

Aus der
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Sektion für experimentelle Anästhesiologie

**Der Glycin-Reuptake als Einflussgröße der
motoneuronalen Aktivität: Eine in vitro-Studie an
Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe**

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

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

vorgelegt von

Hoff, Alina Josephine

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Tatagiba

Tag der Disputation: 30.07.2024

*Diese Arbeit ist meinen Eltern Hubert und Michaela, meinen Schwestern
Carolin und Marieke sowie meinem Freund Julian gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Einleitung.....	16
1.1 Das Zusammenwirken intraoperativer Schmerzen und Bewegungen als Herausforderung der Anästhesie	16
1.2 Schmerzstimuli induzieren Bewegungen über das interneuronale Netzwerk des Rückenmarks	18
1.3 Molekulare Vorgänge an glycinergen Synapsen	20
1.4 Aufbau und Funktion des Glycinrezeptors	22
1.5 Die Glycin-Reuptake-Transporter GlyT1 und GlyT2	23
1.6 Org 24598 und Org 25543 sind selektive Glycintransporter-Inhibitoren	26
1.7 Fragestellung	28
1.8 Wahl des Testsystems organotypischer Zellkulturen.....	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Präparation und Kulturpflege von Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe.....	31
2.2 Videomikroskopische Aufzeichnung muskulärer Aktivität	35
2.2.1 Versuchsablauf videomikroskopischer Aufzeichnungen muskulärer Aktivität	35
2.2.2 Datenanalyse videomikroskopischer Aufzeichnungen muskulärer Aktivität	37
2.3 Extrazelluläre elektrophysiologische Messungen	38
2.3.1 Versuchsablauf extrazellulärer elektrophysiologischer Messungen	40

2.3.2	Datenanalyse extrazellulärer elektrophysiologischer Messungen	42
2.4	Whole Cell-Patch-Clamp-Methode	43
2.4.1	Versuchsablauf der Whole Cell-Patch-Clamp-Methode	44
2.4.2	Datenanalyse der Patch-Clamp-Methode	46
2.5	Statistische Auswertung	48
2.6	Herstellung der Testsubstanzen	49
2.7	Versuchsprotokoll.....	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Einfluss des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 auf die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes	52
3.2	Einfluss des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 auf die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes	55
3.3	Wirkung des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone im Vorderhorn	58
3.4	Wirkung des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone im Vorderhorn	63
3.5	Wirkungen der Glycin-Reuptake-Blocker in Abhängigkeit der neuronalen Grundaktivität	66
3.6	Wirkung des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 auf glycinerge postsynaptische Ströme.....	67
3.7	Wirkung des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 auf glycinerge postsynaptische Ströme.....	73
3.8	Wirkung der Scheinapplikation auf glycinerge postsynaptische Ströme	76
3.9	Einfluss der Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598 auf glycinerge tonische Ströme.....	78
4	Diskussion	83

4.1	Die Reuptake-Transporter GlyT1 und GlyT2 tragen zur Beseitigung von Glycin aus dem synaptischen Spalt bei.....	83
4.2	Die Rolle des Glycin-Reuptake in der Modulation motoneuronaler und interneuronaler Aktivität	85
4.3	Org 25543 und Org 24598 modulieren synaptische Neurotransmission und interneuronale Netzwerkaktivität unterschiedlich.....	86
4.4	Interpretation Strychnin-sensitiver tonischer Ströme in Gegenwart der Glycin-Reuptake-Blocker	88
4.5	Die mögliche Bedeutung der Glycin-Wiederaufnahme-Blockade für die Anästhesie	89
4.6	Glutamaterge Neurotransmission als sekundärer Effekt von Org 24598	93
4.7	Anwendungsgrenzen der vorliegenden Arbeit	95
4.8	Die GlyT2-Blockade als mögliche Alternative zur Behandlung akuter Rückenschmerzen	96
4.9	Ausblick	97
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis.....	101
7	Anhang	106
	Erklärung zum Eigenanteil	118
	Danksagung.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des interneuronalen Netzwerks im Rückenmark zur Generierung Schmerzstimuli-induzierter Bewegungen	20
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Vorgänge an einer glycinergen inhibitorischen Synapse (AP= Aktionspotential)..	21
Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung zur Wirkung homomerer und heteromerer Glycinrezeptoren an einer postsynaptischen Zelle während einer glycinergen synaptischen Neurotransmission.....	23
Abbildung 4 Stöchiometrie des glialen GlyT1 (links) Modus und des neuronalen GlyT2 (rechts). Links ist der reversible Reuptake Modus von GlyT1 zu sehen	24
Abbildung 5 Strukturformeln des neuronalen Glycin-Reuptake-Inhibitors Org 25543 (links) und des glialen Glycin-Reuptake-Inhibitors Org 24598 (rechts) .	27
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Gewinnung von Rückenmark-Schnittkulturen (E14= Embryonalstadium beträgt 14 Tage).	34
Abbildung 7 Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs videomikroskopischer Aufzeichnungen muskulärer Aktivität	36
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Analyse von Messungen spontaner Muskelaktivität aus Kokulturen des Rückenmark- und Muskelgewebes..	37
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Positionen von Motoneuronen (rot gekennzeichnet) in Gewebsschnitten kokultivierter Rückenmarkschnitte.	39
Abbildung 10 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Kokultur aus Rückenmark- und Muskelgewebe nach 21 ex vivo.....	40
Abbildung 11 Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs extrazellulärer elektrophysiologischer Aufzeichnungen	42
Abbildung 12 Detektion von Aktionspotentialen.....	43
Abbildung 13 Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs intrazellulärer Ableitungen.....	46
Abbildung 14 Detektion von IPSCs. Die rote, gestrichelte Linie stellt die manuell gesetzte Schwelle dar.....	47

Abbildung 15 Einfluss des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 auf die Muskelaktivität des kokultivierten Muskelgewebes.	54
Abbildung 16 Beispielhafte Darstellung von Rohdaten, welche die Verringerung der Muskelaktivität unter Zugabe des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 zeigen. A) Kontrollmessung mit ACSF. B) Drogenmessung mit 70 nM Org 24598. C) Drogenmessung mit 140 nM Org 24598. D) Auswaschmessung mit 1µM Pancuronium.....	56
Abbildung 17 Der Einfluss des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 auf die Muskelaktivität des kokultivierten Muskelgewebes.....	57
Abbildung 18 Spontane neuronale Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone während eines Experimentes mit Scheinapplikation (Sham)	59
Abbildung 19 Spontane neuronale Aktionspotentialaktivität spinaler Vorderhornneurone während eines Experimentes mit dem neuronalen Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543.....	60
Abbildung 20 Einfluss des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 in den Konzentrationen A) 160 nM und 320 nM und B) 5 µM und 10 µM auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone.	62
Abbildung 21 Spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Vorderhornneurone während eines Experimentes mit dem glialen Glycin-Reuptake-Blocker Org 24598.....	63
Abbildung 22 Einfluss des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 in den Konzentrationen A) 70 nM und 140 nM und B) 5 µM und 10 µM auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone.	65
Abbildung 23 Spontane glycinerge inhibitorische Ströme (sIPSCs) als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen unter Bicucullin (100 µM), CNQX (10 µM) und AP5 (25 µM)	68
Abbildung 24 Ergebnisse der einzelnen Experimente (A,C,E) und Zusammenfassung (B,D,F) der intrazellulären Messungen mit 320 nM Org 25543. Dabei zeigen A und B die Abklingzeit, C und D die Amplitude und E und F die Frequenz der sIPSCs.....	71
Abbildung 25 Ergebnisse der einzelnen Experimente (A,C,E) und Zusammenfassung (B,D,F) der intrazellulären Messungen mit 5 µM Org 25543.	

Dabei zeigen A und B die Abklingzeit, C und D die Amplitude und E und F die Frequenz der sIPSCs.....	72
Abbildung 26 Ergebnisse der einzelnen Experimente (A,C,E) und Zusammenfassung (B,D,F) der intrazellulären Messungen mit 5 μ M Org 24598. Dabei zeigen A und B die Abklingzeit, C und D die Amplitude und E und F die Frequenz der sIPSCs.....	75
Abbildung 27 Ergebnisse der einzelnen Experimente (A,C,E) und Zusammenfassung (B,D,F) der intrazellulären Messungen mit der Scheinapplikation mit AP5 (25 μ M), CNQX (10 μ M), ACSF und Bicucullin (100 μ M). Dabei zeigen A und B die Abklingzeit, C und D die Amplitude und E und F die Frequenz der sIPSCs.	77
Abbildung 28 Änderungen des Grundstroms als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen unter Applikation mit dem A) glialen Glycin-Reuptake-Blocker Org 24598 und B) neuronalen Glycin-Reuptake-Blocker Org25543 ...	80
Abbildung 29 Veränderung des Grundstroms (in pA) bei Drogenzugabe/ Scheinapplikation und bei Zugabe von 1 μ M Strychnin. Die dünnen, schwarzen Balken geben den Standardfehler an. A) Scheinapplikation (englisch: Sham) mit AP5, CNQX, ACSF und Bicucullin. B) 5 μ M Org 24598 C) 320 nM Org 25543 D) 5 μ M Org 25543.	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkungen intravenöser und volatiler Anästhetika auf den GABAA-Rezeptor bzw. den Glycinrezeptor im Vergleich. Modifiziert nach Grasshoff (Grasshoff et al., 2006)	17
Tabelle 2: Bei der Patch-Clamp-Methode verwendete Substanzen zur pharmakologischen Isolation glycinergere IPSCs und deren Funktion	44
Tabelle 3: Die zur IPSC Auswertung verwendeten Parameter, ihre Einheit und ihre Bedeutung.....	48
Tabelle 4 Versuchsprotokoll aller durchgeführten Experimente	51
Tabelle 5: Darstellung von Rohdaten, welche die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes unter dem Einfluss des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 zeigen.	55
Tabelle 6 Darstellung von Rohdaten, welche die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes unter dem Einfluss des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 zeigen.	58
Tabelle 7 Ergebnisse zur Analyse der aktivitätsabhängigen Wirkung des neuronalen (Org 25543) und glialen (Org 24598) Glycin-Reuptake-Blockers..	67
Tabelle 8 Darstellung von Rohdaten, welche den tonischen Grundstrom (pA) einer Nervenzelle vor und nach der Zugabe der jeweiligen Testsubstanz sowie vor und nach Zugabe von 1µM Strychnin zeigen.....	82
Tabelle 9 Zusammenfassung antinocizeptorischer Wirkungen glycinergere Reuptake-Inhibitoren in chronischen und akuten Schmerzmodellen in Mäusen. Die Anzahl an +-Zeichen gibt die Stärke des anti-allodynschen Effekts an. Modifiziert nach Dohi (Dohi et al., 2009).....	93
Tabelle 10 ANOVA-Auswertung zu den Daten der Muskelaktivitätsänderung unter Org 25543.	107
Tabelle 11 ANOVA-Auswertung zu den Daten der Muskelaktivitätsänderung unter Org 24598.....	108
Tabelle 12 Mixed ANOVA der IPSC-Verfallszeit-Daten von 320nM Org 25543.	110
Tabelle 13 Mixed ANOVA der IPSC-Verfallszeit-Daten von 5µM Org 25543.	111

Tabelle 14 ANOVA Analyse der IPSC-Frequenz mit 320nM Org 25543..	113
Tabelle 15 Mixed ANOVA der IPSC-Frequenz-Daten mit 5µM Org 25543.....	115
Tabelle 16 Mixed ANOVA der IPSC-Amplituden-Daten mit 5µM Org 24598..	116
Tabelle 17 Einfaktorielle ANOVA der Daten von tonischen Strömen nach Strychninzugabe. Verglichen werden die Daten der Scheinapplikationsgruppe mit den Daten mit 320 nM Org 25543..	117
Tabelle 18 Einfaktorielle ANOVA der Daten von tonischen Strömen nach Strychninzugabe. Verglichen werden die Daten der Scheinapplikationsgruppe mit den Daten mit 5 µM Org 25543.	118
Tabelle 19 Einfaktorielle ANOVA der Daten von tonischen Strömen nach Strychninzugabe. Verglichen werden die Daten der Scheinapplikationsgruppe mit den Daten mit 5 µM Org 24598.	118

Abkürzungsverzeichnis

A

α	Alpha
AgCl	chemische Summenformel für Silberchlorid
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit; künstlich hergestellter Liquor
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol Propionsäure-Rezeptor; eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren
AP	Aktionspotential
AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosintriphosphat

B

β	Beta
---------	------

C

CaCl ₂	chemische Summenformel für Calciumchlorid
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter, 10 ⁻² Meter
CsCl	chemische Summenformel für Caesiumchlorid
CsOH	chemische Summenformel für Caesiumhydroxid
CNQX	6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion
CO ₂	chemische Summenformel für Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius

E

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N,N</i> -tetraessigsäure
eIPSC	evoziertes inhibitorisches postsynaptischer Strom

G

γ	Gamma
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GABA _A -Rezeptor	Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptor Typ _A
Gly	Glycin
GlyR	Glycinrezeptor
GlyT1	Glycintransporter 1
GlyT2	Glycintransporter 2
H	
Hz	Hertz; Maßeinheit für die Frequenz
HCl	chemische Summenformel für Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	chemische Summenformel für Wasser
I	
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration; Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom
K	
kHz	Kilohertz, 1000 Hz; Maßeinheit für die Frequenz
K _m	Michaelis-Menten-Konstante; Substratkonzentration, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit eines Enzyms erreicht ist
KCl	chemische Summenformel für Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	chemische Summenformel für Kaliumhydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall zum Niveau 95%
L	
l	Liter
M	

min	Minute
ml	Milliliter, 10^{-3} Liter
mm	Millimeter, 10^{-3} Meter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule; Maßeinheit für den statischen Druck
ms	Millisekunde, 10^{-3} Sekunden
mIPSC	Miniatur-IPSCs
mM	Millimol, 10^{-3} Mol
mV	Millivolt, 10^{-3} Volt; Maßeinheit für die elektrische Spannung
μ	My
μg	Mikrogramm, 10^{-6} Kilogramm
μl	Mikroliter, 10^{-6} Liter
μm	Mikrometer, 10^{-6} Meter
μM	Mikromol, 10^{-6} Mol
M	Mol
Mg^{2+}	Magnesium
MgCl_2	chemische Summenformel für Magnesiumchlorid
MgSO_4	chemische Summenformel für Magnesiumsulfat
M Ω	Megaohm, 10^6 Ohm; Maßeinheit für den elektrischen Widerstand
N	
n	Stichprobengröße
nA	Nanoampere, 10^{-9} Ampere; Maßeinheit für die Stromstärke
nM	Nanomol, 10^{-9} Mol
Na^+	Natrium-Ion
NaCl	chemische Summenformel für Natriumchlorid
NaHCO_3	chemische Summenformel für Natriumbikarbonat

NaH ₂ PO ₄	chemische Summenformel für Natriumhydrogenphosphat
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NGF	Nerve Growth Factor-β von der Ratte
NH ₂	funktionelle Gruppe von Aminen und Aminosäuren; Amino- gruppe
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O	
O ₂	Sauerstoff
P	
p	p-Wert; Signifikanzwert
pA	Picoampere, Maßeinheit für die Stromstärke
pH-Wert	potentia hydrogenii; Maß für die saure oder alkalische Reak- tion einer wässrigen Lösung
R	
ROI	Region of Interest
S	
s	Sekunde
sIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
T	
TIVA	Totale intravenöse Anästhesie
TMD	transmembrane Domäne
V	
V	Volt
VIAAT	vesikulärer inhibitorischer Aminosäure-Transporter
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Zusammenwirken intraoperativer Schmerzen und Bewegungen als Herausforderung der Anästhesie

Während chirurgischer Eingriffe wird immer häufiger auf die totale intravenöse Anästhesie (TIVA) zurückgegriffen, um bei dem Patienten einen narkotisierten Zustand hervorzurufen. Die TIVA ist eine Form der Anästhesie, bei der ausschließlich Hypnotika, Opioide und Muskelrelaxantien verabreicht werden und auf volatile Anästhetika wie Sevofluran gänzlich verzichtet wird. Häufig treten im Rahmen chirurgischer Eingriffe unter TIVA im Gegensatz zu anderen Anästhesieformen jedoch unerwünschte motorische Reaktionen auf (Watson und Shah, 2000; Hensel et al., 2019; Smith und Thwaites, 1999). So ist die Inzidenz unwillkürlicher Bewegungen unter Behandlung mit dem intravenös verabreichten Propofol trotz des Gebrauchs peripherer Muskelrelaxantien doppelt so hoch wie unter Behandlung mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran (Watson und Shah, 2000). Ein weiteres Problem stellen postoperative Schmerzen dar, die nicht selten chronifizieren (Gan, 2017; Kehlet et al., 2006). Die Ursache postoperativer Schmerzen liegt häufig in einer unzureichenden Dosierung von Schmerzmitteln, während intraoperative Bewegungen hauptsächlich auf die zu niedrige Dosierung von Muskelrelaxantien zurückzuführen sind (Eckle, 2009). Das Auftreten motorischer Aktivität und intraoperativer Schmerzen steht im Zusammenhang, da Schmerzstimuli motorische Aktivität über das zentrale Nervensystem (ZNS) induzieren. Dieses Zusammenspiel ist unter anderem aufgrund der individuellen Schmerzempfindlichkeit eine große Herausforderung für die Anästhesie. Das Monitoring der Schmerzempfindung gestaltet sich wegen der Sedierung der Patienten als schwierig, während sich die Muskelrelaxierung mithilfe der Relaxometrie überwachen lässt.

Ein Ansatz zum Limitieren intraoperativer Bewegungen stellt die Modifikation der Schmerzweiterleitung dar. Die Schaltzentrale zur Generierung motorischer Schutzreaktionen befindet sich im Rückenmark, wo Neurone Schmerzimpulse empfangen und über verschiedene Rezeptorsysteme zum Muskel weiterleiten.

Eines dieser Rezeptorsysteme ist das glycinerge System, welches überwiegend für die immobilisierende Wirkung volatiler Anästhetika verantwortlich ist (Zhang et al., 2003; Sonner et al., 2003; Grasshoff und Antkowiak, 2004). Intravenöse Anästhetika hingegen üben ihre immobilisierenden Wirkungen hauptsächlich über GABA_A-Rezeptoren aus (Grasshoff et al., 2006) (siehe Tabelle 1). Während bereits zahlreiche Medikamente, die die Funktionsweise von GABA_A-Rezeptoren modifizieren, in der Klinik verwendet werden, gibt es bisher keine spezifischen Modulatoren für Glycinrezeptoren. Jedoch stellen Glycinrezeptoren ein interessantes pharmakologisches Target dar, um intraoperative Bewegungen zu limitieren: Zum einen erscheint es möglich eine Immobilisierung von Patienten durch eine Verstärkung der glycinergen Inhibition zu erreichen (Zhang et al., 2003; Sonner et al., 2003) und zum anderen befinden sich Glycinrezeptoren im Gegensatz zu GABA-Rezeptoren nicht im Cortex, sondern überwiegend im Rückenmark und Hirnstamm und sollten daher nicht zu einer Sedierung des Patienten beitragen. Letztere Eigenschaft ist von Vorteil, da bei einer kombinierten Verabreichung eines muskelrelaxierenden Medikamentes mit dem Hypnotikum Propofol das postoperative Erwachen des Patienten unbeeinträchtigt bleibt.

	GABA _A -Rezeptor	Glycinrezeptor	Immobilität
Intravenöse Anästhetika (Propofol, Etomidate, Barbiturate)	++	(+)	+
Volatile Anästhetika (Sevofluran, Isofluran)	++	++	++

Tabelle 1: Wirkungen intravenöser und volatiler Anästhetika auf den GABA_A-Rezeptor bzw. den Glycinrezeptor im Vergleich. Modifiziert nach Grasshoff (Grasshoff et al., 2006)

1.2 Schmerzstimuli induzieren Bewegungen über das interneuronale Netzwerk des Rückenmarks

Der Zustand der Vollnarkose wird durch eine reversible Hemmung bestimmter Strukturen des zentralen Nervensystems (ZNS) erreicht. Von besonderer Bedeutung ist hierbei das Rückenmark, da die Aktivität der Skelettmuskulatur durch spinale Neurone koordiniert wird. Allgemeinanästhetika unterdrücken spontane oder Stimulus-induzierte Bewegungen durch die Erregungshemmung spinaler Neurone (Grasshoff et al., 2005).

Schmerzsignale werden durch Nozizeptoren registriert und über afferente Nervenbahnen von der Peripherie über sensorische Ganglien in die graue Substanz des Rückenmarks, welche in zehn Laminae unterteilt wird, weitergeleitet. Im Hinterhorn des Rückenmarks, welches die Laminae I bis VI umfasst, befinden sich die Somata afferenter Neurone, welche dieses Schmerzsignal verarbeiten und in höhere Regionen des ZNS weiterleiten. Im Vorderhorn, welches die Laminae VIII und IX und Teile der Lamina VII umfasst, befinden sich α -Motoneurone und γ -Motoneurone. α -Motoneurone innervieren die Skelettmuskulatur, während γ -Motoneurone intrafusale Muskelfasern stimulieren. Motoneurone bilden mit Muskelfasern neuromuskuläre Synapsen und können eine Muskelkontraktion auslösen. Sensorische Neurone im Hinterhorn können über Interneurone durch synaptische Verbindungen mit Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks verschaltet sein (Collins et al., 1995). Diese Interneurone sind in der grauen Substanz des Rückenmarks verteilt und können die Weiterleitung von Impulsen modifizieren, indem sie exzitatorische oder inhibitorische Synapsen mit spinalen Neuronen bilden.

Motoneurone werden durch Renshaw-Zellen, welche Glycin ausschütten, gehemmt (Fyffe, 1991; Curtis et al., 1976). Renshaw-Zellen werden unter anderem durch Alpha-Motoneurone innerviert und üben somit lokal eine rekurrente Hemmung aus.

An neuromuskulären Synapsen wird der Neurotransmitter Acetylcholin ausgeschüttet, welcher an postsynaptische Acetylcholinrezeptoren bindet und somit

einen Natrium-Ionen-Einstrom in die Muskelfaser bewirkt. Es folgt eine Depolarisation der Postsynapse, welche auch Endplattenpotential genannt wird. Dieser Natrium-Ionen-Einstrom wiederum generiert ein Aktionspotential, welches für die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle verantwortlich ist. Die Ausschüttung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern führt zu der Verschiebung von Aktin- und Myosin-Filamenten. Durch diese Verschiebungen kommt es zu einer Verkürzung der Muskelfaser und somit zur Muskelkontraktion.

Eine Inhibition der Muskelkontraktion kann auf verschiedenen Wegen stattfinden. Peripher wirkende Muskelrelaxantien verhindern die Auslösung von Aktionspotentialen an der neuromuskulären Synapse, indem sie entweder als kompetitiver Antagonist am Acetylcholinrezeptor mit Acetylcholin konkurrieren oder als depolarisierendes Muskelrelaxans wirken. Eine zentrale Muskelrelaxation durch klinisch gebräuchliche Allgemeinanästhetika hingegen erfolgt zumeist durch die Aktivierung inhibitorischer Synapsen zwischen Inter- und Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. Die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter dieser Synapsen sind GABA und Glycin. Neurone, welche Glycin freisetzen (glycinerge Neurone) finden sich sowohl im dorsalen als auch im ventralen Horn des Rückenmarks (Zeilhofer et al., 2018). Aprison und Mitarbeiter zeigten, dass Glycin überwiegend in der Hals- und Lendenwirbelsäule und der Medulla oblongata lokalisiert ist (Aprison et al., 1968).

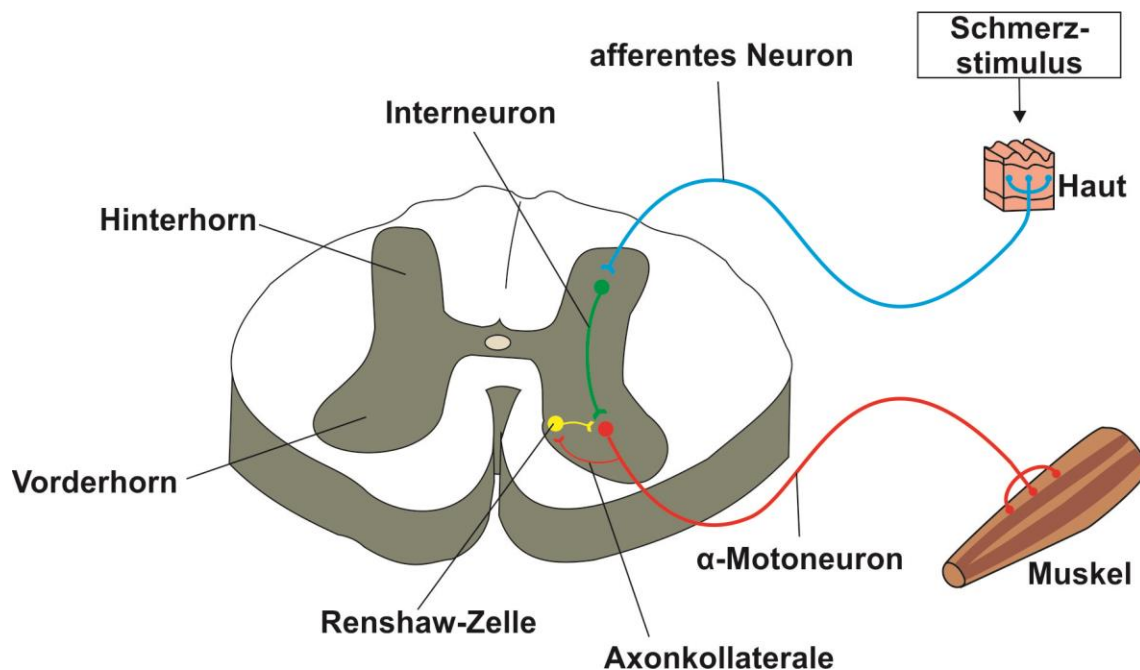


Abbildung 1 Schematische Darstellung des interneuronalen Netzwerks im Rückenmark zur Generierung Schmerzstimuli-induzierter Bewegungen

1.3 Molekulare Vorgänge an glycinergen Synapsen

Die Vorgänge an einer glycinergen Synapse sind in Abbildung 2 dargestellt. Wird ein Aktionspotential entlang eines Axons eines glycinergen Neurons weitergeleitet, so fusionieren die mit Glycin-Molekülen gefüllten Vesikel im präsynaptischen Endknöpfchen mit der präsynaptischen Membran und entleeren ihren Inhalt in den synaptischen Spalt. Glycin kann nun an Strychnin-sensitiven Glycinrezeptoren (GlyR) an der postsynaptischen Membran binden und somit einen Chlorid-Einstrom in das Cytoplasma und die Generierung von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs) bewirken. Damit kann die Entstehung von Aktionspotentialen in der Postsynapse durch Hyperpolarisation des Ruhepotentials inhibiert werden (Laube et al., 2002).

Neben der Funktion an inhibitorischen Synapsen beteiligt sich Glycin an der Modulation der Funktionsweise exzitatorischer glutamaterger Synapsen. Als obligatorischer Co-Agonist von Glutamat bindet Glycin an N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) und ermöglicht somit einen Natrium-Ionen-Einstrom in das

Cytoplasma der exzitatorischen Postsynapse. Der Natrium-Ionen-Einstrom ruft eine Depolarisation der postsynaptischen Membran hervor.

Anders als Acetylcholin, welches durch das Enzym Acetylcholinesterase degradiert und dadurch von der Synapse entfernt wird, wird Glycin durch Diffusion und eine sogenannte Wiederaufnahme (Reuptake) in das präsynaptische Endknöpfchen und in Gliazellen aus dem synaptischen Spalt entfernt (Eulenburg et al., 2005). Diese Wiederaufnahme erfolgt durch die beiden Glycin-Reuptake-Transporter GlyT1 und GlyT2. Im Endknöpfchen der inhibitorischen Präsynapse wird Glycin durch den vesikulären inhibitorischen Aminosäure-Transporter (VIAAT) in Vesikel verpackt.

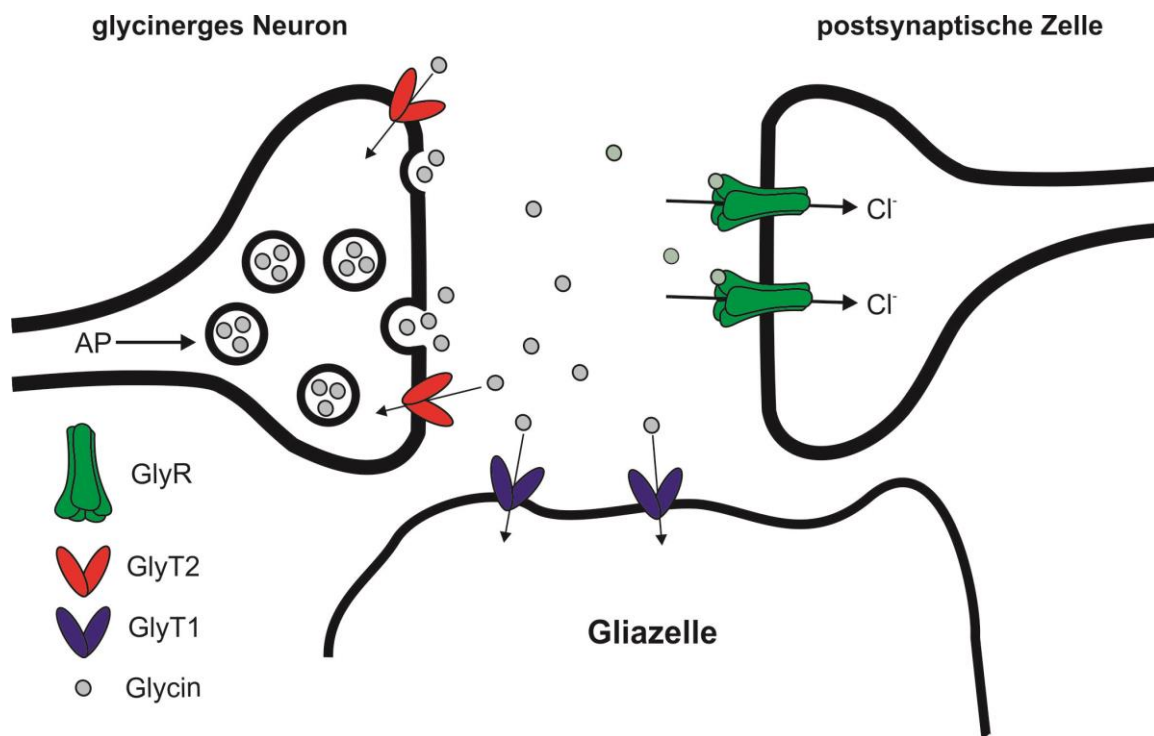


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Vorgänge an einer glycinergen inhibitorischen Synapse (AP= Aktionspotential). Modifiziert nach Eulenburg (Eulenburg et al., 2005).

1.4 Aufbau und Funktion des Glycinrezeptors

Der Glycinrezeptor (GlyR) ist ein ligandengesteuerter und chlorid-permeabler Ionenkanal, welcher zu der Cys-Loop-Rezeptorfamilie gehört (Legendre, 2001). Durch Aktivierung eines Glycinrezeptors erfolgt ein Chlorid-Ionen-Einstrom in das Cytoplasma der postsynaptischen Zelle. Die Zellmembran dieser postsynaptischen Zelle hyperpolarisiert daraufhin und es werden inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) generiert (Cioffi, 2018). Die durch den Glycinrezeptor induzierte inhibitorische Neurotransmission ist ein zentraler Regulationsmechanismus für die Modulation der motorischen und sensorischen Reflexe, des Muskeltonus, des Atemrhythmus und der Schmerzempfindung (Cioffi, 2018). Während der GABA-Rezeptor weitläufig im zentralen Nervensystem exprimiert ist, befindet sich der Glycinrezeptor überwiegend im Cerebellum, Hirnstamm, Rückenmark und in der Retina (Cioffi, 2018). Glycinrezeptoren bestehen aus fünf Protein-Untereinheiten, welche symmetrisch angeordnet sind und einen zentralen Chloridkanal bilden (Cioffi, 2018). Vier α -Untereinheiten (α_{1-4}) und eine β -Untereinheit bestehen jeweils aus einer extrazellulären Domäne mit NH_2 -Ende, welche einen Loop mit zwei Cystein-Residuen aufweist und mit vier Transmembrandomänen verbunden ist (Cioffi, 2018). Die Bindungsstelle für Glycin an dem Rezeptor befindet sich extrazellulär zwischen den angrenzenden Untereinheiten. Glycinrezeptoren können homomere Kanäle aus ausschließlich α -Untereinheiten und heteromere Kanäle aus einer Kombination aus α - und β -Untereinheiten bilden (Cioffi, 2018). Die meisten Glycinrezeptoren sind Heteropentamere bestehend aus α - und β -Untereinheiten (Zeilhofer et al., 2018). Die Unterscheidung zwischen heteromeren und homomeren Glycinrezeptoren ist von zentraler Bedeutung, da diese beiden Formen von Rezeptoren unterschiedliche Funktionen und eine unterschiedliche Lokalisation haben (Abbildung 3). Da heteromere Glycinrezeptoren die β -Untereinheit besitzen, sind sie dazu in der Lage, an das postsynaptische Gerüstprotein Gephyrin zu binden (Grudzinska et al., 2005). Im Gegensatz dazu sind homomere Glycinrezeptoren, welche keine β -Untereinheit und keine Bindungsfähigkeit zu Gephyrin besitzen, extrasynaptisch und präsynaptisch lokalisiert und vermutlich überwiegend für die

Generierung tonischer inhibitorischer Ströme verantwortlich (Zeilhofer et al., 2018).

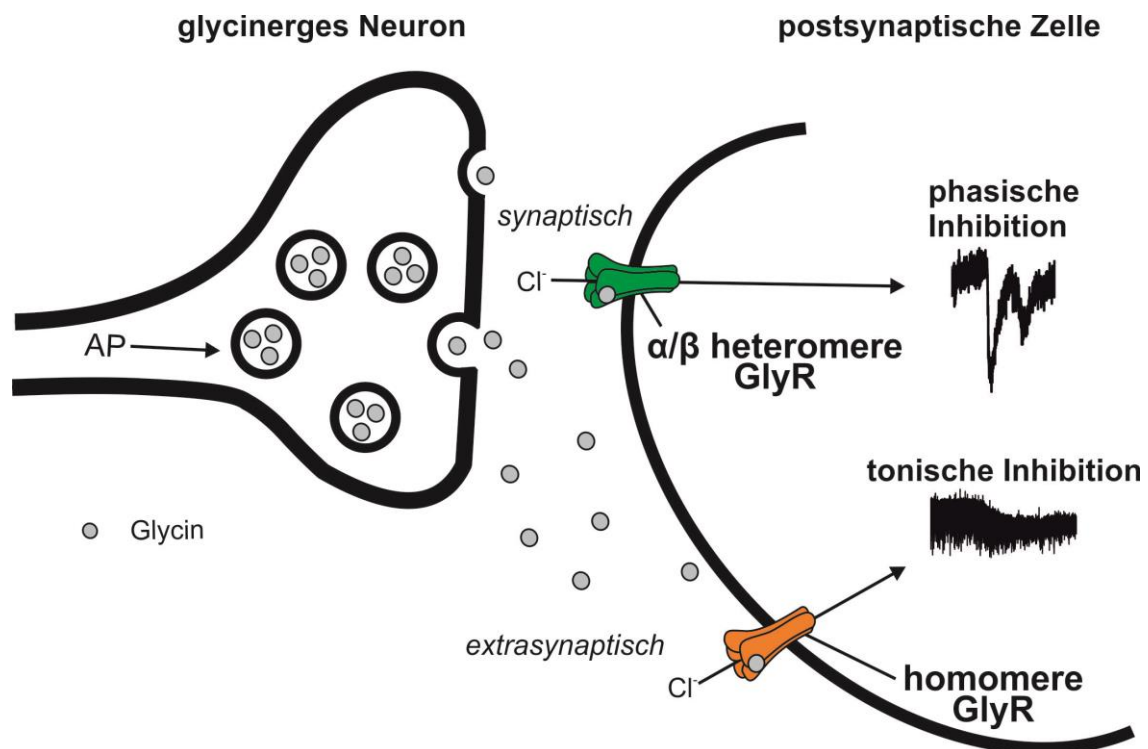


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung zur Wirkung homomerer und heteromerer Glycinrezeptoren an einer postsynaptischen Zelle während einer glycinergen synaptischen Neurotransmission

1.5 Die Glycin-Reuptake-Transporter GlyT1 und GlyT2

Der Glycin-Reuptake bewirkt die Wiederaufnahme von Glycin mithilfe von Reuptake-Transportern vom extrazellulären Raum in das Cytosol der Präsynapse beziehungsweise in das Cytosol von Gliazellen (Eulenburg et al., 2005). Es werden die beiden Subtypen GlyT1 und GlyT2, welche zu 50% die identische Aminosäuresequenz aufweisen, unterschieden (Eulenburg et al., 2005). Beide Transporter gehören zu der Familie von Na^+/Cl^- -abhängigen Proteinen. Diese Proteinfamilie, zu der unter anderem auch die GABA-Transporter gehören, ist energetisch an den transmembranen Natriumgradienten gekoppelt, welcher durch die Na^+/K^+ -ATPase erhalten wird (Eulenburg et al., 2005). Sie bestehen aus 12

transmembranen Domänen (TMDs), welche durch sechs extrazelluläre und fünf intrazelluläre Loops verbunden sind. Beide GlyTs sind mehrfach N-glycosyliert an dem zweiten extrazellulären Loop (Eulenburg et al., 2005). Die N-Glycosylierung spielt für GlyT1, aber nicht für GlyT2, eine Rolle in der Adhäsion zur Zelloberfläche (Olivares et al., 1995).

GlyT1 ist überwiegend in Gliazellen an jenen Stellen im ZNS lokalisiert, an denen Astrozyten inhibitorische glycinerge Synapsen oder exzitatorische glutamaterge Synapsen umgeben (Zafra und Gimenez, 2008). GlyT1 exprimiert 5 Isoformen, von denen sich drei im N-terminalen Ende (a,b,c) und zwei im C-terminalen Ende (d,e) unterscheiden (Eulenburg et al., 2005). Die N- und C-Termini befinden sich intrazellulär (Eulenburg et al., 2005). GlyT1 bewirkt, dass die Glycinkonzentration im Cytosol der Gliazellen ca. 2 nM beträgt (Vandenberg, 2014).

GlyT2 befindet sich in glycinergen Neuronen in Rückenmark, Hirnstamm und Cerebellum an präsynaptischen Endknöpfchen, welche eine hohe intrazelluläre Glycinkonzentration aufweisen (Zafra und Gimenez, 2008). Die Distribution von GlyT2 ist gleichzusetzen mit der Verteilung von Glycinrezeptoren, welche die postsynaptische Komponente glycinerner Synapsen bilden (Zafra et al., 1995). Es existieren drei Isoformen von GlyT2, welche sich in ihrer N-terminalen Region unterscheiden (a,b,c) (Eulenburg et al., 2005).

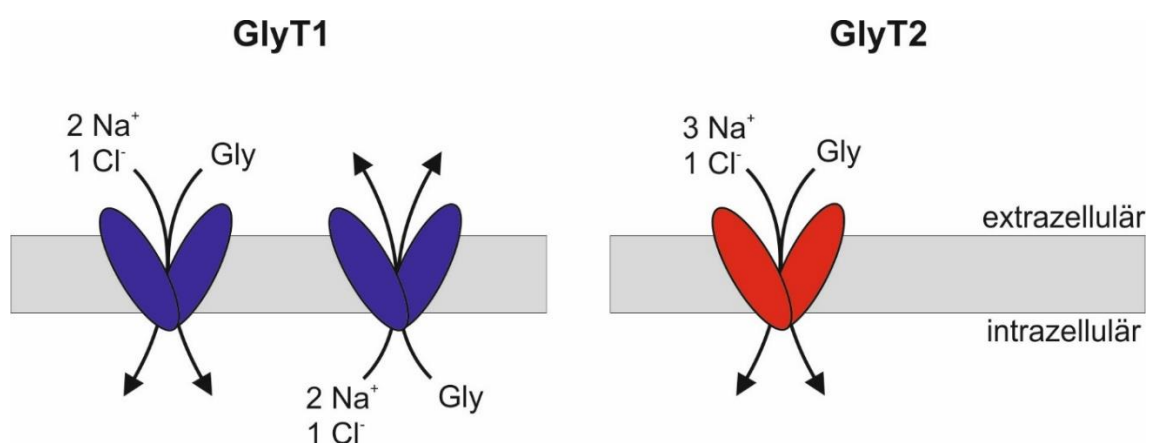


Abbildung 4 Stöchiometrie des glialen GlyT1 (links) Modus und des neuronalen GlyT2 (rechts). Links ist der reversible Reuptake Modus von GlyT1 zu sehen. Modifiziert nach Eulenburg (Eulenburg et al., 2005).

Mit Hinblick auf die Kinetik und die Stöchiometrie weisen GlyT1 und GlyT2 Unterschiede auf. Die Affinität von Glycin zu GlyT1 ist höher ($K_m = 51,15 \mu\text{M}$) als zu GlyT2 ($K_m = 1801 \mu\text{M}$) und vermutlich arbeitet GlyT1 nahezu im Gleichgewicht zwischen dem Im- und Export von Glycin in Abhängigkeit des Ionengradienten und des Membranpotentials (Eulenburg et al., 2005). Der reversible Reuptake-Modus von GlyT1 ermöglicht eine von Calcium unabhängige Ausschüttung von Glycin in den synaptischen Spalt (Eulenburg et al., 2005). Die Anzahl der Ladungen, welche GlyT1 und GlyT2 transportieren, verhält sich proportional zur Glycin-Wiederaufnahme, wobei GlyT2 die doppelte Ladungsmenge von GlyT1 aufweist (Supplisson und Roux, 2002). Abbildung 4 zeigt, dass GlyT1 für den Transport eines Glycin-Moleküls zwei Natrium-Ionen und ein Chlorid-Ion benötigt, während GlyT2 drei Natrium-Ionen und ein Chlorid-Ion benötigt (Roux und Supplisson, 2000). Daher ist die Triebkraft für den Transport in Neuronen annähernd doppelt so groß wie die in Gliazellen (Supplisson und Roux, 2002). Das extra Natrium-Ion, welches an den Transport von GlyT2 gekoppelt ist, macht diesen zu einem leistungsfähigeren Transporter als GlyT1 und kann mit höheren extrazellulären Glycinkonzentrationen als GlyT1 arbeiten (Vandenberg et al., 2014). GlyT2 kann eine intrazelluläre Glycinkonzentration von 10-20 mM einstellen, welche benötigt wird, um den Glycintransport in Vesikel durch den Transporter VIAAT zu gewährleisten (Vandenberg et al., 2014). Die Stöchiometrie des Ionenflusses, welcher an den Reuptake-Transport gekoppelt ist, bestimmt das Gleichgewicht des Glycinkonzentrationsgradienten, wohingegen die Rate, mit welcher dieses Gleichgewicht erreicht wird, von der Anzahl an Transportern und der Kinetik des Transportmechanismus bestimmt wird (Vandenberg et al., 2014). Daher senken Glycin-Reuptake-Inhibitoren, welche die Anzahl an verfügbaren GlyTs und die Ladungskapazität der GlyTs reduzieren, zwar die Rate, mit der das Glycinkonzentrationsgleichgewicht erreicht wird und haben damit Einfluss auf die Dynamik der Neurotransmission, jedoch verändern sie den finalen Glycinkonzentrationsgradienten, die verbliebene intrazelluläre Glycinkonzentration und das Laden der intrazellulären Vesikel nicht (Vandenberg et al., 2014).

Vergangene Studien an GlyT1- und GlyT2-Knockout Mäusen betonen die Kontrolle spinaler Neurone durch das glycinerge Reuptake-System. GlyT1-Knockout

Mäuse zeigen dabei einen hyperglycinergeren Phänotyp mit reduziertem Muskeltonus und Atemwegserkrankungen (Zeilhofer et al., 2018; Gomeza et al., 2003a). Neurone von GlyT1-Knockout Mäusen zeigen eine kontinuierliche Aktivierung von Glycinrezeptoren. Ursächlich hierfür ist eine erhöhte extrazelluläre Glycinkonzentration. Zudem verlängerten sich in diesen Tieren die Abklingzeiten inhibitorischer postsynaptischer Ströme von 9,3 ms auf 14,2 ms (Gomeza et al., 2003a). Anders ergeht es Mäusen, die den neuronalen Reuptake-Blocker nicht exprimieren: Die GlyT2-Knockout Mäuse zeigen einen hypoglycinergeren Zustand, welcher sich phänotypisch in neuromotorischen Beeinträchtigungen wie Starrheit, Tremor und Spastik äußert (Gomeza et al., 2003b). Diese Symptome ähneln denen der angeborenen Krankheit Hyperekplexie, auch Stiff-Baby-Syndrom genannt (Gomeza et al., 2003b). Die Amplitude von Miniatur-IPSCs (mIPSCs) verringert sich in GlyT2-Knockout Mäusen um 42% (Gomeza et al., 2003b). Zudem überleben die Mäuse beider Knockout-Formen die ersten zwei Wochen nicht (Gomeza et al., 2003a; Gomeza et al., 2003b).

1.6 Org 24598 und Org 25543 sind selektive Glycintransporter-Inhibitoren

Zur Modifizierung des Glycin-Reuptakes wurden in der vorliegenden Arbeit die hochspezifischen Glycintransporter-Hemmer Org 24598 und Org 25543 verwendet. Durch die Blockade des Glycin-Reuptakes kann Glycin nicht mehr in die Gliazelle beziehungsweise in das präsynaptische Neuron recycelt werden. Org 24598 und Org 25543 erhöhten in einer Konzentration von 10 μ M die Glycinkonzentration in akuten Gewebsschnitten des Rückenmarks, woraufhin eine Verlängerung der glycinergeren Neurotransmission folgte (Bradaia et al., 2004). Beide Glycin-Reuptake-Hemmer veränderten die Abklingzeit, die Amplitude und die Frequenz GABA-erger IPSCs nicht (Bradaia et al., 2004).

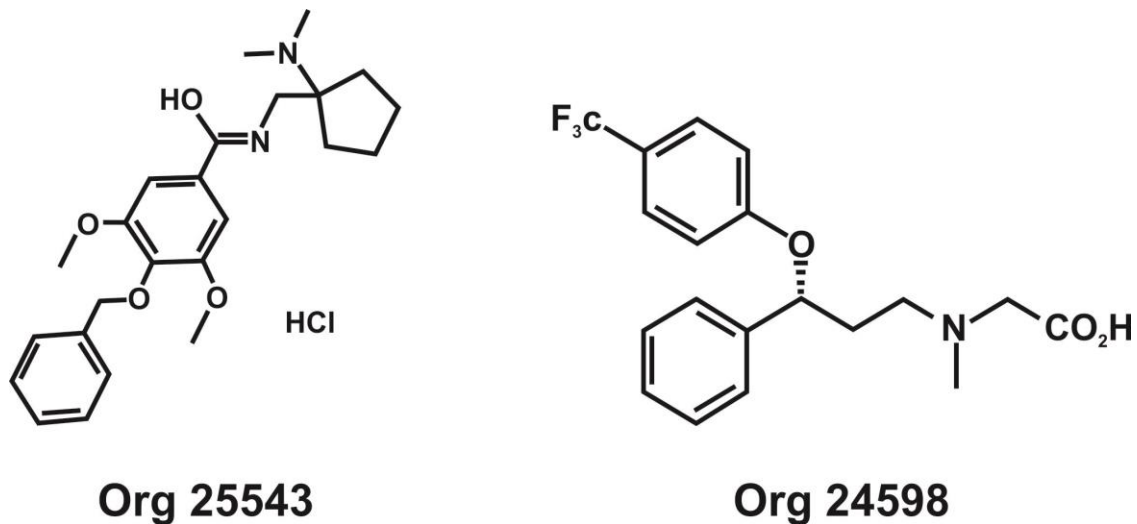


Abbildung 5 Strukturformeln des neuronalen Glycin-Reuptake-Inhibitors Org 25543 (links) und des glialen Glycin-Reuptake-Inhibitors Org 24598 (rechts)

Org 24598 ist ein selektiver Inhibitor des glialen GlyT1 mit einer Konzentration der halbmaximalen Hemmung (IC_{50}) von 6,9 nM (Williams et al., 2003). Eine geringfügige Aktivität übt Org 24598 auf den GABA-Transporter ($IC_{50} = 0,1$ mM) und den neuronalen GlyT2 ($IC_{50} = 1$ mM) aus. Org 24598 wirkt 600-fach effizienter als der GlyT1-Inhibitor Sarkosin (Williams et al., 2003). Ein weiterer Modulator des Glycin-Reuptakes stellt die Substanz Org 25543 dar. Org 25543 Hydrochlorid ist ein potenter und selektiver Inhibitor für GlyT2 mit einem IC_{50} von 16 nM. Es zeigt keine Aktivität an dem glialen GlyT1 oder 56 anderen ähnlichen biologischen Targets ($IC_{50} \geq 100$ μ M) (Caulfield et al., 2001). Zudem ist Org 25543 im Plasma von Mäusen metabolisch stabil (80% verbleiben nach 30 Minuten) (Caulfield et al., 2001).

Glycinerge Neurone sind an der Inhibition der Schmerzsignalweiterleitung beteiligt, indem sie die Erregbarkeit sensorischer Neurone im dorsalen Horn des Rückenmarks vermindern (Zeilhofer et al., 2012). Eine Dysfunktion glycinerger Neurone führt zu einer verstärkten Exzitation und Transmission neuropathischer Schmerzsignale im Hinterhorn des Rückenmarks (von Hehn et al., 2012). Dass glycinerge Neurone im dorsalen Horn des Rückenmarks eine wichtige Rolle in

Bezug auf neuropathischen Schmerz einnehmen, wiesen Imlach und Mitarbeiter nach. In ihrer Studie zeigten sie, dass der inhibitorische glycinerge Input im Hinterhorn des Rückenmarks in Nagetieren, welche unter neuropathischem Schmerz litten, reduziert war (Imlach, 2017). Durch die pharmakologische Blockade der Glycin-Reuptake-Transporter und das hierdurch bewirkte verlängerte Binden von Glycin an dem Glycinrezeptor in Schmerzfasern konnte eine Reduktion der Schmerzweiterleitung erreicht werden (Fratev et al., 2019). Sowohl GlyT1-, als auch GlyT2-Inhibitoren sind vielversprechende Kandidaten zur Linderung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen (Tanabe et al., 2008; Zeilhofer et al., 2018; Cioffi, 2018; Vandenberg et al., 2014). Der GlyT1-Inhibitor Sarkosin zum Beispiel verbesserte thermale und mechanische Hypersensibilität im Falle eines Seltzer-Modells (Initiierung von Ischiasnervschäden) und reduzierte mechanische Hypersensibilität in Mäusen, welche an Diabetes erkrankt waren (Tanabe et al., 2008). Zudem übte die Blockade des glialen Glycintransporters eine anti-nozizeptive Wirkung aus (Zeilhofer et al., 2018). In vivo-Experimente mit dem GlyT2-Inhibitor Org 25543 zeigten eine Verstärkung des Antiallodynie-Effekts nach Ischiasnervschäden in Mäusen (Morita et al., 2008). Daher erscheint der Ansatz vielversprechend, die glycinerge Neurotransmission zur Linderung von Schmerzsymptomen zu verstärken.

1.7 Fragestellung

Die Sicherstellung der Immobilität des Patienten im Rahmen chirurgischer Eingriffe ist insbesondere während der TIVA von zentraler Bedeutung. Verantwortlich für eine zentrale Muskelrelaxation sind wahrscheinlich vor allem jene spinalen Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks, welche Glycinrezeptoren exprimieren (Eckle et al., 2013). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit durch die selektive Hemmung der Glycin-Wiederaufnahme eine Aktivierung der Glycinrezeptoren hervorgerufen, um zu untersuchen, ob Glycinrezeptoren als pharmakologische Targets in der Anästhesie infrage kommen, über die eine weitreichende Muskelrelaxierung bewirkt werden kann. Es wurden auf die Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598, welche den neuronalen beziehungsweise den

glialen Glycintransporter inhibieren, zurückgegriffen. Potenziell könnten beide dieser Reuptake-Blocker sowohl muskelrelaxierend, wie auch analgetisch wirken (Dohi et al., 2009; Morita et al., 2008; Zeilhofer et al., 2018). Es wurde bereits nachgewiesen, dass beide Org-Komponenten die Glycinkonzentration im synaptischen Spalt erhöhen, beide Reuptake-Blocker in einer Konzentration von 10 μM die Kinetik glycinerner inhibitorischer Ströme verändern und der neuronale Reuptake-Blocker Org 25543 zusätzlich die Frequenz glycinerner inhibitorischer Ströme beeinflusst (Bradaia et al., 2004). Der Einfluss von Org 25543 und Org 24598 auf den motorischen Output und die Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks jedoch war zu Beginn dieser Arbeit noch völlig unerforscht. Daher ergaben sich folgende Fragen:

1. In welchem Umfang kann eine Hemmung des Glycin-Reuptakes die motoneuronale Aktivität reduzieren?
2. Inwiefern beeinflusst die Blockade des neuronalen und glialen Glycin-Reuptake-Transporters die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone im ventralen Horn des Rückenmarks?
3. Wie verändern Org 25543 und Org 24598 die Kinetik und Frequenz glycinerner IPSCs, wenn sie in einer Konzentration von weniger als 10 μM verabreicht werden?
4. Gibt es qualitative Unterschiede in den Wirkungen von neuronalem und glialem Glycin-Reuptake-Blocker, die sich auf der zellulären Ebene und Netzwerkebene manifestieren?

1.8 Wahl des Testsystems organotypischer Zellkulturen

Um diese Fragen zu untersuchen, wurden in vitro-Experimente an kokultivierten Gewebsschnitten aus Rückenmark- und Muskelgewebe durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Modell, welches Eckle und Mitarbeiter beispielsweise bereits dazu nutzten, die Effekte des Neurotoxins Botulinumtoxin A auf die spontane Muskelaktivität zu quantifizieren (Eckle et al., 2014). Die Methode basiert auf dem 1981 durch Gähwiler entwickelten Ansatz der organotypischen Zellkulturen (Gähwiler, 1981) und wurde durch Braschler dahingehend erweitert, dass Muskelgewebe mit dem Rückenmarksgewebe kokultiviert wurde (Braschler et al., 1989). Der Begriff „organotypisch“ verweist auf die Ähnlichkeit der kultivierten Strukturen mit ihren Gegenstücken in vivo (Drexler et al., 2010). Typischerweise wird hierbei Gewebe in einem noch unreifen Zustand einem Spendertier entnommen. Der große Vorteil organotypischer Zellkulturen ist, dass Reifungs- und Wachstumsprozesse ähnlich wie in vivo ablaufen (Braschler et al., 1989) und sich dadurch die Architektur anatomischer Strukturen äquivalent zum in vivo Gewebe entwickelt. Ein weiterer Aspekt ist, dass aufgrund der Regeneration und Entwicklung der synaptischen Verbindungen in vitro Neurone stärker in dem kultivierten Gewebe vernetzt sind als in akuten Schnitten (Debanne et al., 1995), weshalb die kultivierten neuronalen Netzwerke spontan aktiv sind. Die geringe Dicke des kultivierten Gewebes gewährleistet zudem eine schnelle Diffusion pharmakologischer Substanzen (Drexler et al., 2010). Während der Inkubation der Gewebsschnitte bilden sich intakte Synapsen zwischen und innerhalb des Rückenmark- und Muskelgewebes aus. Je größer die Anzahl dieser Synapsen ist, desto häufiger generieren Neurone Aktionspotentiale. Von zentraler Bedeutung bei der Durchführung der vorliegenden Studie ist die Tatsache, dass sich die Aktionspotentialaktivität der Motoneurone direkt in einer Kontraktion der postsynaptischen Muskelfasern niederschlägt (Braschler et al., 1989). Somit ist das Testsystem der organotypischen Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe geeignet, um die Beeinflussung der inter- und motoneuronalen Aktivität durch Blocker der Glycin-Wiederaufnahme zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Um die muskelrelaxierende Wirkung der Glycin-Reuptake-Blocker zu untersuchen, wurden zum einen videomikroskopische Aufzeichnungen der muskulären Aktivität, des Weiteren extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen und zusätzlich intrazelluläre elektrophysiologische Messungen mittels Patch-Clamp-Methode an Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe durchgeführt.

2.1 Präparation und Kulturpflege von Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe

Die Gewinnung der Gewebsschnitte basierte auf Braschlers und Gähwilers Methode der organotypischen Zellkulturen (Gähwiler, 1981; Braschler et al., 1989), mit deren Hilfe sich Kulturen aus Nervengewebe herstellen lassen. Die organotypischen Zellkulturen entwickeln sich während der Inkubationsphase ähnlich wie in vivo (Braschler et al., 1989), sodass Synapsen gebildet und kokultiviertes Muskelgewebe innerviert werden kann (Spenger et al., 1991b). Dabei ändert sich die Morphologie des Gewebes so, dass unter idealen Bedingungen die Dicke des Gewebes nur noch wenige Zellschichten beträgt.

Vorbereitend für die Präparation wurden sterilisierte Deckgläser (Kindler O. GmbH & Co. Mikroskopische Gläser, Freiburg, Deutschland) mit 200-300 µl Poly-D-Lysin (25 µg/ml) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland), welches die Adhäsion zwischen Gewebsstück und Glas verstärkt, beschichtet. Anschließend wurden die beschichteten Deckgläser in Petrischalen verteilt. Zudem wurde Agar mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt: Für den Einbettungsblock wurden 0,75 g des Agars (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) mit 50 ml „Geys Balanced Salt Solution“ (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) vermischt und auf einer Heizplatte (Heidolph MR 3001, Deutschland) mit lose aufliegendem Deckel zum Sterilisieren mehrfach zum Kochen gebracht. Die „Geys Balanced

Salt Solution“ bestand aus folgenden Komponenten: 0,2251 g/L CaCl_2 , 0,21 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0342 g/L MgSO_4 , 0,37 g/L KCl , 0,03 g/L KH_2PO_4 , 2,27 g/L NaHCO_3 , 7,0 g/L NaCl , 0,01196 g/L NaH_2PO_4 und 1,0 g/L D-Glucose. Danach wurde der flüssige Agar unter einer Sterilbank (BDK Luft & Reinraumtechnik GmbH, Reutlingen, Deutschland) in eine Petrischale aus Glas gegossen. Der Agarblock, der als Stütze dienen sollte, wurde mit der gleichen Methode hergestellt, jedoch mit dem Unterschied, dass 2 g Agar in 100 ml 0,9-prozentigem Natriumchlorid (Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gelöst wurde. Der Stützblock wurde in Form geschnitten und vorbereitend mit Sekundenkleber auf den Stahlblock geklebt, welcher im Laufe der Präparation in die Kammer des Vibroslicers (Campden Instruments LTD, Loughborough, England) eingehängt wurde. Die zu kultivierenden Präparate des Rückenmarks stammten von Mäuseembryonen 14 Tage nach Befruchtung von Mäusen der Linie C57 Jackson Black 6, die sich zum Zeitpunkt der Anlieferung durch die Firma Charles River (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) im Uterus der Mutter befanden. Nachdem das Muttertier mit Isofluran tief narkotisiert und mit einer Kleintierguillotine dekapitiert wurde, führte man unter Desinfektion des Bauchfells eine Sectio caesarea durch und legte die entnommenen Embryonen in eiskalte „Geys Balanced Salt Solution“. Pro Präparation lag die Anzahl der Embryonen bei vier bis acht. Unter dauerhafter Kühlung wurden die Mäuseembryonen unter einer Sterilbank sezirt, die isolierten Wirbelsäulen in den mit vier U-förmigen Vertiefungen versehenen Einbettungsblock gelegt und mit flüssigem Agar fixiert. Mit einer sterilisierten Rasierklinge (Blades, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) schnitt man den rechteckigen Einbettungsblock nun aus. Dieser wurde auf den Stahlblock direkt vor den Stützblock aus Agar geklebt und in die Kammer des Vibroslicers eingespannt. Danach wurde die Kammer mit eiskalter „Geys Balanced Salt Solution“ aufgefüllt. Der Einbettungsblock wurde nun mit Hilfe des Vibroslicers in 300 µm dicke Scheiben geschnitten. Dann wurde aus den entstandenen Agarscheiben das Rückenmark zusammen mit Muskelgewebe isoliert und mit 13 µl Plasma und 13 µl Thrombin (beides Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) auf die Deckgläser angeheftet. Anschließend wurden die Deckgläser in Kulturröhrchen

überführt und unter Zugabe von 15 µl 0,5 µg/ml-konzentrierten Nerve-Growth-Factor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 750 µl Kulturmedium in einem 36°C-warmen Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit fünfprozentiger Kohlendioxid angereicherter Atmosphäre für mindestens 90 Minuten bei kontinuierlicher Drehung (ca. 10 Umdrehungen pro Stunde) inkubiert. Das Kulturmedium bestand aus 100 ml Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 4 ml 50-prozentiger D(+)- Glucose-Lösung (Applichem GmbH), 200 ml „Basal Medium Eagle“ ohne Glutamin, 100 ml Hanks' Balanced Salt Solution“, und 2 ml 200 mM Glutamin-Lösung (Rest von Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH). Diese Methode der Inkubation wird als „Rollertube-Technik“ bezeichnet. Schematisch ist die Gewinnung der Gewebsschnitte in Abbildung 6 gezeigt. Die Deckel der Kulturröhrchen wurden für circa zwei Stunden lose verschraubt, um einen Gasaustausch im Brutschrank mit einem CO₂-Gehalt von 5% zu gewährleisten und den pH-Wert des Mediums einzustellen. Das Drehen des Rads ermöglichte den Zellen eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Das im Medium enthaltene Phenolrot gab durch seine Färbung Auskunft über das Milieu der Lösung. Drei Tage nach der Präparation erfolgte ein Medienwechsel und zusätzlich eine Behandlung mit 10 µl Zytostatika (10 µM Uridin, 10 µM Cytosin-B-D-Arabino-Furanosid und 10 µM 5-Fluoro-2-Deoxyuridin; alle von Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH), um eine Gliose zu verhindern. Je nach Art des Experiments wurden die Kokulturen ex vivo mindestens ein bis zwei Wochen inkubiert, bevor die ersten Messungen durchgeführt wurden.

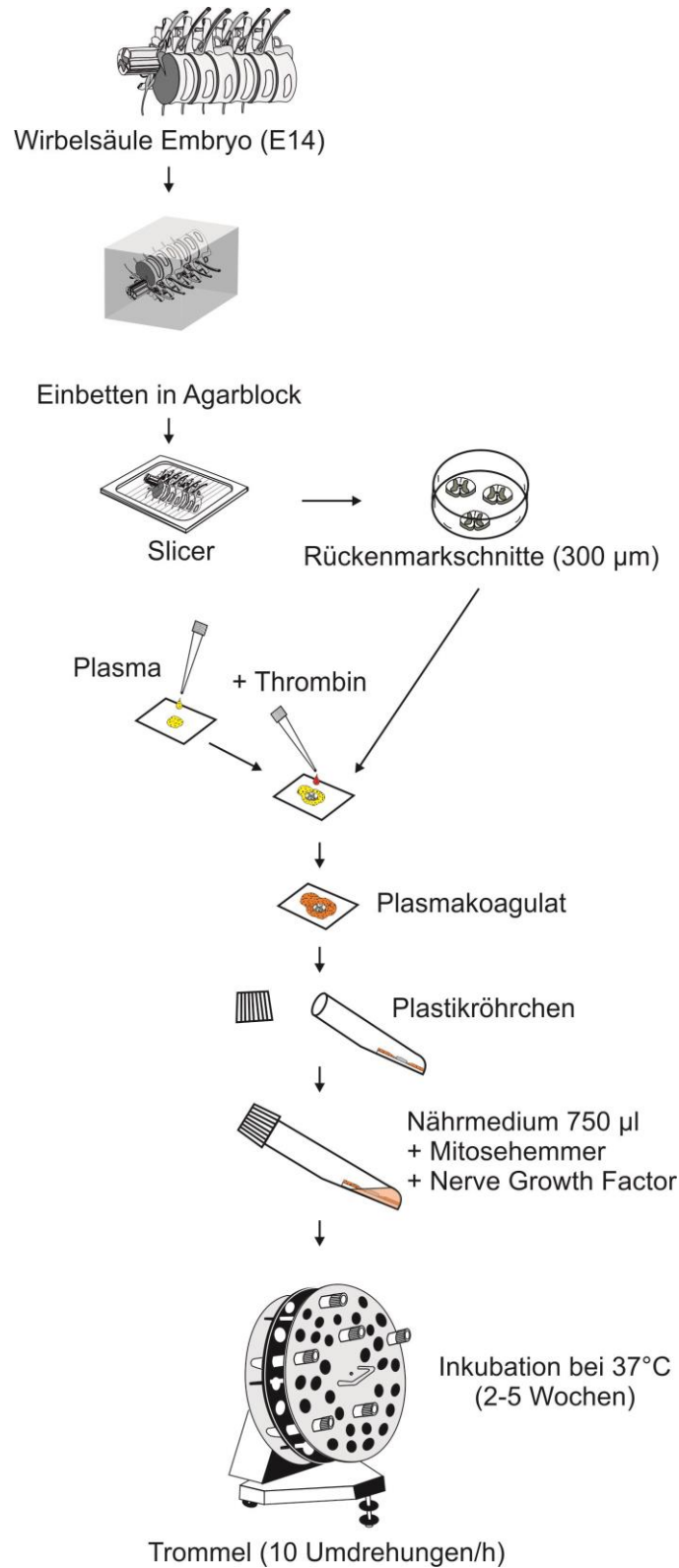


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Gewinnung von Rückenmark-Schnittkulturen (E14= Embryonalstadium beträgt 14 Tage). Umliegendes Muskelgewebe wurde zusammen mit Rückenmarksgewebe seziiert. Die Abbildung wurde von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

2.2 Videomikroskopische Aufzeichnung muskulärer Aktivität

Je größer die Aktivität der spinalen Neurone ist, desto höher ist auch die Frequenz der Kontraktionen von Muskelzellen, die durch synaptische Verknüpfungen mit spinalen Motoneuronen induziert wird. Wie diese Muskelaktivität erfasst und analysiert wurde, ist im Folgenden beschrieben.

2.2.1 Versuchsablauf videomikroskopischer Aufzeichnungen muskulärer Aktivität

Die Schnittkulturen konnten ab der zweiten Woche nach der Präparation aus dem Inkubator entnommen und in eine Badkammer gelegt werden, die vorher mit „Artificial Cerebrospinal Fluid“ (ACSF; artificial = künstlich) gefüllt worden war. Diese ACSF besteht aus in Ampuwa (Wasser für Injektionszwecke, Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) gelöstem 120 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,13 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1,2 mM CaCl₂ und 11 mM D(+)-Glucose (alle Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Die ACSF durchlief die Badkammer permanent mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min. Alle Substanzen wurden mittels zweier IPC Peristaltik-Pumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) in die Badkammer hinein und heraus gepumpt. Dabei betrug die Temperatur der Lösungen in der Badkammer ca. 34°C. Zur Erhaltung eines neutralen pH-Wertes wurde die ACSF mit Carbogen, welches sich aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid zusammensetzte, begast. Unter Beobachtung durch das Mikroskop Axioskop 2 FS plus (Zeiss, Deutschland) fokussierte man eine Videokamera (The Imaging Source DMK 21AU04.AS Schwarz/Weiß-Kamera, USB) auf einen Muskelgewebsabschnitt, welcher kontrahierende Muskelfasern aufwies.

Der Versuchsablauf begann mit dem Einwaschen der ACSF für 30 Minuten. Danach erfolgte die Kontrollmessung von sechs Minuten. Es folgte die erste Applikation der Testsubstanz über zwölf Minuten, wobei immer erst die niedrigere Konzentration der zu überprüfenden Chemikalien appliziert wurde. Während der

sechsmütigen Aufzeichnungsphase wurde die Testsubstanz kontinuierlich in die Badkammer gepumpt. Auch die zweite Substanzapplikation mit der höheren Konzentration hatte eine Einwirkzeit von zwölf Minuten sowie eine Aufzeichnungszeit von sechs Minuten. Im Falle der Scheinapplikationen wurden die Experimente nur mit ACSF unter Ausschluss der Substanz durchgeführt. Als Auswaschmedium verwendete man 1-mikromolares Pancuronium (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) (siehe Abbildung 7). Die Aufzeichnungen der Messungen erfolgten durch die Software IC Capture 2.0. Das Versuchsprotokoll a-b zeigt die verwendeten Substanzen und deren Konzentration (siehe Tabelle 4 im Kapitel „Versuchsprotokoll“).

Das am Ende der Versuche applizierte Pancuronium diente dazu sicherzustellen, dass Motoneurone ursächlich für die Muskelkontraktionen sind. Dies ist wichtig, da Muskelkontraktionen auch beispielsweise unter Hormonausschüttung stattfinden können. Pancuronium blockiert als Acetylcholin-Antagonist die neuromuskuläre Übertragung. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die zu analysierenden Muskelkontraktionen durch spontane Aktivität spinaler Motoneurone ausgelöst wurden.

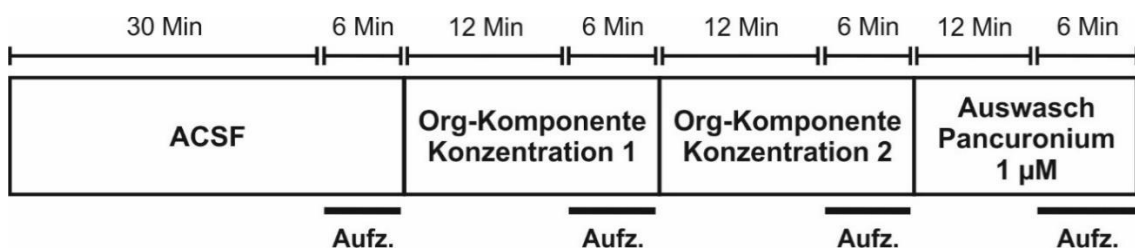


Abbildung 7 Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs videomikroskopischer Aufzeichnungen muskulärer Aktivität

2.2.2 Datenanalyse videomikroskopischer Aufzeichnungen muskulärer Aktivität

Mit Hilfe des Programms Avidemux 2.5.4. wurde der aufgenommene Videoabschnitt mit Muskelaktivität visuell überprüft. Die weitere Analyse erfolgte mit Skripten, die von Prof. Dr. Antkowiak in der Programmumgebung MATLAB R2008a (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Amerika) erstellt wurden. Es wurden sogenannte „Region Of Interest“ (ROI) manuell festgelegt. Hierbei handelte es sich um quadratische Bereiche auf den Bildern des Videoabschnitts, auf dem das kontrahierende Muskelgewebe zu sehen ist. Durch ein kontrastbasiertes Analyseverfahren wurden die Frequenzen der Muskelfaserkontraktionen berechnet.

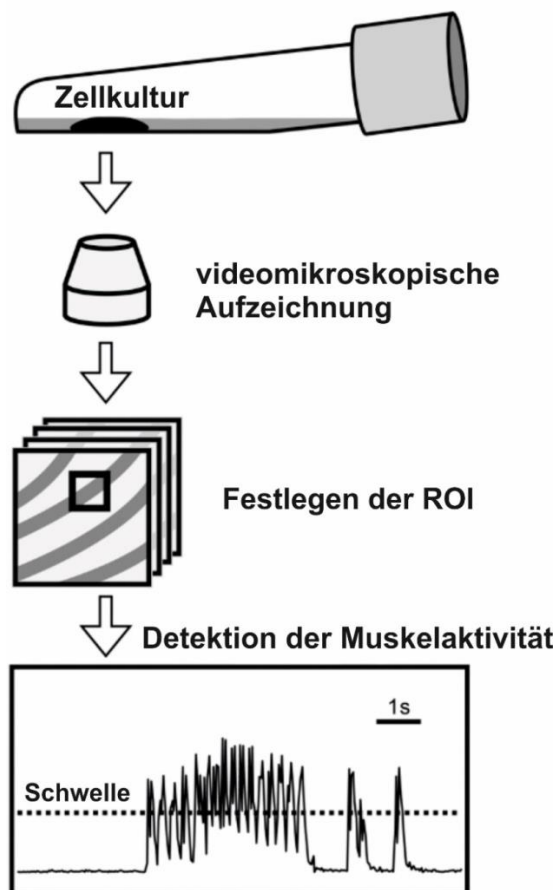


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Analyse von Messungen spontaner Muskelaktivität aus Kokulturen des Rückenmark- und Muskelgewebes. Die gestrichelte Linie zeigt die manuell festgelegte Schwelle an (Drexler et al., 2011).

Dazu wurde zuerst ein „Kontroll-Frame“ festgelegt. Hierbei handelt es sich um ein Einzelbild des Videoausschnittes, in dem keine Muskelkontraktionen erfolgten und das als Referenz für die Quantifizierung der Kontraktionen diente. Die von Bild zu Bild auftretenden Änderungen der Pixelhelligkeit wurden als Graphik repräsentiert. Anhand der Graphik wurde manuell ein Schwellenwert bestimmt (siehe Abbildung 8). Die über dem Schwellenwert liegenden Werte wurden durch die Zeit in Sekunden dividiert und somit zur Quantifizierung der Muskelkontraktion genutzt.

2.3 Extrazelluläre elektrophysiologische Messungen

Das Ziel der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen war es, Aktionspotentiale spinaler Vorderhornneurone zu erfassen, um auf die neuronale Gesamtaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks schließen zu können.

Histologische Anfärbungen kokultivierter Gewebsschnitte haben Aufschluss über die Morphologie und die Position der Motoneurone in dieser Präparation geben. So wurden Motoneurone durch Anfärbung der Acetylcholintransferase, Acetylcholinesterase oder durch Biocytin markiert (Delfs J., 1989; Spenger et al., 1991a; Larkum et al., 1998). Die Motoneurone sind in zwei Gruppen ventrolateral und ventromedial am ventralen Rand des Vorderhorns (Rexed laminae IX) und an beiden Seiten der Fissura mediana anterior medullae spinalis (Delfs, 1989; Spenger, 1991, Avossa, 2003) lokalisiert (siehe Abbildung 9). Ein Teil der Motoneurone migriert in einen Bereich ventral zum Vorderhorn außerhalb des Rückenmarks (Streit et al., 1991). In den Gewebsschnitten, in denen Motoneurone zu sehen waren – dies war bei ungefähr der Hälfte der Schnitte der Fall –, wurde lediglich eine geringe Anzahl von bis zu circa 6 Motoneuronen gesichtet (Spenger, 1991). Die Position GABAerger Interneurone konnte mithilfe der Anfärbung des Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD67) erfolgen (Avossa et al., 2003). Nach einer Woche *in vitro* befanden sich GABAerge Interneurone gleichmäßig verteilt im dorsalen wie auch ventralen Horn des Rückenmarks (Avossa et al. 2003). Nach zwei Wochen *in vitro* wurde eine Änderung dieser Position

beobachtet: GAD67- positive Interneurone waren nun vermehrt im Hinterhorn und in verminderter Anzahl im Vorderhorn zu finden (Avossa et al. 2003). Dies ist vereinbar mit dem entwicklungsbedingten Wechsel von GABA-erger zu glycinerger Neurotransmission im Vorderhorn des Rückenmarks (Gao et al., 2001).

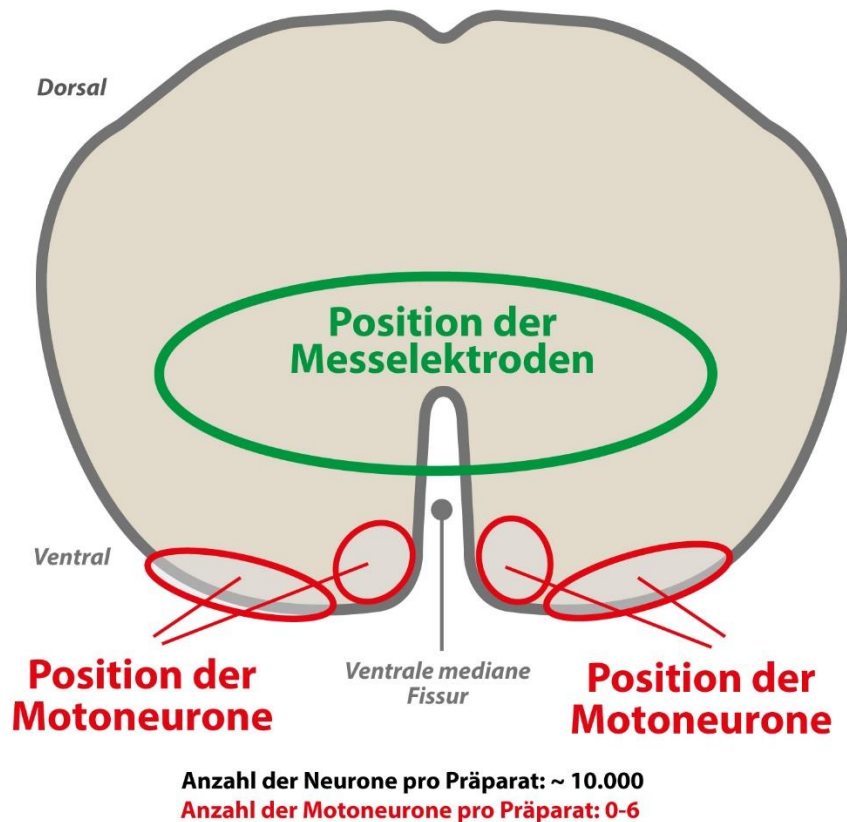


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Positionen von Motoneuronen (rot gekennzeichnet) in Gewebsschnitten kokultivierter Rückenmarksschnitte. Der Bereich in dem die Messelektroden positioniert wurden ist grün gekennzeichnet. Die Anzahl der Motoneurone wird in der Literatur mit lediglich 0-6 pro Gewebeschnitt angegeben. Ihre räumliche Position ist rot markiert.

Abbildung 10 zeigt eine exemplarische mikroskopische Aufnahme einer Kokultur aus Rückenmark- und Muskelgewebe. Die Elektroden wurden auf beiden Seiten des Vorderhorns jeweils lateral der Fissura mediana anterior medullae spinalis platziert (siehe Abbildung 9, 10). In diesem Areal des Gewebeschnittes wurden Motoneurone noch nie beschrieben (Streit et al., 1991). Daher wird in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass sowohl mit den extra- wie auch

intrazellulären Messungen ausschließlich die Aktivität spinaler Interneurone erfasst wurde. Es war jedoch nicht möglich, die in mit diesen Messungen erfassten Aktivitätsmuster bestimmten Typen spinaler Interneurone eindeutig zuzuordnen, denn ihre Identifizierung ist bis heute nicht abgeschlossen. Ebenso werden mögliche Klassifizierungskriterien derzeit noch kontrovers diskutiert (Sengupta und Bagnall, 2023; Russ et al., 2021).

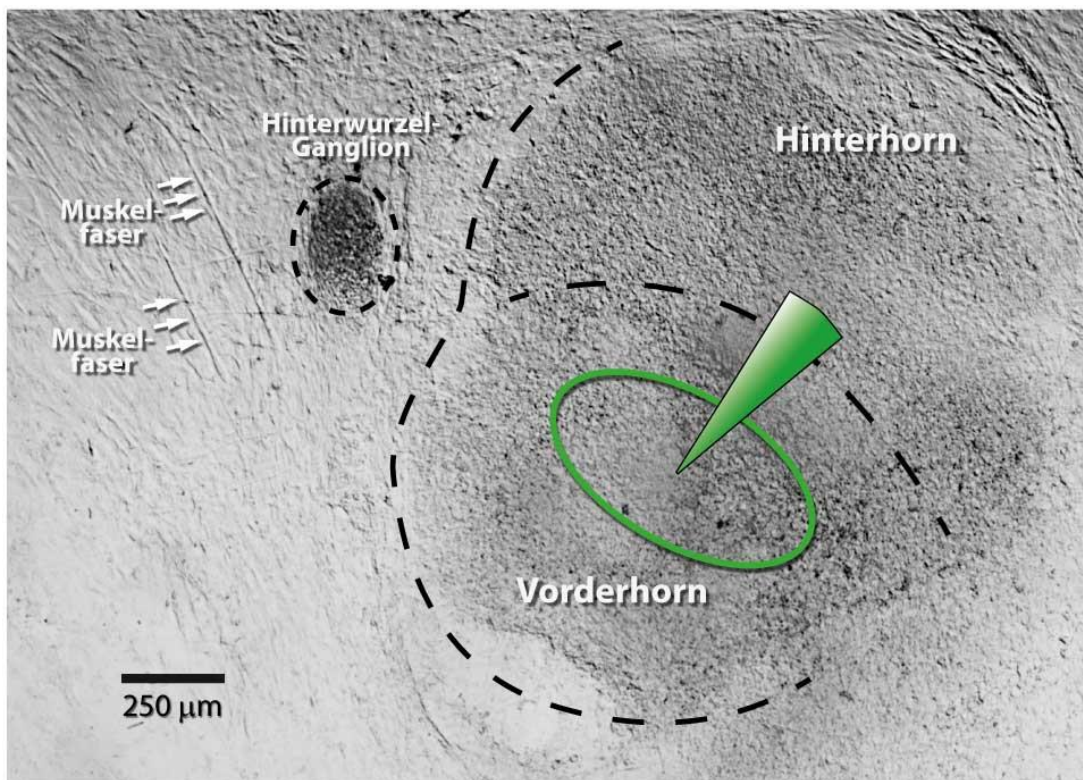


Abbildung 10 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Kokultur aus Rückenmark- und Muskelgewebe nach 21 ex vivo. Die gestrichelten schwarzen Linien zeigen die Bereiche des Hinterhorns, des Vorderhorns und eines Hinterwurzel-Ganglions. Die weißen Pfeile zeigen Muskelfasern. Der Bereich der Gewebekultur in dem die Messelektroden positioniert wurden ist wie in Abbildung 9 grün eingezeichnet. Zur Verfügung gestellt von Prof. Antkowiak.

2.3.1 Versuchsaufbau extrazellulärer elektrophysiologischer Messungen

Die Schnittkulturen wurden ab der zweiten Woche nach der Präparation aus dem Inkubator entnommen und in eine Badkammer gelegt, die vorher mit Artificial

Cerebrospinal Fluid (ACSF) gefüllt wurde. Die ACSF durchlief die Badkammer permanent mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min. Dabei betrug die Temperatur in der Badkammer ca. 34°C. Zur Erhaltung eines neutralen pH-Wertes wurde die ACSF mit Carbogen begast. In der Badkammer befand sich zudem eine Referenzelektrode Ag/AgCl 2 mm* 4 mm (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland), die so platziert war, dass ihre gesamte Oberfläche in stetigem Kontakt mit der ACSF war. Die Messungen erfolgten durch zwei Glaselektroden, welche aus Borosilikatglaskapillaren mit einem Durchmesser von 1 mm (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) mithilfe eines Elektrodenpullers Modell DMZ-Universal-Puller (Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland) gezogen worden waren. Die Glaselektroden hatten einen Spitzendurchmesser von ca. 1-2 µm und wurden mit einer auf eine 1 ml-Einmalspritze (ASKI, Dänemark) gesteckten Micro-Fil-Kanüle (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit ACSF befüllt und in einem Elektrodenhalter (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, USA) platziert. Unter Beobachtung durch das Mikroskop Axioskop 2 FS plus (Zeiss, Deutschland) wurden die Elektroden so in dem ventralen Horn der Substantia grisea des Rückenmarkgewebes positioniert, dass man sowohl visuell als auch akustisch Aktionspotentiale, welche eine Amplitude von mindestens 0,1 mV jenseits des Grundrauschens aufwiesen, registrieren konnte. Alle Substanzen wurden mittels zweier IPC Peristaltik-Pumpen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) in die Badkammer hinein und heraus gepumpt.

Das Rückenmarkgewebe lag für 30 Minuten in der mit ACSF durchfluteten Badkammer. Die Messungen erfolgten mit denselben zeitlichen Abständen wie die der videomikroskopischen Aufzeichnungen muskulärer Aktivität. Um beobachten zu können, ob das Rückenmarkgewebe in der Lage ist, sich von der Substanzapplikation zu regenerieren, führte man eine sechsminütige Auswaschmessung durch, nachdem man die Badkammer für 12 Minuten mit ACSF durchspült hatte (siehe Abbildung 11). Im Falle der Scheinapplikationen wurden die Experimente nur mit ACSF unter Ausschluss der Substanz durchgeführt. Das Versuchsprotokoll c-f zeigt die verwendeten Substanzen und deren Konzentration (siehe Tabelle 4 im Kapitel „Versuchsprotokoll“).

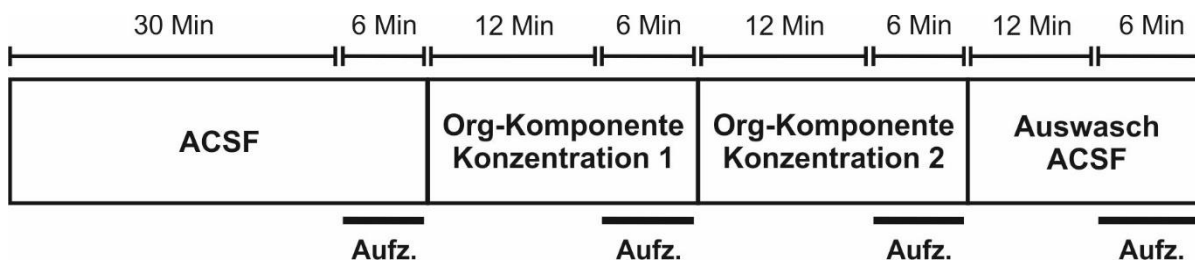


Abbildung 11 Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs extrazellulärer elektrophysiologischer Aufzeichnungen

2.3.2 Datenanalyse extrazellulärer elektrophysiologischer Messungen

Um die Aktionspotentiale aufzunehmen, wurde das Messsignal um den Faktor 5000 amplifiziert (Multi Clamp 700A, Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, USA), Bandpass-gefiltert und über die Digitalisierungskarte Digidata 1200 (Axon Instruments) aufgezeichnet.

Um die neuronale Aktivität des Rückenmarkgewebes beurteilen zu können, wurde als zentraler Parameter die „Feuerrate“ herangezogen, die als Anzahl von Aktionspotentialen pro Sekunde definiert ist. Je nach Versuchsausrüstung wurden die Aktionspotentiale mittels der Software Axoscope 10.4 bzw. Axoscope 10.7 (Axon Instruments, Union City, Kalifornien, USA) oder Clampex 10.4 aufgezeichnet und gespeichert. Um die Aktionspotentiale ermitteln zu können, wurden die Rohsignale nach der Messung offline durch einen Hochpassfilter von 300 Hz gefiltert. Über die gefilterten Rohsignale wurde nun manuell eine Schwelle gesetzt, um so die neuronale Netzwerkaktivität mittels der Anzahl von Schwellenüberschritten quantifizieren zu können (siehe Abbildung 12). Für das Filtern und das manuelle Ziehen des Schwellenwertes wurden Skripte verwendet, die in der Programmumgebung MATLAB R2018b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Amerika) programmiert wurden.

Ausgewertet wurden die Daten nur, wenn das Gleichbleiben des Grundrauschens gewährleistet war und die Aktivitätsmuster während den einzelnen Messungen konstant waren.

Sämtliche weitere Auswertungen erfolgten durch Skripte, welche von Prof. Dr. Antkowiak zur Verfügung gestellt wurden.

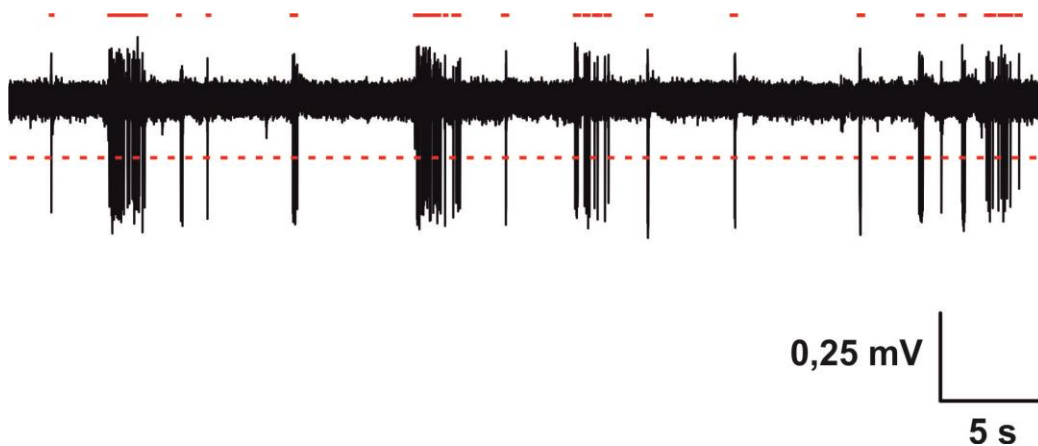


Abbildung 12 Detektion von Aktionspotentialen. Die rote gestrichelte Linie stellt die manuell gesetzte Schwelle dar. Die oberen roten Striche markieren die detektierten Aktionspotentialen.

2.4 Whole Cell-Patch-Clamp-Methode

Mithilfe der Patch-Clamp-Technik ist es möglich, inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) an der Postsynapse eines spinalen Interneurons zu messen. IPSCs spiegeln den Verlauf des Bindens und der Dissoziation des Neurotransmitters an beziehungsweise von dem Rezeptor wider. In dieser Studie wurden durch glycinerge Transmission ausgelöste IPSCs, sogenannte glycinerge IPSCs, registriert und analysiert.

2.4.1 Versuchsablauf der Whole Cell-Patch-Clamp-Methode

Das Deckglas mitsamt Gewebsschnitt wurde mit Silikon (Silikonpaste Karosilone, Baysilon mittelviskos, Bayer) in der mit ACSF gefüllten Badkammer fixiert. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vorbereitend wurden vier Spritzen (Hamilton Company, Nevada, USA) in die Apparatur eingespannt. Dabei war eine Spritze mit ACSF, die zweite mit in ACSF gelöstem Bicucullin und der jeweiligen Testsubstanz, die dritte mit in ACSF gelöstem Strychnin und die vierte mit AP5 und CNQX (beides Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) gefüllt. Folglich befanden sich folgende Substanzen in der Badkammer: 25µM AP5, 10µM CNQX, 100µM Bicucullin, ACSF, eine Org-Komponente (320nM Org 25543, 5µM Org 25543 oder 5µM Org 24598) und 1µM Strychnin (siehe Abbildung 13). Alle Lösungen wurden vorher mit Carbogen begast. Die Scheinapplikationen erfolgten unter Ausschluss der Testsubstanz.

Substanz	Funktion
Cs (Caesium)	Kaliumkanal-Blocker
AP5	NMDA-Rezeptor-Antagonist
CNQX (Cyanquixalin)	AMPA-Rezeptor-Antagonist
Bicucullin	GABA _A -Rezeptor-Antagonist

Tabelle 2: Bei der Patch-Clamp-Methode verwendete Substanzen zur pharmakologischen Isolation glycinerg IPSCs und deren Funktion

Eine Glaselektrode mit einem Widerstand von zwei bis fünf Megaohm wurde aus Borosilikatglaskapillaren mit einem Durchmesser von 1,5 mm mithilfe eines Laserpullers hergestellt. Gefüllt wurde diese Elektrode mit einem Medium bestehend aus folgenden Komponenten: CsCl 121 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, ATP 4 mM und CsOH 24 mM. Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 7,2 eingestellt. Die gefüllte Elektrode wurde in einen Elektrodenhalter eingespannt und mit einem Überdruck von circa 0,3 - 0,5 mmHg an der Zelloberfläche eines spinalen Neurons positioniert. Bevor die Zelle geöffnet wurde, ließ man in

ACSF gelöstes Bicucullin in einer Konzentration von 100 μM mittels einer IPC Peristaltik-Pumpe in die Badkammer pumpen, um GABAerge Ströme zu eliminieren. Befand sich die Glaselektrode nah genug an der Zelloberfläche, applizierte man einen Unterdruck von ca. -0,5 mmHg, bis die Zelle mit einem sogenannten „Gigaseal“ an der Elektrodenspitze versiegelt war. Dabei wurde die Membran unterhalb der Zellöffnung destruiert und die Detektion von IPSCs konnte erfolgen. Nun gab man in die Badkammer die Substanzen AP5 und CNQX hinzu, um exzitatorische Ströme an der Synapse zu blockieren. Nach der Einwirkzeit dieser beiden Substanzen von sechs Minuten erfolgten pro Experiment zwei dreiminütige Kontrollmessungen und drei dreiminütige Testsubstanzmessungen, wobei jeweils in der Regel die letzte Messung für die Analyse herangezogen wurde. Zuletzt wurden zwei dreiminütige Strychninmessungen aufgenommen, wobei die erste der beiden Messungen ausgewertet wurde. Alle Messungen verliefen zeitlich ununterbrochen hintereinander (siehe Abbildung 13). Zur pharmakologischen Isolation glycinерger IPSCs erfolgten die Messungen unter kontinuierlicher Zugabe von AP5, CNQX und Bicucullin. Das Membranpotential des Neurons, von dem die IPSCs aufgezeichnet wurden, wurde auf -70 mV geklemmt, wodurch das Auftreten von Aktionspotentialen verhindert wurde. Am Ende jedes Experiments wurde die Badkammer für mindestens 15 Minuten mit ACSF durchspült. Das Versuchsprotokoll h-k zeigt die bei der Patch-Clamp-Methode verwendeten Substanzen und deren Konzentration (siehe Tabelle 4 im Kapitel „Versuchsprotokoll“).

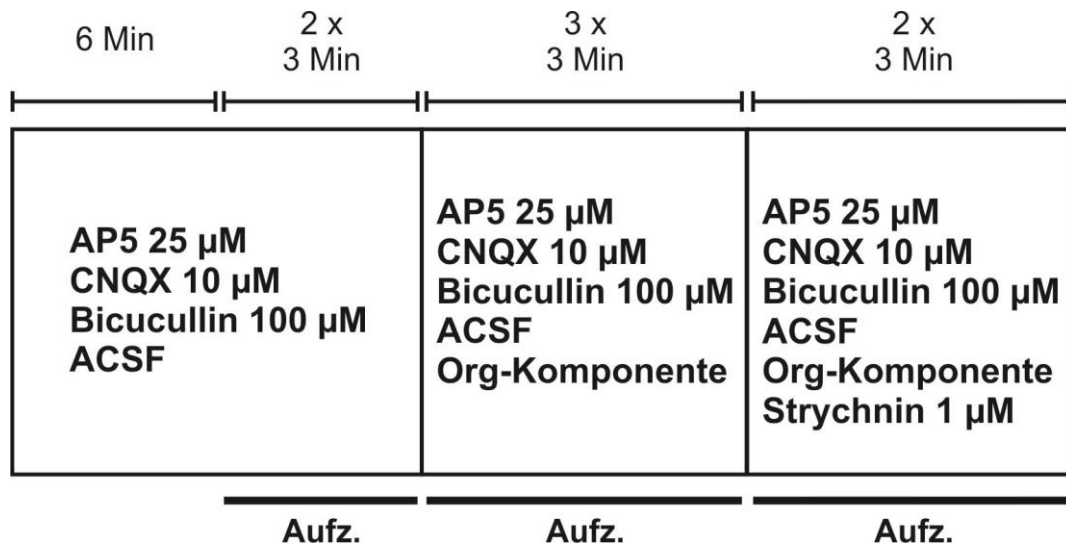


Abbildung 13 Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs intrazellulärer Ableitungen

2.4.2 Datenanalyse der Patch-Clamp-Methode

Die Aufnahme der IPSCs erfolgte mithilfe der Programme Multi Clamp 700B und Clampex 10.7 (Axon Instruments). Das Signal wurde mithilfe des Programms MultiClamp 700B um 5V/nA verstärkt, um 2,0 kHz tiefpassgefiltert und über die Digitalisierungskarte Digidata 1440A (Axon Instruments) und pCLAMP 10 Software (Molecular Devices, Foster City, CA) digitalisiert. Für die weitere Analyse wurde von Prof. Dr. Antkowiak und Dr. Hentschke entworfene Software für das Programm MATLAB R2018b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Amerika) verwendet. Die spontanen IPSCs wurden durch das manuelle Festlegen einer Schwelle (siehe Abbildung 14) detektiert.

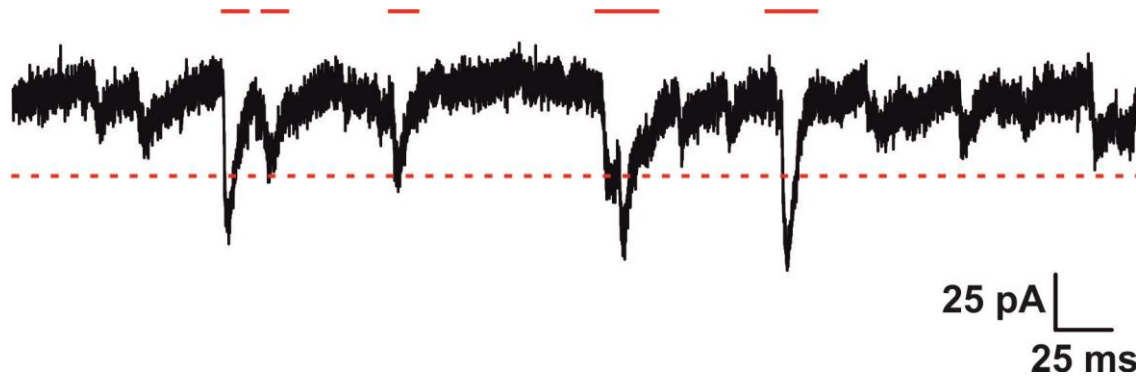


Abbildung 14 Detektion von IPSCs. Die rote, gestrichelte Linie stellt die manuell gesetzte Schwelle dar. Die Striche über den IPSCs bedeuten die Detektion eines Signals.

Die Qualität der IPSCs wurde durch visuelle Inspektion beurteilt. Weiterhin erfolgte die Berechnung der Abklingzeit, der Amplitude und der Frequenz der IPSCs (Zur Bedeutung dieser Parameter siehe Tabelle 3). Die Abklingzeit war mehrphasig und wurde mithilfe folgender biexponentialer Funktion gefittet:

$$y = A1 \left(e^{-\frac{t}{\tau1}} \right) + A2 \left(e^{-\frac{t}{\tau2}} \right), \text{ wobei}$$

A=Amplitude in pA,

t= Zeit,

τ = Zeitkonstante in ms

Die Funktion zur Gewichtung der Zeitkonstante lautete:

$$\tau_{\text{gewichtet}} = \frac{A1}{A1+A2} * \tau1 + \frac{A2}{A1+A2} * \tau2, \text{ wobei}$$

A = Amplitude in pA

τ = Zeitkonstante in ms

$\tau_{\text{gewichtet}}$ = gewichtete Zeitkonstante des Abklingens

Parameter	Einheit	Bedeutung
Abklingzeit	ms	Zeit, in der Glycinrezeptoren inaktivieren
Amplitude	pA	Maximale Aktivierung von Rezeptoren während der synaptischen Übertragung
Frequenz	Hz	Häufigkeit des Auftretens synaptischer Ereignisse

Tabelle 3: Die zur IPSC Auswertung verwendeten Parameter, ihre Einheit und ihre Bedeutung

2.5 Statistische Auswertung

Mit Ausnahme der Daten, die sich auf die tonischen Ströme beziehen, wurden alle Daten, welche aus Messungen mit der jeweiligen Org-Komponente hervorgingen, auf die Kontrollbedingung normalisiert. Zur statistischen Auswertung dieser normalisierten Daten wurde zunächst der Lilliefors-Test durchgeführt, um zwischen normal- und nicht normalverteilten Daten zu unterscheiden. Um auf einen statistisch signifikanten Effekt schließen zu können, wurde im Falle einer Normalverteilung der normalisierten Daten (Lilliefors-Test $p \geq 0,05$) der einseitige t-Test verwendet. Bei nicht normalverteilten Daten griff man auf den nichtparametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test (bei verbundenen Stichproben) und Wilcoxon-Man-Whitney Test (bei unverbundenen Stichproben) zurück. Es wurde mit folgenden Signifikanzniveaus gearbeitet:

$p \leq 0,05$: signifikant

$p \leq 0,01$: sehr signifikant

$p \leq 0,001$: höchst signifikant.

Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler und nicht normalverteilte Daten als Median (KI = unteres 95%- Konfidenzintervall; oberes 95%- Konfidenzintervall) angegeben.

Ebenfalls wurde mit normalverteilten Daten eine Varianzanalyse (ANOVA) durch das Programm IBM SPSS Statistics 29 durchgeführt. Dabei wurde für Experimente, bei denen Scheinapplikationsmessungen stattfanden, eine Mixed ANOVA gewählt, während für Messungen ohne Scheinapplikationsmessung eine einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung gewählt wurde. Für die Auswertung des tonischen Stromes wurde eine Einfaktorielle ANOVA durchgeführt.

2.6 Herstellung der Testsubstanzen

Die zu testende Substanz Org 25543 Hydrochlorid (Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich) wurde mithilfe von Ampuwa (Wasser für Injektionszwecke, Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) zu einer 10-millimolaren Stammlösung angesetzt, die man zu den gewünschten Konzentrationen (160 nM, 320 nM, 5 μ M, 10 μ M) verdünnte. Die zweite zu testende Substanz Org 24598 (Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich) setzte man mit Ampuwa (Wasser für Injektionszwecke, Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) zu einer 1-millimolaren Stammlösung an und verdünnte diese zu den ausgewählten Konzentrationen (70 nM, 140 nM, 5 μ M, 10 μ M). Die Konzentration von 10 μ M diente zur Replikation der Ergebnisse bereits erfolgter Studien anderer Autoren (Bradaia et al., 2004; Beato, 2008). Die nanomolaren Konzentrationen orientierten sich an den IC_{50} -Werten der Substanzen.

2.7 Versuchsprotokoll

Proto- koll	Art des Versuchs	1. Substanz-ap- plikation	2. Substanz- applikation	Auswasch- medium
a	Videomikroskopische Aufzeichnung muskulä- rer Aktivität	Org 25543 160 nM	Org 25543 320 nM	Pancu-ro- nium 1 μ M
b	Videomikroskopische Aufzeichnung muskulä- rer Aktivität	Org 24598 70 nM	Org 24598 140 nM	Pancu-ro- nium 1 μ M
c	Extrazelluläre Ableitung	Org 25543 5 μ M	Org 25543 10 μ M	ACSF
d	Extrazelluläre Ableitung	Org 24598 5 μ M	Org 24598 10 μ M	ACSF
e	Extrazelluläre Ableitung	Org 25543 160 nM	Org 25543 320 nM	ACSF
f	Extrazelluläre Ableitung	Org 24598 70 nM	Org 24598 140 nM	ACSF
g	Extrazelluläre Ableitung	Schein-applika- tion ACSF	Schein-applika- tion ACSF	ACSF
h	Intrazelluläre Ableitung	Bicucullin 100 μ M, AP5 25 μ M, CNQX 10 μ M, Org 25543 5 μ M	-	Strychnin 1 μ M, Bicucul- lin 100 μ M, AP5 25 μ M, CNQX 10 μ M
i	Intrazelluläre Ableitung	Bicucullin 100 μ M, AP5 25 μ M, CNQX 10 μ M , Org 25543 320 nM	-	Strychnin 1 μ M, Bicucul- lin 100 μ M, AP5 25 μ M, CNQX 10 μ M

j	Intrazelluläre Ableitung	Bicucullin 100µM, AP5 25µM, CNQX 10µM, Org 24598 5 µM	-	Strychnin 1 µM, Bicucul- lin 100µM, AP5 25µM, CNQX 10µM
k	Intrazelluläre Ableitung	Scheinapplikation ACSF, Bicucullin 100µM, AP5 25µM, CNQX 10µM	-	Strychnin 1 µM, Bicucul- lin 100µM, AP5 25µM, CNQX 10µM

Tabelle 4 Versuchsprotokoll aller durchgeführten Experimente

3 Ergebnisse

Die zentrale Zielsetzung dieser Dissertation war die Beantwortung der Frage, ob eine signifikante Muskelrelaxierung durch eine Hemmung der Glycin-Wiederaufnahme im Vorderhorn des Rückenmarks induziert wird. Hierzu wurden die Wirkungen der Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598 auf Ebene

- 1) der Muskelkontraktionsaktivität des kokultivierten Muskelgewebes,
- 2) der spontanen Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone im Vorderhorn und
- 3) der glycinergen spontanen IPSCs

ermittelt. Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Experimente sind im Folgenden beschrieben. Gewebskulturen, die für Versuchsreihen verwendet wurden, welche miteinander verglichen wurden, stammten aus derselben Präparation. Die Analyse von Datensätzen mit dem neuronalen und glialen Reuptake-Blocker erfolgte analog. Insgesamt wurden mit allen Konzentrationen 72 Messungen zur Aufzeichnung der muskulären Aktivität, 455 extrazelluläre elektrophysiologische Messungen und 40 intrazelluläre elektrophysiologische Messungen, von denen 15 der letzteren für die Analyse tonischer glycinergen Ströme verwendet wurden, durchgeführt.

3.1 Einfluss des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 auf die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes

Um die Effekte der Reuptake-Blocker auf die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes abzuschätzen, wurde die Frequenz der Muskelfaserkontraktionen gemessen. Mit dem zum Ende jeden Experimentes applizierten Pancuronium wurde überprüft, ob es sich bei den untersuchten Muskelfasern um nicht-spontanaktive Zellen handelte, deren Kontraktionen durch die Impulse von Motoneuronen ausgelöst wurden. Es wurden insgesamt 23 Kokulturen von

Rückenmark- und Muskelgewebe fünf verschiedener Präparationen mit 160 nM und 320 nM des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 getestet und analysiert. Dabei erfolgte die Zugabe der höheren Wirkstoffkonzentration nach der Applikation der niedrigeren Konzentration. Somit handelt es sich bei den Messungen der beiden Konzentrationen um zwei verbundene Stichproben.

Die unter Drogenbedingungen gemessenen Daten wurden auf die Kontrollmessung normalisiert, welche vor der Drogenapplikation unter ACSF-Bedingungen stattfand. Die normal verteilten Daten wurden dem t-Test unterzogen und sind in Abbildung 15 dargestellt. Auf der Y-Achse sieht man die auf die Kontrollbedingung normalisierte Muskelaktivität. Ein Y-Wert von beispielsweise 0,4 bedeutet eine Reduzierung der Muskelaktivitätsfrequenz um 60%. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Nach der Applikation von 160 nM Org 25543 verringerte sich die Muskelaktivität um 24% ($0,76 \pm 0,08$; t-Test, $p < 0,001$). Aus der Erhöhung dieser Konzentration auf 320 nM resultierte eine Hemmung der Muskelaktivität um 33% ($0,67 \pm 0,08$; t-Test, $p < 0,001$).¹

Nimmt man mit den nicht-normalisierten Rohdaten (Tabelle 5) eine Einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung vor, so ergibt sich für die Änderung der Muskelaktivität mit 160nM Org 25543 einen statistisch nicht signifikanten Effekt ($p=0,062$). In der Konzentration von 320nM des neuronalen Reuptake-Blocker Org 25543 hingegen zeigt sich eine statistische Signifikanz ($p=0,012$) bei der Reduktion der Muskelaktivität. Die Ergebnisse der ANOVA sind in Tabelle 10 (Anhang) dargestellt.

¹ Daten werden in Artikel „Muscle relaxation in spinal cord – skeletal muscle cocultures caused by blocking GABA and glycine transporters and muscarinic receptors“ veröffentlicht (in Vorbereitung)

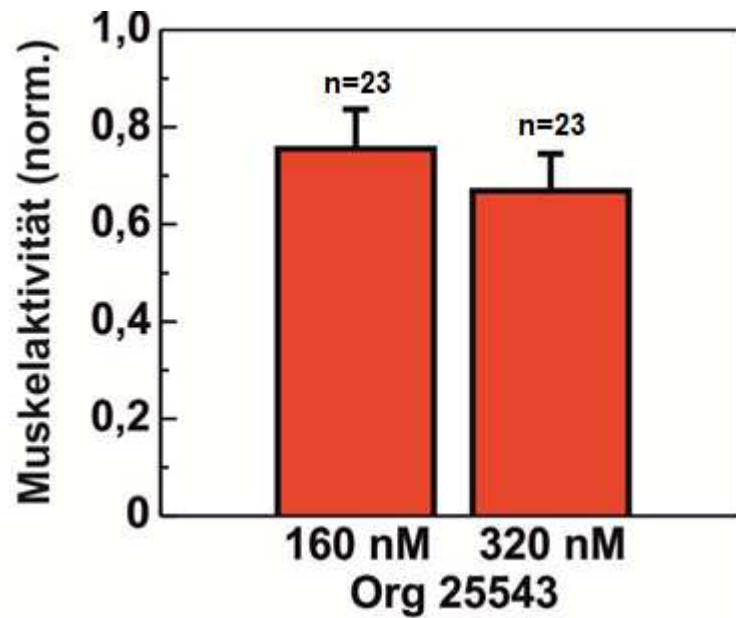


Abbildung 15 Einfluss des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 auf die Muskelaktivität des kokultivierten Muskelgewebes. Die Daten wurden auf die Muskelaktivität der Kontrollmessung normalisiert.

Muskelgewebsschnitt (Nr.)	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde Kontrollbedingung (ohne Substanzzugabe)	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde nach Zugabe von 160 nMol Org 25543	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde nach Zugabe von 320 nMol Org 25543	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde nach Zugabe von 320 nMol Org 25543 und 1µM Pancuronium
1	0,27941	0,0029412	0,0029412	0,0029412
2	1,3676	0,16471	0,17941	0
3	1,8059	0,0058824	0,026471	0,0058824
4	1,5676	1,1294	1,3118	0,047059
5	0,33824	0,27647	0,25294	0,01765
6	0,66471	0,70588	0,83824	0
7	0,12353	0,14706	0,14118	0,01471
8	1,8412	1,7765	1,0912	0,01471
9	0,79412	0,54706	0,70294	0,04706
10	0,46471	0,60882	0,28824	0
11	0,67647	0,48235	0,32647	0,04706
12	1,0441	1,4588	1,2147	0,32647
13	0,33824	0,35882	0,35588	0,03235
14	0,63529	0,52059	0,36471	0
15	0,32059	0,35	0,30882	0,00588
16	0,75588	0,47353	0,37941	0

17	0,75	0,45882	0,67941	0,10588
18	0,81176	0,75588	0,83235	0,01176
19	0,26765	0,07647	0,03529	0
20	2,0441	1,6706	1,6324	0,07353
21	0,4	0,22647	0,22059	0,01471
22	0,60294	0,66176	0,37941	0,04118
23	0,72059	0,33824	0,25588	0,01765

Tabelle 5: Darstellung von Rohdaten, welche die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes unter dem Einfluss des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 zeigen.

3.2 Einfluss des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 auf die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes

Die mit Org 24598-behandelten Schnittkulturen hatten eine Stichprobengröße von 13 und stammten aus drei verschiedenen Präparationen. Die Rohdaten eines Experimentes sind in Abbildung 16 beispielhaft dargestellt. Bei Betrachtung der Rohdaten dieses Experimentes lässt sich eine deutliche Reduzierung der Muskelaktivitätsfrequenz beobachten.

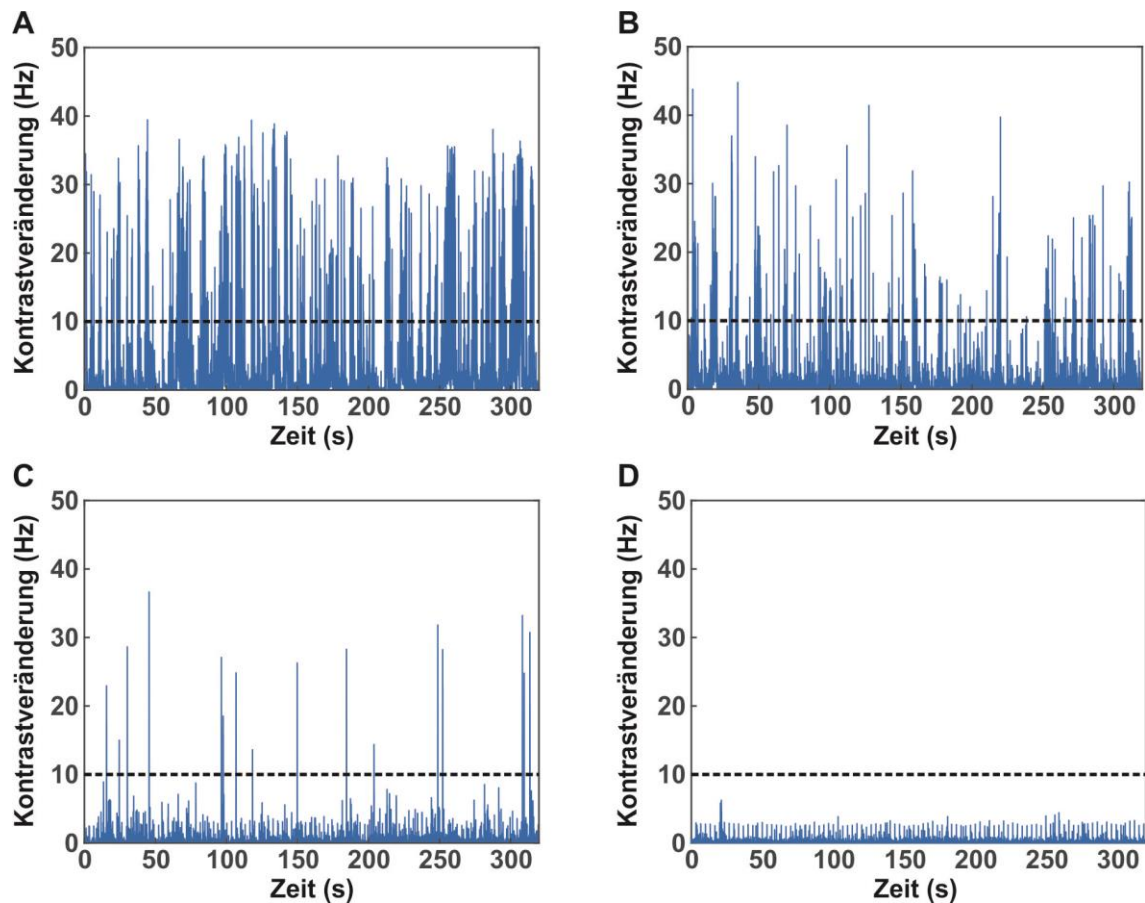


Abbildung 16 Beispielhafte Darstellung von Rohdaten, welche die Verringerung der Muskelaktivität unter Zugabe des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 zeigen. Auf der X-Achse ist die Zeit in Sekunden zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Kontrastveränderung in Hertz. Die horizontale gestrichelte Linie stellt die manuell gesetzte Schwelle dar. **A)** Kontrollmessung mit ACSF. **B)** Drogenmessung mit 70 nM Org 24598. **C)** Drogenmessung mit 140 nM Org 24598. **D)** Auswaschmessung mit 1 µM Pancuronium.

Die auf die Kontrollbedingung normalisierten Daten waren normal verteilt und wurden dem t-Test unterzogen. Die Ergebnisse aller ausgewerteten Experimente mit Org 24598 sind in Abbildung 17 dargestellt. Nach der Applikation von 70 nM Org 24598 verringerte sich die Muskelaktivität um 50% ($0,50 \pm 0,08$, t-Test, $p < 0,001$). Eine Konzentration von 140 nM des glialen Reuptake-Blockers ergab eine Hemmung der Muskelaktivität um 65% ($0,35 \pm 0,08$, t-Test, $p < 0,001$).

Eine Einfaktorielle ANOVA mit den Daten von Org 24598 (Tabelle 6) zeigte ebenfalls für beide Konzentrationen einen statistisch signifikanten Effekt (70nM Org 24598: $p = 0,003$; 140nM Org 24598: $p = 0,001$). Die Ergebnisse der ANOVA mit den Daten von Org 24598 sind in Tabelle 11 (Anhang) dargestellt. Die

einfaktorielle ANOVA zeigt an dieser Stelle signifikante p-Werte, da die Effektstärke bei 70 nM Org 24598 höher ist als bei 160nM Org25543.

Sowohl der neuronale als auch der gliale Reuptake-Blocker üben einen höchst signifikanten aktivitätsdämpfenden Effekt auf die Motoneurone aus.

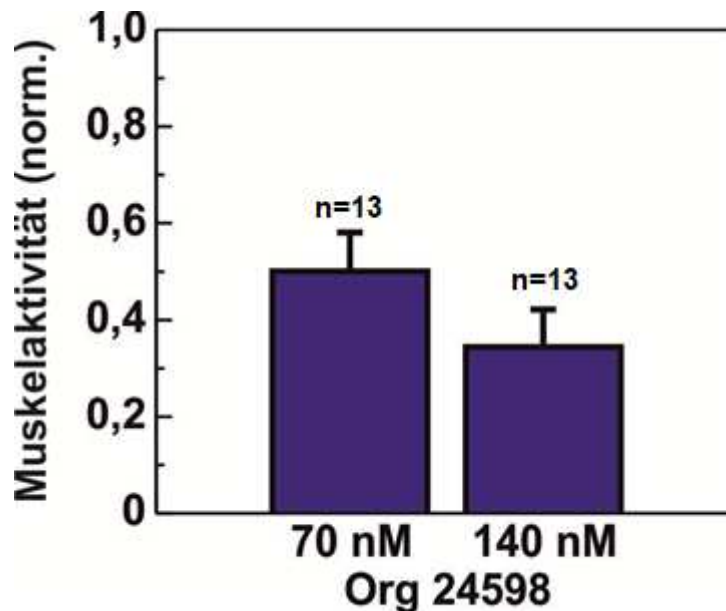


Abbildung 17 Der Einfluss des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 auf die Muskelaktivität des kokultivierten Muskelgewebes. Die Daten wurden auf die Muskelaktivität der Kontrollmessung normalisiert.

Muskelgewebsschnitt (Nr.)	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde Kontrollbedingung (ohne Substanzzugabe)	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde nach Zugabe von 70 nMol Org24598	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde nach Zugabe von 140 nMol Org 24598	Kontrastveränderung (Hz)/Sekunde nach Zugabe von 140 nMol Org 24598 und 1µM Pancuronium
1	1,1765	0,29412	0,07353	0
2	0,74118	0,56176	0,25	0,07353
3	1,2912	1,25	0,10882	0,03823
4	0,41471	0,06765	0,41471	0,00294
5	2,1735	1,4088	1,2	0,22059
6	1,6618	0,94706	0,65294	0,33235
7	0,78235	0,17059	0,19412	0
8	0,2	0,05588	0,06765	0
9	0,92059	0,57941	0,44118	0,01176
10	0,21471	0,15588	0,06765	0,00588

11	0,87059	0,41765	0,03235	0
12	1,3529	0,00294	0,01176	0
13	0,46176	0,37353	0,28529	0,00882

Tabelle 6 Darstellung von Rohdaten, welche die Aktivität des kokultivierten Muskelgewebes unter dem Einfluss des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 zeigen.

3.3 Wirkung des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone im Vorderhorn

Motoneurone können durch inhibitorische Signale verschiedener Interneurone, einschließlich sogenannter Renshaw-Zellen beeinflusst werden. Renshaw-Zellen werden unter anderem durch Alpha-Motoneurone innerviert und üben somit lokal eine negative Rückkopplung aus. Um die Frage zu beantworten, ob die bei der Zugabe der Reuptake-Blocker zu beobachtende Dämpfung der Muskelkontraktionsaktivität auf eine Hemmung der neuronalen Aktivität im ventralen Horn des Rückenmarks zurückzuführen ist, wurden extrazelluläre elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Mithilfe dieser Multi-Unit-Ableitungen wurde die mittlere Aktionspotentialaktivität einer Gruppe von Vorderhornneuronen erfasst. Abbildung 16 zeigt die Aktionspotentialaktivität spinaler Vorderhornneurone als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen in Abwesenheit der Wirkstoffe (Scheinapplikation / Sham).

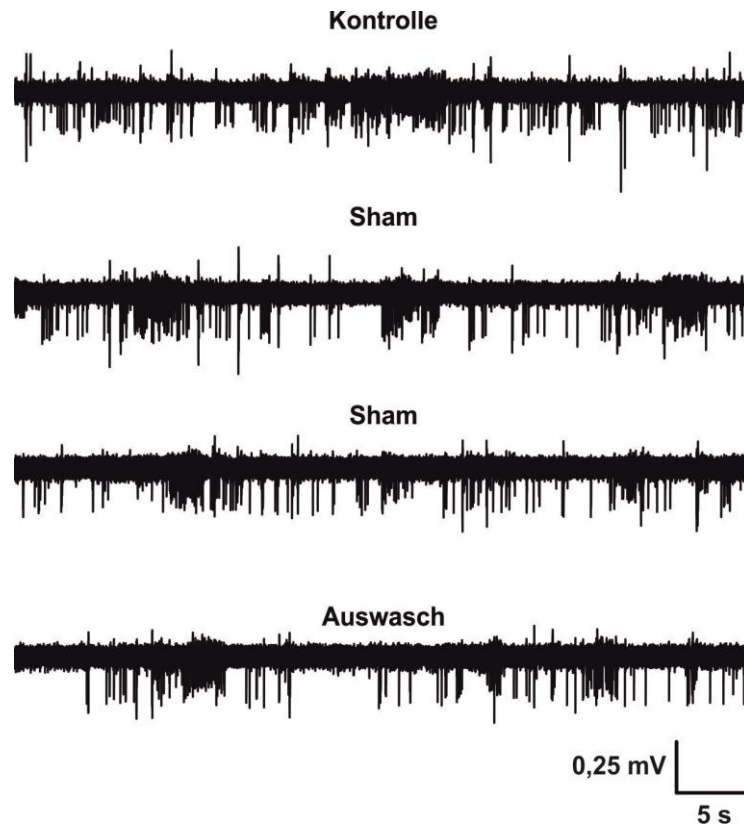


Abbildung 18 Spontane neuronale Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone während eines Experimentes mit Scheinapplikation (Sham). Dargestellt ist die Aktionspotentialaktivität als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen.

Mit beiden Reuptake-Blockern wurden zwei Versuchsreihen mit Kulturen aus jeweils drei verschiedenen Präparationen durchgeführt. Mit dem neuronalen Reuptake-Blocker Org 25543 betragen die Konzentrationen der ersten Versuchsreihe 5 μM und 10 μM und die der zweiten Versuchsreihe 160 nM und 320 nM. Somit handelt es sich bei den Datensätzen der Versuchsreihen um jeweils zwei verbundene Stichproben, welche auch statistisch als solche behandelt wurden. Exemplarisch ist eine der Einzelmessungen mit dem neuronalen Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 in Abbildung 17 dargestellt.

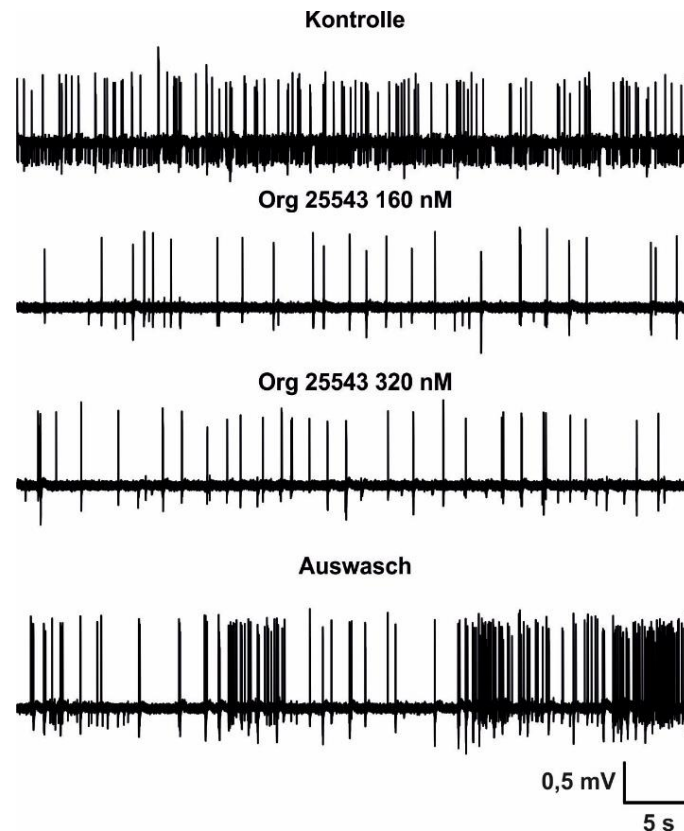


Abbildung 19 Spontane neuronale Aktionspotentialaktivität spinaler Vorderhornneurone während eines Experimentes mit dem neuronalen Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543. Dargestellt ist die Aktionspotentialaktivität als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen.

Die Daten jeder Messung nach der Drogenapplikation wurden auf die jeweils zeitlich äquivalenten Daten der Scheinapplikationsmessungen normalisiert, um einen möglichen zeitlich begründeten „Run-Down“ der Aktionspotentialaktivität auszuschließen. Die Hypothese, dass die Verteilung der Daten der Feuerrate der Org 25543-behandelten Gruppen mit einer Gauß-Verteilung beschrieben werden kann, musste zurückgewiesen werden (Lilliefors-Test, $p < 0,05$). Die normalisierten Daten sind nicht normal verteilt und als Median (KI= unteres 95%-Konfidenzintervall; oberes 95%-Konfidenzintervall) angegeben. Der Ranksum-Test zeigte eine höchst signifikante ($p < 0,001$) Verringerung der spontanen Aktionspotentialaktivität. Die Ergebnisse der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen mit Org 25543 sind in Abbildung 18 dargestellt. Die normalisierte Feuerrate beträgt mit einer Konzentration von 160 nM 0,46 (KI=0,34; 0,57; $n=79$), von 320 nM 0,53 (KI=0,45; 0,65; $n=75$), von 5 μM 0,17 (KI=0,13; 0,42; $n=53$) und von 10 μM

Org 25543 0,23 (KI=0,14; 0,35; n=52). Die Konzentrationen 160 nM und 320 nM verringern die Feuerrate um circa 50% und die Konzentrationen 5 μ M und 10 μ M verringern die Feuerrate um 80% der Scheinapplikation.²

² Daten werden in Artikel „Muscle relaxation in spinal cord – skeletal muscle cocultures caused by blocking GABA and glycine transporters and muscarinic receptors“ veröffentlicht (in Vorbereitung)

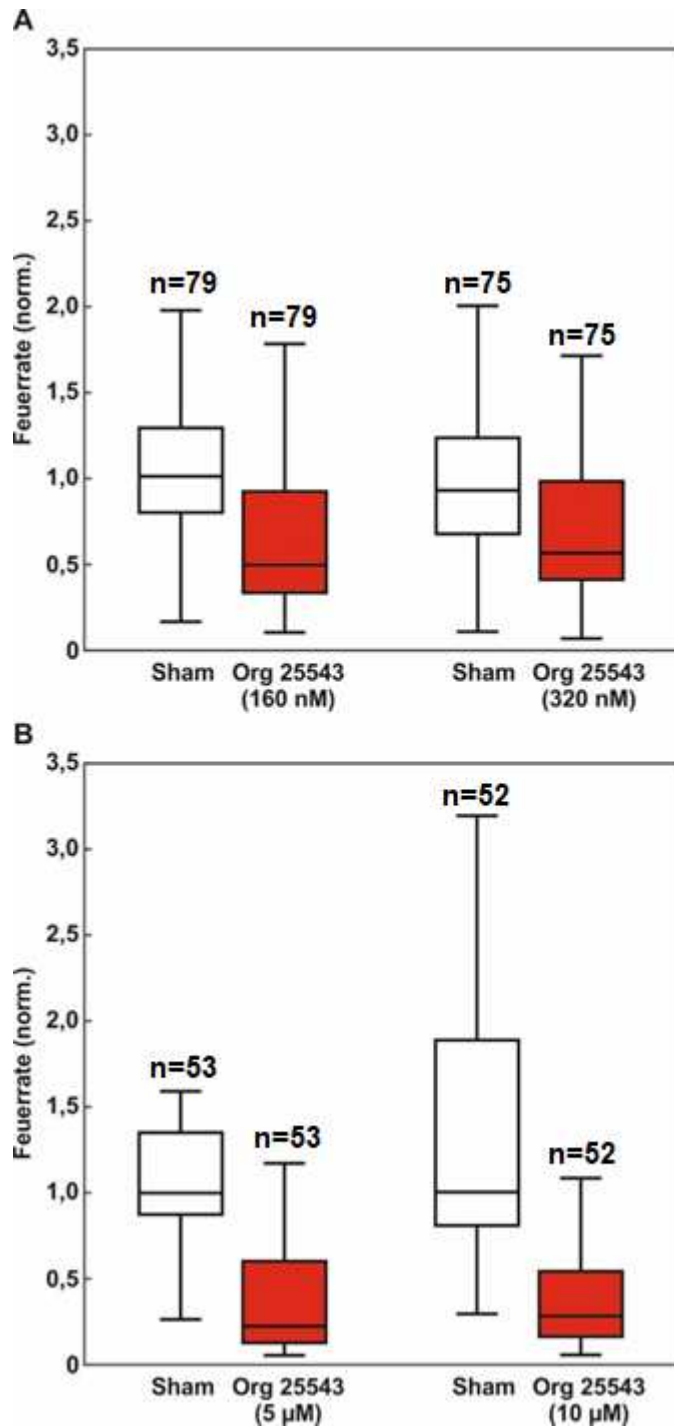


Abbildung 20 Einfluss des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 in den Konzentrationen **A**) 160 nM und 320 nM und **B**) 5 μM und 10 μM auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone. Die Feuerrate der Messungen mit Org 25543 ist auf die zeitlich äquivalente Scheinapplikation unter ACSF normalisiert. Die Feuerrate der Scheinapplikation (=Sham) ist auf die zuvor gemessene Kontrollbedingung normalisiert.

3.4 Wirkung des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone im Vorderhorn

Mit dem glialen Reuptake-Blocker Org 24598 betrug die Konzentrationen der ersten Versuchsreihe 5 μM und 10 μM und die der zweiten Versuchsreihe 70 nM und 140 nM. Somit handelt es sich auch hier um jeweils zwei verbundene Stichproben. Eine der Einzelmessungen mit Org 24598 ist als Rohdatenspur in Abbildung 19 beispielhaft dargestellt.

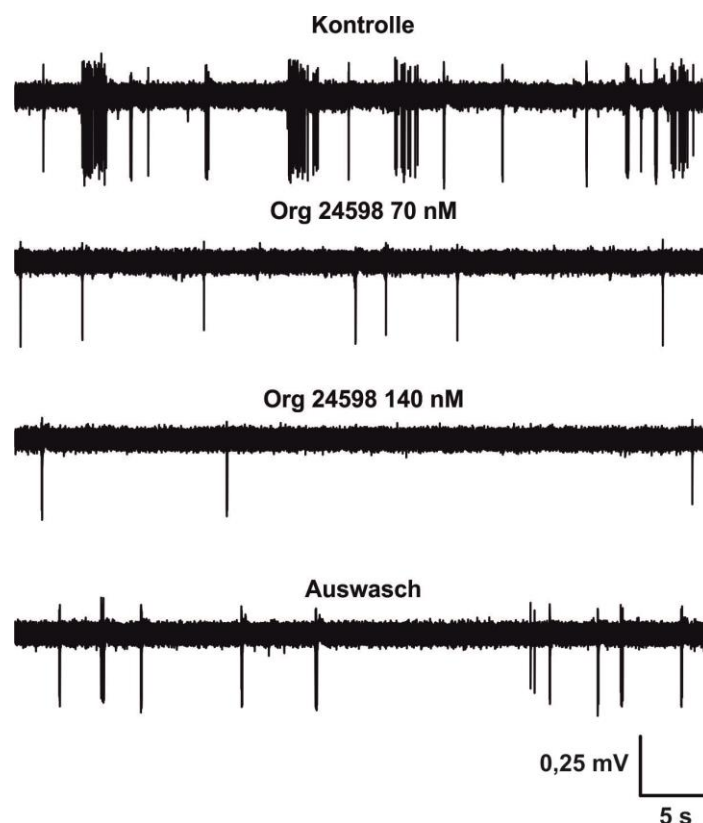


Abbildung 21 Spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Vorderhornneurone während eines Experimentes mit dem glialen Glycin-Reuptake-Blocker Org 24598. Dargestellt ist die Aktionspotentialaktivität als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen.

Die normalisierten Daten sind nicht normal verteilt und als Median (KI= unteres 95%-Konfidenzintervall; oberes 95%-Konfidenzintervall) angegeben. Der Ranksum-Test zeigte eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Verringerung der spontanen Aktionspotentialaktivität mit dem glialen Reuptake-Blocker.

Die Ergebnisse der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen mit Org 24598 sind in Abbildung 20 dargestellt. Die normalisierte Feuerrate beträgt bei einer Konzentration von 70 nM Org 24598 0,38 (KI=0,26; 0,53; n=57), von 140 nM 0,47 (KI=0,31; 0,59; n=59) und von 5 μ M 0,15 (KI=0,06; 0,25; n=42). Die Daten der normalisierten Feuerrate mit einer Konzentration von 10 μ M sind normal verteilt und als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben: $0,33 \pm 0,05$ (n=38). In den Konzentrationen 70 nM und 140 nM verringert Org 24598 die Feuerrate um ca. 60% und in den Konzentrationen 5 μ M und 10 μ M Org 24598 um ca. 80%.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die dämpfende Wirkung beider Reuptake-Blocker nicht nur auf motoneuronaler Ebene, sondern auch auf interneuronaler Ebene, und zwar in Form einer stark reduzierten Feuerrate der Aktionspotentiale, zu finden ist.

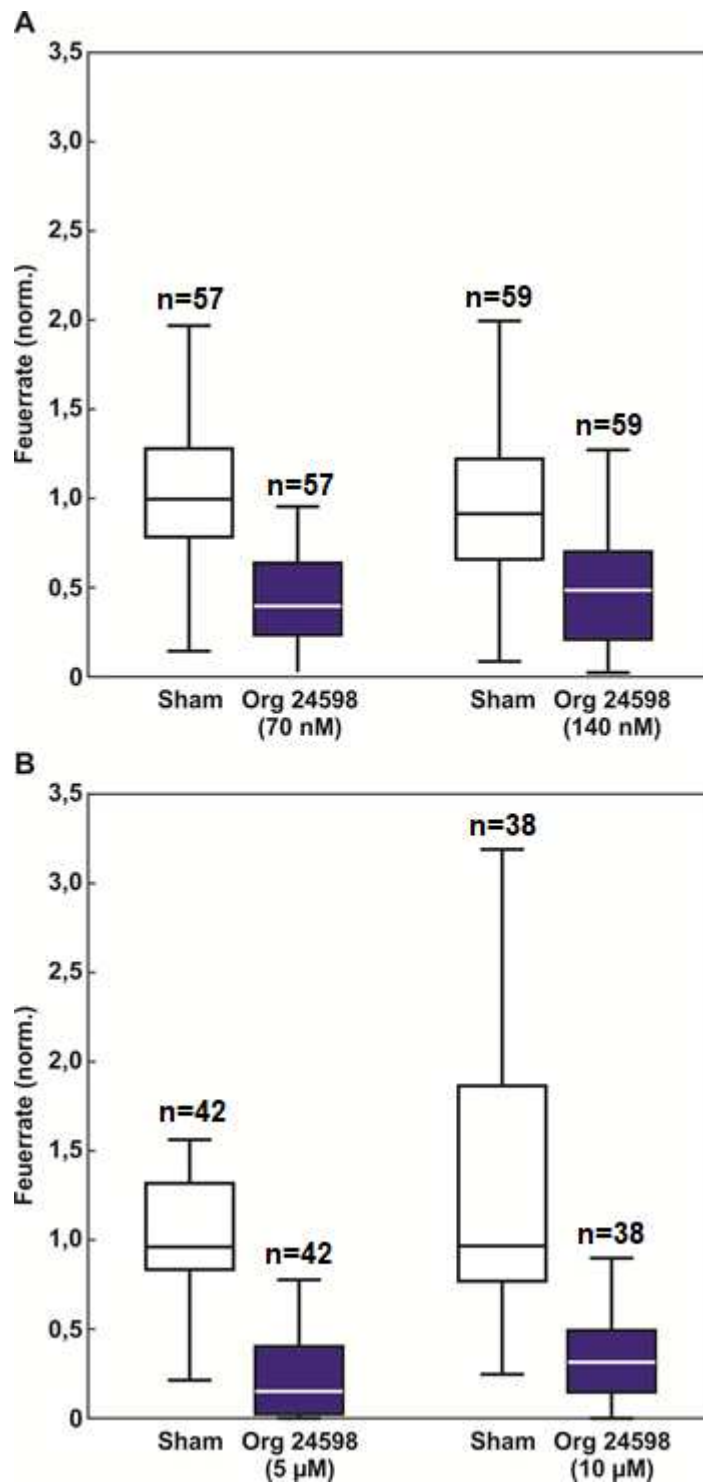


Abbildung 22 Einfluss des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 in den Konzentrationen **A)** 70 nM und 140 nM und **B)** 5 µM und 10 µM auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone. Die Feuerrate der Messungen mit Org 24598 ist auf die zeitlich äquivalente Scheinapplikation unter ACSF normalisiert. Die Feuerrate der Scheinapplikation (=Sham) ist auf die zuvor gemessene Kontrollbedingung normalisiert.

3.5 Wirkungen der Glycin-Reuptake-Blocker in Abhängigkeit der neuronalen Grundaktivität

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Wirkung der Reuptake-Blocker auf die Interneurone aktivitätsabhängig verhält. Ein aktivitätsabhängiger Effekt bedeutet, dass die pharmakologische Hemmung der Neurone mit der Aktionspotentialaktivität positiv korreliert, die vor der Zugabe des Wirkstoffs gemessen wurde.

Um bestimmen zu können, ob die Wirkung der Glycin-Reuptake-Blocker abhängig von der interneuronalen Grundaktivität ist, wurden die auf die Kontrollmessung normalisierten Daten der Drogenmessungen und die Daten der Kontrollmessung in nicht-normalisierter Form verwendet. Mithilfe dieser Daten wurde eine Regressionsgerade erstellt. Das 95%-Konfidenzintervall des Steigungswertes dieser Regressionsgerade gab Aufschluss darüber, ob die Wirkstärke der Reuptake-Blocker durch die interneuronale Grundaktivität beeinflusst wird. Beinhaltet dieses Intervall die Steigung null, so verhält sich die Wirkung der getesteten Droge mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% unabhängig von der Grundaktivität. Die Ergebnisse der Regressionsgeradenanalyse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich der neuronale und gliale Glycin-Reuptake-Blocker mit Hinblick auf die Aktivitätsabhängigkeit unterschiedlich verhalten: Die erhobenen Daten zeigen eine Abhängigkeit der Wirkstärke des neuronalen Reuptake-Blocker Org 25543 von der Grundaktivität. Je höher die neuronale Grundaktivität ist, desto stärker ist die inhibitorische Wirkung von Org 25543. Im Gegensatz dazu scheint die Wirkung des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 unbeeinflusst von der neuronalen Grundaktivität zu sein. Die Scheinapplikation blieb von der neuronalen Grundaktivität unbeeinflusst.

Substanz	Konzentration	Unteres KI	Oberes KI	Steigung der Regressionsgerade
Org 25543	160 nM	-1,166	-0,496	-0,831
Org 25543	320 nM	-1,530	-0,568	-1,049
Org 25543	5 μ M	-0,608	-0,084	-0,346
Org 25543	10 μ M	-0,878	-0,207	0,543
Org 24598	70 nM	-1,658	0,194	-0,732
Org 24598	140 nM	-0,781	0,147	-0,317
Org 24598	5 μ M	-0,188	0,153	-0,018
Org 24598	10 μ M	-0,140	0,257	0,059

Tabelle 7 Ergebnisse zur Analyse der aktivitätsabhängigen Wirkung des neuronalen (Org 25543) und glialen (Org 24598) Glycin-Reuptake-Blockers. Umfasst das 95%-Konfidenzintervall (KI) den Wert null, so handelt es sich um einen aktivitätsunabhängigen Effekt der Reuptake-Blocker. Liegt der Wert null außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls, so wirkt der Reuptake-Blocker in Abhängigkeit der interneuronalen Grundaktivität.

3.6 Wirkung des neuronalen Glycin-Reuptake-Blockers Org 25543 auf glycinerge postsynaptische Ströme

Inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) geben den Zeitverlauf des Bindens und der Dissoziation des Neurotransmitters an dem Rezeptor an. Mithilfe der Analyse der IPSCs kann man Aufschluss darüber erlangen, ob ein Wirkstoff Einfluss auf die synaptische Übertragung hat. Um den Effekt der Glycin-Reuptake-Blocker auf die synaptische Inhibition beurteilen zu können, wurden intrazelluläre elektrophysiologische Messungen an den Rückenmarkkulturen mit der Patch-Clamp-Methode durchgeführt. Dabei wurden spontane glycinerge IPSCs aufgezeichnet, welche beispielhaft in Abbildung 21 dargestellt sind.

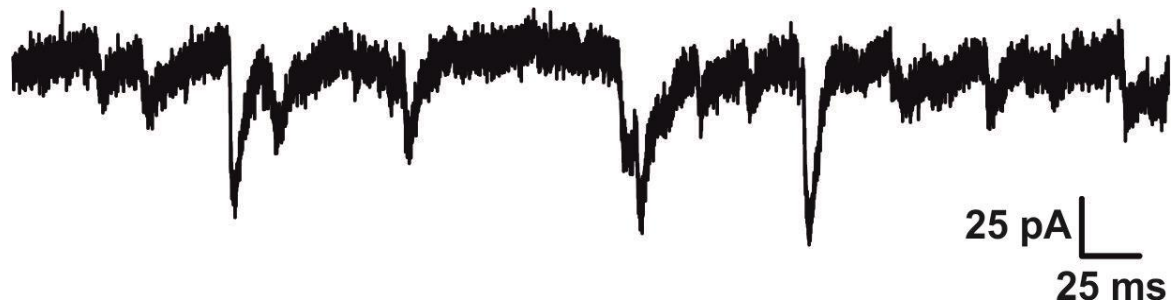


Abbildung 23 Spontane glycinerge inhibitorische Ströme (sIPSCs) als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen unter Bicucullin (100 μM), CNQX (10 μM) und AP5 (25 μM)

Die glycinergen spontanen IPSCs wurden mit Hinblick auf die Parameter Abklingzeit, Amplitude und Frequenz analysiert. Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen die Ergebnisse einzelner Experimente sowie die gemittelten Effekte als Balkendiagramm mit Standardfehler für den neuronalen Reuptake-Blocker Org 25543. Die deskriptive Statistik erfolgte zur besseren Übersicht ohne Beachtung der Normalverteilung der nicht-normalisierten Daten. Um die Effekte der Glycin-Reuptake-Blocker auf die Kinetik und Frequenz der sIPSCs analysieren zu können, wurden die Daten auf die Kontrollbedingung unter AP5, CNQX, ACSF und Bicucullin normalisiert. Für die analytischen Tests dieser normalisierten Daten wurde die Verteilung der Daten berücksichtigt. Die normalisierten Daten sind normalverteilt und wurden dem t-Test unterzogen. Die Parameter sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Die normalisierte Änderung der Abklingzeit (siehe Abbildung 24A-B) der glycinergen IPSCs bei einer Konzentration von 320 nM des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 beträgt $1,10 \pm 0,06$ ($n=16$) und ist nicht signifikant (t-Test, $p=0,89$). Anders verhält es sich mit der höheren Konzentration von 5 μM : Die Abklingzeit steigt von 12,2 ms auf 17,3 ms (siehe Abbildung 25A-B) und somit um etwa 44% mit $1,44 \pm 0,07$ ($n=10$). Diese Änderung ist statistisch höchst signifikant (t-Test, $p=0,001$). Die durchgeführte Mixed ANOVA bestätigte dieses Ergebnis: Der Interaktionseffekt der Abklingzeit zwischen Sham-Applikation und 320 nM Org 25543 verhält sich statistisch nicht signifikant ($p=0,7916$), während der Interaktionseffekt zwischen Scheinapplikation und 5 μM Org 25543 statistisch

signifikant ($p < 0,001$) ist. Die Ergebnisse der Mixed ANOVA mit den Daten von Org 25543 sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 (Anhang) dargestellt.

Zu erwähnen ist, dass die gemessenen Amplituden in nicht-normalisierter Form bei der Konzentration 320 nM (zu sehen in Abbildung 26, C-D) nicht normal-verteilt sind (Lillifors-Test, $p = 0,03$). Bezüglich der IPSC Amplitude weisen weder die normalisierten Daten mit 320 nM ($1,10 \pm 0,06$; $n = 15$) (siehe Abbildung 27C-D) noch die mit 5 μM ($0,99 \pm 0,06$; $n = 6$) (siehe Abbildung 28C-D) einen statistischen Unterschied zur Kontrollmessung auf (t-Test, $p = 0,13$ bzw. t-Test, $p = 0,997$). Die für die ANOVA obligate Erfüllung der Homogenität der Variablen ist mit den Daten der IPSC-Amplitudenmessungen von 5 μM Org 25543 nicht erfüllt (Levene-Test, $p > 0,05$). Auch durch eine Box-Cox Powertransformation mit dem Powerfaktor 0,35 ist das Kriterium der Gleichheit der Fehlervarianzen nicht erfüllt, sodass auf eine weitere Analyse der IPSC-Amplitudendaten mittels ANOVA verzichtet wurde.

Die Wirkung des Reuptake-Blockers auf die Frequenz der Aktionspotentialabhängigen IPSCs ist konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 320 nM steigt die Frequenz (siehe Abbildung 29E-F) um circa 91% ($1,91 \pm 0,37$; $n = 15$; t-Test, $p = 0,03$), während sie bei der Applikation mit 5 μM Org 25543 (siehe Abbildung 30E-F) um circa 56% sinkt ($0,44 \pm 0,076$; $n = 6$; t-Test, $p = 0,0007$). Die Mixed ANOVA ergab für die Rohdaten der IPSC-Frequenz mit 320 nM Org 25543 keinen statistisch signifikanten Effekt ($p = 0,108$). Dieses von dem t-Test abweichende Ergebnis ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass beim t-Test zunächst der Effekt innerhalb der Gruppe berechnet wird und somit die Varianz beim Vergleich zwischen den Gruppen reduziert wird. Die Mixed ANOVA zeigte für die IPSC-Frequenz von 5 μM Org 25543 einen statistisch signifikanten Effekt ($p > 0,001$). Die Ergebnisse der Mixed ANOVA sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 (Anhang) dargestellt.

Der neuronale Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 ruft also in einer Konzentration von 5 μM eine signifikant verlängerte Abklingzeit um 44% und eine Verringerung der Frequenz hervor, jedoch sind die Effekte auf die Kinetik der IPSCs bei einer Konzentration von 320 nM des neuronalen Reuptake-Blockers nicht

signifikant und eine Steigung der IPSC-Frequenz um ca. 91% lässt sich in der 320-nanomolaren Konzentration beobachten.

Folglich lässt sich sagen, dass Org 25543 lediglich bei einer hohen applizierten Konzentration von 5 μM zu einem gewissen Grad eine phasische postsynaptische Inhibition potenziert.

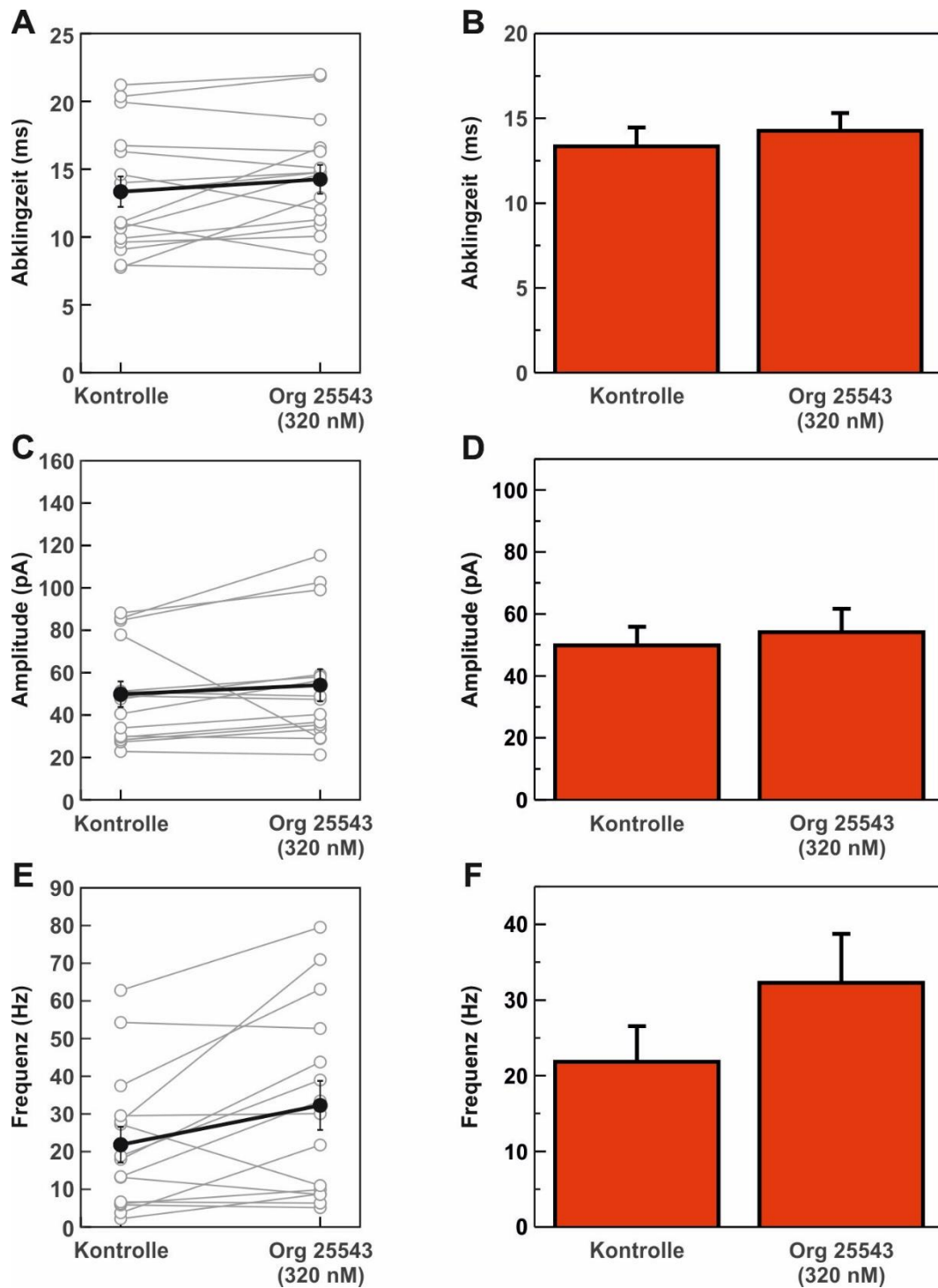


Abbildung 24 Ergebnisse der einzelnen Experimente (**A,C,E**) und Zusammenfassung (**B,D,F**) der intrazellulären Messungen mit 320 nM Org 25543. Dabei zeigen **A** und **B** die Abklingzeit, **C** und **D** die Amplitude und **E** und **F** die Frequenz der sIPSCs. Die Fehlerbalken (in **B,D,F**) stellen den Standardfehler dar.

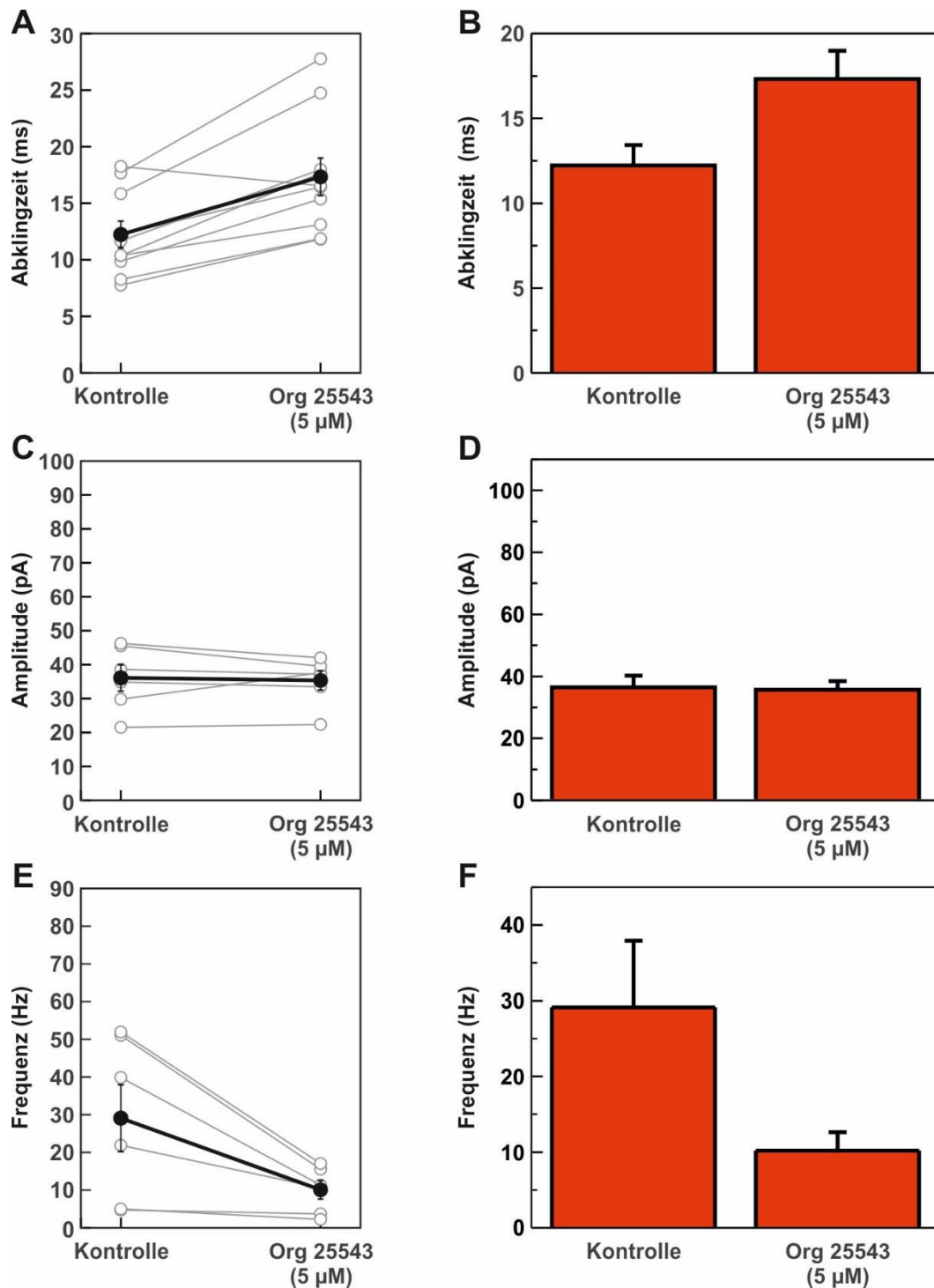


Abbildung 25 Ergebnisse der einzelnen Experimente (**A,C,E**) und Zusammenfassung (**B,D,F**) der intrazellulären Messungen mit 5 µM Org 25543. Dabei zeigen **A** und **B** die Abklingzeit, **C** und **D** die Amplitude und **E** und **F** die Frequenz der sIPSCs. Die Fehlerbalken (in **B,D,F**) stellen den Standardfehler dar.

3.7 Wirkung des glialen Glycin-Reuptake-Blockers Org 24598 auf glycinerge postsynaptische Ströme

Auch die Effekte des glialen Glycin-Reuptake-Blockers (Konzentration: 5 μ M) auf die glycinerge IPSCs wurden bezüglich der Parameter Abklingzeit, Amplitude und Frequenz analysiert. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse einzelner Experimente sowie die gemittelten Effekte als Balkendiagramm mit Standardfehler für den glialen Reuptake-Blocker Org 24598. Die deskriptive Statistik erfolgte zur besseren Übersicht ohne Beachtung der Normalverteilung der nicht-normalisierten Daten. Um die Effekte der Glycin-Reuptake-Blocker auf die Kinetik und Frequenz der sIPSCs analysieren zu können, wurden die Daten auf die Kontrollbedingung unter AP5, CNQX, ACSF und Bicucullin normalisiert. Für die analytischen Tests dieser normalisierten Daten wurde die Verteilung der Daten berücksichtigt.

Im Gegensatz zum neuronalen Reuptake-Blocker zeigten die auf die Kontrollbedingung normalisierten Daten des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 in einer Konzentration von 5 μ M keinen signifikanten Effekt auf die Abklingzeit, die Amplitude oder die Frequenz von spontanen IPSCs. Die auf die Kontrollbedingung normalisierten Daten sind normal verteilt und wurden dem t-Test unterzogen. Die Parameter sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die normalisierten Daten der Abklingzeit (siehe Abbildung 26A-B) betrug $1,22 \pm 0,09$ ($n=14$; t-Test, $p=0,25$) und die der Amplitude (siehe Abbildung 26C-D) $1,06 \pm 0,05$ ($n=13$; t-Test, $p=0,23$). Sowohl die normalisierten als auch die nicht-normalisierten Messwerte der Frequenz (siehe Abbildung 26E-F) folgten nicht einer Normalverteilung. Der Median der Frequenz beträgt 8,74 Hz ($n=13$). Da die Änderung der Frequenz nicht signifikant ist (Signrank-Test, $p=0,41$), ist keine gesonderte statistische Analyse für dieses Teilergebnis durchgeführt worden.

Die IPSC-Daten mit 5 μ M Org 24598 (Abbildung 32A,B) wurden einer Mixed A-NOVA unterzogen. Der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test zeigen, dass die Daten der IPSC Verfallszeit des ersten Recordings der

Scheinapplikationsgruppe nicht für alle Messungen normalverteilt sind (Kolmogorov-Smirnov-Test, $p=0,023$). Die Daten der Drogenapplikationsgruppe hingegen sind normalverteilt (Kolmogorov-Smirnova, $p>0,05$). Der Levine-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen zeigt, dass Homogenität der Variablen nicht vorliegt ($p>0,05$), sodass eine Box-Cox Powertransformation mit dem Powerfaktor 0,15 durchgeführt wurde. Da die Box-Cox Powertransformation der Daten das Kriterium der Varianzgleichheit nicht erfüllt, konnte keine weitere Analyse mittels ANOVA erfolgen. Die qualitative Betrachtung der Daten (Abbildung 33A, B und Abbildung 34A, B) und der t-test zeigen, dass hier kein Unterschied zwischen der Sham- und der Drogengruppe besteht. Die Mixed ANOVA der IPSC- Amplituden zeigt, dass der Interaktionseffekt zwischen der Scheinapplikation und 5 μM Org 24598 statistisch nicht signifikant ist ($p=0,385$). Die Ergebnisse der Mixed ANOVA dieser Daten findet sich in Tabelle 16 (Anhang).

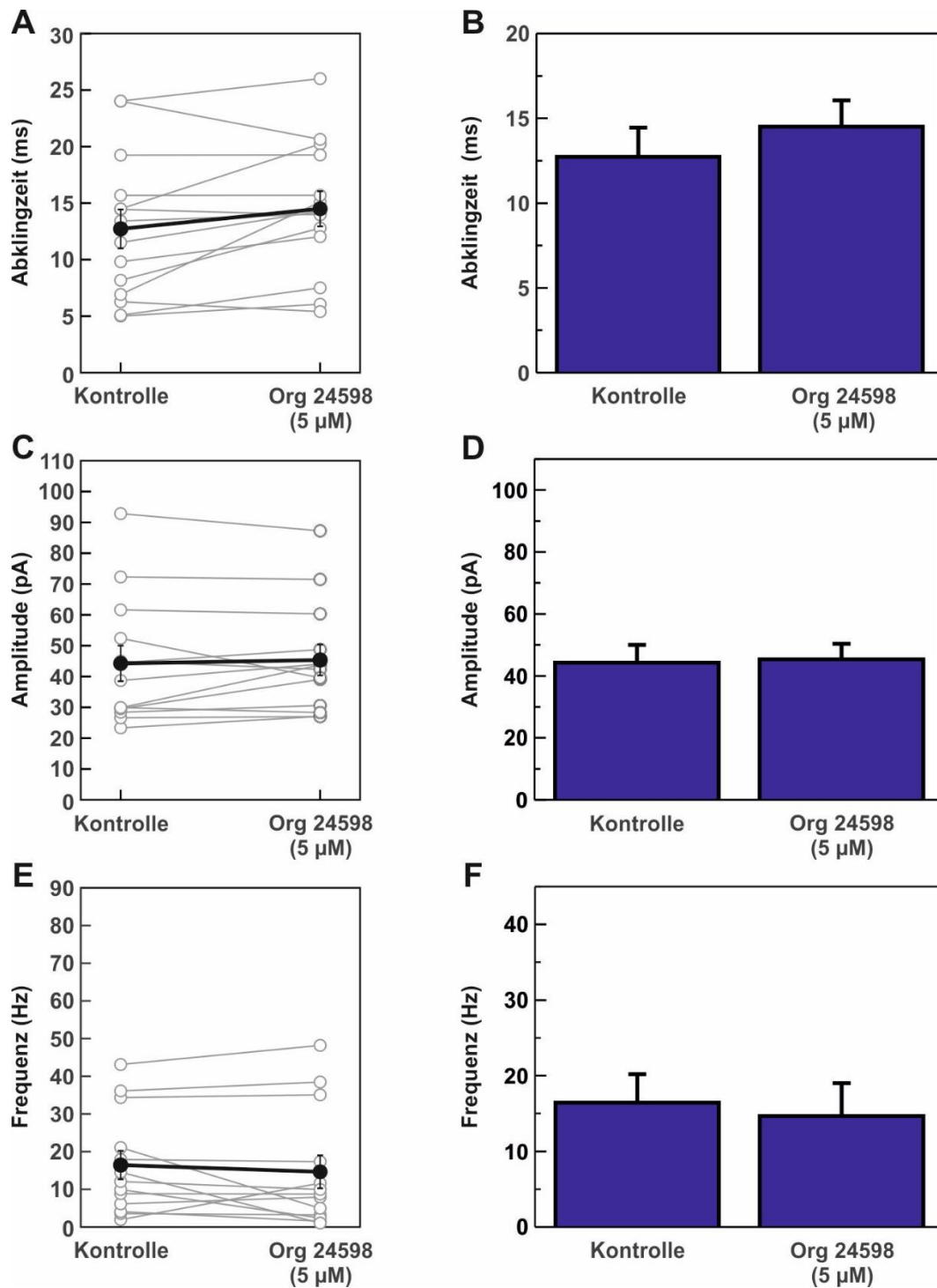


Abbildung 26 Ergebnisse der einzelnen Experimente (**A,C,E**) und Zusammenfassung (**B,D,F**) der intrazellulären Messungen mit 5 µM Org 24598. Dabei zeigen **A** und **B** die Abklingzeit, **C** und **D** die Amplitude und **E** und **F** die Frequenz der sIPSCs. Die Fehlerbalken (in **B,D,F**) stellen den Standardfehler dar.

3.8 Wirkung der Scheinapplikation auf glycinerge postsynaptische Ströme

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse einzelner Experimente sowie die gemittelten Effekte als Balkendiagramm mit Standardfehler für die Scheinapplikation mit AP5, CNQX, ACSF und Bicucullin. Die deskriptive Statistik erfolgte zur besseren Übersicht ohne Beachtung der Normalverteilung der nicht-normalisierten Daten. Um mögliche zeitbegründete Effekte der Kinetik und Frequenz der sIPSCs analysieren zu können, wurden die Daten der Scheinapplikation auf die Kontrollbedingung normalisiert. Für die analytischen Tests dieser normalisierten Daten wurde die Verteilung der Daten berücksichtigt. Die auf die Kontrollbedingung normalisierten Daten sind normal verteilt und wurden dem t-Test unterzogen. Die Parameter sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Die Frequenz ($1,18 \pm 0,11$; $n=16$; t-Test, $p=0,122$) der IPSCs zeigten im Falle der Scheinapplikation keine statistisch signifikante Beeinflussung (siehe Abbildung 27E-F).

Die Abklingzeiten und Amplituden (siehe Abbildung 27A-D) zeigten interessanterweise eine statistisch signifikante Steigerung. Die IPSC Amplitude stieg um etwa 24% ($1,24 \pm 0,10$; $n=15$; t-Test, $p=0,03$). Die nicht-normalisierten Messwerte der Kontrollmessung für die Ermittlung der Abklingzeit sind nicht normal-verteilt (siehe Abbildung 27A-B). Der Median der Kontrollbedingung für die Ermittlung der Abklingzeit beträgt 11,27 ms. Die normalisierten Messwerte der Abklingzeiten sind normal verteilt und zeigen eine Verlängerung um circa 11% mit $1,11 \pm 0,04$ ($n=15$, t-Test, $p=0,018$).

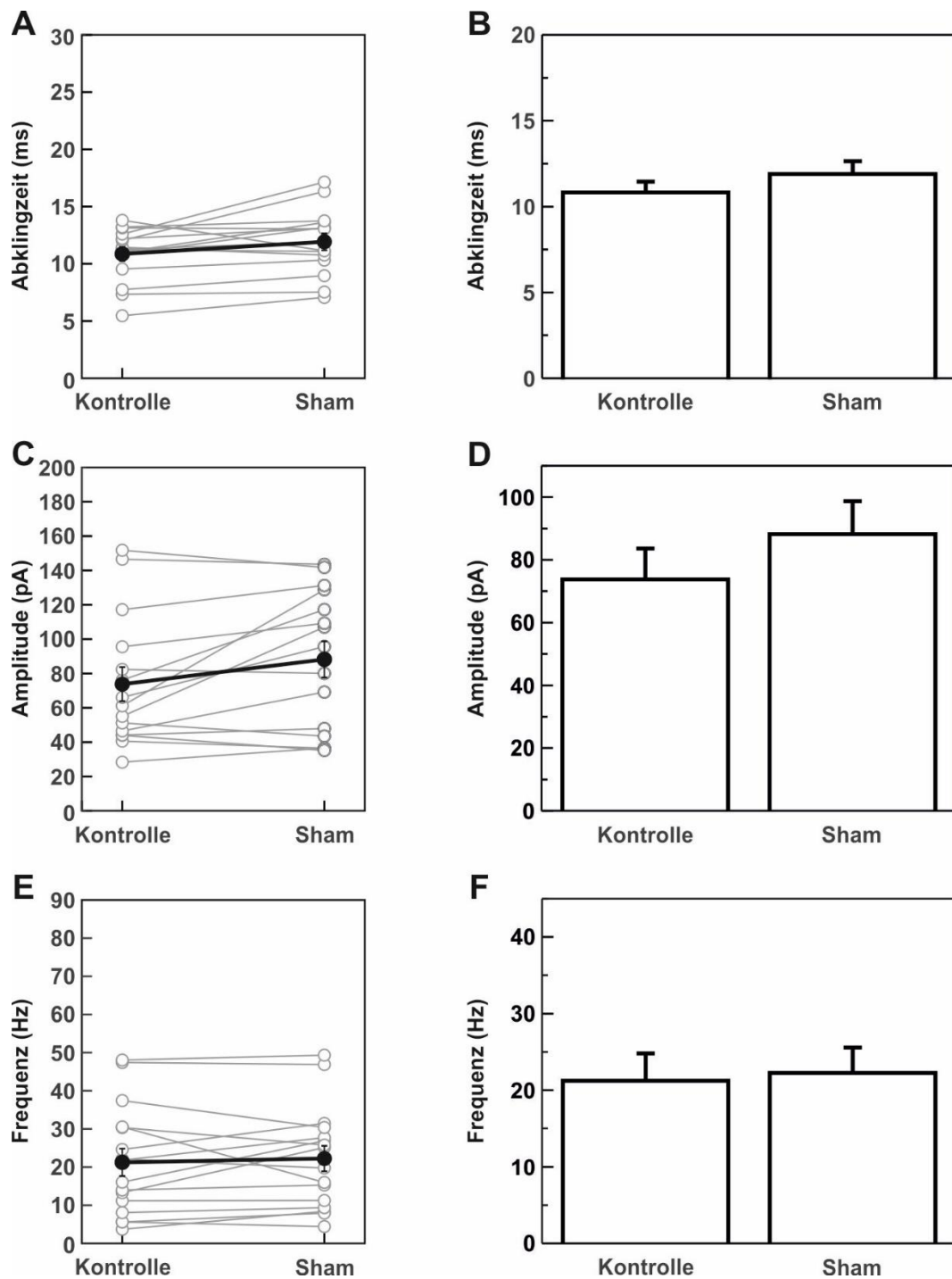


Abbildung 27 Ergebnisse der einzelnen Experimente (**A,C,E**) und Zusammenfassung (**B,D,F**) der intrazellulären Messungen mit der Scheinapplikation mit AP5 (25 μ M), CNQX (10 μ M), ACSF und Bicucullin (100 μ M). Dabei zeigen **A** und **B** die Abklingzeit, **C** und **D** die Amplitude und **E** und **F** die Frequenz der sIPSCs. Die Fehlerbalken (in **B,D,F**) stellen den Standardfehler dar.

3.9 Einfluss der Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598 auf glycinerge tonische Ströme

Anhand der Änderung des Grundstroms während einer Voltage-Clamp-Messung unter Drogenbedingungen und unter Strychnin-Bedingungen kann die Bedeutung der Reuptake-Blocker für die extrasynaptische (tonische) Übertragung an glycinergen Synapsen quantitativ beschrieben werden. Wird der Grundstrom negativer, so deutet dies darauf hin, dass extrasynaptische Glycinrezeptoren aktiviert wurden. Die Änderung des Grundstroms in den positiven Picoampere-Bereich hingegen kann als Hemmung des glycinabhängigen Chlorid-Ionen-Einstroms interpretiert werden. Strychnin besetzt die Glycinrezeptoren und blockiert die Bindungsstelle am Rezeptor somit für den natürlichen Agonisten Glycin. Abbildung 28 zeigt die Änderung des Grundstroms unter Zugabe der Reuptake-Blocker und Strychnin. Die Differenz des Grundstroms unter der Zugabe der Glycin-Reuptake-Blocker und unter Scheinapplikation ist in Abbildung 29 dargestellt. Für die Darstellung des Grundstroms wurde der Median mit Standardfehler verwendet.

Die Daten folgen einer Normalverteilung. Alle p-Werte beziehen sich auf den t-Test. Der neuronale Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 weist in einer Konzentration von 320 nM eine Änderung des Grundstroms um -52 pA auf (n=7; t-Test, p=0,008). Bei Strychninzugabe beträgt die Grundstromdifferenz 55,3 pA (t-Test, p=0,008). Bei einer Konzentration von 5 µM Org 25543 sinkt der Grundstrom um -30 pA (n=5; t-Test, p=0,03) und steigt unter Strychnin-Zugabe auf 33,45 pA (t-Test, p=0,032). Der Grundstrom ändert sich in Anwesenheit des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 in einer Konzentration von 5 µM um -41,5 pA (n=8; t-Test, p=0,0023) und steigt bei Strychnin-Zugabe auf 31,8 pA (t-Test, p=0,019). Die Scheinapplikation, welche unter AP5, CNQX, ACSF und Bicucullin und unter Ausschluss der Reuptake-Blocker durchgeführt wurde, zeigt keine signifikante Änderung des Grundstroms bei der zeitlich zu der Drogenzugabe äquivalenten Messung mit einem Median von 1 pA (n=7; t-Test, p=0,43). Die Zugabe von Strychnin erzeugte in der Sham-Applikation einen starken tonischen Strom mit einem Median von 100,26 pA (t-Test, p= 0,00069).

Im Folgenden wurden die Mittelwerte der Differenzen des tonischen Stroms nach Strychninzugabe zwischen Drogenapplikationsgruppen und Scheinapplikationsgruppe mittels einer Einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen.

Die Daten der 320 nM Org 25543-Applikationsgruppe sowie die der Sham-Applikationsgruppe des tonischen Stroms nach Strychnineinwasch sind normalverteilt. Die Einfaktorielle Varianzanalyse zeigt, dass die Mittelwertdifferenz des tonischen Stroms zwischen 320 nM Org 25543 und der Scheinapplikationsgruppe statistisch nicht signifikant ist ($p=0,112$). Die Auswertung der Einfaktoriellen ANOVA mit 320 nM Org 25543 sind in Tabelle 17 dargestellt (Anhang).

Die Daten der 5 μ M Org 25543-Applikationsgruppe des tonischen Stroms nach Strychnineinwasch sind nicht normalverteilt. Die Daten der Sham-Applikationsgruppe des tonischen Stroms nach Strychnineinwasch sind normalverteilt. Die Einfaktorielle Varianzanalyse zeigt, dass die Mittelwertdifferenz des tonischen Stroms zwischen 5 μ M Org 25543 und der Scheinapplikationsgruppe ebenfalls statistisch nicht signifikant ist ($p=0,312$). Die Auswertung der Einfaktoriellen ANOVA mit 5 μ M Org 25543 sind in Tabelle 18 dargestellt (Anhang).

Die Daten der 5 μ M Org 24598-Applikationsgruppe des tonischen Stroms nach Strychnineinwasch sind nicht normalverteilt. Die Daten der Scheinapplikationsgruppe hingegen sind normalverteilt. Die Einfaktorielle Varianzanalyse zeigt, dass die Mittelwertdifferenz des tonischen Stroms zwischen 5 μ M Org 24598 und der Scheinapplikationsgruppe statistisch nicht signifikant ist ($p=0,079$). Die Auswertung der Einfaktoriellen ANOVA mit 5 μ M Org 24598 sind in Tabelle 19 dargestellt (Anhang).

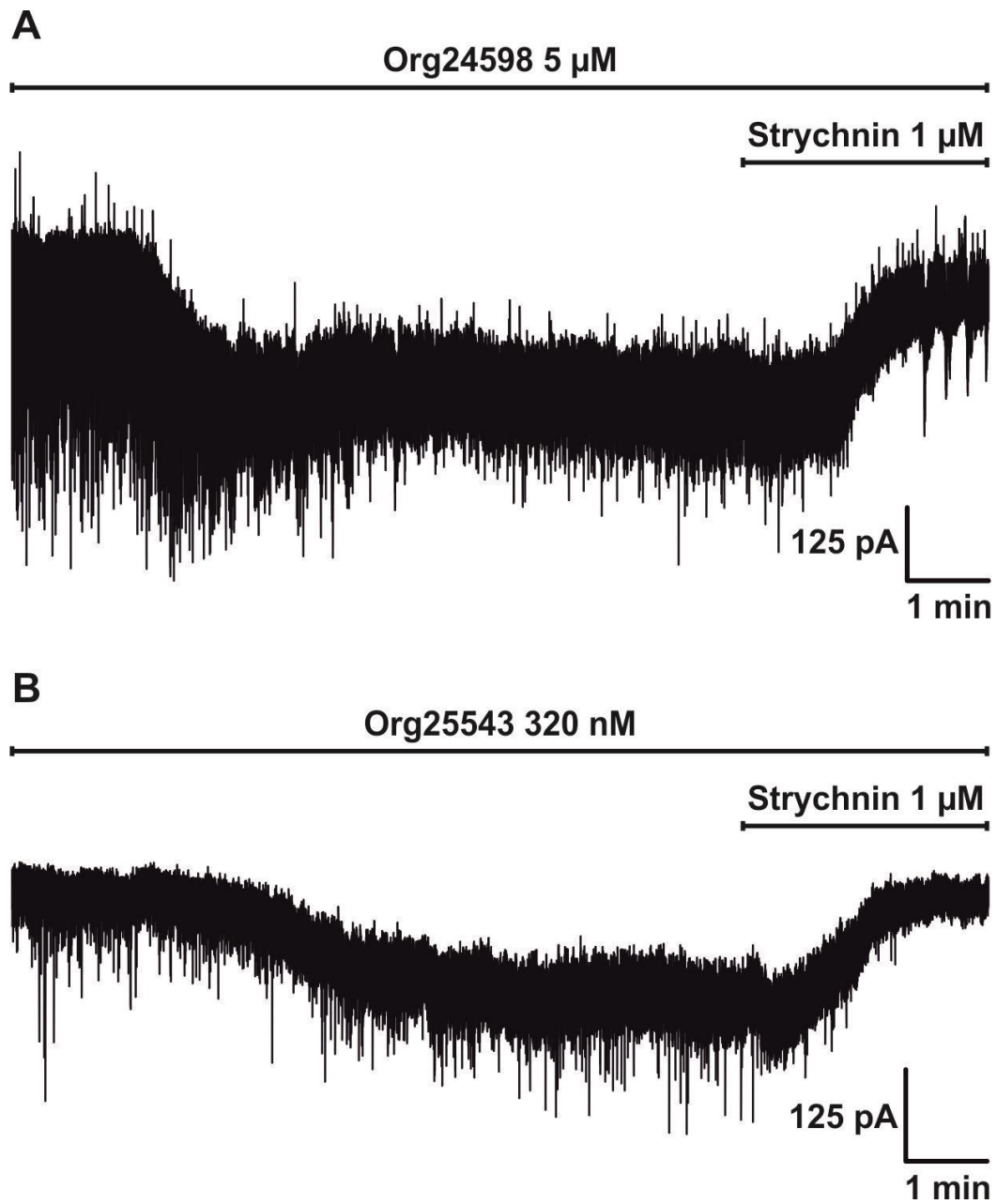


Abbildung 28 Änderungen des Grundstroms als Rohdatenspur aus den Originalaufzeichnungen unter Applikation mit dem **A)** glialen Glycin-Reuptake-Blocker Org 24598 und **B)** neuronalen Glycin-Reuptake-Blocker Org25543

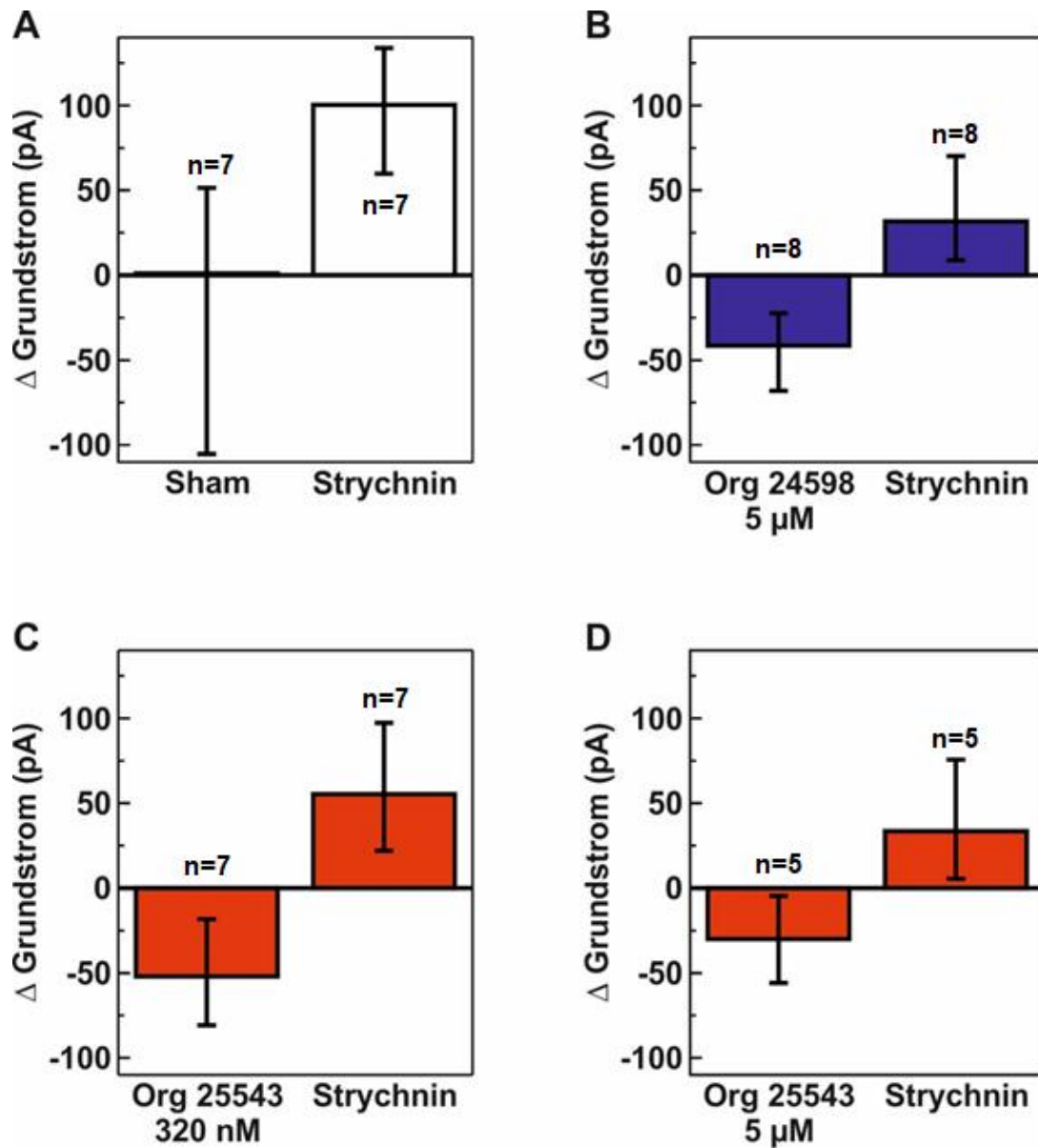


Abbildung 29 Veränderung des Grundstroms (in pA) bei Drogenzugabe/ Scheinapplikation und bei Zugabe von 1 μ M Strychnin. Die dünnen, schwarzen Balken geben den Standardfehler an. **A**) Scheinapplikation (englisch: Sham) mit AP5, CNQX, ACSF und Bicucullin. **B**) 5 μ M Org 24598 **C**) 320 nM Org 25543 **D**) 5 μ M Org 25543.

GS₀ = Grundstrom (pA) vor dem Substanz-Einwasch

GS₁ = Grundstrom (pA) nach Substanz- Einwasch

Δ GS_{Org} = Grundstromdifferenz (pA) nach Substanz- Einwasch (GS_{Org}- GS₀)

GS₁ = Grundstrom (pA) vor 1μM Strychnin- Einwasch

GS_{Stry} = Grundstrom (pA) nach 1μM Strychnin- Einwasch

Δ GS_{Stry} = Grundstromdifferenz (pA) nach 1μM Strychnin- Einwasch (GS_{Stry}- GS₁)

Substanzappli- kation	GS ₀	GS _{Org}	Δ GS _{Org}	GS ₁	GS _{Stry}	Δ GS _{Stry}
320nM Org 25543	-90	-112	-22	-122,5	-67,2	55,3
320nM Org 25543	-153	-160	-7	-183	-162,2	20,8
320nM Org 25543	-176	-289	-113	-331,2	-196,5	134,7
320nM Org 25543	-130	-182	-52	-201,8	-183,2	18,6
320nM Org 25543	-58	-98	-40	-136,6	-95,8	40,8
320nM Org 25543	-1626	-1687	-61	-1652,4	-1591,1	61,3
320nM Org 25543	-102	-154	-52	-148,8	-62,2	86,6
5μM Org 25543	-121	-163	-42	-166,6	-149	17,6
5μM Org 25543	-32	-62	-30	-88,9	-34,3	54,6
5μM Org 25543	-57	-65	-8	-93,2	-59,7	33,5
5μM Org 25543	-254	-267	-13	-266,9	-252	14,8
5μM Org 25543	-282	-340	-58	-422,8	-340,3	82,5
5μM Org 24598	-70	-107	-37	-119,6	-100,8	18,9
5μM Org 24598	-214	-315	-101	-277,7	-158,3	119,4
5μM Org 24598	-341	-382	-41	-433,6	-375,6	58,0
5μM Org 24598	-62	-118	-56	-116	-73,7	42,2
5μM Org 24598	-320	-326	-6	-264	-233,2	30,8
5μM Org 24598	-166	-208	-42	-175,1	-169,2	5,9
5μM Org 24598	-363	-415	-52	-381,5	-348,7	32,8
5μM Org 24598	-150	-177	-27	-191	-183,3	7,8
Scheinapplikation	-331	-312	19	-336,8	-255,1	81,7
Scheinapplikation	-850	-977	-127	-1106,1	-950,5	155,6
Scheinapplikation	-152	-151	1	-165,4	-65,1	100,3
Scheinapplikation	-157	-307	-150	-372,6	-262	110,6
Scheinapplikation	-327	-373	-46	-352,8	-263,1	89,7
Scheinapplikation	-724	-653	71	-898,4	-874,4	24
Scheinapplikation	-567	-523	44	-481,4	-365,9	115,5

Tabelle 8 Darstellung von Rohdaten, welche den tonischen Grundstrom (pA) einer Nervenzelle vor und nach der Zugabe der jeweiligen Testsubstanz sowie vor und nach Zugabe von 1μM Strychnin zeigen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Proof-of-Principle-Studie wurde die Frage untersucht, ob und auf welche Weise Blocker von Glycin-Wiederaufnahmetransportern die Aktivität von Interneuronen und Motoneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks beeinflussen. Als Maß für die motoneuronale Aktivität wurde die Frequenz neurogener Muskelkontraktionen verwendet. Zur Bestimmung der Aktivität der Interneurone wurden extra- und intrazelluläre Messungen durchgeführt. Die Messelektroden wurden hierfür in Regionen im ventralen Teil der Gewebeschnitte positioniert, in denen keine Motoneurone vorkommen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit geben Aufschluss über die Rolle der Glycin-Wiederaufnahme im Hinblick auf die Kontrolle der motoneuronalen Aktivität in Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe. Org 25543 und Org 24598, welche jeweils selektiv den neuronalen beziehungsweise den glialen Glycin-Reuptake-Transporter hemmen, erwiesen sich selbst in Konzentration im nanomolaren Bereich als effiziente Inhibitoren der Muskelaktivität. Zudem beeinflussten beide Substanzen die Aktivität spinaler Interneurone signifikant, indem sie einen inhibitorischen tonischen Strom potenzierten. Auf der Grundlage dieser Befunde erscheint es unwahrscheinlich, dass Blocker von Glycin-Wiederaufnahmetransportern eine muskelrelaxierende Wirkung entfalten, indem sie primär die Motoneurone hemmen. Wahrscheinlich reduzieren sie auch den exzitatorischen Input, den die Motoneurone von den interneuronalen Netzwerken erhalten, was ebenfalls die muskelrelaxierende Wirkung dieser Pharmaka erklären kann. Letztere Hypothese muss jedoch durch Untersuchungen an identifizierten Motoneuronen überprüft werden.

4.1 Die Reuptake-Transporter GlyT1 und GlyT2 tragen zur Beseitigung von Glycin aus dem synaptischen Spalt bei

Der gliale Glycintransporter GlyT1 spielt eine fundamentale Rolle bei der Beseitigung von Glycin aus dem synaptischen Spalt und der Beendigung der

glycinerger Neurotransmission (Eulenburg et al., 2005). Der Anteil des neuronalen Glycintransporters GlyT2 an dieser Glycin-Clearance hingegen ist umstritten. So zeigten Gomeza und Mitarbeiter mithilfe intrazellulärer elektrophysiologischer Messungen an Nervengewebe aus Hirnstamm und Rückenmark, dass in GlyT2-knockout Mäusen keine postsynaptischen Events auftraten (Gomeza et al., 2003b; Eulenburg et al., 2005). Daraus schlossen Eulenburg und Mitarbeiter, dass die Ausschüttung von Glycin am präsynaptischen Endknöpfchen in GlyT2-knockout Mäusen erheblich beeinträchtigt ist und das Defizit von GlyT2 zu einer Verringerung der Glycinkonzentration im synaptischen Spalt und einem ineffektiven vesikulären Verpacken von Glycin im Cytosol des synaptischen Endknöpfchens und folglich zu einer Verminderung postsynaptischer IPSCs führt (Eulenburg et al., 2005). Eulenburg und Mitarbeiter folgern aus ihren Untersuchungen, dass GlyT2 keine maßgebliche Rolle bei der Beseitigung von Glycin aus dem synaptischen Spalt spielt (Eulenburg et al., 2005). Den Erkenntnissen der vorliegenden Studie wie auch den von Bradaia publizierten Untersuchungen (Bradaia et al., 2004) zufolge verhindert die Blockade des neuronalen Glycintransporters GlyT2 jedoch durchaus das Fortschaffen von Glycin aus dem synaptischen Spalt, da durch die Blockade des neuronalen Transporters mit Org 25543 eine erhöhte glycinerge Neurotransmission stattfindet, was sich in der verlängerten Abklingzeit glycinerner IPSCs widerspiegelt. Daraus lässt sich schließen, dass die Diffusion alleine nicht verantwortlich für die Räumung von Glycin aus dem synaptischen Spalt ist, sondern auch der neuronale Reuptake-Transporter aktiv dazu beiträgt. Weiterhin erweist sich das Modell von Knockout-Mäusen für die Untersuchung der Glycin-Clearance als ungeeignet, da sich durch den fehlenden Reuptake durch GlyT2 weniger Glycin in den präsynaptischen Vesikeln befindet als in der Gegenwart von GlyT2, somit auch nur eine geringe Menge von Glycin freigesetzt wird, welches zur Bestimmung der Clearance herangezogen werden kann. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass der gliale GlyT1 womöglich überexprimiert wird und die Voraussetzungen nicht mit einer in vivo-Situation gleichzusetzen ist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Clearance von Glycin wahrscheinlich nicht durch Diffusion alleine verläuft, sondern auch der neuronale GlyT2 vermutlich eine tragende Rolle bei der

Beseitigung Glycins aus dem synaptischen Spalt und der Beendigung der glycinergen Neurotransmission einnimmt.

4.2 Die Rolle des Glycin-Reuptake in der Modulation motoneuronaler und interneuroner Aktivität

Die Hemmung der Netzwerkaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks korreliert mit der durch Anästhetika-induzierten Immobilität (Jinks et al., 2008). Aus diesem Grund stellt das Vorderhorn des Rückenmarks eine vielversprechende Zielstruktur von zentral wirksamen Muskelrelaxantien dar (Eckle und Antkowiak, 2013). Die Abbildungen 15 und 17 zeigen, dass sowohl der neuronale als auch der gliale Reuptake-Blocker eine hochsignifikante Hemmung der muskulären Aktivität bewirkt. Auch auf interneuroner Ebene zeigen beide Reuptake-Blocker eine starke Reduktion der Aktionspotentialaktivität spinaler Vorderhornneurone. Wahrscheinlich tragen also Interneurone maßgeblich zu der Muskelrelaxation bei, welche durch eine Hemmung der Glycin-Wiederaufnahme bewirkt wird. Die Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598 induzierten im mikromolaren Konzentrationsbereich eine maximale Inhibition der spontanen Feuerrate spinaler Neurone um 80% (Abbildung 20 und 22). Verglichen damit erreichte das intravenös verabreichte Anästhetikum Etomidat bei einer Konzentration von mehr als 1 μM eine Inhibition des interneuronalen Netzwerks von 60%, welche Immobilität hervorruft (Grasshoff et al., 2007). Eine Hemmung von 50-60% erreichten die Glycin-Reuptake-Blocker bereits in nanomolarer Konzentration (Abbildung 20A und 22A).

Somit lässt sich aus der vorliegenden Arbeit schließen, dass Org 25543 und Org 24598 bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich eine Verminderung des Glycin-Reuptakes bewirken, die zu einer signifikanten Hemmung der motoneuronalen und interneuronalen Aktivität und zu einer Muskelrelaxation in den Gewebekulturen führt. Mit diesen Untersuchungen wurde erstmalig der Nachweis erbracht, dass Org 25543 und Org 24598 muskelrelaxierende Eigenschaften

besitzen, was die Möglichkeit eröffnet, neuartige muskelrelaxierende Medikamente zu entwickeln, deren Wirkung auf einer Blockade des Glycin-Reuptakes basiert.

4.3 Org 25543 und Org 24598 modulieren synaptische Neurotransmission und interneuronale Netzwerkaktivität unterschiedlich

Der neuronale und der gliale Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598 weisen Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung auf die glycinerge synaptische Transmission auf. Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen der Hypothese Eulenburgs und Mitarbeiter, dass die Blockade von GlyT2 eine Herabsetzung der glycinergen Neurotransmission hervorrufen würde (Eulenburg et al., 2005). Bradaia und Mitarbeiter zeigten bereits, dass sowohl der neuronale Reuptake-Blocker Org 25543 und der gliale Reuptake-Blocker Org 24598 in einer jeweiligen Konzentration von 10 μM eine Herabsetzung des Grundstroms um -10/-50 pA in der postsynaptischen Zelle induzieren (Bradaia et al., 2004). Die vorliegende Studie replizierte dieses Erkenntnis mit der Ergänzung, dass auch in einer Konzentration von 5 μM Org 25543 und 5 μM Org 24598 und für den neuronalen Reuptake-Blocker Org 25543 sogar von 320 nM eine tonische inhibitorische Neurotransmission mit einer Herabsetzung des Grundstroms um -30/-52 pA stattfindet (Abbildung 29). Tonische Inhibition wird über extrasynaptische Glycinrezeptoren vermittelt, während phasische Inhibition synaptisch verläuft (Eckle und Antkowiak, 2013). Daraus lässt sich schließen, dass durch eine Blockade des Glycin-Reuptakes wahrscheinlich hauptsächlich extrasynaptische Rezeptoren aktiviert werden, was zur Herabsetzung der Aktivität und Erregbarkeit der spinalen Neurone führt. Unterschiede weisen die Reuptake-Blocker jedoch in der durch Synapsen vermittelten phasischen Übertragung inhibitorischer Signale auf. So wies eine Studie an Interneuronen in Lamina X des Rückenmarks nach, dass sowohl Org 25543 als auch Org 24598 in einer Konzentration von 10 μM die Abklingzeit glycinerner IPSCs verlängern, jedoch lediglich Org 25543 die Frequenz elektrisch evozierter IPSCs vermindert, während Org 24598 die Frequenz

unbeeinflusst lässt (Bradaia et al., 2004). Im Gegensatz hierzu zeigte eine weitere Studie mit 10 μM des glialen Blockers Org 24598 eine verlängerte Abklingzeit und erhöhte Amplitude von IPSCs (Beato, 2008). Die vorliegende Studie konnte diese Effekte des glialen Reuptake-Blockers in einer Konzentration von 5 μM nicht nachweisen (Abbildung 35). Stattdessen jedoch zeigte der neuronale Reuptake-Blocker in einer Konzentration von 5 μM eine statistisch signifikante Verlängerung der Abklingzeit und in einer Konzentration von 320 nM eine erhöhte IPSC-Frequenz (Abbildung 25A, B; Abbildung 24E,F). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der neuronale Reuptake-Blocker vermutlich neben einer tonischen in einem gewissen Umfang auch die phasische Inhibition potenziert, während der gliale Reuptake-Blocker jedoch überwiegend eine tonische Inhibition verursacht. Erklärt werden kann die tonische Inhibition durch Org 24598 dadurch, dass der Glycintransporter GlyT1 eine weitere Entfernung zu der glycinergen Synapse aufweist, da er sich in Gliazellen befindet (Legendre, 2001), während sich der neuronale GlyT2 in direkter Synapsenumgebung befindet. Dadurch lässt sich die Verlängerung der phasischen Inhibition nach Blockade des neuronalen Transporters GlyT2 erklären. Insgesamt ist jedoch festzustellen, dass unser Verständnis der Rolle der Reuptake-Transporter in der phasischen Neurotransmission unvollständig ist und weitere Studien erforderlich erscheinen.

Ein weiterer Aspekt, in dem sich die beiden getesteten Substanzen unterscheiden, ist die aktivitätsabhängige Wirkung auf der Ebene des interneuronalen Netzwerks. Ein aktivitätsabhängiger Effekt bedeutet, dass die Hemmung der spinalen Interneurone stärker ist, je höher die neuronale Grundaktivität ist. Begründet werden kann dies mit der erhöhten Freisetzung des Neurotransmitters Glycin, welche mit der Gesamtaktivität des neuronalen Gewebes positiv korreliert. Interessanterweise wirkt der neuronale Reuptake-Blocker Org 25543 aktivitätsabhängig, während sich der gliale Reuptake-Blocker Org 24598 von der neuronalen Grundaktivität unbeeinflusst verhält (Tabelle 5). Eine Aktivitätsabhängigkeit ist für die klinische Anwendung von Substanzen im Bereich der Anästhesiologie von Vorteil, da die Inhibition spontaner Aktionspotentialaktivität abhängig von der Intensität des Schmerzstimulus verläuft.

4.4 Interpretation Strychnin-sensitiver tonischer Ströme in Gegenwart der Glycin-Reuptake-Blocker

Die Ergebnisse der Experimente zu den Strychnin-sensitiven tonischen Strömen zeigen, dass in Gegenwart der beiden Reuptake-Blocker der Strychnin-sensitive tonische Strom geringer als in der Scheinapplikationsgruppe ist. Dieser Unterschied ist in der Einfaktoriellen ANOVA statistisch nicht signifikant, jedoch nach qualitativer Betrachtung der Daten (Tabelle 6, Spalte „ ΔGS_{stry} “) deutlich. In der Scheinapplikationsgruppe beträgt dieser Strom ca. 100 pA, in Gegenwart der hohen Konzentrationen der Reuptake-Blocker jedoch nur ca. 30 pA. Die Tatsache, dass die niedrigere Konzentration (320 nM) von Org 25543 mit 55 pA zwischen diesen Werten liegt, geht damit konform. Diese Ergebnisse überraschen umso mehr, da die beiden Reuptake-Blocker den tonischen Strom zunächst erhöhen. Aufgrund dieses Befundes wäre zu erwarten gewesen, dass der Strychnin-sensitive tonische Strom in Gegenwart der Reuptake-Blocker größer, und nicht geringer sein sollte als in der Sham-Gruppe.

Folgende Hypothese wird vorgeschlagen um diese Befunde zu erklären: Die Blockade der Glycin-Wiederaufnahme durch glycinerge Neurone und Gliazellen führt initial und kurzzeitig zu einer Steigerung der tonischen Glycin-vermittelten Inhibition, die aber eine rasche Adaptation nach sich zieht. Der Mechanismus dieser Adaptation ist unbekannt. Es könnte sich beispielsweise um eine Desensibilisierung von Rezeptoren oder um ein Ausspülen des Neurotransmitters aus unserem Testsystem bei ungenügender Neusynthese handeln. Aus diesen Gründen ist der Strychnin-sensitive tonische Strom bei geblocktem Reuptake geringer als bei intakter Wiederaufnahme.

Auch Ergebnisse der extrazellulären Multi-Ableitungen enthalten einen Hinweis auf Adaptationsprozesse, die bei geblocktem Glycin-Reuptake ablaufen. Sowohl bei Behandlung der Gewebeschnitte mit Org 25543 oder Org 24598 kann der Effekt der im gleichen Experiment zunächst applizierten niedrigeren Konzentration (160 bzw. 70 nM) nicht durch die nachfolgende Applikation einer höheren Konzentration (320 bzw. 140) gesteigert werden (Abbildung 36 A und Abbildung

37 A). Dieser Befund kann nicht durch einen Sättigungseffekt erklärt werden, da die erstmalige Applikation von 5000 nM zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Multi-Unit-Aktivität führt (Abbildung 38 B und Abbildung 39 B).

Wieso aber kann bei einer Reduktion der tonischen Inhibition in Gegenwart der Glycin-Reuptake-Blocker die Multi-Unit-Aktivität reduziert werden? Hierzu ist zu sagen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen den Resultaten der intrazellulären und extrazellulären Messungen nicht hergestellt werden darf, da diese Experimente unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden. Während der intrazellulären Experimente mussten zur Isolierung der glycinergen Ströme GABA- und Glutamat-Rezeptoren geblockt werden. Unter diesen Bedingungen wird die Aktivität registriert, die ein pharmakologisch isoliertes Netzwerk glycinerner Interneurone erzeugt, die überwiegend über glycinerge Synapsen und Gap junctions kommunizieren. Während der extrazellulären Experimente waren glutamaterge und GABAerge Synapsen jedoch intakt.

4.5 Die mögliche Bedeutung der Glycin-Wiederaufnahme-Blockade für die Anästhesie

Im Folgenden soll der anfangs gestellten Frage nachgegangen werden, inwiefern den Glycin-Reuptake-Blockern Org 25543 und Org 24598 in der intravenösen Anästhesie ein möglicher Nutzen zugesprochen werden kann.

Da die glycinerge Neurotransmission maßgeblich an der Schmerzweiterleitung und der Kontrolle des Bewegungsapparates beteiligt ist, dürfte die Modulation der Glycinrezeptoraktivität ein sinnvolles Prinzip für neue Schmerzmittel und Muskelrelaxantien darstellen, die auf Rückenmarksebene wirken (Laube, 2002). Glycinerge Neurone haben Anteil an der Schmerzweiterleitung, indem sie Glycin an Schmerzfasern freisetzen und diese dadurch inhibieren (Fratev, 2019). Neuropathische Schmerzmodelle zeigten bereits einen potenziellen antiallodynischen Effekt neuronaler und glialer GlyT-Inhibitoren (Morita et al., 2008; Tanabe et al., 2008; Hermanns et al., 2008). Morita und Mitarbeiter untersuchten die

Glycin-Reuptake-Blocker in verschiedenen Schmerzmodellen (Morita et al., 2008). Zum einen wurde der Ischiasnerv der Mäuse mithilfe einer Seidennaht teilweise legiert (Seltzer-Modell). Weiterhin wurde mithilfe des kompletten Freund-Adjuvans (*englisch: CFS*) ein chronisches Inflammationsmodell induziert. Außerdem wurde mit einer Applikation von Streptozocin in den Mäusen Diabetes verursacht, woraufhin die Mäuse für 14 Tage an Allodynie erkrankten. Unter Allodynie versteht man eine erhöhte Schmerzempfindung ausgelöst durch eine Stimulation nicht-nozizeptiver Nervenfasern (Zeilhofer et al., 2018). Der Ursprung der Allodynie liegt immer im zentralen Nervensystem (Zeilhofer et al., 2018). In allen drei Schmerzmodellen konnten antiallodynische Wirkungen durch GlyT1-Inhibitoren und auch durch den GlyT2-Inhibitor Org 25543 nachgewiesen werden (Tabelle 6). Diese analgetische Wirkung entfaltete sich im Falle des GlyT2-Inhibitors Org 25543 und anderen GlyT1-Inhibitoren als Org 24598 weitaus potenter und länger anhaltend als die des bei neuropathischen Schmerzen eingesetzten Arzneistoffs Gabapentin (Morita et al., 2008). Org 25543 zeigte zudem einen dosisabhängigen antiallodynischen Effekt und wirkte ohne ein Auftreten von Hyperreflexie, eine durch Mutation der α 1- oder β -Untereinheit des Glycinrezeptors verursachte neurologische Erkrankung (Morita et al., 2008). Die antinozizeptorische Wirkung der neuronalen und glialen Reuptake-Blocker entfaltete sich ab dem vierten postoperativen Tag und wurde durch eine intrathekale Injektion mit Strychnin, einem kompetitiven Antagonisten am Glycinrezeptor, aufgehoben (Morita et al., 2008). Dies bedeutet, dass die zu beobachtende antiallodynische Aktion durch Glycinrezeptoren im Rückenmark zustande kommt. Durch GlyT1-Inhibitoren verursachte antiallodynische Effekte werden über den Glycinrezeptor GlyR α 3 vermittelt, welcher sich im Hinterhorn des Rückenmarks befindet (Morita et al., 2008). In einem Formalin-induzierten Schmerzmodell inhibierten GlyT1-Blocker das in der zweiten Phase (10-40 Minuten nach Formalin-Applikation) auftretende Beißverhalten der Mäuse (Tanabe et al., 2008). Auch in dieser Studie wurde die Wirkung von GlyT1-Inhibitoren im Seltzer Modell und im Modell des diabetischen neuropathischen Schmerzes untersucht. Hier traten bereits nach 15 Minuten analgetische Effekte auf (Tanabe et al., 2008). Thermische und

mechanische Hypersensibilität wurden aufgrund der erhöhten Glycinkonzentration reduziert (Tanabe et al., 2008).

Die analgetische Wirkung von GlyT1-Inhibitoren wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert (Mostyn et al., 2019). So zeigten GlyT1-Inhibitoren eine anfängliche Verstärkung von Schmerzsignalen, bevor eine analgetische Wirkung eintrat (Morita et al., 2008). Dies spiegelte sich in einer zeitverzögernden Wirkung der getesteten GlyT1-Inhibitoren wider, wohingegen Org 25543 ohne Zeitverzögerung wirkte. Dies kann auf den möglichen sekundären Effekt glialer Reuptake-Blocker, glutamaterge Neurotransmission zu verstärken, zurückzuführen sein (Whitehead et al., 2004).

Der Vergleich analgetischer Wirkungen zwischen Org 25543 und Org 25498 ist schwierig, da die bisherige Studienlage zu potenziell analgetischen Wirkungen von Org 24598 beschränkt ist, während bereits mehrere Studien vorliegen, welche eine potenzielle analgetische Wirkung des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 nachweisen (Dohi et al., 2009; Morita et al., 2008).

Grasshoff und Mitarbeiter haben die Frage untersucht, welchem Mechanismus die eher ineffektive Reduktion der Muskelaktivität durch intravenöse Anästhetika zugrunde liegen könnte (Grasshoff et al., 2007). Sie fanden heraus, dass die limitierten muskelrelaxierenden Eigenschaften des intravenösen Anästhetikums Etomidat vermutlich auf einem präsynaptischen Mechanismus basieren (Grasshoff et al., 2007). Die muskelrelaxierenden Wirkungen von Etomidat werden überwiegend über den präsynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptor mit β 3-Untereinheit vermittelt (Grasshoff et al., 2007). Somit lässt sich das häufige Auftreten motorischer Reaktionen während chirurgischer Eingriffe mit TIVA erklären. Die Blockade der Glycin-Wiederaufnahme erwies sich bisher auch mit anderen GlyT-Blockern wie beispielsweise ALX 1393 als vielversprechender Mechanismus, um die Aktivität spinaler Motoneurone zu dämpfen (Eckle und Antkowiak, 2013). Doch die Erkenntnis, dass die Blockade des neuronalen sowie des glialen Glycintransporters durch Org 25543 und Org 24598 zu einer erheblichen Reduktion der Muskelaktivität führt, ist neu. Die Kombination aus möglichem analgetischem Effekt und der aus dieser Studie hoch signifikanten muskelrelaxierenden

Wirkung von Org 25545 und Org 24598 machen diese Wirkstoffe interessant für die Anästhesie: Die beiden Reuptake-Blocker sind vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von zentral wirkenden Muskelrelaxantien, welche, kombiniert mit intravenösen Anästhetika, zur Reduktion intraoperativer Bewegungen beitragen können. Weitere Eigenschaften der getesteten Org-Komponenten sind anästhetisch vorteilhaft: So dürften der gliale, vor allem aber der neuronale, Reuptake-Blocker nicht zur Sedierung des Patienten beitragen und das postoperative Erwachen nicht beeinflussen, da der neuronale GlyT2 weitestgehend in Rückenmark und Hirnstamm exprimiert ist. Der gliale GlyT1 hingegen ist auch in anderen Regionen des ZNS zu finden. Die spezifischere Lokalisation von GlyT2 im ZNS lässt im direkten Vergleich zu GlyT1 außerdem eventuell auf geringere Nebenwirkungen schließen (Dohi et al., 2009). Nicht zuletzt ist die aktivitätsabhängige Wirkung von Org 25543 (Tabelle 5) für die klinische Verwendung vorteilhaft. Insgesamt lässt sich also auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse schließen, dass der neuronale Reuptake-Blocker als potenzielles Muskelrelaxans in der Klinik mehr Vorteile aufweisen könnte als der gliale Reuptake-Blocker.

Welche potenziellen Nebenwirkungen sollten in Betracht gezogen werden?

Das Target von Org 25543 und Org 24598 ist der Glycinrezeptor, welcher an diversen lebensnotwendigen Prozessen wie der somatosensorischen Verarbeitung, Kontrolle der Muskelkraft, motorischen Koordination, respiratorischen Kontrolle, visuelle Wahrnehmung, und der akustischen und olfaktorischen Verarbeitung beteiligt ist (Zeilhofer et al., 2018). Diese Diversität an potenziellen Nebenwirkungen ist auf die Lokalisierung der Glycintransporter im Hirnstamm und der Retina zurückzuführen. Insbesondere eine mögliche Atemdepression könnte eine problematische Nebenwirkung darstellen, wenn Patienten im Rahmen einer Sedierung oder Anästhesie nicht künstlich beatmet werden. So zeigten GlyT1-Knockout Mäuse Atemwegsbeschwerden (Gomez et al., 2003a). Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass die Nebenwirkungen, die mit Aktivierung des Glycinrezeptors auftreten, geringfügiger ausfallen als dies bei anderen Targets wie dem GABAergen System der Fall ist, da sich die Glycintransporter, insbesondere der neuronale GlyT2, nicht im zerebralen Cortex befindet (Zeilhofer et al., 2018).

GlyT1 hingegen befindet sich weitläufiger im ZNS und könnte somit auch Einfluss auf das Erinnerungsvermögen und das Bewusstsein haben.

Studie	Schmerzmodell	GlyT1 Inhibitoren	GlyT2 Inhibitoren
(Morita et al., 2008)	Seltzer-Modell	+++	+++
	Chronisches Inflamationsmodell	+++	+++
	Diabetisches neuropathisches Modell	+++	+++
(Tanabe et al., 2008)	Formalin-Test (2. Phase)	++	++

Tabelle 9 Zusammenfassung antinozizeptorischer Wirkungen glycinergere Reuptake-Inhibitoren in chronischen und akuten Schmerzmodellen in Mäusen. Die Anzahl an +-Zeichen gibt die Stärke des anti-allodynschen Effekts an. Modifiziert nach Dohi (Dohi et al., 2009)

4.6 Glutamaterge Neurotransmission als sekundärer Effekt von Org 24598

Im Vorderhirn wird GlyT1 in Gliazellen, jedoch auch in prä- und postsynaptischen glutamatergen Neuronen mit einer hohen Dichte an NMDA-Rezeptoren, exprimiert (Cioffi, 2018). Daher liegt die Vermutung nahe, dass mit einer Blockade von GlyT1 auch die glutamaterge Neurotransmission gesteigert wird, da Glycin als Coagonist an NMDA-Rezeptoren wirkt (Cioffi, 2018). Die bereits erwähnten kontroversen Effekte bezüglich der Analgesie unter GlyT1-Inhibitoren könnten auf dieses Phänomen zurückzuführen sein. Einige Studien unterstützen diese These (Whitehead et al., 2004; Bradaia et al., 2004).

Whitehead und Mitarbeiter wiesen eine erhöhte Citrullinkonzentration in Anwesenheit von Org 24598, aber nicht in Anwesenheit des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543, nach. Erhöhte extrazelluläre Citrullinwerte sind ein Indikator einer erhöhten NOS-Aktivität und einer dadurch assoziierten erhöhten NMDA-Rezeptoraktivität (Whitehead, 2004). 10 µM Org 24598 zeigte eine, wenn auch statistisch nicht signifikante, Tendenz von Glutamatausschüttung (Whitehead et al., 2004). Geringere Konzentrationen von Org 24598 (1 µM und 0,1 µM) hingegen zeigten keinen Effekt auf die Glutamatausschüttung (Whitehead, 2004).

Die exzitatorische Rolle Glycins wurde aufgrund der hohen extrazellulären Glycinkonzentration von 5-10 μM , welche eine Sättigung der NMDA-Rezeptoren wiederzugeben scheint, infrage gestellt (Whitehead, 2001). Nachfolgende Studien zeigten jedoch, dass die allosterische Glycin-Bindungsstelle am NMDA-Rezeptor nicht gesättigt ist und die glutamaterge Neurotransmission durch eine erhöhte intrasynaptische Glycinkonzentration moduliert werden kann (Whitehead, 2004). Dies dient offenbar als Schutzmechanismus, damit die intrazelluläre Glycinkonzentration nicht die der zerebralen Spinalflüssigkeit erreicht (Whitehead, 2004). Auch in vitro Experimente mit Org 24598 zeigten eine erhöhte glutamaterge Transmission. Glutamaterge eIPSCs wiesen eine signifikant vergrößerte Amplitude und eine Verlängerung der Abklingzeit in Anwesenheit von 10 μM Org 24598 auf (Bradaia et al., 2004; Beato, 2008). Aus diesen Gründen könnten GlyT1-Inhibitoren von therapeutischem Nutzen sein, um psychische Krankheiten wie Schizophrenie zu behandeln. Ein Isomer von Org 24598 verbesserte bereits Schizophrenie-assoziierte Symptome in Mäusen (Harsing, 2003). Aktuelle klinische Studien mit GlyT1-Inhibitoren zeigten jedoch keine Verbesserung von Schizophrenie-Symptomen (Singer et al., 2015; Zeilhofer et al., 2018).

Andererseits ist auch bekannt, dass ein kontinuierliches Binden von Glycin am NMDA-Rezeptor wahrscheinlich eine NMDA-Rezeptor-Internalisierung hervorruft (Nong et al., 2003). Erhöhte Glycinkonzentrationen durch die Blockade eines GlyT1-Inhibitors und durch Zugabe von Glycin (100 μM) führte zu einer lediglich kurzzeitigen Potenzierung der NMDA-Rezeptor-Aktivität, welche gefolgt von einer progressiven Reduktion dieser Ströme war (Martina et al., 2004). Diese Ergebnisse wurden auf eine NMDA-Rezeptor-Internalisierung zurückgeführt (Martina et al., 2004). Im Falle einer NMDA-Rezeptor-Internalisierung würden die durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors verursachten pronozzeptorischen Effekte unterdrückt werden (Dohi et al., 2009).

Der Zusammenhang zwischen der GlyT1-Inhibition und glutamaterger Neurotransmission bleibt unklar. In der vorliegenden Studie konnte keinerlei exzitatorische Wirkung mit Blockade des glialen Glycintransporters, sondern eine hoch signifikante Reduktion auf interneuronaler und motorischer Ebene festgestellt

werden. Sensorische Hinterhornneurone reagieren sensitiver auf pharmakologische Einflüsse als Motoneurone (Dohi et al., 2009). Möglicherweise sind daher auch glutamaterge Neurone im Hinterhorn empfänglicher für die durch die Reuptake-Blockade verursachte Erhöhung des extrazellulären Glycin-Pegels als im Vorderhorn des Rückenmarks. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bindungsstellen von Glycin an NMDA-Rezeptoren an glutamatergen Synapsen im Hinterhorn des Rückenmarks weniger mit Glycin gesättigt sind als im Vorderhorn. Dies könnte die Verstärkung der glutamatergen Neurotransmission durch GlyT1-Reuptake-Blocker in Schmerzmodellen im Gegensatz zu der signifikanten Inhibition im Vorderhorn des Rückenmarks erklären. Eindeutige Hinweise, die für diese Hypothese sprechen, existieren in der Literatur jedoch nicht.

4.7 Anwendungsgrenzen der vorliegenden Arbeit

Durch das verwendete Modellsystem ergeben sich Einschränkungen bezüglich der Schlussfolgerungen, in welcher Weise eine Blockade der Glycin-Wiederaufnahme die glycinerge Transmission im Rückenmark beeinflusst.

So wurden während der elektrophysiologischen Experimente die Gewebsschnitte kontinuierlich mit ACSF perfundiert. Dies kann eventuell erklären, dass die jeweils zweite Drogenapplikation in den extrazellulären Ableitungen keine konzentrationsabhängige Wirkung verglichen mit der ersten Drogenapplikation zeigte. In den Abbildungen 20 und 22 ist dargestellt, dass die normalisierte Feuerrate der zweiten Applikation beider Org-Komponenten höher ist als die der ersten Applikation, obwohl es sich bei der zweiten Applikation jeweils um eine höhere Konzentration handelt und zu erwarten wäre, dass ein höher konzentrierter Reuptake-Blocker auch eine stärkere Hemmung erzielen kann. Dieses Phänomen kann mit einem Auswaschen von Glycin aus dem Testsystem durch den kontinuierlichen Strom des Perfusats in Zusammenhang stehen. Da bereits die jeweils niedrigen Konzentrationen der Reuptake-Blocker eine hoch signifikante Hemmung der interneuronalen Aktionspotentialaktivität erzeugen, lässt sich schließen, dass während der Blockade des Glycin-Reuptakes die synaptische und extrasynaptische Glycinkonzentration erhöht ist. Das Glycin, welches durch die

Gliazellen und Neuronen nicht aufgenommen wird, könnte durch den Perfusionsstrom aus dem Testsystem teilweise entfernt werden. Somit wäre zu dem Zeitpunkt der zweiten Drogenapplikation weniger Glycin verfügbar, um Strychnin-sensitive Glycinrezeptoren zu aktivieren. Um diese Hypothese zu testen, müssten extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen mit der jeweils höheren Konzentration unter Auslassung der ersten, niedriger konzentrierten Drogenapplikation über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Warum sich dieses Phänomen nicht bei den Änderungen der Muskelaktivität zeigt (Abbildung 15 und 17) bleibt ungeklärt.

Weiterhin ergaben die Ergebnisse der extra- und Intrazellulären Messungen mit Org 25543 verschiedenartige Befunde. Die extrazellulären Messungen unter Org 25543 zeigten eine Verringerung der Feuerrate spinaler Interneurone, während die erhobenen Befunde der intrazellulären Messungen unter 320nM Org 25543 eine signifikante Abnahme der IPSC-Frequenz um 56% ergaben. Man würde bei einer erhöhten Glycin-Konzentration im synaptischen Spalt eine Erhöhung der IPSC-Frequenz durch eine vermehrte Aktivierung spinaler inhibitorischer Interneurone erwarten. Die Begründung der Korrelation dieser Befunde bleibt unklar. Mit den vorliegenden Experimenten ist keine Kausalität zwischen intra- und extrazellulären Messungen bewiesen.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Untersuchungen besteht darin, dass keine Patch-Clamp-Ableitungen an Motoneuronen durchgeführt worden sind. Dies hatte verschiedene Gründe. Eine zweifelsfreie Identifizierung der Motoneurone in den in Abbildung 9 rot markierten Arealen war aufgrund ausschließlich morphologischer Kriterien schwierig. Des Weiteren war es in Präparaten mit Motoneuronen und ausgeprägter Muskelaktivität nicht möglich Patch-Clamp-Ableitungen über längere Zeiträume stabil zu halten.

4.8 Die GlyT2-Blockade als mögliche Alternative zur Behandlung akuter Rückenschmerzen

Die Verabreichung von Medikamenten mit muskelrelaxierenden Wirkungen ist auch an anderen Stellen der medizinischen Versorgung von Patienten mit

Problemen behaftet: Zur Behandlung akuter unterer Rückenschmerzen werden bisher unter anderem Benzodiazepine herangezogen, welche jedoch unerwünschte sedierende Effekte wie Benommenheit und Lethargie mit sich bringen (Griffin et al., 2013). Benzodiazepine haben ihre Bindungsstelle an GABA_A Rezeptoren und üben dort einen positiven allosterischen Effekt aus (Tan et al., 2011). In Schmerzzuständen, welche gepaart mit erhöhtem Muskeltonus auftreten, können muskelrelaxierende Eigenschaften von Medikamenten von Vorteil sein (Zeilhofer et al., 2018). Da es sich bei der Behandlung akuter Rückenschmerzen nicht um operative Eingriffe handelt, ist es ebenfalls von Vorteil, den Bewusstseinszustand des Patienten unbeeinflusst zu lassen. Es ist bekannt, dass Sedierung über das kortikale Netzwerk vermittelt wird (Rudolph und Antkowiak, 2004; Eckle und Antkowiak, 2013). Daher wird zumindest von der Blockade des neuronalen GlyT2 erwartet, dass dieser Effekt ausbleibt (Eckle und Antkowiak, 2013). Org 25543 stellt daher neben anderen neuronalen Reuptake-Blockern in der Behandlung akuter Rückenschmerzen eine potenzielle Alternative zu Benzodiazepinen dar.

4.9 Ausblick

Da die glycinerge Neurotransmission eine modulierende Rolle in der Schmerzweiterleitung und der Regulation der Lokomotion einnimmt, ist die Modulation der Glycinrezeptoraktivität wahrscheinlich ein nützliches Prinzip für neue zentral wirkende Muskelrelaxantien, die im Rahmen der anästhesiologischen Versorgung von Patienten Verwendung finden könnten (Laube et al., 2002; Eckle und Antkowiak, 2013). Die vorliegende Studie konnte die muskelrelaxierende Wirkung, welche über spinale Interneurone und Motoneurone vermittelt wird, mithilfe der beiden Glycin-Reuptake-Blocker Org 25543 und Org 24598 nachweisen. Um die praktische Anwendbarkeit der Org-Substanzen für die Anästhesie einschätzen zu können, werden weitere Studien benötigt, welche die genauen Eigenschaften in vivo definieren. Beispielsweise ist nicht nachgewiesen, dass ausschließlich spinale Interneurone für das Zustandekommen der Muskelrelaxation durch den Glycin-Reuptake-Block verantwortlich sind. Daher bedarf es weiterer

Studien, welche beispielsweise den Anteil der lokalen glycinergen Inhibition durch Renshaw-Zellen untersuchen. Außerdem wäre es sinnvoll, anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve der beiden Org-Substanzen eine noch geringere Konzentration als 70 nM für den glialen bzw. 160 nM für den neuronalen Reuptake-Blocker auf das Kokulturmodell anzuwenden. Weiterhin ist nicht bekannt, wie die Reuptake-Blocker in Anwesenheit mit klinisch verwendeten Anästhetika wie Propofol wirken. Diesbezüglich ergäbe sich die Frage, ob und inwiefern sich bei einer Kombination aus zentral und peripher wirkenden Muskelrelaxantien ein additiver muskelrelaxierender Effekt ergeben würde. Die analgetische Wirkung beider Org-Substanzen, insbesondere die des glialen Reuptake-Blockers Org 24598, ist ebenfalls noch nicht geklärt. Zukünftige Studien sollten sich außerdem mit möglichen Nebenwirkungen wie der Atemdepressivität der Org-Substanzen auseinandersetzen.

5 Zusammenfassung

Während chirurgischer Eingriffe wird immer häufiger auf die totale intravenöse Anästhesie (TIVA) zurückgegriffen, um bei Patienten einen narkotisierten Zustand hervorzurufen. Jedoch kommt es unter Propofol, welches während der TIVA als Hypnotikum verabreicht wird, doppelt so häufig zu unerwünschten motorischen Reaktionen wie unter dem volatilen Anästhetikum Sevofluran (Watson und Shah, 2000). Das Auftreten motorischer Aktivität und intraoperativer Schmerzen steht im Zusammenhang, da Schmerzstimuli motorische Aktivität über das zentrale Nervensystem (ZNS) induzieren. Daher ist es sinnvoll, zentral wirkende Muskelrelaxantien während der Anästhesie zu verwenden, um sowohl postoperative Schmerzen als auch intraoperative Bewegungen zu reduzieren. Als Schaltzentrale zur Generierung motorischer Reaktionen dient das Vorderhorn des Rückenmarks, in dem überwiegend das glycinerge Rezeptorsystem an der immobilisierenden Wirkung volatiler Anästhetika beteiligt ist (Zhang et al., 2003). Die vorliegende Studie untersucht die Frage, inwiefern eine verstärkte glycinerge Neurotransmission durch eine Glycin-Reuptake-Blockade zu einer Modulation der neuronalen Aktionspotentialaktivität im Vorderhorn des Rückenmarks und einer Veränderung der motorischen Aktivität führt. Die Glycin-Wiederaufnahme-Blocker Org 25543 und Org 24598 sind selektive Inhibitoren für den neuronalen beziehungsweise den glialen Glycintransporter und wurden für diese Studie als pharmakologische Modulatoren genutzt, da sie bereits in vergangenen Studien auch als potenzielle Analgetika getestet wurden (Morita et al., 2008; Tanabe et al., 2008). Als Modellsystem dienten Kokulturen aus Rückenmark- und Muskelgewebe, an denen intra- und extrazelluläre elektrophysiologische Experimente durchgeführt wurden. Beide Reuptake-Blocker erwiesen sich in nanomolaren Konzentrationen als effiziente Inhibitoren der Muskelaktivität (muskuläre Aktivitätshemmung >33%). Zudem dämpften beide Substanzen die Feuerrate spinaler Interneurone signifikant mit einer prozentualen Inhibition von 50-60% in nanomolarer und 80% in mikromolarer Konzentration. Intrazelluläre Ableitungen mit 5 μM des neuronalen Reuptake-Blockers Org 25543 ergaben eine Reduktion der

IPSC-Frequenz um 56% und eine Zunahme der Abklingzeit glycinerner IPSCs um 33%. Die Applikation von 320 nM Org 25543 wies keine signifikanten Änderungen der IPSC-Kinetik auf, jedoch stieg die IPSC-Frequenz um 91%. Die Wirkung des glialen Reuptake-Blockers Org 24598 ist für die Kinetik und Frequenz der IPSCs nur von geringer Bedeutung. Beide Reuptake-Blocker induzieren einen tonischen inhibitorischen Strom. Die beiden Org-Komponenten unterscheiden sich in zwei Eigenschaften: Während der neuronale Reuptake-Blocker Org 25543 die neuronale Feuerrate aktivitätsabhängig inhibiert, weist der gliale Reuptake-Blocker Org 24598 keine aktivitätsabhängige Wirkung auf. Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass der neuronale Reuptake-Blocker phasisch und tonisch potenziert, der gliale Reuptake-Blocker jedoch in dieser Studie ausschließlich die tonische Inhibition verstärkt. Die vorliegende Dissertation zeigt erstmalig, dass die beiden Org-Substanzen muskelrelaxierend wirken und die Feuerrate von Interneuronen im ventralen Horn dämpfen.

Sowohl der neuronale als auch der gliale Reuptake-Blocker erweisen sich als aktivitätsreduzierende Substanzen auf Ebene der Interneurone im ventralen Teil des Rückenmarks. Beide Reuptake-Blocker besitzen muskelrelaxierende Eigenschaften, welche, mit intravenösen Anästhetika kombiniert, zur Reduzierung intraoperativer Bewegungen beitragen könnten. Zu klären bleibt jedoch die Frage, ob die untersuchten Substanzen auch die Motoneurone direkt hemmen oder ob die reduzierte motoneuronale Aktivität aus einer verminderten Erregung der Motoneurone durch die Interneurone resultiert. Darüber hinaus stellt der neuronale Reuptake-Blocker Org 25543 wegen seiner möglichen analgetischen Wirkung eine interessante Ergänzung zu intravenösen Opioiden dar und trägt somit eventuell zu der Linderung postoperativer Schmerzen bei.

6 Literaturverzeichnis

- Aprison, M. H., Shank, R. P., Davidoff, R. A. und Werman, R. 1968. The distribution of glycine, a neurotransmitter suspect in the central nervous system of several vertebrate species. *Life Sciences*, 7, 583-590.
- Beato, M. 2008. The time course of transmitter at glycinergic synapses onto motoneurons. *J Neurosci*, 28, 7412-25.
- Bradaia, A., Schlichter, R. und Trouslard, J. 2004. Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *J Physiol*, 559, 169-86.
- Braschler, U. F., Iannone, A., Spenger, C., Streit, J. und Liischer, H.-R. 1989. A modified roller tube technique for organotypic cocultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 29, 121-129.
- Caulfield, W. L., Collie, I. T., Dickins, R. S., Epemolu, O., McGuire, R., Hill, D. R., McVey, G., Morphy, J. R., Rankovic, Z. und Sundaram, H. 2001. The first potent and selective inhibitors of the glycine transporter type 2. *J Med Chem*, 44, 2679-82.
- Cioffi, C. L. 2018. Modulation of Glycine-Mediated Spinal Neurotransmission for the Treatment of Chronic Pain. *J Med Chem*, 61, 2652-2679.
- Collins, J. G., Kendig, J. J. und Mason, P. 1995. Anesthetic actions within the spinal cord: contributions to the state of general anesthesia. *Trends Neurosci.*, 18, 549-553.
- Curtis, D. R., Game, C. J. A., Lodge, D. und McCulloch, R. M. 1976. A pharmacological study of Renshaw cell inhibition. *J. Physiol.* , 258, 227-242.
- Debanne, D., Guerineau, N. C., Gähwiler, B. H. und Thompson, S. M. 1995. Physiology and Pharmacology of Unitary Synaptic Connections Between Pairs of Cells in Areas CA3 and CA1 of Rat Hippocampal Slice Cultures *JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY*, 73, 1282-1294.
- Delfs, J. F. J., Ishimoto, S. und Saroff, D. 1989. Ventral and dorsal horn acetylcholinesterase neurons are maintained in organotypic cultures of postnatal rat spinal cord explants. *Brain Research*, 488, 31-42.
- Dohi, T., Morita, K., Kitayama, T., Motoyama, N. und Morioka, N. 2009. Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain. *Pharmacol Ther*, 123, 54-79.
- Drexler, B., Hentschke, H., Antkowiak, B. und Grasshoff, C. 2010. Organotypic Cultures as Tools for Testing Neuroactive Drugs - Link Between In-Vitro and In-Vivo Experiments. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 4538-4550.
- Drexler, B., Seeger, T., Grasshoff, C., Thiermann, H. und Antkowiak, B. 2011. Long-term evaluation of organophosphate toxicity and antidotal therapy in co-cultures of spinal cord and muscle tissue. *Toxicol Lett*, 206, 89-93.
- Eckle, V. S. und Antkowiak, B. 2013. ALX 1393 inhibits spontaneous network activity by inducing glycinergic tonic currents in the spinal ventral horn. *Neuroscience*, 253, 165-71.
- Eckle, V. S., Drexler, B., Grasshoff, C., Seeger, T., Thiermann, H. und Antkowiak, B. 2014. Spinal cord--skeletal muscle cocultures detect muscle-relaxant action of botulinum neurotoxin A. *ALTEX*, 31, 433-40.

- Eckle, V. S., Hauser, S., Drexler, B., Antkowiak, B. und Grasshoff, C. 2013. Opposing actions of sevoflurane on GABAergic and glycinergic synaptic inhibition in the spinal ventral horn. *PLoS One*, 8, e60286.
- Eulenburg, V., Armsen, W., Betz, H. und Gomeza, J. 2005. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci*, 30, 325-33.
- Fratev, F., Miranda-Arango, M., Padilla, E. und Sirimulla, S. 2019. Discovery of New Classes of Glycine transporter 2 (GlyT2) Inhibitors and Study of GlyT2 Selectivity by Combination of Novel Structural Based Virtual Screening Approach and Free Energy Perturbation (FEP+) Calculations.
- Fyffe, R. E. W. 1991. Glycine-like immunoreactivity in synaptic boutons of identified inhibitory interneurons in the mammalian spinal cord. *Brain Research*, 547, 175-179.
- Gähwiler 1981. organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 4 329-342.
- Gan, T. J. 2017. Poorly controlled postoperative pain: prevalence, consequences, and prevention. *J Pain Res*, 10, 2287-2298.
- Gomeza, J., Hülsmann, S., Ohno, K., Eulenburg, V., Szöke, K., Richter, D. W. und Betz, H. 2003a. Inactivation of the Glycine Transporter 1 Gene Discloses Vital Role of Glial Glycine Uptake in Glycinergic Inhibition. *Neuron*, 40, 785-796.
- Gomeza, J., Ohno, K., Hülsmann, S., Armsen, W., Eulenburg, V., Richter, D. W., Laube, B. und Betz, H. 2003b. Deletion of the Mouse Glycine Transporter 2 Results in a Hyperekplexia Phenotype and Postnatal Lethality. *Neuron*, 40, 797-806.
- Grasshoff, C. und Antkowiak, B. 2004. Propofol and Sevoflurane Depress Spinal Neurons In Vitro via Different Molecular Targets. 101, 1167-76.
- Grasshoff, C., Drexler, B., Rudolph, U. und Antkowiak, B. 2006. Anaesthetic Drugs: Linking Molecular Actions to Clinical Effects. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 1-15.
- Grasshoff, C., Jurd, R., Rudolph, U. und Antkowiak, B. 2007. Modulation of presynaptic beta3-containing GABAA receptors limits the immobilizing actions of GABAergic anesthetics. *Mol Pharmacol*, 72, 780-7.
- Grasshoff, C., Rudolph, U. und Antkowiak, B. 2005. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 18, 386-391.
- Griffin, C. E., Kaye, A. M., Bueno, F., R und Kaye, A. D. 2013. Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System-Mediated Effects. *The Ochsner Journal*, 13, 214-223.
- Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H. und Laube, B. 2005. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*, 45, 727-39.
- Harsing, L. 2003. The glycine transporter-1 inhibitors NFPS and Org 24461: a pharmacological study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74, 811-825.
- Hensel, M., Fisch, S., Kerner, T., Wismayer, A. und Birnbaum, J. 2019. Gibt es eine Rationale für die kombinierte Anwendung von volatilen Anästhetika und Propofol zur Aufrechterhaltung der Narkose.

- Hermanns, H., Muth-Selbach, U., Williams, R., Krug, S., Lipfert, P., Werdehausen, R., Braun, S. und Bauer, I. 2008. Differential effects of spinally applied glycine transporter inhibitors on nociception in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*, 445, 214-9.
- Imlach, W. L. 2017. New approaches to target glycinergic neurotransmission for the treatment of chronic pain. *Pharmacol Res*, 116, 93-99.
- Jinks, S. L., Bravo, M. und Hayes, S. G. 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, 1016–24.
- Kehlet, H., Jensen, T. S. und Woolf, C. J. 2006. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *The Lancet*, 367, 1618-1625.
- Larkum, M. E., Launey, T., Dityatev, A. und Lüscher, H.-R. 1998. Integration of Excitatory Postsynaptic Potentials in Dendrites of Motoneurons of Rat Spinal Cord Slice Cultures. *Journal of Neurophysiology*, 80, 924-935.
- Laube, B., Maksay, G., Schemm, R. und Betz, H. 2002. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 23, 519-527.
- Legendre, P. 2001. The glycinergic inhibitory synapse.
- Martina, M., Gorfinkel, Y., Halman, S., Lowe, J. A., Periyalwar, P., Schmidt, C. J. und Bergeron, R. 2004. Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *J Physiol*, 557, 489-500.
- Morita, K., Motoyama, N., Kitayama, T., Morioka, N., Kifune, K. und Dohi, T. 2008. Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 633-45.
- Mostyn, S. N., Rawling, T., Mohammadi, S., Shimmon, S., Frangos, Z. J., Sarker, S., Yousuf, A., Vetter, I., Ryan, R. M., Christie, M. J. und Vandenberg, R. J. 2019. Development of an N-Acyl Amino Acid That Selectively Inhibits the Glycine Transporter 2 To Produce Analgesia in a Rat Model of Chronic Pain. *J Med Chem*, 62, 2466-2484.
- Nong, Y., Huang, Y.-Q., Ju, W., Kalia, L. V., Ahmadian, G., Wang, Y. T. und Salter, M. W. 2003. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *NATURE*, 422 302-307.
- Olivares, L., Aragon, C., Gimenez, C. und Zafra, F. 1995. The Role of N-Glycosylation in the Targeting and Activity of the GLYT1 Glycine Transporter.
- Roux, M. J. und Supplisson, S. 2000. Neuronal and Glial Glycine Transporters Have Different Stoichiometries. *Neuron*, 25, 373–383.
- Rudolph, U. und Antkowiak, B. 2004. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 709-720.
- Russ, D. E., Cross, R. B. P., Li, L., Koch, S. C., Matson, K. J. E., Yadav, A., Alkaslasi, M. R., Lee, D. I., Le Pichon, C. E., Menon, V. und Levine, A. J. 2021. A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. *Nat Commun*, 12, 5722.
- Sengupta, M. und Bagnall, M. W. 2023. Spinal Interneurons: Diversity and Connectivity in Motor Control. *Annu Rev Neurosci*, 46, 79-99.

- Singer, P., Dubroqua, S. und Yee, B. K. 2015. Inhibition of Glycine Transporter 1: The Yellow Brick Road to New Schizophrenia Therapy? *Current Pharmaceutical Design*, 21, 3771-3787.
- Smith, I. und Thwaites, A. J. 1999. Target-controlled propofol vs. sevoflurane a double-blind, randomised comparison in day-case anaesthesia.
- Sonner, J. M., Antognini, J. F., Dutton, R. C., Flood, P., Gray, A. T., Harris, R. A., Homanics, G. E., Kendig, J., Orser, B., Raines, D. E., Trudell, J., Vissel, B. und Eger, a. E. I. 2003. Inhaled Anesthetics and Immobility: Mechanisms, Mysteries, and Minimum Alveolar Anesthetic Concentration. *Anesthesia & Analgesia*, 718-740.
- Spenger, C., Braschler, U. F., Streit, J. und Luscher, H. R. 1991a. An Organotypic Spinal Cord - Dorsal Root Ganglion - Skeletal Muscle Coculture of Embryonic Rat. I. The Morphological Correlates of the Spinal Reflex Arc. *Eur J Neurosci*, 3, 1037-1053.
- Spenger, C., Braschler, U. F., Streit, J. und Luscher, H. R. 1991b. An organotypic spinal cord – dorsal root ganglion skeletal muscle coculture of embryonic rat. I. The morphological correlates of the spinal reflex arc.
- Supplisson, S. und Roux, M. J. 2002. Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS Letters*, 529, 93-101.
- Tan, K. R., Rudolph, U. und Luscher, C. 2011. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci*, 34, 188-97.
- Tanabe, M., Takasu, K., Yamaguchi, S., Kodama, D. und Ono, H. 2008. Glycine Transporter Inhibitors as a Potential Therapeutic Strategy for Chronic Pain with Memory Impairment. *Anesthesiology*, 108.
- Vandenberg, R. J., Ryan, R. M., Carland, J. E., Imlach, W. L. und Christie, M. J. 2014. Glycine transport inhibitors for the treatment of pain. *Trends Pharmacol Sci*, 35, 423-30.
- von Hehn, C. A., Baron, R. und Woolf, C. J. 2012. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, 73, 638-52.
- Watson, K. R. und Shah, M. V. 2000. clinical comparison of 'single agent' anaesthesia with sevoflurane versus target controlled infusion of propofol. *British Journal of Anaesthesia*, 85 (4), 541-6.
- Whitehead, K. J., Pearce, S. M., Walker, G., Sundaram, H., Hill, D. und Bowery, N. G. 2004. Positive N-methyl-D-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo. *Neuroscience*, 126, 381-90.
- Williams, J. B., Mallorga, P. J., Lemaire, W., Williams, D. L., Na, S., Patel, S., Conn, J. P., Pettibone, D. J., Austin, C. und Sur, C. 2003. Development of a scintillation proximity assay for analysis of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporter activity. *Analytical Biochemistry*, 321, 31-37.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C. und Storm-Mathisen, J. 1995. Glycine Transporters Are Differentially Expressed among CNS Cells. . *The Journal of Neuroscience*, 15, 3952-3969.
- Zafra, F. und Gimenez, C. 2008. Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life*, 60, 810-7.
- Zeilhofer, H. U., Acuna, M. A., Gingras, J. und Yevenes, G. E. 2018. Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? *Cell Mol Life Sci*, 75, 447-465.

- Zeilhofer, H. U., Wildner, H. und Yevenes, G. E. 2012. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*, 92, 193-235.
- Zhang, Y., Michael J. Laster, M. J., Koji Hara, K., Harris, R. A., Eger, E. I., 2nd, Stabernack, C. R. und Sonner, J. M. 2003. Glycine Receptors Mediate Part of the Immobility Produced by Inhaled Anesthetics. *Anesth Analg*, 96, 97–101.

7 Anhang

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Kontrolle	23	,002	23	,006
Org 25543 160nM	23	,049	23	,004
Differenz Org 25543 160nM und Kontrolle	23	,001	23	<,001
Normalisierung Org 25543 160nM auf Kontrolle	23	,200*	23	,413

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Kontrolle	23	,002	23	,006
Org25543 320nM	23	<,001	23	,008
Differenz Org 25543 320nM und Kontrolle	23	,004	23	<,001
Normalisierung Org 25543 320nM auf Kontrolle	23	,200*	23	,481

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Mauchly-Test auf Sphärizität

	df	Sig.	Epsilon
			Greenhouse-Geisser
Innersubjekteffekt	2	<,001	,645

Paarweise Vergleiche

		Std.-Fehler	Sig. ^b	95% Konfidenzintervall für Differenz ^b	
				Untergrenze	Obergrenze
Kontrolle	Org25543,160nMol	,095	,062	-,009	,480
	Org25543,320nMol	,092	,012	,058	,533

Tabelle 10 ANOVA-Auswertung zu den Daten der Muskelaktivitätsänderung unter Org 25543. Die Rohdaten der Kontrollmessung, der Messung unter 160nM Org 25543 sowie der Messung unter 320nM Org 25543 sind nicht normalverteilt. Die auf die Kontrollmessung normalisierten Daten von 160nM und 320nM Org 25543 hingegen sind normalverteilt (Shapiro-Wilk, $p=0,41$ bzw $p=0,48$). Der Mauchly-Test auf Sphärizität zeigte, dass die Daten der Muskelaktivitätsmessungen eine ungleiche Varianz vorweisen; demnach also eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorlag. Aus diesem Grund wurde eine Greenhouse–Geisser Korrektur vorgenommen, da $\epsilon < 0,75$. Die ANOVA mit Messwiederholung zeigt mit der Greenhouse-Geisser-Korrektur, dass sich die Muskelaktivität zwischen den Gruppen signifikant unterscheidet ($p < 0,0059$) (hier nicht dargestellt). Der Post-hoc Test der ANOVA-Analyse zeigt, dass sich die Muskelaktivität der Kontrollmessung statistisch signifikant von der Messung unter 320nM Org 25543 unterscheidet ($p=0,012$), während sich der Unterschied zwischen der Kontrollmessung und der Messung mit 160nM Org 25543 statistisch nicht signifikant verhält ($p=0,062$).

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Kontrolle	13	,200	13	,636
Org 24598 70nM	13	,200	13	,061
Differenz 70nM Org 24598 und Kontrolle	13	,200	13	,170
Normalisiert 70nM Org 24598 auf Kontrolle	13	,200	13	,703

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Kontrolle	13	,200	13	,636
Org24598 140nM	13	,168	13	,005
Differenz 140nM Org 24598 und Kontrolle	13	,200	13	,331
Normalisiert 140nM Org 24598 auf Kontrolle	13	,200	13	,277

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

	df	Sig.	Epsilon ^b
			Greenhouse-Geisser
Innersubjekteffekt	2	,547	,906

Paarweise Vergleiche

		Std.- Fehler	Sig. ^b	95% Konfidenzintervall für Dif- ferenz ^b	
				Untergrenze	Obergrenze
Kontrolle	Org24598, 70nMol	,108	,003	,159	,761
	Org24598, 140nMol	,126	<,001	,302	1,000

b. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

Tabelle 11 ANOVA-Auswertung zu den Daten der Muskelaktivitätsänderung unter Org 24598. Die Daten der Kontrollmessungen, der Messungen unter 70nM Org24598 sowie der Messungen unter 140nM Org24598 sind normalverteilt (Kolmogorov-Smirnova, $p=0,2$; $p=0,2$; $p=0,17$). Die Voraussetzung der Sphärizität ist gegeben (Mauchly-Test, $p=0,547$). Die ANOVA mit Messwiederholung zeigt, dass sich die Muskelaktivität zwischen den Gruppen signifikant unterscheidet ($p<0,001$). Die Muskelaktivität der Kontrollmessung unterscheidet sich statistisch signifikant ($p<0,0034$) von der Muskelaktivität unter 70nM Org 24598. Ebenso ist der Unterschied in der Muskelaktivität zwischen der Kontrollmessung und der Messung unter 140nM Org 24598 statistisch signifikant ($p<0,0007$).

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Sham	15	0,023	15	0,086
Rec 2 Sham	15	,200	15	0,819
Differenz Sham Rec2 Rec1	15	,200	15	0,606
Normalisiert Sham Rec2 auf Rec1	15	,200	15	0,709

b. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 320nM Org 25543	16	0,110	16	0,146
Rec 2 320nM Org 25543	16	,200	16	0,636
Differenz 320nM Org 25543 Rec2 Rec1	16	,200	16	0,351
Normalisiert 320nM Org 25543 Rec2 auf Rec1	16	0,147	16	0,103

c. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Transformierte Daten: Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen

		df	Sig.
Rec1_transfor- miert (Kontrolle)	Basiert auf dem Mittelwert	29	,096
	Basiert auf dem Median	29	,077
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	28,403	,077
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	29	,080
Rec2_Transfor- miert (320nM Org25543)	Basiert auf dem Mittelwert	29	,369
	Basiert auf dem Median	29	,473
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	27,299	,474
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	29	,374

Transformierte Daten: Tests der Innersubjekteffekte

	df	Sig.
Faktor1 * Gruppe Sphärizität angenommen	1	,792
Greenhouse-Geisser	1,000	,792
Huynh-Feldt (HF)	1,000	,792
Untergrenze	1,000	,792

Tabelle 12 Mixed ANOVA der IPSC-Verfallszeit-Daten von 320nM Org 25543. Der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test zeigten, dass die Daten des ersten Recordings der Scheinapplikationsgruppe nicht für alle Messungen normalverteilt sind (Kolmogorov-Smirnov-Test, $p=0,023$). Die Daten der Drogenapplikationsgruppe hingegen sind normalverteilt ($p>0,05$). Zwischen den Gruppen des ersten Recordings war keine Homogenität der Fehlervarianzen gemäß dem Levene-Test vorhanden ($p < 0,05$). Um die Varianzen dieser Daten zu stabilisieren, wurden sie mithilfe der Box-Cox Transformation transformiert (Parameter $\lambda=0,1$). Die transformierten Daten erfüllen die Bedingung der Homogenität der Fehlervarianzen (Levine-Test, $p>0,05$), sodass mit diesen Daten die weitere Analyse fortgesetzt wurde. Der Interaktionseffekt zwischen Scheinapplikation und 320nM Org25543 zeigt sich als statistisch nicht signifikant ($p=0,7916$).

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Sham	15	0,023	15	0,086
Rec 2 Sham	15	,200	15	0,819
Differenz Sham Rec2 Rec1	15	,200	15	0,606
Normalisiert Sham Rec2 auf Rec1	15	,200	15	0,709

d. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tests auf Normalverteilung				
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Org 25543 5µM	10	,200	10	,194
Rec 2 Org 25543 5µM	10	,075	10	,113
Diff Rec2Rec1 Org 25543 5µM	10	,200	10	,846
normRec2Rec1 Org 25543 5µM	10	,104	10	,049

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen			
		df	Sig.
Rec 1 Kontrolle	Basiert auf dem Mittelwert	23	,091
	Basiert auf dem Median	23	,158
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	19,628	,160
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	23	,092
Rec 2 5µM Org 25543	Basiert auf dem Mittelwert	23	,147
	Basiert auf dem Median	23	,216
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	14,734	,223
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	23	,167

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		df	Sig.
Faktor1 * Gruppe	Sphärizität angenommen	1	<,001

Tabelle 13 Mixed ANOVA der IPSC-Verfallszeit-Daten von 5µM Org 25543. Der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test zeigten, dass die Daten des ersten Recordings der Scheinapplikationsgruppe nicht für alle Messungen normalverteilt sind (Kolmogorov-Smirnov-Test, $p=0,023$). Die Daten der Drogenapplikationsgruppe hingegen

normalverteilt (Kolmogorov-Smirnova, $p > 0,05$). Der Levine-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen zeigt, dass Homogenität der Variablen vorliegt ($p > 0,05$). Der Interaktionseffekt zwischen Scheinapplikation und 5 μ M Org25543 zeigt sich als statistisch signifikant ($p < 0,001$)

Tests auf Normalverteilung				
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Sham	16	,200	16	,167
Rec 2 Sham	16	,200	16	,220
Differenz Sham Rec2 Rec1	16	,200	16	,712
Normalisiert Sham Rec2 auf Rec1	16	,200	16	,185

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tests auf Normalverteilung				
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 320 nM Org 25543	15	,200	15	,054
Rec 2 320 nM Org 25543	15	,105	15	,080
Diff Rec2Rec1 320 nM Org 25543	15	,200	15	,644
normRec2Rec1 320 nM Org 25543	15	,116	15	,013

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Transformierte Daten: Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen

		df	Sig.
Rec1_transfor- miert_Kontrolle	Basiert auf dem Mittelwert	29	,367
	Basiert auf dem Median	29	,425
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	27,061	,425
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	29	,371
Rec2_transfor- miert_Org 25543 320nM	Basiert auf dem Mittelwert	29	,047
	Basiert auf dem Median	29	,114
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	27,499	,115
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	29	,047

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		df	Sig.
Faktor1 * Gruppe	Sphärizität angenommen	1	,108

Tabelle 14 ANOVA Analyse der IPSC-Frequenz mit 320nM Org 25543. Die Daten der Scheinapplikationsgruppe weisen eine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Ebenfalls sind die Daten der Drogenapplikationsgruppe mit 320 nM Org 25543 normalverteilt. Zwischen den Gruppen des ersten Recordings war keine Homogenität der Fehlervarianzen gemäß dem Levene-Test vorhanden ($p < 0,05$). Um die Varianzen dieser Daten zu stabilisieren, wurden sie mithilfe der Box-Cox Transformation transformiert (Parameter $\lambda = 0,1$). Die transformierten Daten erfüllen die Bedingung der Homogenität der Fehlervarianzen weitestgehend (Levine-Test, $p > 0,05$), so dass mit diesen Daten die weitere Analyse fortgesetzt wurde.

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Sham	16	,200	16	,167
Rec 2 Sham	16	,200	16	,220
Differenz Sham Rec2 Rec1	16	,200	16	,712
Normalisiert Sham Rec2 auf Rec1	16	,200	16	,185

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 5µM Org 25543	6	,200	6	,183
Rec 2 5µM Org 25543	6	,200	6	,461
Differenz Rec2 Rec1 5µM Org 25543	6	,200	6	,151
Normalisiert Rec2 Rec1 5µM Org 25543	6	,200	6	,116

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen^a

		df	Sig.
Rec 1 Kontrolle	Basiert auf dem Mittelwert	20	,075
	Basiert auf dem Median	20	,087
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	19,959	,087
	Basiert auf dem getrimmten Mit- tel	20	,076
Rec 2 5µM Org 25543	Basiert auf dem Mittelwert	20	,075
	Basiert auf dem Median	20	,069
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	17,046	,072
	Basiert auf dem getrimmten Mit- tel	20	,075

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		df	Sig.
Faktor1 * Gruppe	Sphärizität angenommen	1	<,001
	Greenhouse-Geisser	1	<,001
	Huynh-Feldt (HF)	1	<,001
	Untergrenze	1	<,001

Tabelle 15 Mixed ANOVA der IPSC-Frequenz-Daten mit 5µM Org 25543. Die Daten der Scheinapplikationsgruppe weisen eine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Ebenfalls sind die Daten der Drogenapplikationsgruppe mit 5µM Org 25543 normalverteilt. Das Kriterium der Homogenität der Fehlervarianzen ist erfüllt (Levine-Test, $p > 0,05$). Der Interaktionseffekt zwischen Scheinapplikation und 5µM Org25543 zeigt sich als statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Sham	15	,200	15	,038
Rec 2 Sham	15	,200	15	,075
Differenz Sham Rec2 Rec1	15	,200	15	,057
Normalisiert Sham Rec2 auf Rec1	15	,123	15	,061

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Rec 1 Kontrolle	13	,099	13	,041
Rec 2 5µM Org 24598	13	,081	13	,057
Differenz 5µM Org 24598 Rec2 Rec1	13	,200	13	,965
Normalisiert 5µM Org 24598 Rec2 auf Rec1	13	,200	13	,404

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen^a

		df	Sig.
Rec 1 Kontrolle	Basiert auf dem Mittelwert	26	,049
	Basiert auf dem Median	26	,144
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	19,880	,147
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	26	,058
Rec 2 5µM Org 24598	Basiert auf dem Mittelwert	26	<,001
	Basiert auf dem Median	26	,001
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	22,599	,002
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	26	<,001

Transformierte Daten: Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen^a

		df	Sig.
Rec2_transfor- med_Kontrolle	Basiert auf dem Mittelwert	26	,190
	Basiert auf dem Median	26	,424
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	23,629	,425
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	26	,210
Rec1_transfor- med_5µM Org 24598	Basiert auf dem Mittelwert	26	,705
	Basiert auf dem Median	26	,702
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	25,782	,702
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	26	,717

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		df	Sig.
Faktor1 *	Sphärizität angenommen	1	,385
Gruppe	Greenhouse-Geisser	1,000	,385
	Huynh-Feldt (HF)	1,000	,385
	Untergrenze	1,000	,385

Tabelle 16 Mixed ANOVA der IPSC-Amplituden-Daten mit 5µM Org 24598. Die Daten der Scheinapplikationsgruppe weisen weitestgehend eine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Ebenfalls sind die Daten der Drogenapplikationsgruppe mit 5µM Org 24598 normalverteilt. Der Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen zeigt, dass Homogenität der Variablen nicht vorliegt ($p > 0,05$), sodass eine Box-Cox Powertransformation mit dem Powerfaktor-0.446173 durchgeführt wurde. Der

Interaktionseffekt zwischen Scheinapplikation und 5µM Org24598 zeigt sich als statistisch nicht signifikant ($p=0,385$)

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
320 nM Org 25543 Differenz nach Strychnineinwasch	7	,200	7	,410

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
Sham Differenz nach Strychninein- wasch	7	,200	7	,686

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

ANOVA		df	Sig.
Zwischen den Gruppen		1	,112

Tabelle 17 Einfaktorielle ANOVA der Daten von tonischen Strömen nach Strychninzugabe. Verglichen werden die Daten der Scheinapplikationsgruppe mit den Daten mit 320 nM Org 25543.

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
sham_Differenz nach Strychninein- wasch	7	,200	7	,686

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
5 µM Org 25543_Differenz nach Strychninein- wasch	7	,167	7	,006

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

ANOVA

	df	Sig.
Zwischen den Gruppen	1	,312

Tabelle 18 Einfaktorielle ANOVA der Daten von tonischen Strömen nach Strychninzugabe. Verglichen werden die Daten der Scheinapplikationsgruppe mit den Daten mit 5 μ M Org 25543

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
sham_Differenz nach Strychnineinwasch	7	,200*	7	,686

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

	Tests auf Normalverteilung			
	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	df	Signifikanz	df	Signifikanz
5 μ M Org 24598 Differenz nach Strychnineinwasch	10	,042	10	,010

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

ANOVA

	df	Sig.
Zwischen den Gruppen	1	,

Tabelle 19 Einfaktorielle ANOVA der Daten von tonischen Strömen nach Strychninzugabe. Verglichen werden die Daten der Scheinapplikationsgruppe mit den Daten mit 5 μ M Org 24598.

Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Studie wurde an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Antkowiak durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Antkowiak. Die Herstellung und Pflege der organotypischen Kokulturen wurden durch Professor Dr. Antkowiak, Frau Holt, Frau Pappe und mich durchgeführt. Experimente zur videomikroskopischen Aufzeichnung muskulärer Aktivität wurden größtenteils durch die Labormitglieder Frau Holt und Frau Pappe durchgeführt und ausgewertet. Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Holt und Frau Pappe erfolgten die Experimente der extrazellulären und intrazellulären Ableitungen sowie Teile der videomikroskopischen Aufzeichnungen muskulärer Aktivität durch mich. Teile der extrazellulären und intrazellulären Ableitungen erfolgten durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Herrn Bieletzki.

Die Datenanalyse erfolgte nach Einweisung der Labormitglieder Frau Holt, Frau Pappe und Herrn Dr. Hentschke durch mich. Die statistische Auswertung wurde unter Anleitung von Professor Dr. Antkowiak und Frau Holt durch mich durchgeführt. Die dafür entworfenen Skripte für das Programm MATLAB stammten von Professor Dr. Antkowiak und Herrn Dr. Henschke. Die Abbildungen wurden gemeinsam mit Frau Holt erstellt. Aus der Literatur übernommene Abbildungen und Tabellen sind mit einer Quellenangabe in der Abbildungs- bzw. Tabellenbeschriftung versehen und wurden durch mich modifiziert. Professor Dr. Antkowiak hat das Manuskript korrigiert.

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

Essen, den 29.01.2023

Alina Josephine Hoff

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Bernd Antkowiak sowohl für die engagierte Betreuung und Korrektur meiner Doktorarbeit als auch für die Vermittlung grundlegender Kenntnisse im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens. Dies verstärkte mein Interesse an der medizinischen Forschung.

Zudem gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Sektion Experimentelle Anästhesiologie für die angenehme Atmosphäre im Labor und die hilfsbereite fachliche Unterstützung sowohl im praktischen als auch im theoretischen Teil der Dissertation. An dieser Stelle bedanke ich mich insbesondere bei Frau Ina Pappe und Frau Claudia Holt für die geduldige Einweisung in praktische Laborarbeiten und datenanalytische Auswertung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund für die moralische Unterstützung, welche zu dem Gelingen der Doktorarbeit beigetragen hat.