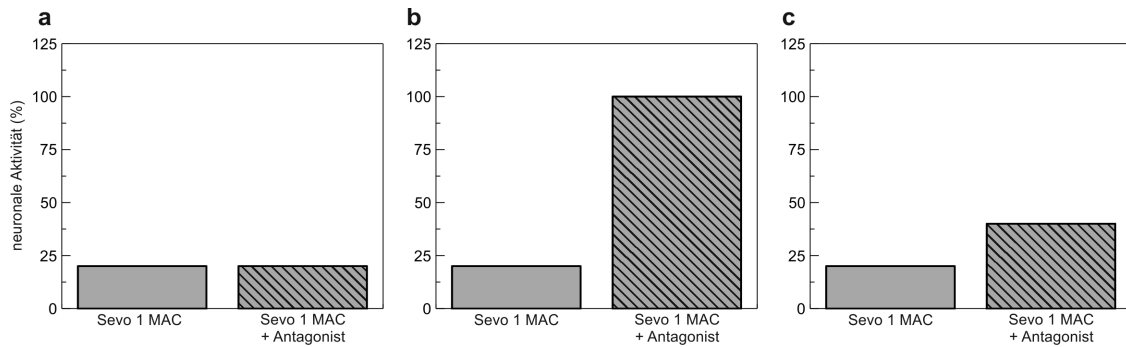


Abbildung 5: Schemata zur Verdeutlichung der Hypothesen zur pharmakologischen Isolierung von inhibitorischen Rezeptorsystemen mittels Strychnin oder Bicucullin
a) Sevofluran wirkt nicht über den antagonisierten Rezeptor b) Sevofluran wirkt nur über den Rezeptor c) Sevofluran wirkt teilweise über den Rezeptor

1.2 Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran

Durch Inhalationsanästhetika werden verschiedene Funktionen des ZNS reversibel verändert. Diese Funktionsänderungen sind dosisabhängig: Amnesie, Verlust des Bewusstseins (Hypnose) und die Abschwächung der Schmerzreflexe (Immobilität). Die Abwehrreaktionen auf Schmerzreize werden in hohen Konzentrationen unterdrückt. Die Narkosetiefe korreliert mit dem in der Lunge vorherrschenden Partialdruck des volatilen Anästhetikums.

Eine zielgerichtete Abwehrreaktion auf einen Schmerzreiz, zum Beispiel einen Hautschnitt, ist ein klinischer, vergleichsweise leicht zu erhebender Parameter, für die Determination der Narkosetiefe. Dieser wurde genutzt, um das MAC-Konzept zu entwickeln. Der MAC-Wert beschreibt die minimale alveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikums in Volumenprozent, die bei 50 % der Probanden eines untersuchten Kollektivs eine zielgerichtete Abwehrbewegung auf einen Schmerzreiz verhindert (Eger et al. 1965a).

Sevofluran ist ein halogener Ether aus der Gruppe der Flurane. Abbildung 6 zeigt die Strukturformel von Sevofluran. Sevofluran wird in der Allgemeinanästhesie zur Erzeugung von Hypnose, Amnesie und Immobilität eingesetzt. Es ist bei Raumtemperatur eine nicht brennbare, nicht explosive und eher angenehm riechende ätherische Flüssigkeit.

Die wesentlichen Eigenschaften, die die Geschwindigkeit der An- und Abflutung volatiler Anästhetika bestimmen, sind der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient, die alveoläre Ventilation, sowie die inspiratorische Konzentration. Sevofluran ist relativ schlecht im Blut löslich, der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient beträgt 0,65 (Ostwald-Verteilungskoeffizient λ bei 37 °C, 1 atm) im Vergleich zu Halothan ($\lambda=2,4$) und Isofluran ($\lambda=1,4$). Dadurch flutet das Gas in der Einleitungsphase einer Narkose rasch im Alveolarraum und in den gut perfundierten Organen wie Gehirn, Myokard, Nieren und Leber an. Somit kann Sevofluran als nicht irritatives volatiles Anästhetikum auch zur inhalativen Narkoseeinleitung verwendet werden. Während einer Narkose machen Abatmung und Umverteilungsvorgänge in weniger gut durchblutete Gewebe, wie Fettgewebe und Muskulatur, eine ständige Zufuhr von Sevofluran nötig, um den alveolären Partialdruck auf konstantem Niveau zu halten.

Sevofluran ist ausgesprochen lipidlöslich. Der Fett/Blut-Verteilungskoeffizient ist ähnlich dem von Halothan und Isofluran, und liegt bei 48. Sevofluran kann zügig über die Blut-Hirnschranke in das Gehirn penetrieren und ist schnell wirksam.

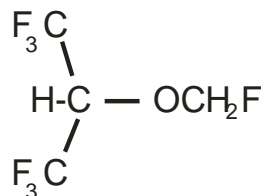


Abbildung 6: Strukturformel von Sevofluran [Fluormethyl-2,2,2-trifluor-1-(trifluormethyl)äthyl-Äther]

Weiterhin können beim Kontakt von Sevofluran mit Bestandteilen der CO₂-Absorber (Natrium-Hydroxid, Kalium-Hydroxid) geringe Mengen an Compound A und Compound B entstehen. In tierexperimentellen Studien ergaben sich leichte nephrotoxische Schäden ab einer Konzentration von 114 ppm für Compound A. Allerdings gibt es auch eine klinische Studie, die zeigt, dass Compound A für den Menschen kein nephrotoxisches Potential besitzt (Bito und Ikeda 1994). Das in der Leber gebildete HFIP wird in glukuronidierter Form schnell über die Nieren ausgeschieden (Eger 2009).

1.3 Fragestellung

Immobilität als wichtige Komponente der Allgemeinanästhesie wird durch die Unterdrückung der Aktionspotentialaktivität der Interneurone im Vorderhorn des Rückenmarks induziert. Es ist bekannt, dass die Aktionspotentialaktivität der Interneurone physiologischerweise durch GABAerge und glycinerge inhibitorische Rezeptorsysteme moduliert wird. Überraschenderweise zeigten *in vivo* Experimente an Ratten, dass durch Anästhetika induzierte Immobilität vorwiegend über die Modulation glycinerge, jedoch weniger über GABAerge Rezeptoren vermittelt wird (Sonner et al. 2003). Völlig unklar ist jedoch, wieso eine Modulation inhibitorischer GABA_A-Rezeptoren nur eine untergeordnete Rolle bei der Hemmung der Aktionspotentialaktivität der Interneurone im Vorderhorn des Rückenmarks spielt. Hieraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Wie beeinflusst das volatile Anästhetikum Sevofluran die inhibitorische Transmission von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren im Vorderhorn des Rückenmarks?
2. Ändert sich dieser Einfluss mit zunehmenden Konzentrationen des Anästhetikums?

3. Kann aus den Ergebnissen eine Arbeitshypothese abgeleitet werden, die die *in vivo* gewonnenen Beobachtungen erklärt, dass bei zwei verschiedenen inhibitorischen Rezeptorsystemen offenbar nur eines für die Hemmung der Aktionspotentialaktivität in klinisch relevanten Konzentrationen des volatilen Anästhetikums verantwortlich ist?

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird neben den verwendeten Materialien die Herstellung von organotypischen Kulturen erläutert. Sie werden als „organotypisch“ bezeichnet (Crain 1966), da bei diesen Gewebekulturen, obwohl sie zu einem sehr frühen Zeitpunkt entnommen werden, *in vitro* zahlreiche Entwicklungsprozesse ähnlich denen *in vivo* ablaufen. Es bilden sich neuronale Netzwerke aus, an denen pharmakologische Untersuchungen durchgeführt werden können.

2.1 Präparation organotypischer Rückenmark-Schnittkulturen

Gähwiler beschrieb im Jahr 1981 zum ersten Mal eine Methode zur Herstellung und Kultivierung von Gewebeschnitten (Gähwiler 1981). Die Gewebeschnitte stammten damals aus unterschiedlichen Regionen des ZNS. Diese organotypische Kultivierungsmethode weist den Vorteil auf, dass wichtige Differenzierungsprozesse, wie die Entwicklung gewebespezifischer Zelltypen, auch *ex vivo* stattfinden.

Für die vorliegende Arbeit wurden organotypische Gewebeschnitte des Rückenmarks nach der von Braschler und Kollegen verfeinerten Methode aus Mäuseembryonen hergestellt (Braschler et al. 1989). Dafür wurden Wildtypmäuse 'Jackson Black 6/J' gepaart. Die Mäusemutter wurde dann am 14. bis 15. Schwangerschaftstag mittels Isofluran bis zum Erliegen des Aufrichtreflexes (im Tiermodell ein Maß für die Hypnose) narkotisiert und anschließend mit einer Guillotine (Harvard apparatus, Edinbridge, Kent, England) dekapitiert. Das Bauchfell wurde mit 99-prozentigem Alkohol (Ethanol, Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) desinfiziert, und das Fell an der Bauchseite unter Schonung des Peritoneums abpräpariert. Alle verwendeten Instrumente für die Präparation stammten von der Firma FST (Fine Science

Tools, Heidelberg, Deutschland). Nach der Eröffnung des Peritoneums wurde der Uterus eröffnet und die Embryonen steril entnommen und in eine, mit eiskalter Gey's-Lösung gefüllte, sterile Petrischale gelegt. Gey's-Lösung (GBSS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) ist eine Salzlösung, die 1,5 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 0,22 mM KH_2PO_4 , 11 mM MgCl_2 , 0,3 mM MgSO_4 , 137 mM NaCl, 0,7 mM NaHCO_3 und 33 mM D-Glucose enthält. Die Petrischale mit dem Uterus und den darin enthaltenen Embryonen wurde zur weiteren Präparation unter eine Sterilbank (BDK Luft & Reinraumtechnik GmbH, Reutlingen, Deutschland) gebracht und auf eine Kühlplatte gestellt. Zur Verbesserung der Kontrastverhältnisse wurde ein schwarzes Papier unter die Petrischale geschoben. Nun wurden unter einem Binokular (Leitz, Wetzlar) mit externer Kaltlichtbeleuchtung (Intralux 150H, Volpi, Denzlingen, Deutschland) die Embryonen von Uterus und Amnionsack befreit und jeder einzelne Embryo in eine sterile Petrischale, mit eiskalter Gey's-Lösung gefüllt, separiert. Es wurden pro Präparationstag zwischen 2 und 4 Embryonen präpariert. Im Anschluss wurden die einzelnen Embryonen sequentiell dekapitiert und das Rückenmark von dem umliegenden Gewebe und der Dura mater befreit. Schließlich wurden die einzelnen Rückenmarkstränge in einen ca. 2 cm langen, 1 cm hohen und 7 mm dicken Agarblock eingebettet.

Für die Zubereitung des Agars (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden 750 mg hochreinen Agars abgewogen (Merck, Darmstadt, Deutschland), in 50 ml Gey's-Lösung gegeben und auf einer Heizplatte mit integriertem Rührer (Heidolph MR 3001, Deutschland) aufgelöst und mehrmals zum Kochen gebracht. Im heißen flüssigen Zustand wurde ein Teil des Agars in eine sterile Petrischale gegossen bis eine Dicke von etwa 7 mm erreicht wurde.

Nach dem Erhärten wurde aus dem Agar ein ca. 2 cm langer, 1 cm hoher und 7 mm dicker Block mit U-förmigen Vertiefungen für die Rückenmarkstränge hergestellt. Nach dem Einbetten wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette das Rückenmark mit dem restlichen, flüssigen Agar vorsichtig überträuelt und damit

verschlossen. Sofort wurde der Agar und die darin enthaltenen Rückenmarkstränge mit eiskalter Gey's-Lösung gekühlt und die Kanten des Agarblockes mit einer zuvor sterilisierten Rasierklinge (Blades, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) begradigt. Weiterhin wurde ein Agarblock als Stütze benötigt. Dieser, ein 2-prozentiger Agarblock, wurde an einer Kantenlänge mit Sekundenkleber (Tesa Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) bestrichen und auf einen Teflonblock (Lee, Frankfurt, Deutschland) geklebt. Ebenso wurde der 1,5-prozentige Agarblock mit den Rückenmarksträngen an einer Kantenlänge mit Sekundenkleber bestrichen und direkt neben dem 2-prozentigen Agarblock platziert, so dass dieser als Stütze dienen konnte. Mit Hilfe eines Vibratoms (Campden Instruments LTD Vibroslice U.K.) mit gekühlter Badkammer (Kältetechnik Fryka, Esslingen, Deutschland) wurden 300 µm dicke, transversale Schnitte des Rückenmarkes angefertigt. Diese wurden nach der Dissektion wieder in sterile, mit eiskalter Gey's-Lösung gefüllte Petrischalen gelegt und von dem Agar mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette befreit.

Im Anschluss wurden die spinalen Schnitte auf bereits vorbereitete Deckgläser 12 x 24 mm (Kindler O. GmbH & Co. Mikroskopische Gläser, Freiburg, Deutschland) aufgebracht. Die Deckgläser wurden mindestens einen Tag vor der Rückenmarkspräparation 20 Minuten lang in einem Deckglashalter in Alkohol gekocht und danach abgekühlt. Danach wurde unter der Sterilbank der Alkohol durch das Anzünden der Deckgläser wieder entfernt und die Deckgläser in sterile Petrischalen gelegt. Jetzt wurden 0,5 ml einer Stammlösung mit 500 µg/ml Poly-D-Lysin mit 9,5 ml Aqua Destillata (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) unter der Sterilbank vermischt. Von diesem Gemisch wurden 230 µl auf jeweils einem Deckglas verteilt und nach etwa 3 Stunden mit Aqua Destillata wieder abgewaschen und getrocknet. Die fertigen Deckgläser wurden in einer sterilen Petrischale aufbewahrt.

Auf die fertigen Deckgläser wurde jeweils 13 µl heparinisiertes Hühnerplasma (P3266, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) aufgebracht. In das Hühnerplasma wurde der Rückenmarksschnitt mit Hilfe zweier kleiner

Spatel gelegt. Danach wurden sofort 13 µl Thrombin 10.000 U (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zugefügt und die Schnitte somit auf den Deckgläsern fixiert. Nach etwa 10 Minuten war das Koagulat fest und die Deckgläser mit den daran haftenden Schnitten konnten jeweils in ein steriles Plastikkulturrohrchen (Nunc A/S Roskilde, Dänemark) gelegt werden. In das Kulturrohrchen wurden zusätzlich 750 µl Nährlösung und 15 µl NGF, ein neuronaler Wachstumsfaktor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gegeben. Die sterile Nährlösung setzte sich aus 100 ml Pferdeserum, 100 ml Hanks (beide von Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 4 ml 50-prozentige D-Glucose, 2 ml Glutamat zu 200 mM und 200 ml Eagles Basalmedium ohne Glutamin (alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zusammen. Die Kulturrohrchen wurden bei nur leicht verschraubtem Deckel für etwa 2 Stunden in einem Wärmeschrank (Thermo scientific, Heraeus, Hanau, Deutschland) mit 5-prozentigem CO₂ begast und danach zugeschraubt. Das CO₂ wird benötigt um den pH-Wert der Nährlösung zu stabilisieren. Nach viertägiger Kultivierung bei 36 °C durch die Roller-Tube-Technik im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) wurden einmalig 10 µl Zytostatika dem Nährmedium zugesetzt. Die Zytostatikalösung bestand aus 10 µM 5-Fluro-2-Deoxyuridine, 10 µM Cytosin-B-D-Arabino-Furanosid und 10 µM Uridin und diente der Begrenzung der Gliazellproliferation. Zweimal in der Woche wurde das Nährmedium erneuert und in den ersten beiden Wochen der Kultivierung wurden jeweils zusätzlich 15 µl des NGF zugesetzt. Nach jedem Mediumwechsel wurden die Kulturrohrchen mit leicht verschraubtem Deckel im Brutschrank für 2 Stunden mit 5-prozentigem CO₂ begast. Nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen konnten die Zellkulturen für elektrophysiologische Untersuchungen herangezogen werden. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung der Präparation.

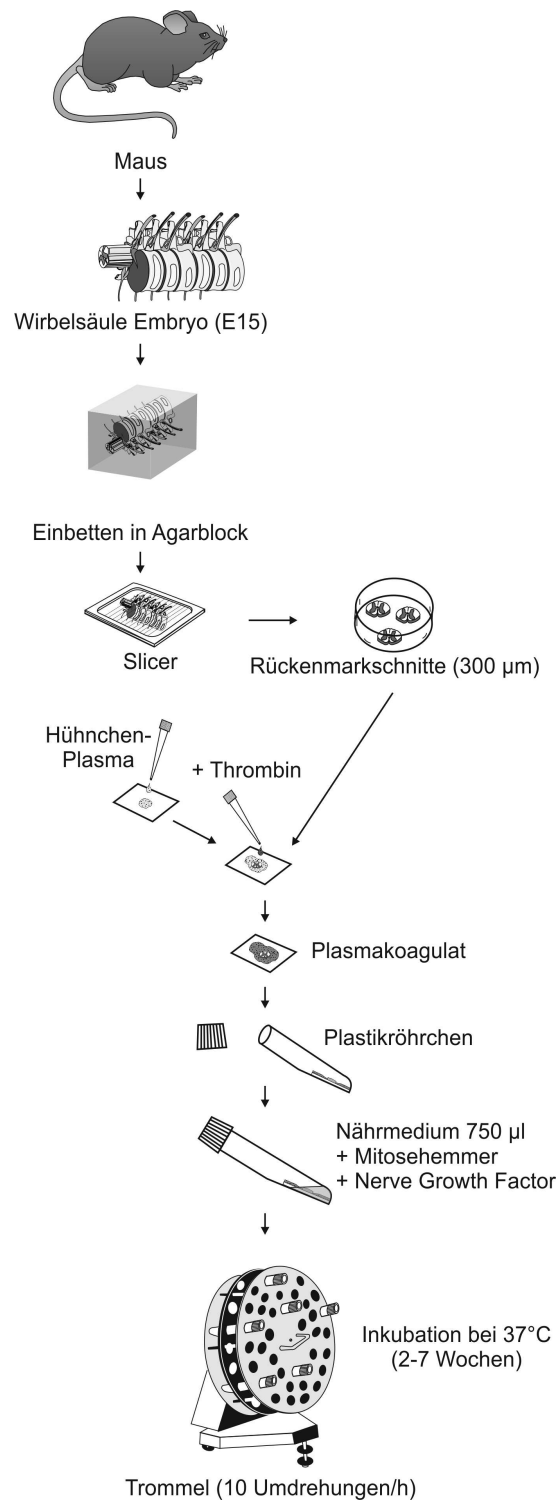


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung von organotypischen Rückenmark-Schnittkulturen von Wildtypmäusen

2.2 Roller-Tube-Technik

Die Kultivierung der Rückenmarksschnitte erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) in einer horizontal leicht geneigten Trommel. Diese Trommel drehte sich mit einer Geschwindigkeit von 10 Umdrehungen pro Stunde, gewährleistete somit eine kontinuierliche Durchmischung von Flüssigkeit und Gas und stellte damit eine ausreichende Oxygenierung und Versorgung der Kulturen mit Nährstoffen sicher. Während der Kultivierung flachten die Schnitte ab, bis im Idealfall ein Monolayer entstand.

2.3 Elektrophysiologie

Die Messelektroden für die extrazellulären Messungen wurden aus Borosilikatkapillaren (OD 1,0 mm, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit einem Horizontalpuller (DMZ-Universal, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Deutschland) gezogen. Die Messelektroden wiesen einen Spitzendurchmesser von ca. 1 bis 2 μm auf. Die Elektroden wurden anschließend mit ACSF, befüllt. Die ACSF bestand aus 120 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,13 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 26 mM NaHCO_3 , 1,8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 11 mM D-Glucose (alle Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst in Aqua Destillata. Anschließend wurde die ACSF mindestens 30 Minuten lang mit 95-prozentigem O_2 und 5-prozentigem CO_2 (Carbogen 5, Westfalen AG, Münster, Deutschland) begast, um einen pH-Wert von etwa 7,4 zu erreichen. Die mit ACSF gefüllten Elektroden wiesen einen elektrischen Widerstand zwischen 2 und 5 $\text{M}\Omega$ auf. Um die Elektroden adäquat in den Rückenmarksschnitten platzieren zu können, wurde ein Mikroskop (Axiovert 135M, Zeiss, Jena, Deutschland) benutzt. Die Messkammer bestand aus einem Metallrahmen und einem Glasboden. Um den Metallrahmen herum war ein Heizdraht (Philipps, Niederlande) gelötet, so dass die Messungen bei gleichbleibenden Temperaturen zwischen 34 °C und 36 °C

durchgeführt werden konnten. Über ein Digitalthermometer (Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland) konnte die Temperatur kontrolliert werden. Weiterhin befand sich eine Referenzelektrode Ag/AgCl 2 mm x 4 mm (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) in der Badkammer. Während des Versuches wurde der Rückenmarkschnitt mit begaster ACSF umspült. Für den Zu- und Abfluss der ACSF sorgten jeweils IPC-Peristaltik-Pumpen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland). Die Durchflussrate betrug 1 mL/min.

Für jede Messung wurden zwei Elektroden über dem Rückenmarksschnitt platziert und dann in das Gewebe vorgeschoben. Wenn Aktionspotentiale eindeutig vom Grundrauschen abzugrenzen waren (extrazelluläre Spikes mit einer Amplitude von etwa 0,1 mV), wurde mit dem Beginn der Aufzeichnungen noch mindestens 5 Minuten gewartet, um stabile Versuchsbedingungen zu garantieren. Weiterhin wurde sichergestellt, dass sich der Rückenmarksschnitt mindestens 20 bis 30 Minuten in der Badkammer befand, bevor der Versuch gestartet wurde. Damit wurde bezweckt, dass sich die Rückenmarkszellen an die ACSF adaptieren konnten und die erzielten Ableitungen konstant blieben. Die Position der Elektroden wurde so gewählt, dass die Messungen im Bereich des Vorderhorns des Rückenmarkes durchgeführt wurden.

2.4 Herstellung der chemischen Lösungen und Art der Applikation

Die chemischen Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch hergestellt. Dazu wurde als Trägerlösung ACSF verwendet. Sevofluran (SEVOrane, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) wurde in folgenden Konzentrationen getestet: 0,5 MAC, 1 MAC und 1,5 MAC (entsprechend 0,175, 0,350 und 0,525 mmol/L). Die gewählten Konzentrationen entsprechen den Plasmaspiegeln von volatilen Anästhetika in Säugetieren bei 37 °C (Franks und

Lieb 1996). Dazu wurden 290 ml begaste ACSF in einen genormten Glaskolben gefüllt und mit der entsprechenden Menge Sevofluran gemischt. Strychnin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde in einer 1 μM -Konzentration verwendet und Bicucullin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in einer 100 μM Konzentration. Auch diese beiden Substanzen wurden entsprechend in begaster ACSF gelöst. Anschließend wurden die gebrauchsfertigen Lösungen in gasdichte Glaskolben (ZAK, Medizintechnik, Marktheidenfeld, Deutschland) umgefüllt und mit einer Spritzenpumpe (Harvard apparatus, Edinbridge, Kent, England) über Teflonschläuche (Lee, Frankfurt, Deutschland) in die Badkammer gepumpt. Die Durchflussrate betrug 1 mL/min.

2.5 Versuchsprotokoll

Die Messungen wurden mit verschiedenen Sevoflurankonzentrationen durchgeführt. Es wurden 0,5 MAC, 1 MAC und 1,5 MAC Sevofluran getestet. Die inhibitorischen Rezeptorsysteme wurden jeweils mit 1 μM Strychnin oder mit 100 μM Bicucullin isoliert. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Darstellung der Spritzenfüllung.

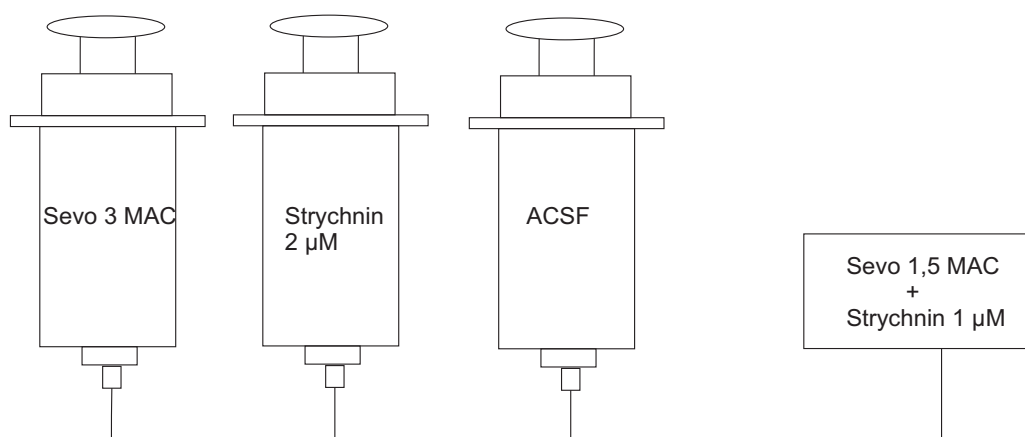


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Spritzenfüllung

Nach Platzierung der Elektroden wurde 5 Minuten gewartet, um sicherzustellen, dass die Aktivitätsmuster stabil waren. Insgesamt wurde darauf geachtet, dass sich der Rückenmarksschnitt mindestens 20 bis 30 Minuten an das neue Medium adaptieren konnte, bevor die Messung gestartet wurde. Sobald die Ableitungen stabil waren, wurden zweimal dreiminütige Kontrollmessungen aufgezeichnet. Danach wurde über zwölf Minuten Sevofluran eingewaschen und die Aktionspotentiale über zweimal drei Minuten aufgezeichnet. Im Anschluss wurde Sevofluran zusammen mit Strychnin über zwölf Minuten eingewaschen und wiederum zweimal dreiminütige Aufzeichnungen durchgeführt. Am Ende folgte nochmals ein zwölfminütiger Auswasch mit ACSF und eine dreiminütige Aufzeichnung. Abbildung 10 zeigt den zeitlichen Verlauf des Versuchsprotokolls.

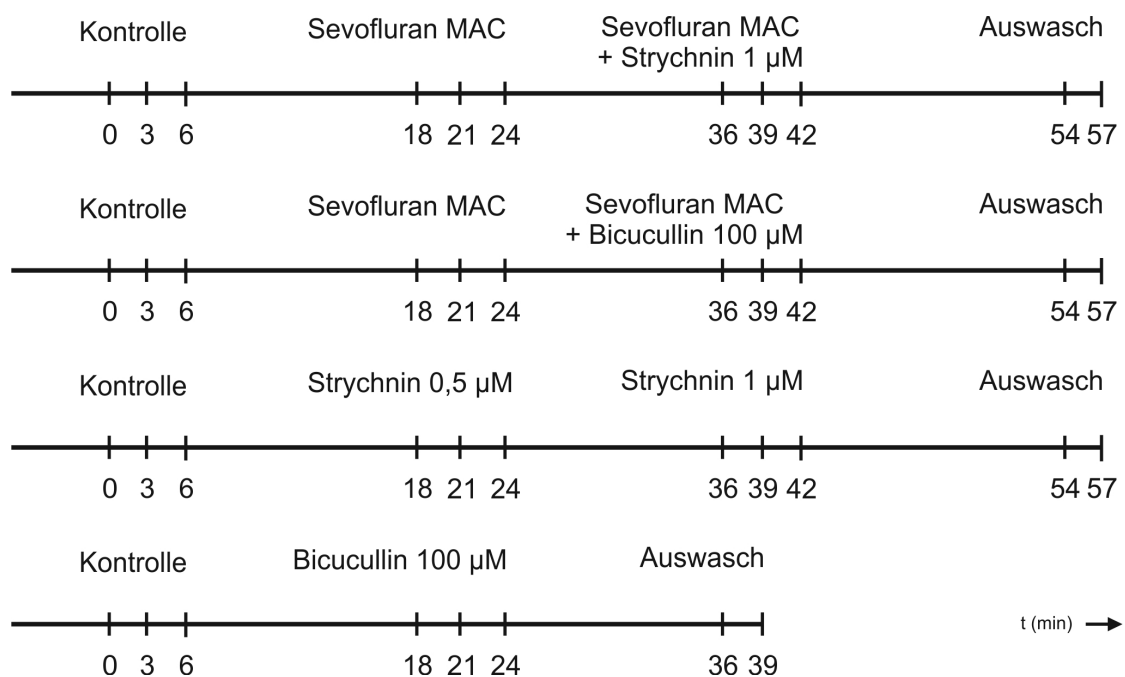


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf des Versuchsprotokolls.

t ist die Zeitachse in Minuten. Jede Zeile stellt ein Experiment mit einer Schnittkultur dar. Nachdem die Kultur sich mindestens 20 Minuten an die ACSF adaptieren konnte, wurden die Aktionspotentiale zweimal für jeweils drei Minuten aufgezeichnet. Für die Auswertung wurden grundsätzlich nur die zweiten Aufzeichnungen verwendet.

Die ACSF wurde über die gesamte Versuchsdauer mit 95-prozentigem O₂ und 5-prozentigem CO₂ (Carbogen 5, Westfalen AG, Münster, Deutschland) begast, um einen gleichbleibenden pH-Wert von 7,4 sicherzustellen.

2.6 Datenanalyse

Zentraler Parameter der Auswertungen war die Aktionspotentialaktivität oder 'Feuerrate'. Die 'Feuerrate' entspricht der Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit und ist damit ein Parameter für die neuronale Aktivität. Die Aktionspotentiale und die Feldpotentiale wurden mit Hilfe eines PC, einer analog-digitalen Wandlerkarte Digidata 1200 AD/DA und dem Computerprogramm Axoscope 9 (beide von Axon Instruments, Union City, Kalifornien, USA) aufgezeichnet und gesichert.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, mussten zuerst die Feldpotentiale und die Aktionspotentiale getrennt werden, um die Messungen bezüglich der Feuerrate auswerten zu können. Deshalb wurde das Rohsignal mittels eines Tiefpass- (< 100 Hz) und Hochpassfilters (> 300 Hz) separiert. Durch einen Tiefpassfilter ließen sich die Feldpotentiale darstellen und mit einem Hochpassfilter die Aktionspotentiale. Um die Aktionspotentiale zu quantifizieren, wurde, wie in Abbildung 12 gezeigt, eine Schwelle definiert.

Um Messungen bewerten und auswerten zu können, wurden im Vorfeld für die Rohsignale sogenannte Ausschlusskriterien festgesetzt.

1. Auswasch = Kontrolle; in beiden Aufzeichnungen annähernd gleiche Aktivität (bis Faktor 2 in beide Richtungen erlaubt)
2. keine gegensätzlichen Effekte in den Feldpotentialen und Spikes
3. keine Veränderungen im Grundrauschen
4. keine plötzlichen Veränderungen in den Aktivitätsmustern, die während der Messung auftreten

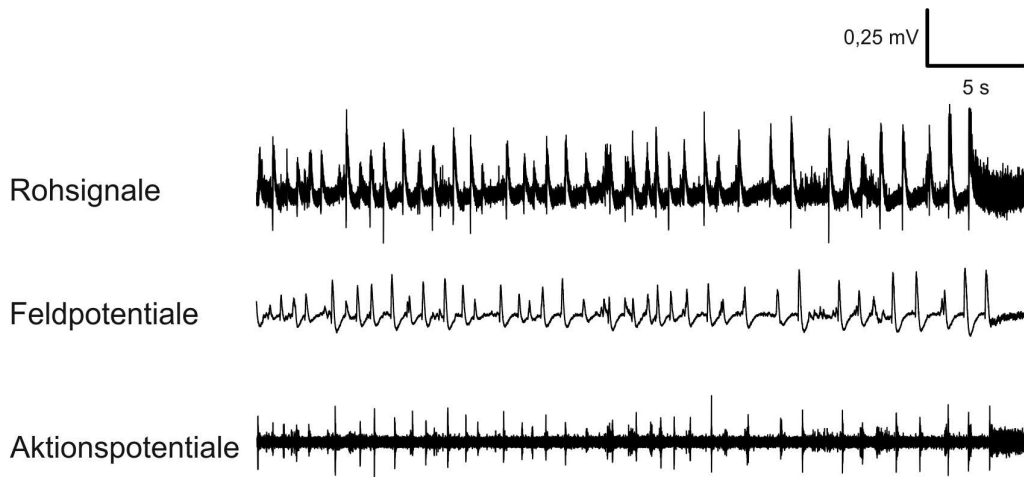


Abbildung 11: Originalaufzeichnungen extrazellulärer Messungen an Rückenmarksschnittkulturen. Separierung von Feld- und Aktionspotentialen mittels Tief- bzw. Hochpassfilter

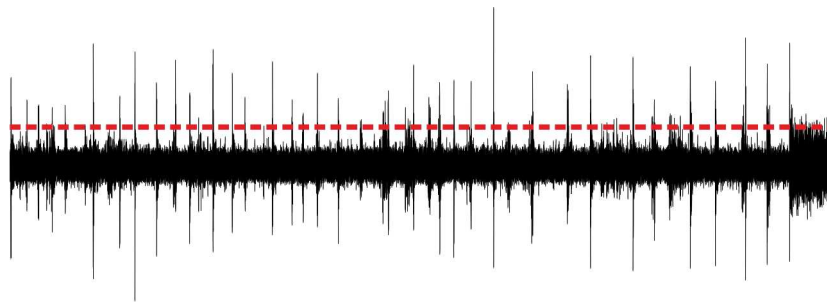


Abbildung 12: Quantifizierung der Aktionspotentialaktivität mittels Schwellensetzung

Wenn diese Voraussetzungen erfüllt waren, wurde das jeweilige Experiment in die statistische Auswertung mit einbezogen. Ausgewertet wurden alle Messungen mit Hilfe eines PCs und dem Computerprogramm MATLAB Version 7.5 (The MathWorks Inc, Natick, USA). Die Abbildungen wurden mit dem Computerprogramm OriginPro Version 7 SR1 (Origin LAB Corporation, Nothampton, USA) generiert und in Corel Draw X4 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) weiter bearbeitet. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test und die einseitige Varianzanalyse ANOVA benutzt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgetragen.

3 Ergebnisse

Für diese Studie wurden die Ergebnisse von Messungen aus insgesamt 164 Schnittkulturen des Rückenmarks von Mäuseembryonen ausgewertet. In Abbildung 13 wird exemplarisch ein Aktivitätsmuster unter Kontrollbedingungen, also ohne Medikamenteneinwirkung, dargestellt. Der Zeitverlauf der Aktionspotentialaktivität eines spinalen Neurons ist auf der x-Achse dokumentiert. Die Ausschläge auf der y-Achse (in mV) stellen die Aktionspotentiale dar. Diese Aktionspotentiale heben sich durch vertikale Spikes deutlich vom Grundrauschen ab. Die Aktionspotentiale sind durch Phasen ohne neuronale Aktivität (Ruhepausen), unterbrochen. Ein Messintervall betrug drei Minuten. Alle Daten für diese Studie wurden auf die Kontrolle normalisiert.

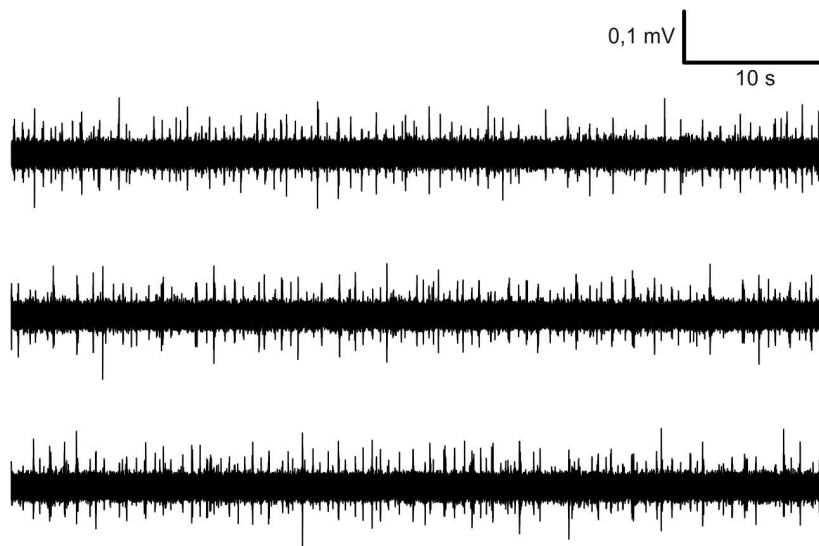


Abbildung 13: Spontane neuronale Aktionspotentialaktivität eines spinalen Vorderhornneurons unter Kontrollbedingungen, dargestellt als Rohspur aus den Originalaufzeichnungen

3.1 Wirkung von Sevofluran auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten

In Abbildung 14 werden die konzentrationsabhängigen Effekte von Sevofluran auf die spontane Netzwerkaktivität von kultivierten Rückenmarkschnitten gezeigt. Messgröße ist die Feuerrate in Hz, die Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normalisiert. Die einzelnen Werte für jede Konzentration wurden aus mehr als 30 Einzelmessungen berechnet. Die Werte sind normal verteilt und dargestellt als MW \pm SEM. Sevofluran führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aktionspotentialaktivität: 0,5 MAC Sevofluran hemmte die Feuerrate auf $0,50 \pm 0,04$, 1 MAC Sevofluran auf $0,16 \pm 0,03$ und 1,5 MAC Sevofluran auf $0,12 \pm 0,03$ des Kontrollwertes.

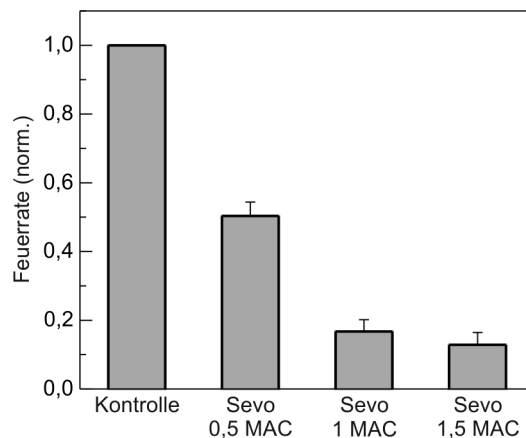


Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Effekte von Sevofluran auf die Feuerrate von spinalen Vorderhornneuronen

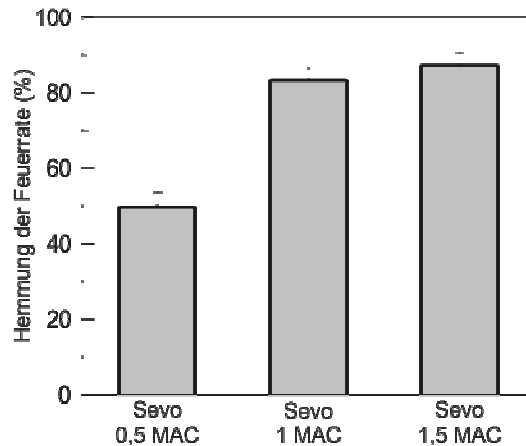


Abbildung 15: Hemmung der Feuerrate in %

Zum besseren Verständnis wurde in Abbildung 15 die konzentrationsabhängige Hemmung der spinalen Aktionspotentialaktivität als Hemmung in Prozent dargestellt. Zur Berechnung diente die Differenz aus Kontrolle und entsprechender Feuerrate unter Einwirkung von Sevofluran. 0,5 MAC Sevofluran hemmt die neuronale Aktivität um 50 %, 1 MAC Sevofluran um 84 %, und mit einer Sevoflurankonzentration von 1,5 MAC kommt es zu einer Hemmung von 88 %.

3.2 Effekte von Strychnin auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten

Um die Bedeutung der hemmenden Rezeptorsysteme GABA_A und Glycin für die spontane Aktionspotentialaktivität abschätzen zu können, wurde in weiteren Experimenten die Wirkung von Sevofluran auf die neuronale Aktivität in An- und Abwesenheit des Glycin-Rezeptorantagonisten Strychnin und des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin untersucht. Glycin- und GABA_A-Rezeptoren sind wesentliche Komponenten der Inhibition im Vorderhorn des Rückenmarks.

Eine selektive Blockade eines dieser Rezeptorsysteme sollte daher eine Steigerung der neuronalen Aktivität induzieren. Die Rationale hierzu ist, dass durch die Blockade eines inhibitorischen Rezeptorsystems, wie in diesem Falle des glycinergen Systems, der entsprechende hemmende Neurotransmitter nicht mehr in der Lage ist, sich an dem entsprechenden Rezeptor anzulagern, und diesen zu aktivieren. Um eine vollständige Blockade der Rezeptoren zu erreichen wurde eine 1 μ Molare Strychninlösung gewählt. In einer Studie konnten Bracci und Mitarbeiter zeigen, dass eine weitere Erhöhung der Strychninkonzentration über 1 μ M keinen Einfluss auf die Häufigkeit und Dauer der Feuerrate hat (Bracci et al. 1996). Abbildung 16 a zeigt eine Originalaufzeichnung unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von 0,5 μ M und 1 μ M Strychnin. Wie in Abbildung 16 b gezeigt, steigt die Feuerrate (normalisiert) in Anwesenheit von 0,5 μ M Strychnin auf $2,00 \pm 0,19$ SEM und in Anwesenheit von 1 μ M Strychnin auf $2,18 \pm 0,16$ SEM. Das entspricht einer prozentualen Steigerung der neuronalen Aktivität um 100 % (0,5 μ M), beziehungsweise um 118 % (1 μ M).

Der Effekt ist in dem Modellsystem nicht auswaschbar.

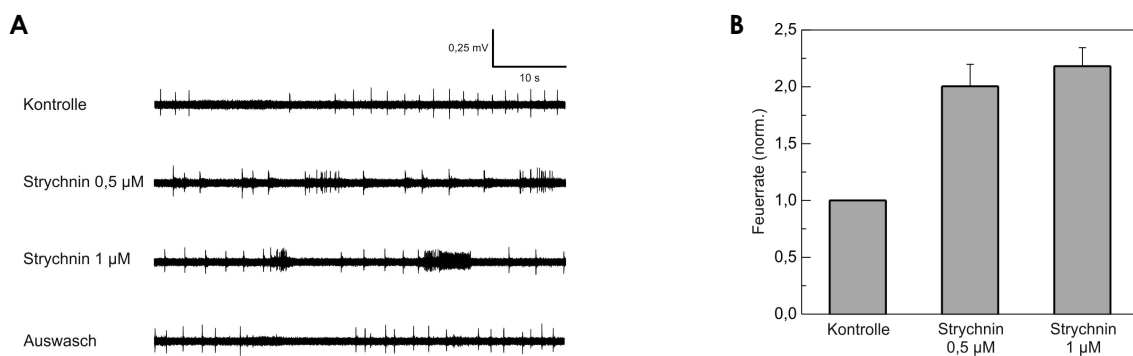


Abbildung 16: a) Effekte von Strychnin auf die spontane Aktionspotentialaktivität-Originalaufzeichnung b) Zusammenfassung verschiedener Glycinkonzentrationen

3.3 Einfluss von Strychnin auf die hemmenden Effekte von Sevofluran im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten

Zur Abschätzung der jeweiligen Beiträge von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren an der Hemmung von Sevofluran im Vorderhorn des Rückenmarks untersuchte ich die Veränderungen der Sevofluranwirkung in Anwesenheit der jeweiligen kompetitiven Antagonisten. In Abbildung 17 a – c werden Originalspuren der Effekte von Strychnin auf die durch Sevofluran vermittelte Hemmung gezeigt. Abbildung 17 d zeigt, dass in allen getesteten Konzentrationen die Applikation von Strychnin zu einer Zunahme der Aktionspotentialaktivität führte. Dies spricht dafür, dass ein Teil der hemmenden Effekte über Glycinrezeptoren vermittelt werden. Um das Ausmaß der Hemmung besser beurteilen zu können, wurde die Zunahme der Aktivität bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 e aufgetragen. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, kommt es konzentrationsabhängig zu einer Zunahme des glycinergen Anteils an den inhibitorischen Effekten von Sevofluran auf die Aktionspotentialaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks.

Die Darstellung erfolgt als $\Delta MW \pm SEM$ in Tabelle 1.

	$\Delta MW \pm SEM$
Sevofluran 0,5 MAC und Sevofluran 0,5 MAC + Strychnin 1 μ M	1,14 \pm 0,17
Sevofluran 1 MAC und Sevofluran 1 MAC + Strychnin 1 μ M	1,42 \pm 0,18
Sevofluran 1,5 Mac und Sevofluran 1,5 Mac + Strychnin 1 μ M	1,64 \pm 0,21

Tabelle 1: Veränderung des durch Glycinrezeptoren vermittelten Anteils an der Hemmung der Aktionspotentiale bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen

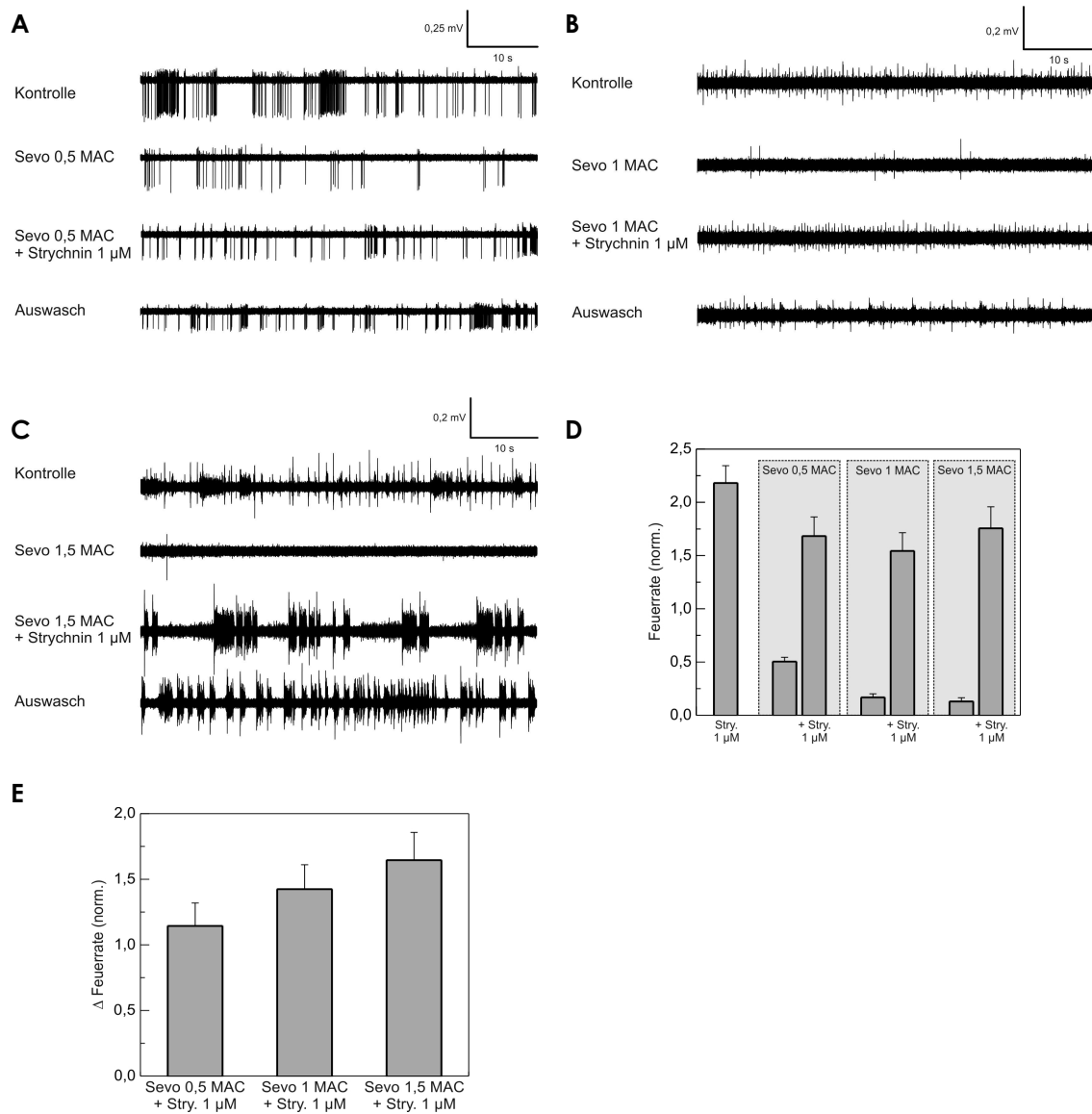


Abbildung 17: Einfluss von Strychnin auf die Effekte von Sevofluran

a) - c) Originalaufzeichnungen d) Auswertung e) Veränderung des glycinergen Anteils bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen

3.4 Effekte von Bicucullin auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten

Bicucullin ist ein kompetitiver GABA_A-Rezeptorantagonist. Abbildung 18 a zeigt eine Originalaufzeichnung unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Bicucullin. Die Auswertung in Abbildung 18 b belegt, dass in Gegenwart von Bicucullin die neuronale Aktivität um ungefähr den Faktor drei zunimmt. Die normalisierte Feuerrate steigt auf $2,81 \pm 0,28$ SEM. Dies spricht dafür, dass GABA_A-Rezeptoren die spontane Aktivität im Vorderhorn des Rückenmarks hemmen.

3.5 Wirkung von Sevofluran auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn von kultivierten Rückenmarkschnitten in Anwesenheit von Bicucullin

Wie in Kapitel 3.4 gezeigt werden konnte, wird die Feuerrate unter Einfluss von Bicucullin gesteigert. Um die Bedeutung von GABA_A-Rezeptoren für die Hemmung im Vorderhorn des Rückenmarks besser abschätzen zu können werden in Abbildung 19 a - c Originalaufzeichnungen von Messungen mit Bicucullin und unterschiedlichen Sevoflurankonzentrationen gezeigt. Die zunehmende Hemmung mit steigenden Sevoflurankonzentrationen wird durch Bicucullin teilweise aufgehoben. Abbildung 19 d zeigt, dass in Anwesenheit von Bicucullin die neuronale Aktivität trotz Sevofluran wieder zunimmt. Dies spricht dafür, dass ein Teil der hemmenden Wirkung von Sevofluran durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird.

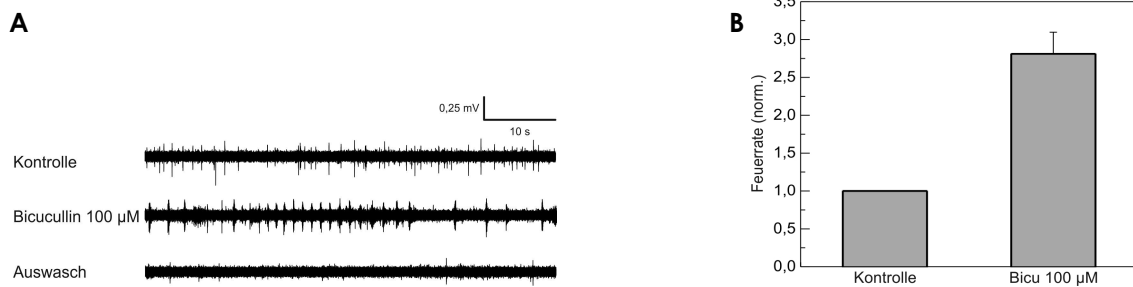


Abbildung 18: Effekte von Bicucullin auf die spontane Aktionspotentialaktivität
 a) Originalaufzeichnung b) Auswertung

Um das Ausmaß der Hemmung besser beurteilen zu können, wurde die Zunahme der Aktivität bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 e aufgetragen. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, kommt es mit zunehmender Sevoflurankonzentration zu einer Abnahme des GABAergen Anteils an den inhibitorischen Effekten des Anästhetikums auf die Aktionspotentialaktivität.

Die Darstellung erfolgt als $MW \pm SEM$ in Tabelle 2.

	$\Delta MW \pm SEM$
Sevofluran 0,5 MAC und	$1,23 \pm 0,20$
Sevofluran 0,5 MAC + Bicucullin 100 µM	
Sevofluran 1 MAC und	$1,17 \pm 0,15$
Sevofluran 1 MAC + Bicucullin 100 µM	
Sevofluran 1,5 MAC und	$0,86 \pm 0,11$
Sevofluran 1,5 MAC + Bicucullin 100 µM	

Tabelle 2: Veränderung des durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Anteils an der Hemmung der Aktionspotentiale bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen

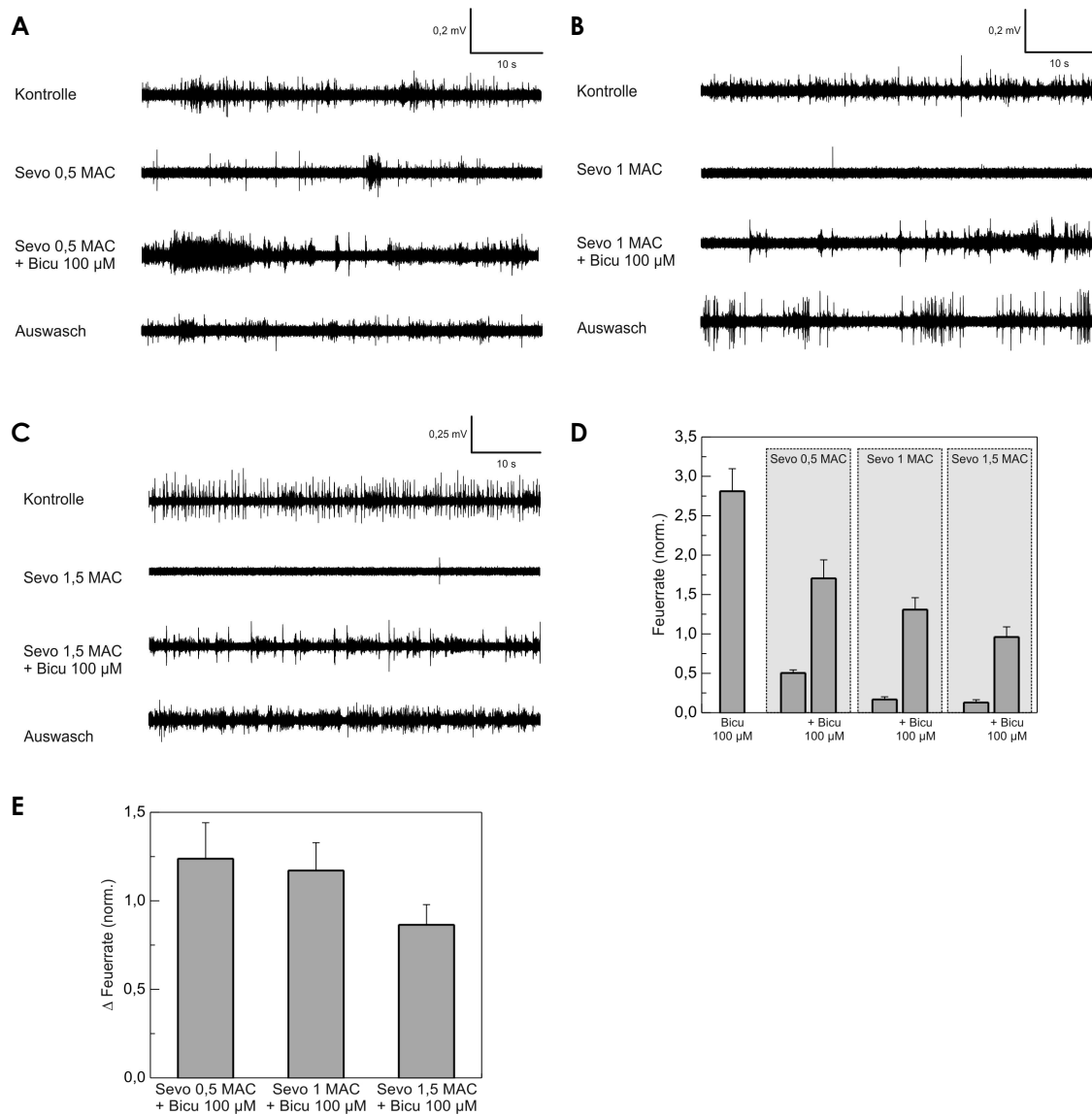


Abbildung 19: Einfluss von Bicucullin auf die Effekte von Sevofluran

a) – c) Originalaufzeichnungen d) Auswertung e) Veränderung des GABAergen Anteils bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen

3.6 Zusammenfassung der Auswertungen des GABAergen, sowie des glycinergen Anteils an den hemmenden Effekten von Sevofluran auf spinale Vorderhornneurone

In Abbildung 20 und Abbildung 21 werden die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen von Sevofluran in Anwesenheit der beiden Antagonisten Strychnin und Bicucullin zusammengefasst. Die Differenzen zwischen der Bedingung „Sevofluran“ und „Sevofluran + Antagonist“ stellen jeweils ein Maß für die Beteiligung des jeweiligen Rezeptorsystems an der Hemmung der Aktionspotentialaktivität bei einer definierten Sevoflurankonzentration dar.

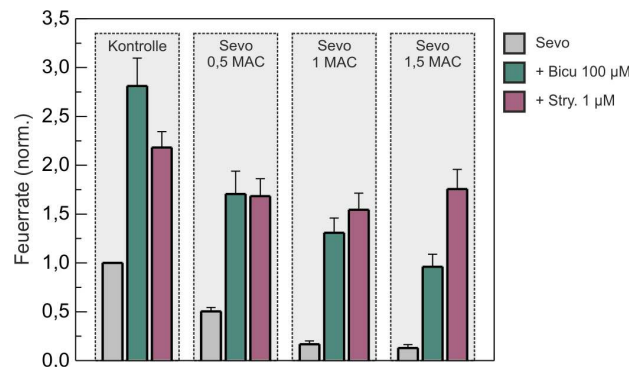


Abbildung 20: Gesamtübersicht über die Veränderungen der Feuerraten durch inhibitorische Antagonisten bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen

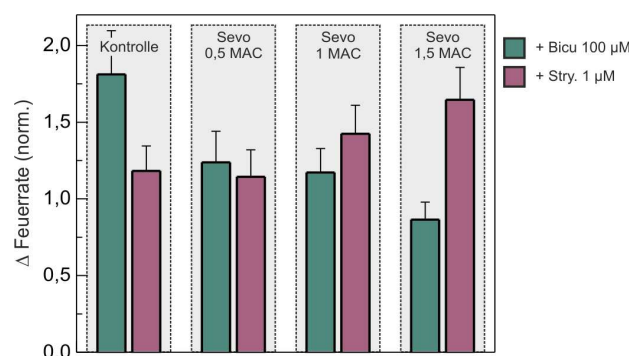


Abbildung 21: Veränderungen des glycinergen und GABAergen Anteils bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen.

Der glycinerge Anteil (Stry 1 µM, rot) nimmt mit zunehmender Sevoflurankonzentration zu, während die Bedeutung des GABAergen Anteils (Bicu 100 µM, grün) für die durch zunehmende Sevoflurankonzentrationen verursachte Hemmung abnimmt.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das glycinerge Rezeptorsystem bei ansteigenden Sevoflurankonzentrationen an Bedeutung gewinnt, während das GABAerge Rezeptorsystem an Bedeutung verliert. Bei einer immobilisierenden Sevoflurankonzentration von 1,5 MAC ist der durch Strychnin verursachte Anstieg in der Aktionspotentialaktivität nahezu doppelt so groß, wie der durch Bicucullin induzierte Anstieg. Dies ist ein Hinweis dafür, dass bei höheren Sevoflurankonzentrationen der durch Modulation von Glycinrezeptoren induzierten Hemmung der neuronalen Aktivität eine zunehmende Bedeutung zukommt. In Abbildung 21 wurden die in den Tabellen 1 und 2 errechneten und dokumentierten Differenzen graphisch dargestellt.

4 Diskussion

Hintergrund der vorliegenden Studie waren die in *in vivo* Versuchen gewonnenen Erkenntnisse, dass bei zwei verschiedenen inhibitorischen Rezeptorsystemen im Vorderhorn des Rückenmarks offenbar nur die Modulation des glycinergen für die Hemmung der Aktionspotentialaktivität in immobilisierenden Konzentrationen des volatilen Anästhetikums verantwortlich ist. Hieraus ergab sich die Fragestellung dieser Studie: es sollte geklärt werden, inwieweit das volatile Anästhetikum Sevofluran die inhibitorische Transmission von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren im Vorderhorn des Rückenmarks beeinflusst. Weiterhin sollte getestet werden, ob sich die Bedeutung der zwei wichtigsten inhibitorischen Rezeptorsysteme, des GABAergen, sowie des glycinergen Systems, für die Hemmung der Aktionspotentialaktivität im spinalen Vorderhorn mit zunehmender Konzentration des volatilen Anästhetikums ändert. Die hierzu notwendigen Experimente wurden in organotypischen Kulturen des Rückenmarks durchgeführt. Im Folgenden möchte ich zunächst auf die Wahl des Modellsystems eingehen.

4.1 Organotypische Rückenmarksschnitte – Wahl des Modellsystems

Hintergrund der Wahl von organotypischen Gewebekulturen zur pharmakologischen Testung der inhibitorischen Effekte von Sevofluran war der Wunsch, Veränderungen der Spontanaktivität in neuronalen Netzwerken zu beurteilen. Kultivierte spinale Gewebekulturen wurden erstmals vor ungefähr 25 Jahren beschrieben.

Braschler zeigte 1989, dass organotypische Kulturen des Rückenmarks von Ratten mittels einer sogenannten „Roller-Tube-Technik“ kultiviert werden konnten und mehrere Wochen überlebten (Braschler et al. 1989). Das

präparierte Gewebe enthält neben Rückenmark auch sensorische Hinterwurzelganglien sowie Skelettmuskulatur. Während der Kultivierungszeit kam es zu einer Abnahme der ursprünglichen Schnittdicke, die typischerweise zur Ausbildung eines neuronalen Monolayers führte.

Die besondere Qualität von kultivierten organotypischen Gewebeschnitten ergibt sich aus der Vernetzung der Neuronenpopulationen. Zum Zeitpunkt der Präparation der organotypischen Zellkulturen ist das neuronale Gewebe noch nicht ausgereift. Es bestehen noch keine oder nur spärliche synaptische Verknüpfungen. Die Expression von Rezeptoren und die Aufrechterhaltung von Ionengradienten mittels Transportsystemen für Elektrolyte entsprechen noch nicht dem adulten Zustand (Drexler et al. 2010). Die Entwicklung spinaler neuronaler Netzwerke *in vivo* beinhaltet zunächst die Anlage der zellulären Grundelemente während der Embryonalperiode. Die Funktion der von uns untersuchten Neurotransmittersysteme GABA_A und Glycin unterscheidet sich jedoch grundsätzlich: die im Erwachsenenalter der Tiere inhibitorischen Rezeptorsysteme wirken in der frühen Embryonalperiode (E12-15 bei Mäusen und E14-16 in Ratten) zunächst exzitatorisch an Motoneuronen. In dieser Entwicklungsperiode verursachen GABA und Glycin einen Cl⁻-Ausstrom, was eine Depolarisation des Membranruhepotentials zur Folge hat. Das Ausmaß der exzitatorischen Effekte durch GABA und Glycin verringert sich mit der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes bis zur Geburt. Zum Zeitpunkt der Geburt wirken beide Transmitter dann bereits inhibitorisch und führen zu einer Hyperpolarisation des Membranruhepotentials (Nishimaru und Kakizaki 2009). Während des Zeitraumes der Kultivierung der organotypischen Zellkulturen reift das neuronale Netzwerk, bis es einen Zustand vergleichbar dem eines adulten Tieres hat (Drexler et al. 2010). Dies wurde in einer aus unserem Labor stammenden Arbeit gezeigt, in der nachgewiesen wurde, dass der intrazelluläre Cl⁻-Gradient bereits nach einer Kultivierungszeit von zwölf Tagen dem Cl⁻-Gradienten in adulten Neuronen entspricht (Grasshoff et al. 2008).

Nachteile des von uns verwendeten Modellsystems bestehen einerseits in der eingeschränkten Eignung verschiedener Hirnregionen, sich in Kultur zu entwickeln. Dieser Nachteil kommt glücklicherweise bei den von uns verwendeten spinalen Schnitte nicht zum tragen. Weiterhin können starke Gliazellwucherungen auf der Oberfläche der Kulturen beobachtet werden, die es erschweren, elektrophysiologische Messungen an Neuronen technisch durchzuführen. Eine routinemäßige Behandlung der Kulturen mit einem DNA-Synthesehemmer verhindert das Auftreten eines solchen „Gliazellrasens“ weitgehend.

Im folgenden Abschnitt möchte ich die jeweiligen Vor- und auch Nachteile von alternativen Modellsystemen beleuchten und kritisch gegen die organotypischen spinalen Kulturen evaluieren. Die gängigsten Modellsysteme sind sogenannte „akute Schnitte“, des weiteren dissoziierte Zellkulturen und die isoliert exprimierten Rezeptorsysteme wie die Oozyten- oder das HEK-Zellsystem.

Oozyten und auch die HEK-Zellen sind geeignete Modellsysteme für die Rezeptorphanakologie. Die Technik ist einfach und der Durchsatz an Experimenten pro Zeiteinheit ist sehr hoch. Allerdings mangelt es einem Rezeptor in einem nicht-neuronalen Gewebe an „natürlicher“ Umgebung. Es fehlen z.B. Ankerproteine. In organotypischen Kulturen ist diese natürliche Umgebung vorhanden, was eher den Verhältnissen im lebenden Tier entspricht. Weiterhin ist es schwierig, die Erkenntnisse, die in einem Ein-Rezeptorsystem gewonnen wurden, bezüglich der Effekte *in vivo* zu interpretieren. Hinzu kommt, dass viele Anästhetika nicht nur mit einem Rezeptor, sondern mit mehreren molekularen Zielstrukturen interagieren. Dissoziierte Kulturen sind ebenfalls weit verbreitete Präparationen, die allerdings ihre Zytoarchitektur durch die Aufarbeitung verlieren. Hierdurch werden die für eine Hirnregion repräsentativen neuronalen Verknüpfungen aufgelöst, sie sind somit nicht unbedingt repräsentativ für das zu untersuchende Netzwerk *in vivo*.

Die Zytoarchitektur einer Hirnregion wird noch am ehesten bei der Herstellung von sogenannten „akuten“ Schnitten beibehalten, die nach der Präparation am selben Tag für eine Messung verwendet werden. Das Gewebe wird von adulten Tieren präpariert. Je nach präparierter Hirnregion kann es allerdings sein, dass ein großer Teil der neuronalen Verknüpfungen dabei zerstört wird. Dies ist zum Beispiel der Fall bei der Präparation von „akuten“ spinalen Schnitten. Aus diesem Grund müssen diese Kulturen extern pharmakologisch oder elektrisch stimuliert werden. Hingegen sind kultivierte organotypische Kulturen spontan aktiv und benötigen keine externe Stimulation. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von „akuten“ Schnitten besteht in ihrer relativen Dicke von in der Regel 300 µm und der damit verbundenen langen Diffusionszeit für extern applizierte Pharmaka, in unserem Fall das Sevofluran. In der Literatur werden bis zu Stunden beschrieben (Benkowitz et al. 2007; Gredell et al. 2004). Dies erhöht die Unsicherheit bezüglich der Konzentration eines Pharmakons vor Ort. Ebenso erhöht es den Zeitaufwand für ein Experiment. Hier liegt ein weiterer Vorteil bei den organotypischen Kulturen. Die Schichtdicke einer organotypischen Kultur nimmt während der Kultivierung von etwa 300 µm auf etwa 50 µm ab. Idealerweise entsteht ein Monolayer von intakten Zellen, die Diffusionszeit reduziert sich dementsprechend auf wenige Minuten (Drexler et al. 2010). Die Thematik führt zu dem nächsten wichtigen Punkt der Diskussion, der relevanten Wirkstoffkonzentration vor Ort.

4.2 Klinisch relevante Konzentrationen von Sevofluran

In der Geschichte des Faches Anästhesie wurde viele Jahre darüber diskutiert, welche der Qualitäten einer Allgemeinanästhesie diese am ehesten charakterisiere. In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts definierten Eger und Mitarbeiter die Immobilität als entscheidende Komponente und führten den Begriff des MAC-Wertes ein (Eger et al. 1965a). Der MAC-Wert steht für die mediane alveoläre Konzentration eines volatilen Anästhetikums, bei der 50 %

einer untersuchten Population (z. B. Patienten), nicht mehr auf einen definierten Schmerzreiz, wie einen Hautschnitt, mit einer gezielten Abwehrreaktion reagieren. Er ist somit ein Maß für die Wirkungen von Allgemeinanästhetika auf spinaler Ebene. Die Einführung des MAC-Wertes ermöglichte erstmals die Vergleichbarkeit verschiedener volatiler Anästhetika bezüglich ihrer Wirksamkeit/Potenz (Eger et al. 1965a; Eger et al. 1999).

Volatile Anästhetika werden im klinischen Alltag in der Regel dem Patienten gasförmig, bei einer Körpertemperatur um 37 °C zugeführt. Wenn in *in vitro* Experimenten volatile Anästhetika verwendet werden, stellt sich die Frage inwieweit die verwendeten Gaskonzentrationen den klinisch relevanten Konzentrationen entsprechen. Es ist zum Beispiel für eine Reihe von volatilen Anästhetika bekannt, dass ihr MAC-Wert bei sinkenden Temperaturen abnimmt (Antognini 1993; Eger et al. 1965b; Franks und Lieb 1996; Vitez et al. 1974). Franks und Mitarbeiter konnten dagegen in einer Studie zeigen, dass zwar die Wirksamkeit eines gasförmigen Anästhetikums bei sinkenden Temperaturen zunimmt, die Wirksamkeit der korrespondierenden gelösten Form jedoch annähernd gleich bleibt. Der MAC-Wert des in Wasser gelösten Gases ist somit der adäquate Parameter für klinisch relevante Konzentrationen. Er wird bei Nagetieren für Sevofluran mit 0,350 mM angegeben (Franks und Lieb 1996).

In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe an organotypischen Kulturen (Grasshoff und Antkowiak 2004) konnte ein konzentrationsabhängiger hemmender Effekt von Sevofluran auf die spontane neuronale Aktivität im Rückenmark in einem Bereich von 0 bis 2 MAC festgestellt werden. Dabei entsprach die Konzentration von Sevofluran, die die Feuerrate um die Hälfte reduzieren konnte (EC_{50}) einem MAC-Wert von 0,32 (was einer Blut-Serum-Konzentration von 0,11 mM entspricht). Dieser Wert korreliert mit Werten aus anderen Experimenten in denen ebenfalls eine Reduzierung von spinaler neuronaler Aktivität durch Sevofluran untersucht wurde. So zum Beispiel das Hinterhorn- und Vorderhorn-Potential (EC_{50} , 0,07 mM) oder der Monosynaptische Reflex (EC_{50} , 0,22 mM) (Matute und Lopez-Garcia 2003).

Zusammenfassend möchte ich festhalten, dass die in der vorliegenden Studie von mir verwendeten Konzentrationen innerhalb eines klinisch relevanten Bereiches liegen.

4.3 Wirkmechanismen von Sevofluran im Rückenmark

Matute und Mitarbeiter konnten in einer Studie an Ratten zeigen, dass Sevofluran spinale Reflexe in klinisch relevanten Konzentrationen unterdrückt (Matute und Lopez-Garcia 2003). Wie in Abbildung 22 gezeigt, werden spinale Reflexe über die Aktivierung von exzitatorisch wirkenden Rezeptoren vermittelt. Matute und Mitarbeiter fanden heraus, dass Sevofluran die durch NMDA-Rezeptoren induzierte Depolarisation der Motoneurone reversibel und konzentrationsabhängig hemmt (Matute und Lopez-Garcia 2003).

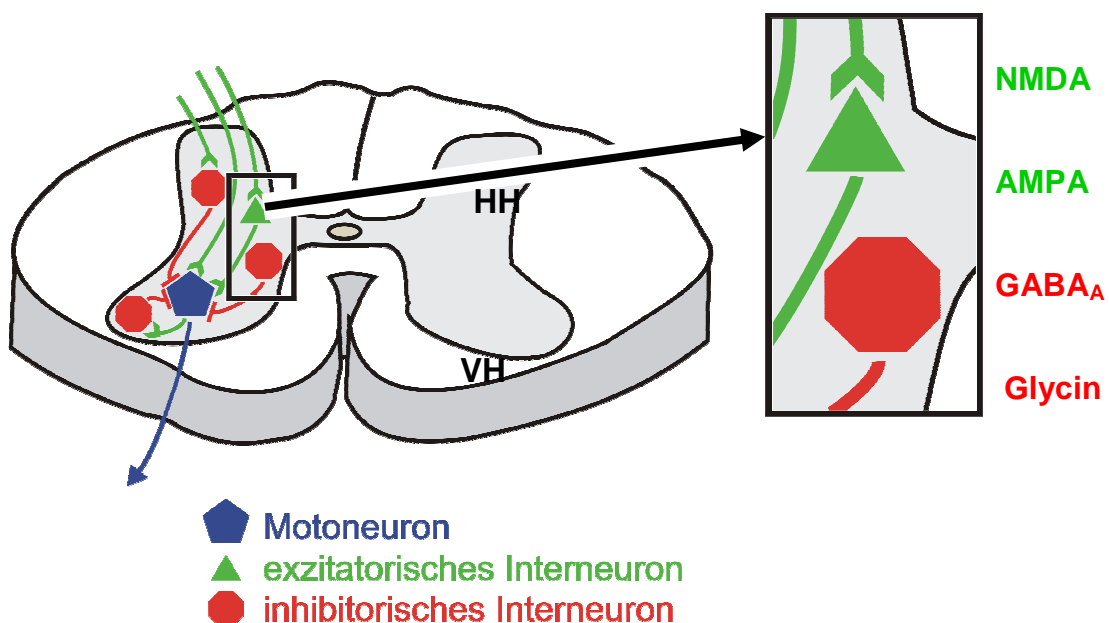


Abbildung 22: Schematische Darstellung des interneuralen Netzwerkes im Vorderhorn des Rückenmarks zur Modulation von Schmerzreflexen

Eine Modulation von NMDA Rezeptoren wurde bereits früher für andere volatile Anästhetika in Gehirnpräparaten von Nagetieren nachgewiesen (Nishikawa und MacIver 2000; Perouansky et al. 1995). Die Matute-Studie zeigte weiterhin, dass der Effekt von Sevofluran auf die Motoneurone durch postsynaptische Modulation von NMDA-Rezeptoren hervorgerufen wird, AMPA-Rezeptoren scheinen weniger sensibel zu reagieren. Die erhöhte Sensitivität von NMDA-Rezeptoren wurde bereits für die Wirkung von Isofluran auf Neurone im Hippocampus beschrieben (Nishikawa und MacIver 2000).

Eine weitere Rolle bei der Vermittlung der anästhetischen Effekte von Sevofluran spielen zwei-porige Kaliumkanäle, die in mehreren Studien auf verschiedenen Typen von Neuronen im zentralen Nervensystem identifiziert wurden (Kim et al. 1995; Lesage und Lazdunski 2000; Talley et al. 2003; Wei et al. 1996). Kaliumkanäle sind sowohl an der Kontrolle des Kaliumhaushaltes der Neurone beteiligt, als auch an physiologischen und pathophysiologischen Veränderungen, die das Membranpotential modulieren. So ist bekannt, dass Kaliumkanäle das Ruhemembranpotential festigen und depolarisierenden Einflüssen entgegen wirken (Heurteaux et al. 2004). Sie spielen eine Schlüsselrolle in der neuronalen Erregbarkeit. Bei der Aktivierung von Kaliumkanälen kommt es zu einer Hyperpolarisation der Synapsen und postsynaptischen Strukturen, sowie zu einer verminderten Ausschüttung des exzitatorisch wirkenden Transmitters Glutamat (Lauritzen et al. 2000).

Der TREK-1-Kanal ist ein wichtiger Vertreter der zwei-porigen Kaliumkanäle und kommt im gesamten zentralen Nervensystem vor (Fink et al. 1996; Hervieu et al. 2001; Maingret et al. 2000; Talley et al. 2001). Dieser TREK-1-Kanal kann durch volatile Anästhetika moduliert werden (Patel et al. 1999) und ist eine der molekularen Zielstrukturen. In einer Studie von Hervieu wurde eine Kolokalisation für TREK-1-Kanäle und GABAerge Interneurone beschrieben (Hervieu et al. 2001). Dies bedeutet, dass die TREK-1-Kanäle das Ruhemembranpotential von GABAergen Interneuronen beeinflussen. In einer weiteren Studie von Patel an Knock-out-Mäusen (das Gen für die TREK-1-

Kanäle wurde nicht exprimiert) konnte eine partielle Resistenz gegenüber volatilen Anästhetika nachgewiesen werden (Patel et al. 1999). Auch dies zeigt, dass diese Art von Kaliumkanälen eine molekulare Zielstruktur für volatile Anästhetika ist, aber nicht für die komplette Wirkung jener verantwortlich ist.

Zusammenfassend möchte ich festhalten, dass die anästhetischen Effekte von Sevofluran auf spinaler Ebene über verschiedene molekulare Zielstrukturen vermittelt werden. Eine direkte oder indirekte Beeinflussung der exzitatorischen Rezeptoren ist mit Sicherheit ein konkurrierender molekularer Mechanismus. Das Gleiche gilt für die Kaliumkanäle. Sie scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, sind aber nicht alleinige Zielstruktur für volatile Anästhetika. Die Ergebnisse der hier zitierten Studien lassen allerdings völlig offen, wie Sevofluran die inhibitorischen spinalen Rezeptorsysteme moduliert.

4.4 Die Bedeutung von inhibitorischen Rezeptorsystemen für die Unterdrückung der Aktionspotentialaktivität im spinalen Vorderhorn

Ausgangspunkt der von mir bearbeiteten Fragestellung war die scheinbare Diskrepanz zwischen der Beobachtung, dass volatile Anästhetika inhibitorische GABA_A-Rezeptoren modulieren (Grasshoff und Antkowiak 2006) und den Ergebnissen von Tierversuchen, aus denen hervorgeht, dass diese Modulation für die Vermittlung von Immobilität nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Sonner et al. 2003). Sonner und Koautoren begründen ihre Annahme unter anderem mit den Ergebnissen von Studien an Knockin-, beziehungsweise Knockout-Mäusen die zeigten, dass die Insensitivität der β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors nur zu geringfügigen Änderungen des MAC-Wertes für volatile Anästhetika führte (Jurd et al. 2003; Quinlan et al. 2002). Auch in einer Studie von Liao konnte bei Knockin-Mäusen, die an der β_3 -Untereinheit eine Punktmutation besitzen und damit nicht sensitiv für GABAerge Anästhetika

sind, nur eine geringe Zunahme des MAC-Wertes für Isofluran verzeichnet werden (Liao et al. 2005). Die Hypothese dieser Arbeitsgruppe ist, dass wenn die β_3 -Untereinheit maßgeblich immobilisierende Effekte vermitteln würde, die Zunahme des MAC-Wertes bei Mäusen, bei denen GABA_A-Rezeptoren ausgeschaltet werden, deutlich größer ausfallen müsste. In einer weiteren Studie von Zhang konnte gezeigt werden, dass die intrathekale Gabe des GABA_A-Rezeptorantagonisten Picrotoxin den MAC-Wert für Isofluran gleichwertig wie den für Cyclopropan anhebt (Zhang et al. 2004), von dem bekannt ist, dass es keine modulierende Eigenschaften am GABA_A-Rezeptor besitzt (Raines et al. 2001). Die Arbeitsgruppe interpretiert die Ergebnisse dahingehend, dass durch die Gabe von Picrotoxin lediglich eine GABAerge tonische Inhibition blockiert wird, und damit Isofluran, wenn überhaupt, indirekt immobilisierende Effekte aufweist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an GABA_A-Rezeptoren steht die Beobachtung, dass die intrathekale Injektion des Glycin-Rezeptorantagonisten Strychnin bei adulten Ratten den MAC-Wert für Isofluran und Halothan signifikant anhebt (Zhang et al. 2003). Dies wurde dahingehend interpretiert, dass Glycin-Rezeptoren einen Teil der immobilisierenden Effekte von inhalativen Anästhetika vermitteln.

Zur Wirkung von volatilen Anästhetika auf spinale molekulare Zielstrukturen war bisher bekannt, dass volatile Anästhetika den Chlorideinstrom von auf Motoneuronen lokalisierten Glycin- und GABA_A-Rezeptoren vergrößert, sobald der entsprechende Transmitter sich an den Rezeptor angelagert hat (Cheng und Kendig 2002; Wong et al. 2001). Dadurch wird das entsprechende Neuron hyperpolarisiert und weniger erregbar. Weiterhin konnte durch den Einsatz von Rezeptorantagonisten an inhibitorischen Rezeptoren nachgewiesen werden, dass die hemmenden Effekte von Anästhetika reduziert werden (Wong et al. 2001). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass volatile Anästhetika, allerdings unter artifiziellen Bedingungen einer Natriumkanalblockade, die Glycinfreisetzung erhöhen (Cheng und Kendig 2002). Die Kombination aus präsynaptisch erhöhter Glycinfreisetzung und verlängerter postsynaptischer Abklingzeit resultieren in einen erhöhten Chlorideinstrom durch den Rezeptor.

Aus der klinischen Tätigkeit ist bekannt, dass die immobilisierende Wirkung von volatilen Anästhetika diejenige von intravenösen, ausschließlich über GABA_A-Rezeptoren wirkenden, Anästhetika übersteigt. Es wurde gezeigt, dass es bei Mononarkosen mit Propofol deutlich häufiger zu intraoperativen Spontanbewegungen des Patienten kommt, als bei Narkosen mit volatilen Anästhetika (Ashworth und Smith 1998; Smith und Thwaites 1999; Watson und Shah 2000). Weitere Hinweise, dass sich die hemmende Wirkung im Rückenmark von volatilen Anästhetika und intravenösen Anästhetika unterscheidet, ergaben Studien, in denen der intraoperative Muskelrelaxansverbrauch bei beiden Anästhetikagruppen untersucht wurde (Lowry et al. 1998; Motamed und Donati 2002). Die Ergebnisse zeigten, dass während der Narkosen mit intravenösen Anästhetika deutlich mehr Muskelrelaxantien benötigt wurden, als bei Narkosen mit volatilen Anästhetika. Ein höherer Verbrauch von Muskelrelaxantien lässt indirekt auf eine schlechtere Hemmung von spinalen Neuronen durch intravenöse Anästhetika schließen.

Es stellt sich daher die Frage nach einer Erklärung der unterschiedlichen Effektivität volatiler und intravenöser GABA_A-erger Anästhetika, spinale Neurone zu unterdrücken. Vorangegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an organotypischen spinalen Kulturen zeigten, dass sowohl GABA_A- als auch Glycin-Rezeptoren spinale Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks hemmen können (Grasshoff und Antkowiak 2006). In einer Konzentration von 0,5 MAC hemmten die volatilen Anästhetika Isofluran oder Enfluran die spontane spinale Netzwerkaktivität über GABA_A- und Glycinrezeptoren. Die vorliegende Studie erweitert dieses Wissen dahingehend, dass es keine alleinige inhibitorische molekulare Zielstruktur gibt, die die hemmenden Wirkungen von Sevofluran vermittelt. Es wurde vielmehr gezeigt, dass GABA_A-Rezeptoren im niedrigen MAC-Bereich (hier 0,5 MAC) einen Teil der Inhibition übernehmen. Die Bedeutung der GABA_A-Rezeptoren für die inhibitorischen Effekte des Sevoflurans nimmt mit zunehmender Konzentration ab. Dafür erlangen die Glycinrezeptoren immer mehr an Bedeutung und vermitteln in klinisch relevanten, immobilisierenden Konzentrationen einen Großteil der hemmenden

Wirkung. Beide Rezeptorgruppen sind Zielstrukturen für Sevofluran und beide Rezeptorgruppen haben hemmende Effekte. Dabei ist klar, dass Sevofluran 0,5 MAC für eine Narkose nicht ausreicht um komplette, immobilisierende Effekte zu erreichen. In klinisch üblichen Bereichen zwischen 1 MAC und maximal 1,5 MAC nimmt der GABAerge Anteil immer weiter ab, ist aber noch vorhanden. Es stellt sich somit die Frage, wie es zu einer Abnahme des GABAergen Anteils bei zunehmenden Sevoflurankonzentrationen kommt. Ein möglicher Grund könnte schon die für intravenöse Anästhetika beschriebene präsynaptische Inhibition sein. In einer Studie von Grasshoff wurde untersucht, warum intravenöse Anästhetika wie z.B. Etomidat, die ihre Wirkung hauptsächlich über GABA_A-Rezeptoren vermitteln, sehr gute Hypnotika sind (Grasshoff et al. 2007), aber nur eingeschränkte Immobilität vermitteln können (Ashworth und Smith 1998; Grasshoff et al. 2006; Smith und Thwaites 1999). In extrazellulären Messungen der Netzwerkaktivität in Wildtypmäusen konnte gezeigt werden, dass der hemmende Effekt von Etomidat hauptsächlich über die β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors vermittelt wird. Bei einer Konzentration von 1 μ M erreicht die Konzentrations-Wirkungskurve bei ca. 60 % Hemmung ein Plateau. Höhere Etomidatkonzentrationen können diesen Effekt nicht weiter steigern. Diese Ergebnisse zeigen, dass Etomidat nicht nur in der Lage ist, die Netzwerkaktivität zu hemmen, sondern auch die Aktionspotentialfrequenz von GABAergen Interneuronen reduziert, so dass daraus ein gegensätzlicher Effekt für die Gesamtaktivität resultiert. Bei einer bestimmten Konzentration gleichen sich dann beide Effekte aus, so dass keine weitere Wirkungsverstärkung im Netzwerk mehr zu beobachten ist.

Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse weiterer Studien die zeigen, dass volatile Anästhetika GABA_A-Rezeptoren hemmend als auch erregend modulieren können (Evers und Steinbach 1999; Raines und Zachariah 1999). Volatile Anästhetika führen an GABAergen Synapsen einerseits zu einer Verlängerung der Abklingzeit der synaptischen Ströme und andererseits verringern sie die Aktivität derselben (Antkowiak und Heck 1997; Banks und Pearce 1999; Drexler et al. 2006b). Banks und Pearce konnten in ihrer Studie

zeigen, dass der hemmende Effekt von Enfluran und Isofluran auf der postsynaptischen Membran lokalisiert ist. Sowohl der verlängernde als auch der blockierende Effekt an den GABA_A-Rezeptoren ist konzentrationsabhängig (Antkowiak und Heck 1997; Banks und Pearce 1999). Dies könnte auch in der vorliegenden Studie ein Grund für die Abnahme des GABAergen Anteils sein: bei steigenden Sevoflurankonzentrationen sinkt die GABA-Freisetzung durch präsynaptische Inhibition und damit verlieren die GABA_A-Rezeptoren bei der Vermittlung von Immobilität an Bedeutung.

Im Gegensatz zu den Effekten auf GABA_A-Rezeptoren verändert eine hohe Sevoflurankonzentration nicht die glycinerg vermittelte Aktivität und Qualität der synaptischen Ströme (Eckle et al. 2013). Somit könnten mit der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Hypothesen in Einklang gebracht werden. Denn sie zeigt, dass sowohl glycinerge als auch GABAerge Rezeptoren an der Hemmung neuronaler Aktionspotentialaktivität im spinalen Vorderhorn des Rückenmarks durch Sevofluran ihren Beitrag leisten, der jeweilige Anteil an einer Hemmung jedoch konzentrationsabhängig ist. Sevofluran, als volatiles Anästhetikum, vermittelt seine bessere inhibitorische Wirkung nicht über eine einzige Zielstruktur wie die intravenösen GABAergen Anästhetika, sondern über verschiedene, sich in ihrer Wirkung ergänzende molekulare Zielstrukturen.

5 Zusammenfassung

Das Vorderhorn des Rückenmarks ist die Region des zentralen Nervensystems, in der volatile Anästhetika Immobilität über eine Hemmung neuronaler Aktionspotentialaktivität induzieren. Die Gesamtaktivität des im Vorderhorn lokalisierten neuronalen Netzwerkes wird hierbei maßgeblich über inhibitorisch wirkende GABA_A- und Glycin-Rezeptoren kontrolliert. Beide Ionenkanäle werden durch inhalative Anästhetika, wie zum Beispiel Sevofluran, moduliert. Ziel dieser Studie war es zu klären, welche Bedeutung diese beiden inhibitorischen Rezeptorsysteme für die Vermittlung von Immobilität auf Rückenmarksebene bei verschiedenen Sevoflurankonzentrationen haben. Hintergrund der Untersuchungen stellt dabei die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen *in vitro* Untersuchungen und *in vivo* Untersuchungen dar, dass volatile Anästhetika die Effekte von beiden Rezeptorsystemen verstärken, aber *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass die GABA_A-Rezeptoren für die Vermittlung von Immobilität keine Rolle zu spielen scheinen.

Hierzu wurden elektrophysiologische Untersuchungen an organotypischen Gewebekulturen des Rückenmarks von Mäusen durchgeführt. Sevofluran wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen 0,5 MAC, 1 MAC und 1,5 MAC (entsprechend 0,175, 0,350 und 0,525 mmol/L) appliziert. Für diese MAC-Werte konnte bereits ein konzentrationsabhängiger Effekt nachgewiesen werden. Die verschiedenen inhibitorischen Rezeptorsysteme (GABA_A und Glycin) wurden durch selektive Blockade mit den Antagonisten Bicucullin und Strychnin pharmakologisch isoliert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass Sevofluran die Aktionspotentialaktivität von Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks konzentrationsabhängig hemmt. So führt die Applikation von 0,5 MAC Sevofluran zu einer Reduzierung der Aktionspotentialaktivität um ca. 50 %, 1 MAC Sevofluran um 84 % und 1,5 MAC Sevofluran reduziert die Aktivität um 88 %. Über selektive Blockade des GABA_A- und Glycin-Rezeptors konnte der

Anteil des jeweiligen Rezeptors an der Hemmung der Aktionspotentialaktivität isoliert betrachtet werden. Die Darstellung erfolgt dimensionslos als $MW \pm SEM$: Bei ansteigenden Sevoflurankonzentrationen kommt es zu einer Zunahme des glycinergen Anteils an den inhibitorischen Effekten (0,5 MAC Sevofluran $1,14 \pm 0,17$, 1 MAC Sevofluran $1,42 \pm 0,18$, 1,5 MAC Sevofluran $1,64 \pm 0,21$). Dagegen nimmt der GABAerge Anteil bei ansteigenden Sevoflurankonzentrationen ab (0,5 MAC Sevofluran $1,23 \pm 0,2$, 1 MAC Sevofluran $1,17 \pm 0,15$, 1,5 MAC Sevofluran $0,86 \pm 0,11$).

Diese Studie zeigt, dass sowohl GABA_A- als auch Glycin-Rezeptoren an der Hemmung von Aktionspotentialaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks beteiligt sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass bei hohen Sevoflurankonzentrationen die Hemmung der neuronalen Aktivität vorwiegend über Glycinrezeptoren vermittelt wird und weniger über die GABA_A-Rezeptoren. Diese Ergebnisse stützen gemeinsam mit Ergebnissen aus Tierversuchen die Hypothese, dass die Bedeutung von GABA_A-Rezeptoren an der Vermittlung von Immobilität auf Rückenmarksebene geringer ist als die der Glycinrezeptoren. Der Grund für die Abnahme der GABAergen Wirkung in höheren Anästhetikakonzentrationen könnte eine präsynaptische Inhibition von GABAergen Interneuronen sein, die zu einer Verringerung der GABA-Freisetzung und damit zu einer verringerten Effektivität von Sevofluran führt.

6 Literaturverzeichnis

Alford S, Schwartz E and Viana di PG (2003) The pharmacology of vertebrate spinal central pattern generators. *Neuroscientist*. 9: 217-228.

Antkowiak B (1999) Different actions of general anesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the GABA(A) receptor. *Anesthesiology* 91: 500-511.

Antkowiak B and Heck D (1997) Effects of the volatile anesthetic enflurane on spontaneous discharge rate and GABA(A)-mediated inhibition of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J.Neurophysiol*. 77: 2525-2538.

Antognini JF (1993) Hypothermia eliminates isoflurane requirements at 20 degrees C. *Anesthesiology* 78: 1152-1156.

Antognini JF and Carstens E (1999) Increasing isoflurane from 0.9 to 1.1 minimum alveolar concentration minimally affects dorsal horn cell responses to noxious stimulation. *Anesthesiology* 90: 208-214.

Antognini JF and Carstens E (2002) In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *Br.J.Anaesth*. 89: 156-166.

Antognini JF and Schwartz K (1993) Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain. *Anesthesiology* 79: 1244-1249.

Ashworth J and Smith I (1998) Comparison of desflurane with isoflurane or propofol in spontaneously breathing ambulatory patients. *Anesth.Analg*. 87: 312-318.

Banks MI and Pearce RA (1999) Dual actions of volatile anesthetics on GABA(A) IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology* 90: 120-134.

Belelli D, Pistis M, Peters JA and Lambert JJ (1999) General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *Trends Pharmacol.Sci*. 20: 496-502.

Benkwitz C, Liao M, Laster MJ, Sonner JM, Eger EI and Pearce RA (2007) Determination of the EC50 amnesic concentration of etomidate and its diffusion profile in brain tissue: implications for in vitro studies. *Anesthesiology* 106: 114-123.

Betz H and Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J.Neurochem.* 97: 1600-1610.

Bito H and Ikeda K (1994) Closed-circuit anesthesia with sevoflurane in humans. Effects on renal and hepatic function and concentrations of breakdown products with soda lime in the circuit. *Anesthesiology* 80: 71-76.

Bracci E, Ballerini L and Nistri A (1996) Localization of rhythmogenic networks responsible for spontaneous bursts induced by strychnine and bicuculline in the rat isolated spinal cord. *J.Neurosci.* 16: 7063-7076.

Braschler UF, Iannone A, Spenger C, Streit J and Luscher HR (1989) A modified roller tube technique for organotypic cocultures of embryonic rat spinal cord, sensory ganglia and skeletal muscle. *J.Neurosci.Methods* 29: 121-129.

Burke RE, Degtyarenko AM and Simon ES (2001) Patterns of locomotor drive to motoneurons and last-order interneurons: clues to the structure of the CPG. *J.Neurophysiol.* 86: 447-462.

Cheng G and Kendig JJ (2002) Pre- and postsynaptic volatile anaesthetic actions on glycinergic transmission to spinal cord motor neurons. *Br.J.Pharmacol.* 136: 673-684.

Collins JG, Kendig JJ and Mason P (1995) Anesthetic actions within the spinal cord: contributions to the state of general anesthesia. *Trends Neurosci.* 18: 549-553.

Conzen P and Hobbhahn J (2008) Sevofluran Kompendium: Inhalationsanästhetikum. 6-36: Wiss. Verl.-Abt. Abbott GmbH, 2001, Wiesbaden.

Conzen PF, Nuscheler M, Melotte A, Verhaegen M, Leupolt T, Van AH and Peter K (1995) Renal function and serum fluoride concentrations in patients with stable renal insufficiency after anesthesia with sevoflurane or enflurane. *Anesth.Analg.* 81: 569-575.

Crain SM (1966) Development of "organotypic" bioelectric activities in central nervous tissues during maturation in culture. *Int.Rev.Neurobiol.* 9: 1-43.

Cull-Candy S, Brickley S and Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11: 327-335.

Drexler B, Grasshoff C, Rudolph U, Unertl K and Antkowiak B (2006a) [The GABA(A) receptor family: possibilities for the development of better anesthetics]. *Anaesthesist* 55: 287-295.

Drexler B, Hentschke H, Antkowiak B and Grasshoff C (2010) Organotypic cultures as tools for testing neuroactive drugs - link between in-vitro and in-vivo experiments. *Curr.Med.Chem.* 17: 4538-4550.

Drexler B, Jurd R, Rudolph U and Antkowiak B (2006b) Dual actions of enflurane on postsynaptic currents abolished by the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3(N265M) point mutation. *Anesthesiology* 105: 297-304.

Dudel J (1997) Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle. in *Physiologie des Menschen* 50-54: R. F. Schmidt & G. Thews, eds., Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Eckle VS, Hauser S, Drexler B, Antkowiak B and Grasshoff C (2013) Opposing actions of sevoflurane on GABAergic and glycinergic synaptic inhibition in the spinal ventral horn. *PLoS.One.* 8: e60286.

Eger EI (2009) Inhaled Anesthetics: Uptake and Distribution. in *Miller's Anesthesia* 539-560: R. D. Miller, ed., Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia.

Eger EI, Ionescu P, Laster MJ, Gong D, Hudlicky T, Kendig JJ, Harris RA, Trudell JR and Pohorille A (1999) Minimum alveolar anesthetic concentration of fluorinated alkanols in rats: relevance to theories of narcosis. *Anesth.Analg.* 88: 867-876.

Eger EI, Saidman LJ and Brandstater B (1965a) Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 26: 756-763.

Eger EI, Saidman LJ and Brandstater B (1965b) Temperature dependence of halothane and cyclopropane anesthesia in dogs: correlation with some theories of anesthetic action. *Anesthesiology* 26: 764-770.

Ernst M, Brauchart D, Boesch S and Sieghart W (2003) Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* 119: 933-943.

Evers AS and Steinbach JH (1999) Double-edged swords: volatile anesthetics both enhance and inhibit ligand-gated ion channels. *Anesthesiology* 90: 1-3.

Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C and Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* 15: 6854-6862.

Franks NP and Lieb WR (1996) Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments. *Anesthesiology* 84: 716-720.

Gähwiler B (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J.Neurosci.Methods* 4: 329-342.

Grasshoff C and Antkowiak B (2004) Propofol and sevoflurane depress spinal neurons in vitro via different molecular targets. *Anesthesiology* 101: 1167-1176.

Grasshoff C and Antkowiak B (2006) Effects of isoflurane and enflurane on GABAA and glycine receptors contribute equally to depressant actions on spinal ventral horn neurones in rats. *Br.J.Anaesth.* 97: 687-694.

Grasshoff C, Drexler B, Rudolph U and Antkowiak B (2006) Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects. *Curr.Pharm.Des* 12: 3665-3679.

Grasshoff C, Jurd R, Rudolph U and Antkowiak B (2007) Modulation of presynaptic beta3-containing GABAA receptors limits the immobilizing actions of GABAergic anesthetics. *Mol.Pharmacol.* 72: 780-787.

Grasshoff C, Netzhammer N, Schweizer J, Antkowiak B and Hentschke H (2008) Depression of spinal network activity by thiopental: shift from phasic to tonic GABA(A) receptor-mediated inhibition. *Neuropharmacology* 55: 793-802.

Grasshoff C, Rudolph U and Antkowiak B (2005) Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept. *Curr.Opin.Anaesthesiol.* 18: 386-391.

Gredell JA, Turnquist PA, Maciver MB and Pearce RA (2004) Determination of diffusion and partition coefficients of propofol in rat brain tissue: implications for studies of drug action in vitro. *Br.J.Anaesth.* 93: 810-817.

Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H and Laube B (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45: 727-739.

Grutter T and Changeux JP (2001) Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem.Sci.* 26: 459-463.

Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, bo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU and Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304: 884-887.

Hervieu GJ, Cluderay JE, Gray CW, Green PJ, Ranson JL, Randall AD and Meadows HJ (2001) Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* 103: 899-919.

Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G and Lazdunski M (2004) TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* 23: 2684-2695.

Jinks SL, Antognini JF and Carstens E (2003a) Isoflurane depresses diffuse noxious inhibitory controls in rats between 0.8 and 1.2 minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth.Analg.* 97: 111-6, table.

Jinks SL, Bravo M and Hayes SG (2008) Volatile anesthetic effects on midbrain-elicited locomotion suggest that the locomotor network in the ventral spinal cord is the primary site for immobility. *Anesthesiology* 108: 1016-1024.

Jinks SL, Martin JT, Carstens E, Jung SW and Antognini JF (2003b) Peri-MAC depression of a nociceptive withdrawal reflex is accompanied by reduced dorsal horn activity with halothane but not isoflurane. *Anesthesiology* 98: 1128-1138.

Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B and Rudolph U (2003) General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J.* 17: 250-252.

Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu.Rev.Neurosci.* 29: 279-306.

Kim D, Sladek CD, guado-Velasco C and Mathiasen JR (1995) Arachidonic acid activation of a new family of K⁺ channels in cultured rat neuronal cells. *J.Physiol* 484 (Pt 3): 643-660.

Kim J, Yao A, Atherley R, Carstens E, Jinks SL and Antognini JF (2007) Neurons in the ventral spinal cord are more depressed by isoflurane, halothane, and propofol than are neurons in the dorsal spinal cord. *Anesth.Analg.* 105: 1020-6, table.

Kirsch J (2006) Glycinergic transmission. *Cell Tissue Res.* 326: 535-540.

Kuhse J, Becker CM, Schmieden V, Hoch W, Pribilla I, Langosch D, Malosio ML, Muntz M and Betz H (1991) Heterogeneity of the inhibitory glycine receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 625: 129-135.

- Kungys G, Kim J, Jinks SL, Atherley RJ and Antognini JF (2009) Propofol produces immobility via action in the ventral horn of the spinal cord by a GABAergic mechanism. *Anesth.Analg.* 108: 1531-1537.
- Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G and Lazdunski M (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* 19: 1784-1793.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol.Life Sci.* 58: 760-793.
- Lesage F and Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 279: F793-F801.
- Liao M, Sonner JM, Jurd R, Rudolph U, Borghese CM, Harris RA, Laster MJ and Eger EI (2005) Beta3-containing gamma-aminobutyric acidA receptors are not major targets for the amnesic and immobilizing actions of isoflurane. *Anesth.Analg.* 101: 412-8, table.
- Lowry DW, Mirakhur RK, McCarthy GJ, Carroll MT and McCourt KC (1998) Neuromuscular effects of rocuronium during sevoflurane, isoflurane, and intravenous anesthesia. *Anesth.Analg.* 87: 936-940.
- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56: 303-309.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M and Honore E (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J.Biol.Chem.* 275: 10128-10133.
- Makarovsky I, Markel G, Hoffman A, Schein O, Brosh-Nissimov T, Tashma Z, Dushnitsky T and Eisenkraft A (2008) Strychnine--a killer from the past. *Isr.Med.Assoc.J.* 10: 142-145.
- Matute E and Lopez-Garcia JA (2003) Characterisation of sevoflurane effects on spinal somato-motor nociceptive and non-nociceptive transmission in neonatal rat spinal cord: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* 44: 811-816.
- McCrea DA (2001) Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J.Physiol* 533: 41-50.
- Mody I and Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci.* 27: 569-575.

Moss SJ and Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat.Rev.Neurosci.* 2: 240-250.

Motamed C and Donati F (2002) Sevoflurane and isoflurane, but not propofol, decrease mivacurium requirements over time. *Can.J.Anaesth.* 49: 907-912.

Nishikawa K and MacIver MB (2000) Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology* 92: 228-236.

Nishimaru H and Kakizaki M (2009) The role of inhibitory neurotransmission in locomotor circuits of the developing mammalian spinal cord. *Acta Physiol (Oxf)* 197: 83-97.

Olsen RW, Ban M and Miller T (1976) Studies on the neuropharmacological activity of bicuculline and related compounds. *Brain Res.* 102: 283-299.

Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G and Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat.Neurosci.* 2: 422-426.

Perouansky M, Baranov D, Salman M and Yaari Y (1995) Effects of halothane on glutamate receptor-mediated excitatory postsynaptic currents. A patch-clamp study in adult mouse hippocampal slices. *Anesthesiology* 83: 109-119.

Pfeiffer F, Graham D and Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J.Biol.Chem.* 257: 9389-9393.

Quinlan JJ, Ferguson C, Jester K, Firestone LL and Homanics GE (2002) Mice with glycine receptor subunit mutations are both sensitive and resistant to volatile anesthetics. *Anesth.Analg.* 95: 578-82, table.

Raines DE, Claycomb RJ, Scheller M and Forman SA (2001) Nonhalogenated alkane anesthetics fail to potentiate agonist actions on two ligand-gated ion channels. *Anesthesiology* 95: 470-477.

Raines DE and Zachariah VT (1999) Isoflurane increases the apparent agonist affinity of the nicotinic acetylcholine receptor. *Anesthesiology* 90: 135-146.

Rampil IJ (1994) Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology* 80: 606-610.

- Rampil IJ and Laster MJ (1992) No correlation between quantitative electroencephalographic measurements and movement response to noxious stimuli during isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 77: 920-925.
- Rampil IJ, Mason P and Singh H (1993) Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology* 78: 707-712.
- Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, Hadingham KL, Hutson PH, Belelli D, Lambert JJ, Dawson GR, McKernan R, Whiting PJ and Wafford KA (2003) Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *J.Neurosci.* 23: 8608-8617.
- Sarto-Jackson I and Sieghart W (2008) Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol.Membr.Biol.* 25: 302-310.
- Smith I and Thwaites AJ (1999) Target-controlled propofol vs. sevoflurane: a double-blind, randomised comparison in day-case anaesthesia. *Anaesthesia* 54: 745-752.
- Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, Homanics GE, Kendig J, Orser B, Raines DE, Rampil IJ, Trudell J, Vissel B and Eger EI (2003) Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth.Analg.* 97: 718-740.
- Starke K (2005) Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* : K. Aktories et al., eds., Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, München.
- Talley EM, Sirois JE, Lei Q and Bayliss DA (2003) Two-pore-Domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist.* 9: 46-56.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D and Bayliss DA (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J.Neurosci.* 21: 7491-7505.
- Todd AJ, Watt C, Spike RC and Sieghart W (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J.Neurosci.* 16: 974-982.
- Unwin N (1998) The nicotinic acetylcholine receptor of the Torpedo electric ray. *J.Struct.Biol.* 121: 181-190.

Vitez TS, White PF and Eger EI (1974) Effects of hypothermia on halothane MAC and isoflurane MAC in the rat. *Anesthesiology* 41: 80-81.

Watson KR and Shah MV (2000) Clinical comparison of 'single agent' anaesthesia with sevoflurane versus target controlled infusion of propofol. *Br.J.Anaesth.* 85: 541-546.

Wei A, Jegla T and Salkoff L (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35: 805-829.

Whiting PJ (2003) GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today* 8: 445-450.

Wong SM, Cheng G, Homanics GE and Kendig JJ (2001) Enflurane actions on spinal cords from mice that lack the beta3 subunit of the GABA(A) receptor. *Anesthesiology* 95: 154-164.

Zhang Y, Laster MJ, Hara K, Harris RA, Eger EI, Stabernack CR and Sonner JM (2003) Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth.Analg.* 96: 97-101, table.

Zhang Y, Sonner JM, Eger EI, Stabernack CR, Laster MJ, Raines DE and Harris RA (2004) Gamma-aminobutyric acidA receptors do not mediate the immobility produced by isoflurane. *Anesth.Analg.* 99: 85-90.

[No authors listed] (2000) Looking back on the millennium in medicine. *N.Engl.J.Med.* 342: 42-49.

7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die vorliegende Studie wurde an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Grasshoff durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Grasshoff.

Die Herstellung und Pflege der organotypischen Kulturen wurde von mir in Zusammenarbeit mit den Labormitgliedern Herrn Professor Antkowiak und Frau Holt durchgeführt.

Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Holt und Frau Pappe wurden die Experimente von mir durchgeführt.

Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Holt und Herrn Dr. Hentschke erfolgte die Datenanalyse durch mich. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung von Herrn Professor Grasshoff und Herrn Dr. Hentschke.

Die Daten-Recherche erfolgte überwiegend durch mich und ergänzend durch Herrn Professor Grasshoff.

Die Abbildungen wurden zusammen mit Frau Holt erstellt. Ausnahmen bilden die Abbildungen 1,2 und 3. Diese wurden nach freundlicher Genehmigung des Autors für diese Arbeit übernommen und von Frau Holt und mir modifiziert (Drexler et al. 2006a). Abbildung 8 wurde mit freundlicher Genehmigung des Autors aus der Dissertationsschrift von Dr. Nicolai Netzhammer übernommen und von mir modifiziert.

Die Veröffentlichung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Eckle, Herrn Professor Grasshoff, Herrn PD Dr. Drexler und Herrn Professor Antkowiak verfasst.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig und nach Anleitung durch Professor Grasshoff verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Steinenbronn, den 20.11.2015

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Veit-Simon Eckle, Sabrina Hauser, Berthold Drexler, Bernd Antkowiak, Christian Grasshoff – Opposing Actions of Sevoflurane on GABAergic and Glycinergic Synaptic Inhibition in the Spinal Ventral Horn – PLOS one – 2013 – Volume 8 – Issue 4 – e60286