

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

Sektion für Experimentelle Anästhesiologie

Leiter: Professor Dr. B. Antkowiak

**Elektrophysiologische in vitro-Studien zum
Wirkmechanismus von Barbituraten
im Vorderhorn des Rückenmarks**

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

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

vorgelegt von

Nicolai Daniel Netzhammer

aus

Konstanz

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Fretschner

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	III
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
III	Abbildungsverzeichnis	X

1. Einleitung

1.1	Medikamentensynthese	1
1.2	Molekularer Aufbau von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren	3
1.3	Modulatoren des GABA_A-Rezeptors	6
1.4	Synapsen	6
1.5	Komponenten der Allgemeinanästhesie	8
1.6	Die Bedeutung interneuronaler Netzwerke im Vorderhorn des Rückenmarks für die Vermittlung von Immobilität	9
1.7	Allgemeinanästhetika unterscheiden sich in ihrer Effektivität, die spinale Netzwerkaktivität zu hemmen	10
1.8	Fragestellung	11

2. Material und Methoden

2.1	Präparation organotypischer Rückenmarks-Zellkulturen	13
2.2	Roller-tube-Technik	16
2.3	Elektrophysiologie	18
2.4	Herstellung von Testlösungen und anschließende Messungen	21
2.5	Versuchsprotokoll	22
2.6	Datenauswertung	24

3. Ergebnisse

3.1	Wirkungen von Thiopental und Pentobarbital auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen des Vorderhorns kultivierter Rückenmarksschnitte	25
3.2	Wirkung von Barbituraten auf die abgegebenen Feuermuster spinaler Netzwerkaktivität	30
3.3	Wirkungen von Barbituraten in Gegenwart von Blockern des GABA_A- und Glycin-Rezeptors	32

4. Diskussion	
4.1 Thiopental und Pentobarbital vermindern die Spontanaktivität von Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks	42
4.2 Molekulare Angriffspunkte von Thiopental und Pentobarbital im Vorderhorn des Rückenmarks	43
4.3 Vergleich der Wirkungen unterschiedlicher Anästhetika im Vorderhorn des Rückenmarks in vitro	46
4.4 Vergleich der immobilisierenden Wirkung verschiedenen Anästhetika	48
5. Zusammenfassung	XIII
6. Literaturverzeichnis	XIV
IV Dankesworte	XXI
V Lebenslauf	XXII

II Abkürzungsverzeichnis

A

α	Alpha (erster Buchstabe des griechischen Alphabets)
ACSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit, künstlich hergestellter Liquor
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
AP	Aktionspotential
APV	(\pm)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid, (Glutamatantagonist)

B

β	Beta (zweiter Buchstabe des griechischen Alphabets)
---------	---

C

CaCl ₂	Calciumchlorid
Cl ⁻	Chlorid
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione, (Glutamatantagonist)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPG	Central-Pattern-Generator, neuronales Netzwerk
°C	Grad Celsius

D

δ	Delta (vierter Buchstabe des griechischen Alphabets)
dB	10 ¹⁻ B (Dezibel)
DRG	Dorsal root Ganglion

E

ε	Epsilon (fünfter Buchstabe des griechischen Alphabets)
E	Embryo
EC ₅₀	Halbwertskonzentration

G

γ	Gamma (dritter Buchstabe des griechischen Alphabets)
g	Gramm
g/mol	molare Masse, Molmasse
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A	γ -Aminobuttersäure–Rezeptoren Typ _A

H

h	Stunde
HH	Hinterhorn
Hz	Hertz

I

IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom
------	--

K

KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat

L

LFP	Lokales Feldpotential
-----	-----------------------

M

M	Mol (Basiseinheit für diejenige Stoffmenge, die in 12 Gramm eines Kohlenstoff-Nuklids ^{12}C enthalten sind.)
Mg^{2+}	Magnesium
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MgSO_4	Magnesiumsulfat
mg/kg	10^{-3} Gramm/ Kilogramm
min	Minute
ml	10^{-3} Liter
ml/min	10^{-3} Liter/ Minute
ms	10^{-3} Sekunden
mm	10^{-3} Meter
mM	10^{-3} Mol
M Ω	10^6 Ohm (elektrischer Widerstand)
μl	10^{-6} Liter
μm	10^{-6} Meter
μM	10^{-6} Mol (μ molar)
μV	10^{-6} Volt (elektrische Spannung)

N

n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natrumbikarbonat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, (Glutamant-Rezeptor)

O

O₂ Sauerstoff

P

π Pi

p statistische Wahrscheinlichkeit

PC Personal Computer

Port-Hoc-Test Überprüfung der Testvoraussetzungen von einfaktoriellen Varianzanalysen

R

R² Güte

ρ Roh

S

s Sekunde

Student-t-test statistischer Mittelwertsvergleichstest

T

θ Teta

TM-Segment transmembranöses Segment

U

U Unit

U/h Umdrehungen pro Stunde

V

VH Vorderhorn

Z

ZNS Zentrales Nervensystem

III Abbildungsverzeichnis

1. Strukturformeln der in dieser Arbeit untersuchten Barbiturate.
2. Die räumliche Anordnung des GABA_A-Rezeptors in der Plasmamembran mit seinen fünf Untereinheiten.
3. Aufbau einer Untereinheit des GABA_A-Rezeptors mit ihren vier transmembranösen Segmenten (TM 1 – 4), modifiziert nach Karasowski MD and Harrison NL (1999) General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. Cell Mol Life Sci 55: 1278-1303.
4. Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors aus der Sicht von oben, modifiziert nach Karasowski MD and Harrison NL (1999) General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. Cell Mol Life Sci 55: 1278-1303.
5. Schematische Darstellung des pentameren Aufbaus von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren.
6. Darstellung einer GABAergen Synapse, modifiziert nach bisher unveröffentlichten Daten der Experimentellen Anästhesiologie, Tübingen.
7. Schema der Arbeitshypothese.
8. Arbeitsschritte bei der Herstellung organotypischer Zellkulturen, modifiziert nach Homepage der Experimentellen Anästhesiologie der Universitätskliniken Tübingen (http://www.uni-tuebingen.de/kliniken/anaest_kl/abt_anaest/sekt_exp_anaest/forschung/methoden.htm) 22.09.07.
9. Extrazelluläre Ableitung kultivierter organotypischer Rückenmarksschnitte, zur Registrierung von Aktionspotentialen, modifiziert nach Ballerini L, Galante M (1998) Eur J Neurosci 10: 2871-9.
10. Originalaufzeichnung extrazellulärer Messungen an Rückenmarksschnittkulturen. Gegenüberstellung von Ableitungen weniger Zellen in A und vieler Zellen in B.
11. Schema des zeitlichen Verlaufs der durchgeführten Versuche.
12. Darstellung von Auszügen der Messungen konzentrationsabhängiger Wirkung von Thiopental auf spontane Aktionspotential-Aktivität in organotypischen Gewebekulturen des Rückenmarks unter Kontrollbedingungen in A, in Anwesenheit von 10 µM Thiopental in B und 20 µM in C.

13. Darstellung von Auszügen der Messungen konzentrationsabhängiger Wirkung von Pentobarbital auf spontane Aktionspotential-Aktivität in organotypischen Gewebekulturen des Rückenmarks unter Kontrollbedingungen in A, in Anwesenheit von 10 μ M Pentobarbital in B und 20 μ M in C.
14. Wirkung von Thiopental auf die gebinnte Aktionspotential-Aktivität über den gesamten Zeitraum der Aufnahme von 180 s.
15. Wirkung von Pentobarbital auf die gebinnte Aktionspotential-Aktivität über den gesamten Zeitraum der Aufnahme von 180 s.
16. Wirkung von Thiopental auf die kumulierte Spike-Aktivität.
17. Effekte von Pentobarbital auf die kumulierte Spike-Aktivität.
18. Konzentrationsabhängige Wirkung von Thiopental auf die spontane Aktivität von Interneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks.
19. Konzentrationsabhängige Wirkung von Pentobarbital auf die spontane Aktivität von Interneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks.
20. Konzentrationsabhängige Wirkung von Thiopental auf die maximale Feuerrate innerhalb der Bursts und die Burstfrequenz.
21. Konzentrationsabhängige Wirkung von Pentobarbital auf die maximale Feuerrate innerhalb der Bursts und die Burstfrequenz.
22. Identifikation der molekularen Wirkmechanismen von Thiopental mit Hilfe von GABA_A-Antagonisten, nach bisher unveröffentlichten Daten der Experimentellen Anästhesiologie, Tübingen.
23. Identifikation der molekularen Wirkmechanismen von Thiopental mit Hilfe von Glycin-Rezeptorantagonisten, nach bisher unveröffentlichten Daten der Experimentellen Anästhesiologie, Tübingen.
24. Aktionspotential-Aktivität unter Kontrollbedingungen mit Bicucullin bzw. mit Strychnin im Perfusat.
25. Peak-Feuerrate unter Kontrollbedingungen mit Bicucullin bzw. mit Strychnin im Perfusat.
26. Vergleich der Burst-Raten unter Kontrollbedingungen, sowie mit Bicucullin oder Strychnin im Perfusat.

- 27.** Auswirkungen unterschiedlicher Thiopentalkonzentrationen auf die Feuerrate in Anwesenheit von GABA_A- und Glycin-Rezeptorblockern.
- 28.** Wirkung unterschiedlicher Pentobarbitalkonzentrationen auf die Feuerrate in Anwesenheit von GABA_A- und Glycin-Rezeptorblockern.
- 29.** Geschätzter Beitrag von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren an der Wirkung von Thiopental 20 µM in A und 75 µM in B auf die Aktivität spinaler Neurone.
- 30.** Geschätzter Beitrag von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren an der spinalen Wirkung von Pentobarbital, in Konzentrationen von 20 µM in A und 75 µM in B, in Prozent.

1. Einleitung

1.1 Medikamentensynthese

Adolf von Baeyer synthetisierte 1864 die Barbituratsäure aus der Kondensation von Malonsäure mit Harnstoff unter Zugabe eines Alkali-Alkoholats. Diese Verbindung wies weder sedierende, noch hypnotische Effekte auf.

Das erste hypnotisch wirkende Barbiturat, Diethylbarbiturat, wurde 1903 durch Hermann Emil Fischer und Josef Freiherr von Mering beschrieben (Leo Levi, 1957). Die Entwicklung weiterer Derivate erfolgte durch Ernest H. Volwiler, ein bedeutender Erfinder auf dem Gebiet der anästhesiologischen Pharmakologie. Er entdeckte 1930 Pentobarbital und 1936, zusammen mit Donalee L. Tabern, Thiopental (Abbott Laboratories).

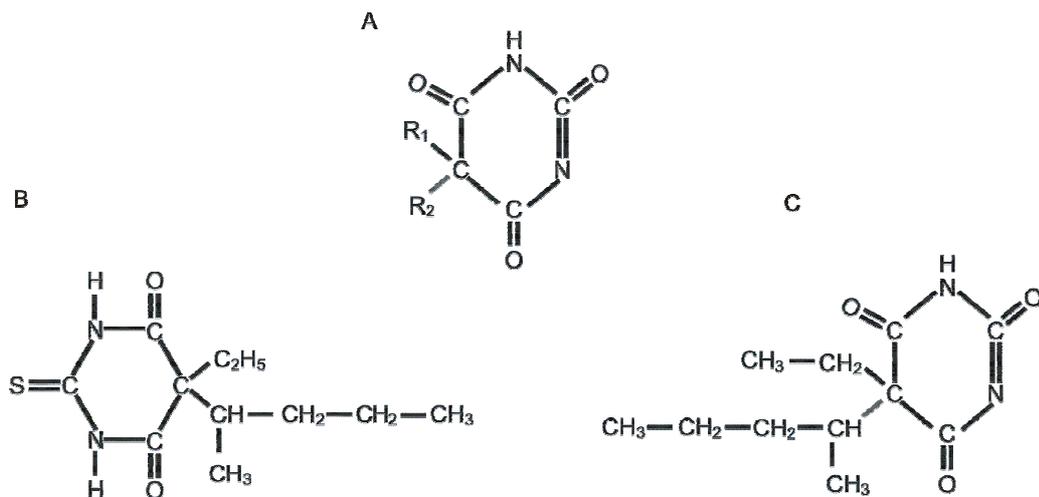


Abb. 1

Abb. 1 Strukturformeln der in dieser Arbeit untersuchten Barbiturate. A zeigt das Barbituratgerüst, R₁ und R₂ stellen die Reste der Malonsäureester dar; B: Thiopental (5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-Thiobarbituratsäure); C: Pentobarbital (5-ethyl-5-(1-methylbutyl) Barbituratsäure).

Die klinische Verwendung von Allgemeinanästhetika hat die Chirurgie revolutioniert. Denn Allgemeinanästhetika rufen eine reversible Dämpfung des zentralen Nervensystems hervor. Wichtig für die Allgemeinanästhesie ist dieser weitgehende Verlust von körpereigenen Reaktionen, die gewöhnlich durch äußere sensorische Reize ausgelöst werden. Von zentraler Bedeutung ist die Unterdrückung von Schmerzreiz-induzierten Bewegungen, die insbesondere durch spinal vermittelte Wirkungen intravenöser oder inhalativer Anästhetika herbeigeführt wird. Arbeiten von Karasowski und Harrison (Karasowski and Harrison, 1999) zeigten, dass die Aktivität ligandengesteuerter Ionenkanäle durch zahlreiche Allgemeinanästhetika beeinflusst wird. Die Erkenntnis der molekularen Wirkmechanismen dieser Substanzen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. GABA_A-Rezeptoren sind eine bedeutende molekulare Zielstruktur, an der viele klinisch verwendete Allgemeinanästhetika angreifen (Antkowiak, 1999; Hentschke et al., 2005). Diese Rezeptoren sind Ionenkanäle, die durch den Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) aktiviert werden. In der von Campagna und Kollegen (Campagna et al., 2003) veröffentlichten Übersichtsarbeit werden zahlreiche Studien zitiert, die zeigen, dass viele Narkosemittel in klinisch relevanten Konzentrationen die Funktionsweise von GABA_A-Rezeptoren beeinflussen.

1.2 Molekularer Aufbau von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren

Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau von GABA_A-Rezeptoren.

Diese Ionenkanäle setzen sich aus fünf Proteinuntereinheiten zusammen (Langosch et al., 1988; Cooper et al., 1991), die so arrangiert sind, dass in ihrer Mitte eine für Chloridionen durchlässige Pore gebildet wird (Ernst et al., 2003).

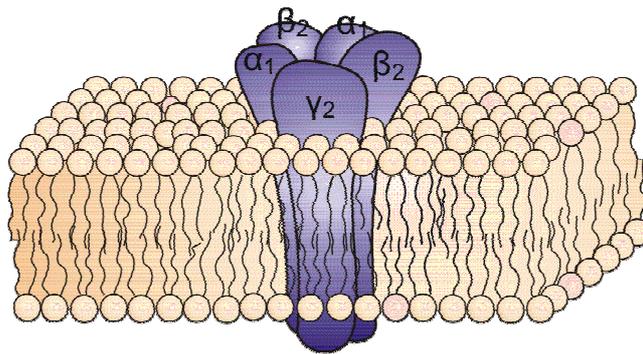


Abb. 2

Abb. 2 Die räumliche Anordnung des GABA_A-Rezeptors in der Plasmamembran mit seinen fünf Untereinheiten.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, weisen Proteinuntereinheiten von GABA_A-Rezeptoren jeweils ein langes N-terminales Ende, vier transmembranöse Domänen (M1 - M4), eine intrazelluläre Schleife sowie ein kurzes C-terminales Ende auf (Karasowski and Harrison, 1999). Heute sind zahlreiche unterschiedliche Subtypen von GABA_A-Rezeptoren bekannt, die sich in ihren Untereinheiten unterscheiden.

Im Nervensystem von Säugern wurden bisher 19 verschiedene GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten entdeckt. Hierzu zählen die α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ (Barnard et al., 1998; Bonnert et al., 1999) sowie π und ρ_{1-3} Untereinheiten (Barnard et al., 1998).

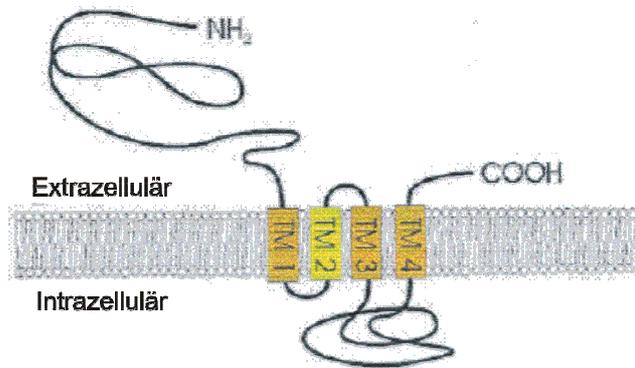


Abb.3

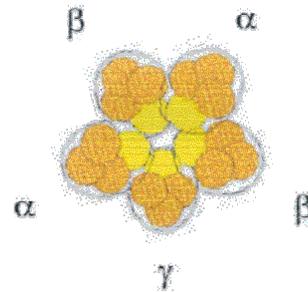


Abb.4

Abb.3 Aufbau einer Untereinheit des GABA_A-Rezeptors mit ihren vier transmembranösen Segmenten (TM 1 - 4), modifiziert nach Karasowski MD and Harrison NL (1999).

Abb. 4 Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors aus der Sicht von oben. Die Schnittebene liegt im Bereich der Zellmembran. Der im Zentrum liegende Ionenkanal wird von den TM 2-Segmenten der fünf Protein-Untereinheiten gebildet, modifiziert nach Karasowski MD and Harrison NL (1999).

Da sich GABA_A-Rezeptoren Heteropentamere bilden, die sich aus unterschiedlichen Protein-Untereinheiten zusammensetzen, wurden zahlreiche Subtypen im Zentralnervensystem entdeckt. Der Subtyp, der am häufigsten vorkommt, ist in Abbildung 2 dargestellt. (Stephenson, 1988; McKernan and Whiting, 1996; Barnard et al., 1998; Bormann, 2000). Es wird vermutet, dass dieser Ionenkanal durch die im Uhrzeigersinn angeordneten Untereinheiten γ_2 - α_1 - β_2 - α_1 - β_2 gebildet wird. Mehr als 60 % aller GABA_A-Rezeptoren besitzen diese Kombination von Proteinuntereinheiten. Allerdings ist dieser Subtyp für die Anästhesie von untergeordneter Bedeutung (Reynolds et al., 2003). GABA_A-Rezeptoren, die wahrscheinlich für die Anästhesie relevant sind, weisen zwei α_2 -, zwei β_3 - sowie eine γ_2 -Untereinheit auf (Drexler et al., 2006). Abbildung 4 zeigt in Aufsicht, ohne die Subtypen zu spezifizieren, eine schematische Darstellung des Rezeptors. Diesen strukturellen Aufbau weisen alle GABA_A-Rezeptoren auf. Ihnen ist gemeinsam, dass die TM2-Segmente der

Untereinheiten zur Mitte ausgerichtet sind und die für Anionen permeable Pore auskleiden. Die γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin zählen zu den wichtigsten hemmenden Botenstoffen im Zentralnervensystem (ZNS). Während GABA fast in allen Körperregionen vorkommt, ist Glycin vor allem im Rückenmark und im Stammhirn als hemmender Neurotransmitter von Bedeutung (Kuhse et al., 1995; Zafra et al., 1997). Der Glycin-Rezeptor ist ebenso wie der GABA_A-Rezeptor für Chlorid-Ionen permeabel. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass sich Glycin-Rezeptoren aus α_{1-4} und β Untereinheiten zusammensetzen (Betz, 1991; Betz, 1992; Kuhse et al., 1995; Zafra et al., 1997; Rajendra et al., 1997). Fünf dieser Untereinheiten bilden einen funktionellen Ionenkanal.

Abbildung 5 veranschaulicht die wichtigen gemeinsamen Merkmale und Unterschiede von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren.

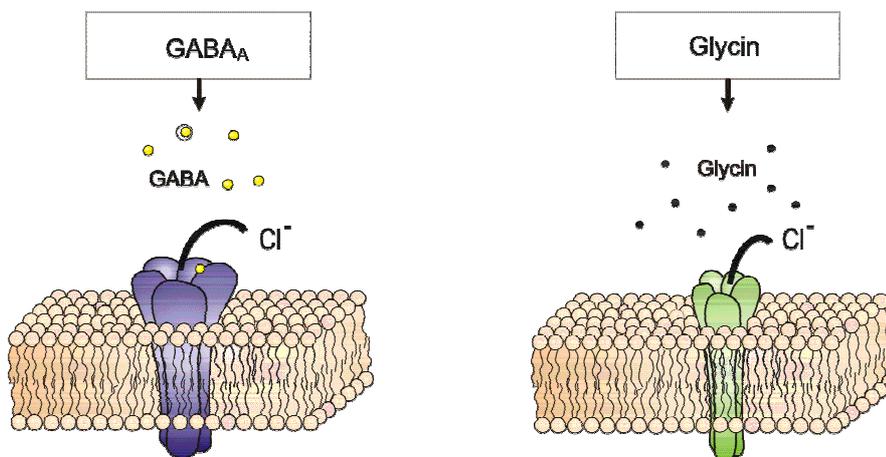


Abb.5

Abb. 5 Schematische Darstellung des pentameren Aufbaus von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren

1.3 Modulatoren des GABA_A-Rezeptors

Pharmaka, die an GABA_A-Rezeptoren angreifen, können diese entweder über eine GABA-mimetische (agonistische) Wirkung direkt aktivieren oder den Rezeptor in seiner Funktionsweise modulieren. Die Bindungsstelle von Modulatoren ist von der des natürlichen Liganden verschieden. Damit Modulatoren überhaupt wirken können, muss der Agonist GABA bereits am Rezeptor gebunden sein.

Modulatoren verändern die durch GABA-induzierte Aktivierung des Rezeptors.

Im klinisch relevanten Konzentrationsbereich wirken Allgemeinanästhetika positiv modulatorisch, d.h. sie verlängern das durch GABA induzierte Öffnen des Ionenkanals (Belelli et al., 1999). Im Bereich sehr hoher Konzentrationen werden GABA_A-Rezeptoren durch Anästhetika auch dann geöffnet, wenn die GABA-Bindungsstellen nicht besetzt sind (agonistische oder GABA-mimetische Wirkung).

1.4 Synapsen

GABAerge Synapsen sind ein zentraler Wirkort für Anästhetika.

Die an diesen Synapsen ablaufenden physiologischen Prozesse sind in Abbildung 6 dargestellt. Erzeugt ein Neuron, das den Transmitter GABA freisetzt, ein Aktionspotential, dann wird dieses über das Axon zum präsynaptischen Endköpfchen weitergeleitet. Dort werden spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet. Aufgrund des Einstromens von Kalzium-Ionen steigt die Kalziumkonzentration im präsynaptischen Endköpfchen. Hierdurch werden Vesikel mobilisiert, die den Botenstoff GABA enthalten.

Diese Vesikel wandern zur präsynaptischen Membran, mit der sie fusionieren.

Danach wird γ -Aminobuttersäure (GABA) in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, was zu einer raschen Steigerung der GABA-Konzentration führt. Indem die γ -

Aminobuttersäure an postsynaptische GABA_A-Rezeptoren anbindet, werden diese ligandengesteuerten Ionenkanäle aktiviert. Dies führt zu einer

Konformationsänderung der Kanäle, die dann für Chloridionen durchlässig werden.

Durch den geöffneten GABA_A-Rezeptor kommt es zum einwärts gerichteten

Chloridioneneinstrom in die postsynaptische Zelle. Da elektrisch negativ geladene

Ionen in die Zelle gelangen, wird die Zellmembran hyperpolarisiert und die postsynaptische Zelle gehemmt (Olsen RW and DeLorey TM, 1999).

Der Rezeptorstrom weist initial einen steilen Anstieg auf, da zahlreiche GABA_A-Rezeptoren gleichzeitig geöffnet werden. Danach dissoziiert der Agonist von seiner Bindungsstelle, und es resultiert ein exponentieller Abfall des Rezeptorstromes. Die molekularen Prozesse, die diesem exponentiellen Abfall zugrunde liegen, sind komplex. Neben der Dissoziation des Agonisten scheint auch eine Desensibilisierung der Rezeptoren von Bedeutung zu sein. Der Begriff „Desensibilisierung“ bezeichnet das spontane Schließen von GABA_A-Rezeptoren, obwohl die beiden GABA-Bindungsstellen noch besetzt sind. Damit ein Rezeptor aus einer desensibilisierten in eine aktivierbare Konformation übergehen kann, muss zunächst der Agonist die Bindungsstellen verlassen (Cash DJ and Subbarao K, 1987).

Im synaptischen Spalt erreicht die GABA-Konzentration innerhalb weniger Millisekunden nach dem Beginn der präsynaptischen Freisetzung wieder den Ruhewert. Deutlich länger bleiben die GABA-Moleküle an ihrer Bindungsstelle am Rezeptor gebunden. Der postsynaptische Strom klingt deshalb vergleichsweise langsamer ab. Aufgetragen ist in Abbildung 6 der Zeitverlauf dieses Stromes als rote Kurve. In blau dargestellt ist der Zeitverlauf unter Einwirkung von Anästhetika, die das Abklingen des Rezeptorstromes verlangsamen. Überwiegend wird der Strom durch die kinetische Eigenschaft aktivierter GABA_A-Rezeptoren bestimmt und weniger durch die GABAerge Konzentration im synaptischen Spalt (Mody and Pearce, 2004). Die Halbwertszeit des Stromes ist umso größer, je stärker die Affinität von GABA zum Rezeptor ist.

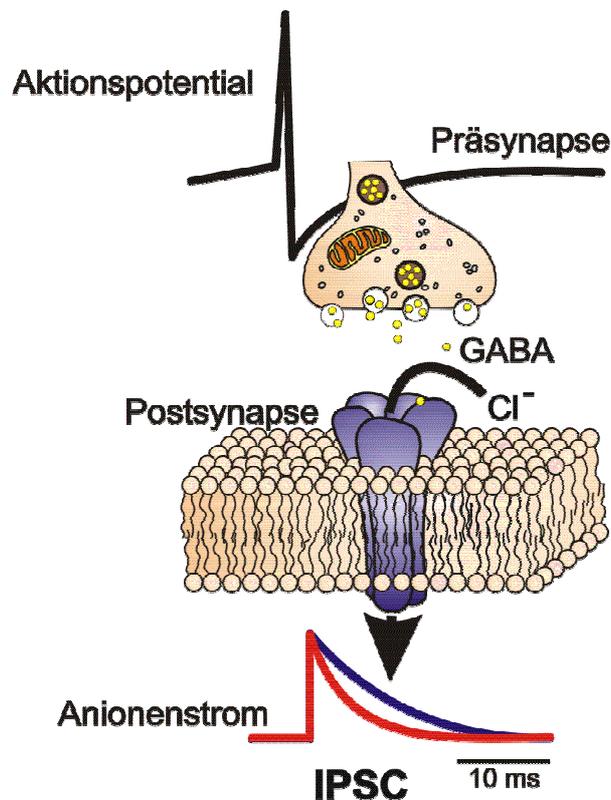


Abb.6

Abb. 6 Ein GABA_A-Rezeptor, eingebettet in die Lipiddoppelmembran. Indem die präsynaptischen Vesikel mit der Membran verschmelzen, wird der hemmende Neurotransmitter GABA in den synaptischen Spalt entlassen. Hierdurch wird eine sprunghafte und transiente Aktivierung postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren induziert, die für Chloridionen durchlässig werden. Die Ströme, welche die postsynaptische Zelle hemmen, haben eine Halbwertszeit von etwa 10 ms.

1.5 Komponenten der Allgemeinanästhesie

Allgemeinanästhesie weist verschiedene Komponenten auf. Ihre wichtigen Teilaspekte sind: Analgesie, Amnesie, Hypnose, Muskelrelaxation, Anxiolyse und Immobilität. Diese Komponenten sind je nach Art des chirurgischen Eingriffes von unterschiedlicher Bedeutung. Eine ausreichende Analgesie soll die Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses, eine dauerhaft bestehende Sensitivierung der Schmerzbahn und nicht zuletzt verstärkte postoperative Schmerzen verhindern. Amnesie und Hypnose sollen ein bewusstes Erleben des operativen Eingriffes

sowie ein hiermit verbundenes Erinnern unterbinden. Erinnerungen an Eingriffe, die durch intraoperative Wachheit bedingt sind, werden von den Patienten als psychisch belastend empfunden. Durch die Muskelrelaxierung werden Abwehrbewegungen des Patienten unterdrückt. Zudem eröffnen Muskelrelaxantien bei bestimmten Eingriffen den Zugang zum Operationsgebiet. Probleme, die vorrangig bei der Narkoseeinleitung aufgrund von Angst und Unruhe des Patienten entstehen können, werden durch Axioolytika vermieden.

Immobilität ist Unterdrückung willkürlicher und unwillkürlicher motorischer Reaktionen.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit spinalen Mechanismen, die an der immobilisierenden Wirkung von Barbituraten beteiligt sind.

1.6 Die Bedeutung interneuronaler Netzwerke im Vorderhorn des Rückenmarks für die Vermittlung von Immobilität

Stereotype motorische Aktionen werden durch neuronale Netzwerke gesteuert, die im Vorderhorn des Rückenmarks lokalisiert sind (Marder et al., 1996; Beato et al. 1999; Kiehn, 2006). Diese Netzwerke, auch Central Pattern Generators (CPGs) genannt, bilden funktionelle Einheiten, die die Muskulatur durch zeitlich koordinierte Aktionspotentialaktivität steuern. Anästhetika wirken immobilisierend, weil sie die Aktivität und Erregbarkeit dieser spinalen Netzwerke vermindern (Jinks et al., 2005; Collins et al., 1995). Braschler und Spenger sowie weitere Autoren haben die Entwicklung sowie die funktionellen Eigenschaften von CPGs an organotypischen Rückenmarksschnittkulturen untersucht (Braschler et al., 1989; Spenger et al., 1991; Ballerini et al., 1999; Ballerini and Galante, 1998; Darbon et al., 2002). Mit Hilfe des gleichen in vitro-Modells wurden in späteren Arbeiten Wirkungen von Anästhetika auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone untersucht.

1.7 Allgemeinanästhetika unterscheiden sich in ihrer Effektivität, die spinale Netzwerkaktivität zu hemmen

Volatile Anästhetika wie Enfluran, Isofluran und Sevofluran unterdrücken spontan entstehende Aktionspotentiale im Vorderhorn des Rückenmarks vollständig, wenn hohe, aber noch klinisch relevante Konzentrationen verabreicht werden (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff and Antkowiak, 2006). Eine völlige Hemmung der neuronalen Aktivität konnte mit Propofol und Etomidat, zwei klinisch verwendeten Vertretern intravenöser Anästhetika, nicht erreicht werden, selbst wenn extrem hohe Dosierungen eingesetzt wurden (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff et al., 2006 b). Die maximal erreichbare Unterdrückung der Netzwerkaktivität betrug ca. 60 % (Grasshoff and Antkowiak 2004; Grasshoff et al., 2006 a).

Weiterführende experimentelle Studien an organotypischen Gewebeschnitten des Rückenmarks ergaben, dass die hemmende Wirkung von Propofol und Etomidat auf der molekularen Ebene ausschließlich über γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren Typ_A (GABA_A) vermittelt wird (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff et al., 2006). Volatile Anästhetika hingegen wirken über GABA_A-Rezeptoren, Glycin-Rezeptoren und über weitere Ionenkanäle (Campagna et al., 2003).

Diese Ergebnisse stimmen mit jenen von Belelli und Mitarbeitern (Belelli et al., 1999) überein, die Wirkungen verschiedener Anästhetika auf GABA_A- und Glycin-Rezeptoren untersucht haben, die in Oocyten exprimiert wurden.

Im Rahmen dieser Studien wurden die Wirkungen von Halothan und Isofluran und anderer Anästhetika im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen quantifiziert.

Während volatile Anästhetika Ströme durch Glycin-Rezeptoren potenzierten (Downie et al., 1996), zeigten intravenöse Anästhetika wie Propofol und Pentobarbital keine vergleichbaren Effekte (Downie et al., 1996; Pistis et al., 1997; Mascia et al., 1996). Im klinisch relevanten Konzentrationsbereich wurden ausschließlich GABA_A-Rezeptoren durch Propofol und Pentobarbital moduliert, wobei eine Potenzierung der Rezeptorströme von mehr als 200 % gemessen wurde.

1.8 Fragestellung

Diese Ergebnisse implizieren, dass Anästhetika die Aktivität spinaler Neurone umso stärker unterdrücken, je mehr molekulare Zielstrukturen involviert sind. Diese Arbeitshypothese ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Dabei werden in der linken Kolumne die molekularen Wirkungen volatiler Anästhetika, in der Mitte die molekularen Zielstrukturen intravenöser Anästhetika veranschaulicht und rechts der noch unklare Wirkmechanismus von Barbituraten aufgezeigt.

Volatile Anästhetika scheinen durch ihre vielseitigen molekularen Wirkungen, über GABA_A -Rezeptoren, Glycin-Rezeptoren und andere Ionenkanäle, eine stärkere Unterdrückung der neuronalen Aktivität herbeizuführen als Propofol und Etomidat. Die vergleichsweise selektiv wirkenden intravenösen Anästhetika greifen ausschließlich über GABA_A -Rezeptor an.

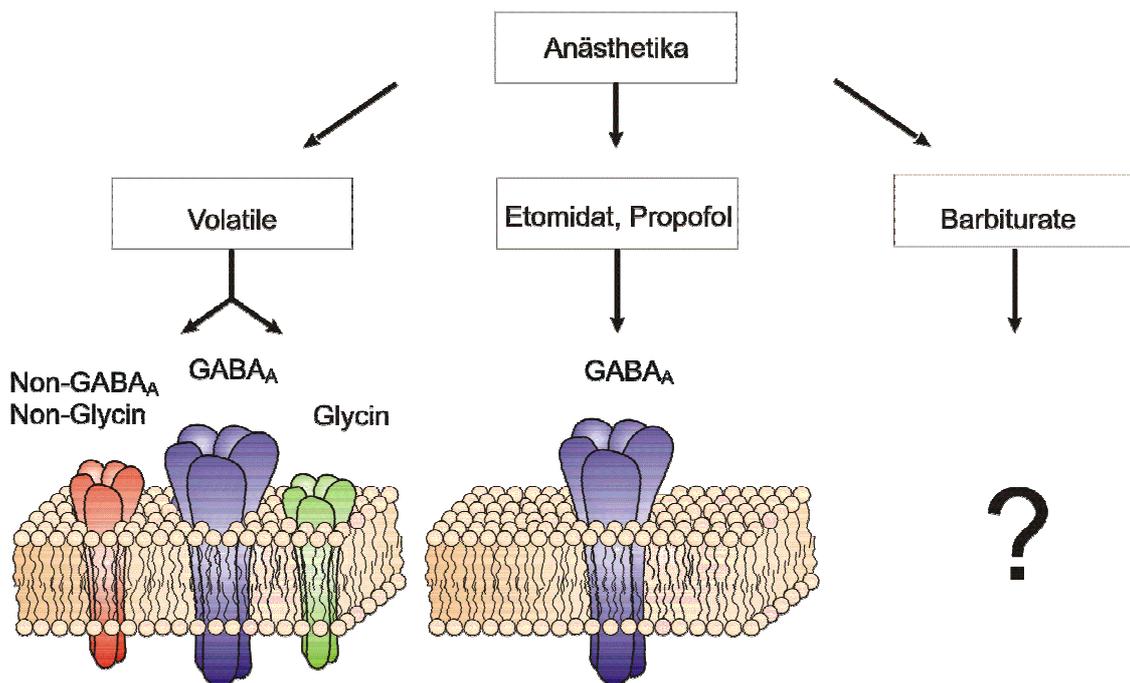


Abb. 7

Abb. 7 Schema der Arbeitshypothese.

Eine Beantwortung der Frage, durch welche molekularen Zielstrukturen die anästhetischen Eigenschaften von Barbituraten vermittelt werden, ist auf der Grundlage der aktuellen Literatur nur schwer möglich, da unterschiedliche Studien auf verschiedene Wirkaspekte der Barbiturate fokussieren und die Studien zudem an sehr unterschiedlichen in vitro-Modellen durchgeführt worden sind.

So wird in einer Untersuchung berichtet, dass Thiopental und Pentobarbital ihre Wirkungen hauptsächlich über GABA_A-Rezeptoren entfalten (Lukatch and MacIver, 1996; Belelli et al., 1999; Dickinson et al., 2002; Yang et al., 2006).

Andere Autoren kommen zu dem Schluss, dass Thiopental auch über Glycin-Rezeptoren wirkt, die im Rückenmark eine entscheidend Rolle einnehmen (Hadipour-Jahromy and Daniels, 2003).

Insbesondere im Bereich hoher Konzentrationen können weitere molekulare Mechanismen von Bedeutung sein (Liu H et al., 2006; Ohtsuka et al., 2006).

Mögliche Ursachen für die Divergenz der Literaturdaten, die zum Wirkmechanismus der Barbiturate erhoben wurden, liegen somit im untersuchten Konzentrationsbereich und in den für die Untersuchungen verwendeten in vitro-Modellsystemen.

In der vorliegenden Studie am Vorderhorn des Rückenmarks wurden Charakteristika der Barbiturate Thiopental und Pentobarbital in Bezug auf die anästhetische Effektivität und molekulare Spezifität beleuchtet. Hierbei war die Frage leitend, inwieweit durch Thiopental und Pentobarbital die spontane Aktivität von Interneuronen im Vorderhorn unterdrückt wird und ob hierfür ausschließlich GABA_A-Rezeptoren verantwortlich sind.

Die Hypothese einer GABA-selektiven Wirkung von Barbituraten basiert auf den weiter oben dargestellten Ergebnissen von Belelli und Mitarbeiter (Belelli et al., 1999), die an exprimierten Rezeptoren gewonnen wurden. Es war jedoch völlig unklar, ob diese Resultate auf wesentlich komplexere neuronale Systeme wie Gewebeschnitte mit synaptisch interagierenden Nervenzellen übertragen werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Präparation organotypischer Rückenmarks-Zellkulturen

Eine Methode zur Herstellung und Kultivierung von Gewebsschnitten, die aus unterschiedlichen Regionen des ZNS isoliert werden können, wurde 1981 erstmals durch Gähwiler (Gähwiler, 1981) beschrieben. Diese organotypische Kultivierungsmethode wies einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu dissoziierten Zellkulturen auf, da wichtige Differenzierungsprozesse wie die Entwicklung gewebespezifischer Zelltypen auch ex vivo ablaufen.

Für die vorliegende Arbeit wurden organotypische Gewebeschnitte des Rückenmarks nach der von Braschler und Kollegen (Braschler et al., 1989) verbesserten Methode aus Mäuseembryonen hergestellt. Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse 129/SV verpaart. Um den 14 - 15 Schwangerschaftstag wurden die Mäuse mittels eines Halothan-Vapors 19.3 (Lübeck, Germany) tief narkotisiert und anschließend mit einer Guillotine (Harvard apparatus, Edinbridge, Kent) dekapitiert. Das Bauchfell wurde mit 99 %igem Alkohol (Ethanol, Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) desinfiziert und das Fell an der Bauchseite vorsichtig und unter Erhalt des Peritoneums abpräpariert. Für die Präparation wurden Instrumente der Firma A. Dumont & Fils verwendet (A. Dumont & Fils, Schweiz). Sodann wurde das Peritoneum eröffnet, der Uterus aseptisch abgesetzt und in eine sterile Petrischale gegeben. Die Petrischale mit dem Uterus und den darin enthaltenen Embryonen wurde unter einer Sterilbank (BDK Luft & Reinraumtechnik GmbH, Reutlingen, Deutschland) zur weiteren Präparation mit einer Kühlplatte versehen. Unter einem Binokular (Leitz Wetzlar) mit externer Kaltlichtbeleuchtung (Intralux 150H, Volpi, Denzlingen, Deutschland) wurden nun die Embryonen von Uterus und Amnionsack befreit und umgehend in einer mit eiskaltem Gey`s (GBSS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gefüllten Petrischale aufbewahrt. Gey`s ist eine ausgeglichene Salzlösung, die aus 1,5 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 0,22 mM KH_2PO_4 , 11 mM MgCl_2 , 0,3 mM MgSO_4 , 137 mM NaCl, 0,7 mM NaHCO_3 und 33 mM D-Glucose besteht.

Zur Kontrasterhöhung wurde eine dunkle Unterlage unter das Präparat geschoben. Anschließend wurden die Embryonen dekapitiert und das Rückenmark von inneren Organen und Gliedmaßen befreit. Nach Ablösung der Dura mater wurde das Rückenmark in ein 1 cm langes und 5 mm dickes Agarquadrat eingebettet, in Agar hochrein (Merck, Darmstadt, Deutschland), das mittig eine U-förmige Vertiefung aufwies und vor Präparationsbeginn zubereitet wurde.

Für die Zubereitung des Agars wurde eine Waage (Mettler PE 3600, Mettler, Schweiz), eine Heizplatte mit integriertem Rührer (Heidolph MR 3001, Deutschland), ein Wärmeschrank (Certomat, B. Braun, Deutschland), Rührfische und ein Rührfischstab verwendet.

0,3 g des 1,5 %igen Agars wurden in 20 ml Gey's Salzlösung (GBSS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gekocht. Im noch heißen und somit flüssigen Zustand wurde der Agar in eine sterile Glaspetrischale gegeben. Nach dem Erhärten wurde der Agar zugeschnitten. Das im Agar-Block eingebettete Rückenmark wurde an den Rändern mit Parafin verschlossen und auf Eis gestellt, während aus einem 2 %igen Agarstück, bestehend aus 2 g Agar in 100 ml 0,9 %iger NaCl, ebenfalls ein 1 cm langes und 10 mm dickes Agarquadrat isoliert wurde. Das 2 %ige Agarquadrat wurde an einer Kantenlänge mit Sekundenkleber (Tesa Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) bestrichen und anschließend auf einem Teflonblock (Lee, Frankfurt, Deutschland) befestigt. Auf gleiche Weise wurde mit dem 1,5 %igen Agarquadrat, das das Rückenmark enthielt, verfahren. Das 2 %ige Agarquadrat diente als Stütze, gegen das das 1,5 %ige gelehnt wurde. Unter dem Vibratom (Campden Instruments LTD Vibroslice U.K.) mit gekühlter Badkammer (Kältetechnik Fryka, Esslingen, Deutschland) wurden transversale Schnitte von 300 µm angefertigt.

Noch vor der Präparation wurden Deckgläser 12 * 24 mm (Kindler O. GmbH & Co. Mikroskopische Gläser, Freiburg, Deutschland) unter aseptischen Bedingungen mit Poly-D-Lysin 70000 - 150000 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) beschichtet. Hierzu wurde nach Sterilisation der im 99 %igen, kochenden Alkoholbad (Ethanol, Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) für

20 min aufgereihten Deckgläser in wedelnden Bewegungen unter der Sterilbank (BDK Luft & Reinraumtechnik GmbH, Reutlingen, Deutschland) abgeflammt und dann in sterile Plastikpetrischalen gelegt. Sodann wurden 0,5 ml einer Stammlösung zu 500 µg/ml Poly-D-Lysin mit 9,5 ml Aqua Destillata (Ampuva, Fresenius Kabi, Bad Homburg Deutschland) unter der Sterilbank versetzt. Mit 230 µl dieser Lösung wurde jedes Deckglas unter sterilen Bedingungen zur besseren Haftung der Rückenmarksschnitte beschichtet und für ein bis zwei Stunden ruhen lassen.

Anschließend wurden die Deckgläser unter der Sterilbank zwei bis dreimal in Aqua Destillata geschwenkt, somit abgewaschen und in eine sterile Glaspetrischale zum Trocknen gegeben. Auf die getrockneten Deckgläser wurden nun die 300 µM dicken Schnitte, die das Rückenmark sowie die Hinterwurzelganglien enthielten, mit einer Pasteurpipette (A. Dumont & Fils, Schweiz) transferiert.

Im nächsten Schritt wurden die Rückenmarksschnitte in ein Plasmakoagulat gebettet, das aus 20 µl heparinisiertem Hühnchenplasma P3266 und 20 µl Thrombin 10 000 U (beide von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) bestand.

Die Deckgläschen mit den darauf haftenden Schnitten wurden nach der Koagulation jeweils in ein Plastikkulturrohrchen (Nunc A/S Roskilde, Dänemark) gegeben, das 750 µl Nährlösung enthielt.

Die sterile Nährlösung setzte sich zusammen aus 100 ml Pferdeserum, 100 ml Hanks, ausgeglichene Salzlösung mit Phenylrot (beide von Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 4 ml 50 %ige D-Glucose, 2 ml Glutamat zu 200 mM und 200 ml Eagles Basalmedium ohne Glutamin (Rest Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Die Kulturrohrchen wurden bei leicht verschlossenem Deckel mit 5 %igem CO₂ bei einer Temperatur von 36 °C für ein bis zwei Stunden begast.

Die anfänglich hohe CO₂-Konzentration war notwendig, um den pH-Wert der Nährlösung zu stabilisieren, so dass eine Alkalisierung des Mediums während der Kultivierung verhindert wird, wie Braschler und Mitarbeiter (Braschler et al., 1989) zeigen konnten.

Nach der eintägigen Kultivierung durch die Roller-tube-Technik bei 36 °C im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland), wurden 10 µl Zytostatika (10 µM 5-Fluoro-2-Deoxyuridine, 10 µM Cytosin-B-D-Arabino-Furanosid und 10 µM Uridin) (alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zugesetzt, um die Gliazellproliferation zu limitieren. Zweimal in der Woche wurde das Nährmedium ausgetauscht. In den ersten beiden Wochen wurde zusätzlich 15 µl des neuronalen Wachstumsfaktors (NGF, ebenfalls von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zugeführt. Das Zytostatikum wurde hingegen einmal pro Woche über einen Zeitraum von drei Wochen hinzugegeben, worauf die Kulturen wieder jeweils für ein bis zwei Stunden mit 5 %igem CO₂ begast wurden. Nachdem die Schnittkulturen 14 Tage in vitro kultiviert worden waren, erfolgten die pharmakologischen Untersuchungen mittels extrazellulärer Messungen.

2.2 Roller-tube-Technik

Die Kultivierung der Rückenmarksschnitte erfolgte in einer mit 10 U/h rotierenden und um fünf Grad horizontal geneigten Trommel, die sich in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 36 °C befand. Die langsame Rotation der Kulturröhrchen gewährleistete eine stetig wechselnde Flüssigkeit-Gas-Verteilung und sicherte damit eine ausreichende Oxygenierung.

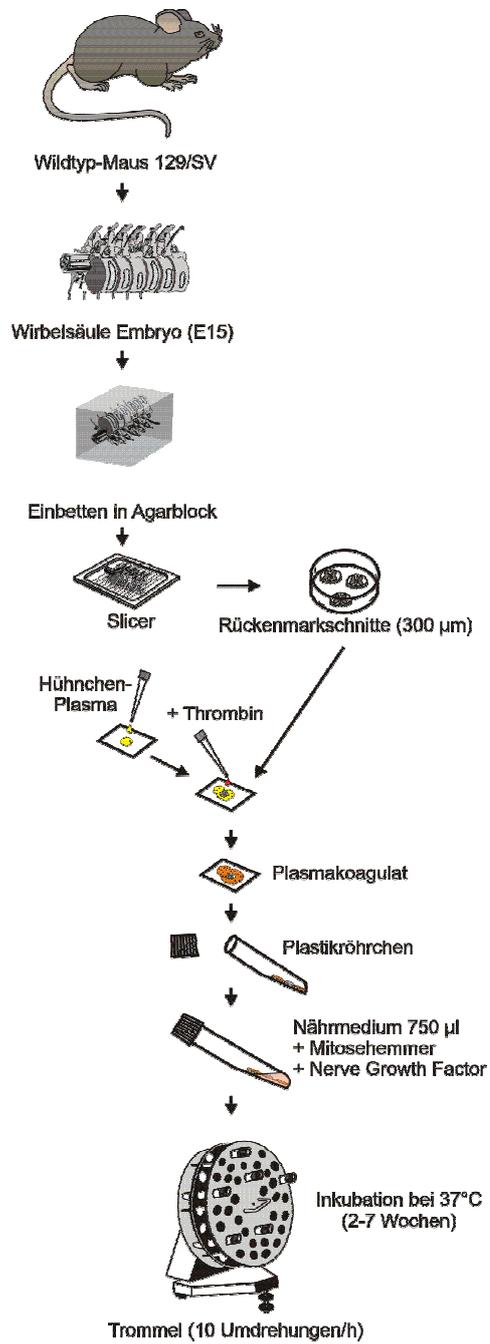


Abb. 8

Abb. 8 Arbeitsschritte bei der Herstellung organotypischer Zellkulturen.

2.3 Elektrophysiologie

Für die extrazellulären Messungen wurden Messelektroden aus Borosilikatkapillaren (OD 1,0 mm, World Preciso Instruments, Berlin, Deutschland) mit einem Puller (DMZ-Universal, Zeit-Instrumente, Augsburg, Deutschland) gezogen, die einen Spitzendurchmesser von ca. 1 - 2 μM aufwiesen. Diese Elektroden wurden anschließend mit künstlichem Liquor (ACSF) durch Einführen einer feinen Micro-Fil-Kanüle (World Preciso Instruments, Berlin, Deutschland), die auf eine 1ml Einmalspritze (Handelsname ESTRA, ASKI, Dänemark) gesteckt war, gefüllt. Diese ACSF bestand aus 120 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,13 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 1,8 mM CaCl_2 , und 11 mM D-Glucose (alle Chemikalien von Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland), gelöst in Aqua Destillata (Ampuva, Fresenius Kabi, Bad Homburg Deutschland). Anschließend wurde diese Lösung mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 versehen. Die mit ACSF gefüllten Kapillaren wiesen einen elektrischen Widerstand von zwei bis fünf $\text{M}\Omega$ auf. Die Messkammer bestand aus einem Metallrahmen und einem Deckglasboden 24 * 32 mm (Kindler O. GmbH & Co. Mikroskopische Gläser, Freiburg, Deutschland). Zur Positionierung der Elektroden kam ein inverses Mikroskop (Modell Axiovert 135 M, Zeiss, Deutschland) zum Einsatz. Über den gesamten Messverlauf wurden die organotypischen Rückenmarksschnitte, die in die Badkammer überführt worden waren, mit begaster ACSF-Lösung umspült. Für den Zu- und Abfluss der Lösung sorgten jeweils IPC Peristaltik-Pumpen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland). In der Badkammer herrschte eine gleichbleibende Temperatur von 34 - 36 $^{\circ}\text{C}$, die durch einen angelöteten Heizdraht (Philipps, Holland) eingestellt und ein Digitalthermometer (Geisinger electronic, Deutschland) kontrolliert werden konnte.

Die Position der Elektroden wurde in der Voreinstellung des Mikroskops so gewählt, dass die Messungen im Bereich des Rückenmarksvorderhorns durchgeführt werden konnten.

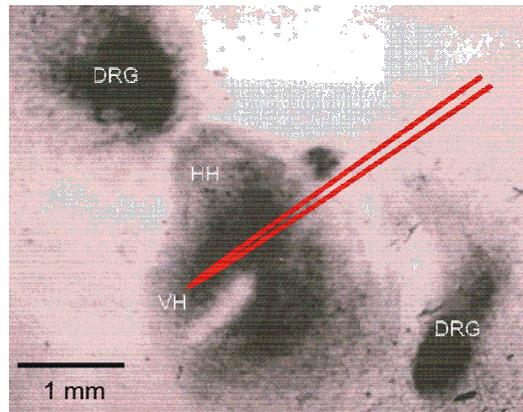


Abb. 9

Abb. 9 Extrazelluläre Ableitung kultivierter organotypischer Rückenmarksschnitte, zur Registrierung von Aktionspotentialen, modifiziert nach Ballerini L, Galante M (1998) Eur J Neurosci 10: 2871-9. VH Vorderhorn, HH Hinterhorn, DRG Dorsal root Ganglion, Kapillare zur extrazellulären Ableitung rot eingezeichnet.

In der Feineinstellung wurden die Elektroden so auf dem Schnitt platziert, dass Aktionspotentiale, extrazelluläre Spikes, mit einer Amplitude von 100 μ V deutlich vom Messrauschen diskriminiert wurden.

Eine zusätzliche Elektrode wurde als Referenzelektrode Ag/AgCl 2 mm * 4 mm (World Preciso Instruments, Berlin, Deutschland) in der Messkammer platziert. Aufgezeichnet wurden die Aktionspotentiale (AP) und lokalen Feldpotentiale (LFP) mittels eines PC, einer analog-digitaler Wandlerkarte Digidata 1200 AD/DA sowie mit dem Computerprogramm Axoscope 9 (beide von Axon Instruments, Union City, Kalifornien, USA).

Zusätzlich wurden zur kontinuierlichen Kontrolle der Messungen die im Gewebeschnitt aufgezeichneten elektrischen Signale in akustische Signale umgewandelt und durch Lautsprecher (MPI biologische Kybernetik, Tübingen, Deutschland) hörbar gemacht. Zur weiteren Datensicherung der Signale wurde ein mit den Aufnahmegeräten verschalteter Kassettenrekorder (Modell PC 204A Sony digital instrumentation cassette recorder, Racel Elektronik, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet.

Die Aktionspotentiale (APs) (200 - 2000 Hz) wurden durch einen digitalen Bandpass mit einem Durchlassbereich zwischen 3 - 10 kHz von den lokalen Feldpotentialen (LFP) (1 - 10 Hz) getrennt. Eine Signalabschwächung von 30 dB im Bandpassbereich und 0,5 dB im Durchlassbereich wurden durch den Tiefpassfilter erreicht. Die Amplitude des Hintergrundrauschens betrug ca. 50 μ V. Die registrierten Signale ließen sich als Einzel- oder Multinetzwerkableitung klassifizieren. Abbildung 10 zeigt Ausschnitte aus Originalaufzeichnungen. Hierbei wurde in 10 A von wenigen Zellen abgeleitet, die Darstellung in 10 B zeigt zum Vergleich eine Ableitung der Netzwerkaktivität vieler Zellen.

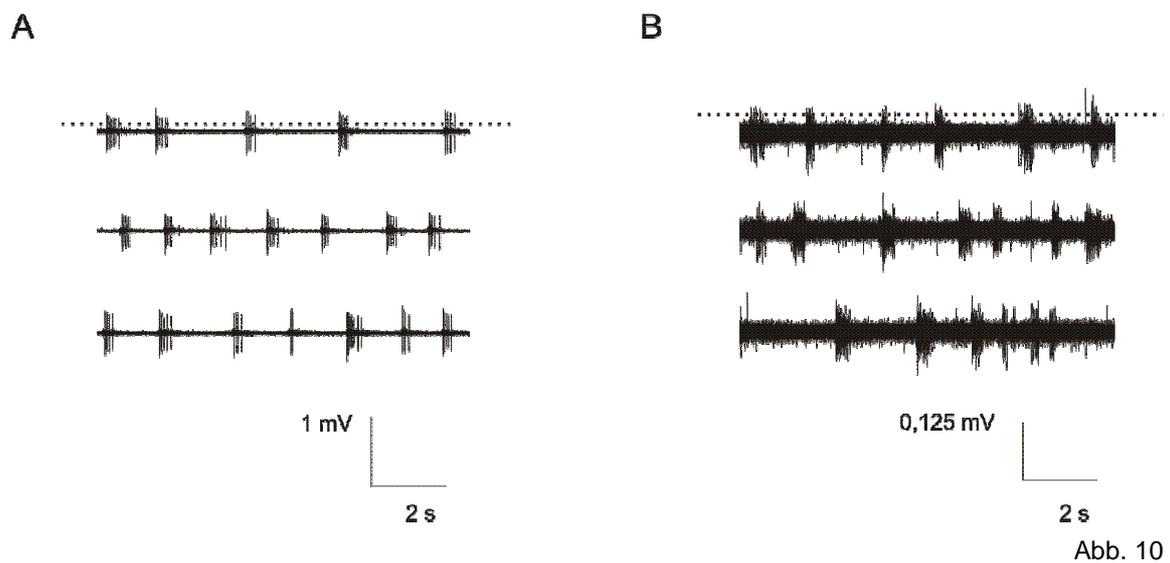


Abb. 10 Originalaufzeichnung extrazellulärer Messungen an Rückenmarksschnittkulturen. Dargestellt sind abgeleitete Aktionspotentiale weniger Zellen in A und vieler Zellen in B. Gepunktet dargestellt ist die Schwelle, die nach Durchsehen der Daten festgelegt wurde.

2.4 Herstellung von Testlösungen und anschließende Messungen

Die zu testenden intravenösen Anästhetika Thiopental und Pentobarbital (beide von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurden in den Konzentrationen 2,5, 5, 10, 20, 50, 75 und 150 μM untersucht. Beide Medikamente wurden in ACSF gelöst, die zuvor mit 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid begast worden waren. Die Anästhetika wurden mittels eines Perfusionssystems in die Badkammer geleitet, in der sich die kultivierten Rückenmarksschnitte befanden. Hierzu wurden gasdichte Perfusorenspritzen (ZAK, Medizintechnik, Marktheidenfeld, Deutschland) in eine Spritzenpumpe (Harvard apparatus, Edenbridge, Kent) eingelegt. Diese waren über zwischengeschaltete Ventile mit der Badkammer durch Teflonleitungen verbunden (beide von Lee, Frankfurt, Deutschland). Die durchschnittliche Flussrate betrug ein 1 ml/min.

Zu Beginn jeder Messreihe wurden Kontrollmessungen mit ACSF durchgeführt. Fünf Minuten nach dem Umschalten der Testlösungen waren die Auswirkungen von Thiopental oder Pentobarbital auf die Aktionspotentialmuster vollständig ausgeprägt. Um bei den Aufzeichnungen Steady-state Bedingungen zu garantieren, erfolgten die Messungen erst zehn Minuten nach dem Beginn des Einwaschens der Testlösungen. Eine Messzeit von mindestens einer Stunde war für ein gelungenes Experiment nötig, um die Kontrollaktivität, die Wirkung der zu testenden Pharmaka und die neuronale Aktivität nach dem Auswaschen der Pharmaka zu erfassen.

2.5 Versuchsprotokoll

Nachdem eine für die Durchführung der extrazellulären Ableitung geeignete Stelle im Präparat gefunden war, wurde die Grundaktivität ca. 10 Minuten lang beobachtet. Waren die Aktivitätsmuster stabil, dann wurde eine dreiminütige Kontrollmessung der Spontanaktivität durchgeführt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 10 min die Testlösung (Thiopental 50 μM) appliziert, gefolgt von der dreiminütigen Messung, bei der unter Aufrechterhaltung der Applikation des Medikaments die Auswirkungen der Testsubstanz auf die Spontanaktivität in den Zellkulturen aufgezeichnet wurde. Danach erfolgte der Einwasch mit der nächst höheren Barbituratkonzentration (75 μM), ebenfalls 10 min lang, anschließend eine Messung von drei Minuten. Dann erfolgte die Applikation von 150 μM Thiopental und eine weitere dreiminütige Aufzeichnung.

Daran schloss sich der 10minütige Auswasch der Medikamente und nachfolgend die dreiminütige Messung an. Gemessen wurde immer in aufsteigender Medikamentenkonzentration. Es erfolgten Versuche bei Konzentrationen von 10 und 20 μM Thiopental sowie bei 2,5 und 5 μM . Vergleichbar aufgebaute Versuchsreihen wurden auch für das zweite zu testende Barbiturat, Pentobarbital, durchgeführt.

In weiteren Versuchen zum Wirkmechanismus der Testsubstanzen sollte geklärt werden, ob Barbiturate die spinale Netzwerkaktivität ausschließlich über GABA_A -Rezeptoren hemmen. Es wurden hierzu die Effekte von Thiopental und separat für Pentobarbital in Anwesenheit des spezifischen Rezeptorantagonisten Bicucullin (100 μM) geprüft. Ferner wurden die Auswirkungen des spezifischen Rezeptorantagonisten Strychnin (1 μM) für Thiopental sowie Pentobarbitalkonzentrationen (20 μM und ebenfalls 75 μM) untersucht (alle aufgeführten Medikamente Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland).

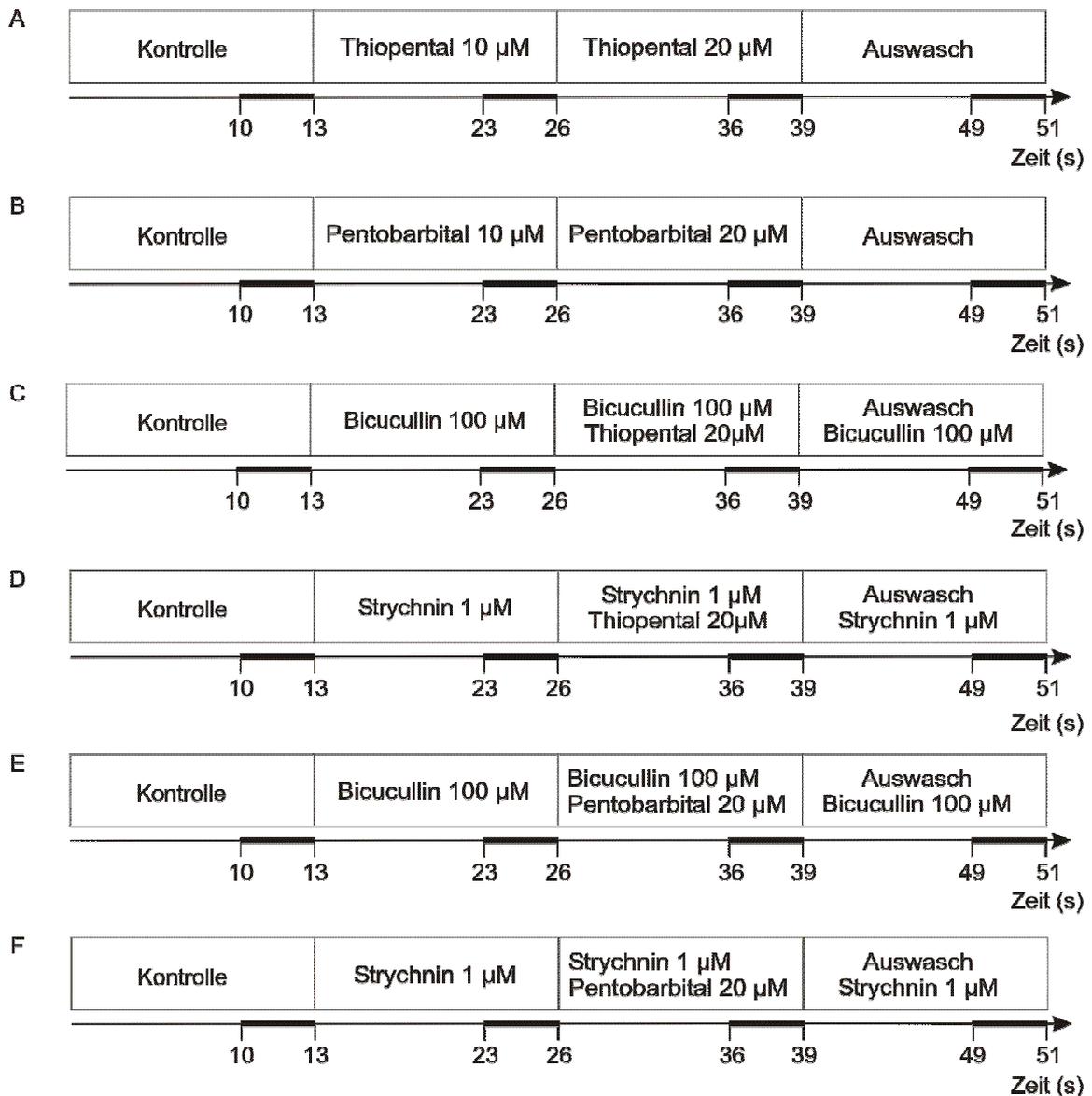


Abb. 11

Abb. 11 Zeitlicher Verlauf der durchgeführten Versuche.

Die verstärkten horizontalen Balken zeigen die Phasen der Datenregistrierung an. A und B zeigen die Versuchsprotokolle für Thiopental und Pentobarbital. Mit den in C und D dargestellten Protokollen wurden Wirkungen von Thiopental in Anwesenheit des spezifischen Rezeptorantagonisten Bicucullin bzw. Auswirkungen des spezifischen Rezeptorantagonisten Strychnin untersucht. E und F entsprechen den Versuchen in C und D, allerdings wurde hierbei Pentobarbital untersucht.

2.6 Datenauswertung

Für die Datenanalyse wurden speziell erstellte Programme (Dr. Harald Hentschke, Dr. Bernd Antkowiak) sowie die Software-Pakete OriginPro Version 7 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) und MATLAB Version 6 (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Amerika) verwendet. Zur Detektion der Aktionspotentiale wurde, wie in Abbildung 10 gezeigt, nach Durchsehen der Daten eine Schwelle festgelegt. Die neuronale Aktivität wurde als Einzel- und Multieinheiten registriert. Die Anzahl von Schwellenübertritten diente als quantitativer Parameter der neuronalen Aktivität.

Die Aktionspotentiale erschienen zumeist gruppiert in so genannten Bursts, die durch Ruheperioden voneinander getrennt waren. Ein Burst wurde definiert als eine Gruppe von Aktionspotentialen, die ein Inter-Spike-Intervall von weniger als 0,5 s aufwiesen. Die Burst-Rate wurde definiert als die Frequenz der Bursts in einem Zeitfenster von 180 s. Zur Quantifizierung der Spitzenaktivität innerhalb der Bursts wurden die Burstsphasen in 50 ms breite Segmente unterteilt.

Zur statistischen Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-test sowie die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Dosis-Wirkungskurven wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung, wie von Antkowiak und Helfrich beschrieben (Antkowiak and Helfrich, 1998), oder mittels der Boltzmann-Gleichung gefittet. Aus den gefitteten Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden die EC_{50} -Werte interpoliert.

3. Ergebnisse

3.1 Wirkungen von Thiopental und Pentobarbital auf die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen des Vorderhorns kultivierter Rückenmarksschnitte

Nachdem spinale Gewebeschnitte über einen Zeitraum von 14 Tagen ex vivo kultiviert worden waren, konnte in diesen Präparaten spontane neuronale Aktivität registriert werden. Über einen Zeitraum von zwei bis fünf Wochen blieben die Burst- und Feuerraten der Interneurone des Vorderhorns, an denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, weitgehend stabil (Grasshoff and Antkowiak, 2004). Repräsentative Beispiele solcher Messungen unter Kontrollbedingungen und mit Barbituraten sind in Abbildung 12 (Thiopental) und in Abbildung 13 (Pentobarbital) dargestellt. Die gemessenen Spuren zeigen spontan erscheinende Aktionspotentiale, wobei kürzere Aktivitätsphasen durch Ruheperioden voneinander getrennt sind. Die spontane Netzwerkaktivität wird durch Barbiturate konzentrationsabhängig verringert. Aus den Messdaten wurden gebinnte Feuerraten berechnet, die für Thiopental in Abbildung 14, für Pentobarbital in 15 dargestellt sind. Im Vergleich zur Kontrollmessung war in Gegenwart von Thiopental (10 und 20 μM) die mittlere Feuerrate der Neurone vermindert. Die zeitliche Struktur der neuronalen Aktivität blieb jedoch weitgehend erhalten. Signifikante Unterschiede in den Feuermustern, insbesondere das Auftreten von langen Ruhephasen, hätte zu einer Stufenbildung in den kumulativ gebinnten Daten geführt, die in Abbildung 16 und 17 dargestellt sind. Die dargestellten Zeitverläufe weisen jedoch unter allen Bedingungen einen kontinuierlichen Verlauf auf, wobei sich die Steilheit der Kurven konzentrationsabhängig verringert.

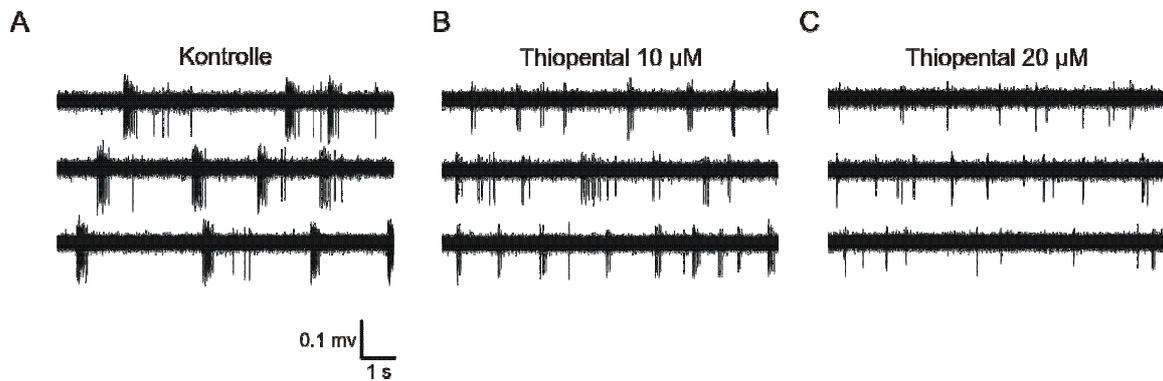


Abb. 12

Abb. 12 Konzentrationsabhängige Wirkungen von Thiopental auf spontane Aktionspotential-Aktivität in organotypischen Gewebekulturen des Rückenmarks. Dargestellt sind Auszüge der Messungen unter Kontrollbedingungen in A, in Anwesenheit von 10 μM Thiopental in B und 20 μM in C. Die durchschnittlichen Feuerraten betragen unter Kontrollbedingungen 8,6 Hz und unter Einwirkung von 10 μM bzw. 20 μM Thiopental 5,2 Hz und 2,3 Hz. Die Burst-Raten lagen in der Kontrolle bei 0,3 Hz, nach Zugabe von 10 μM Thiopental bei 0,3 Hz und nach Applikation von 20 μM Thiopental bei 0,4 Hz.

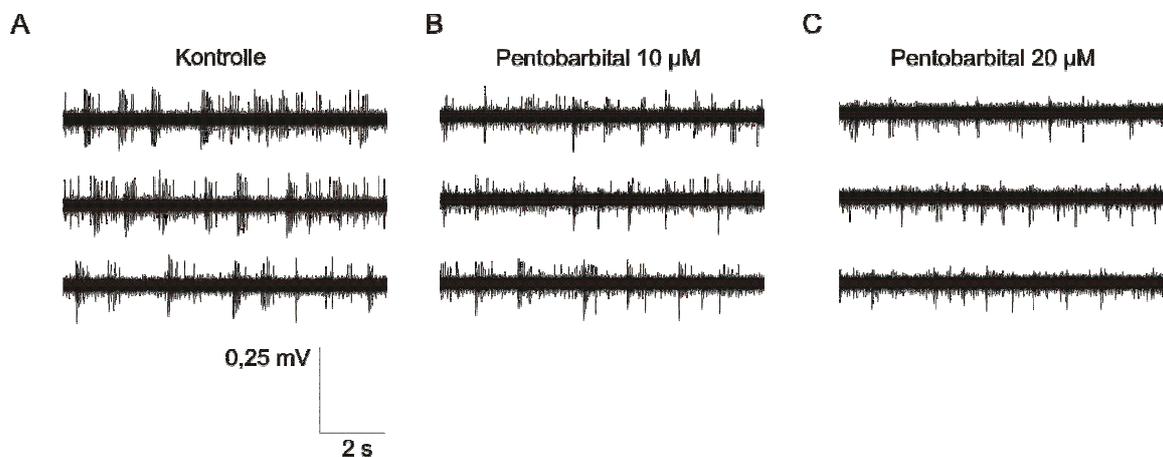


Abb. 13

Abb. 13 Auswirkungen von Pentobarbital auf die Aktionspotential-Aktivität in organotypischen Rückenmarksschnitten. Dargestellt sind Auszüge von Aufzeichnungen unter Kontrollbedingungen in A, in Anwesenheit von 10 μM Pentobarbital in B und von 20 μM Pentobarbital in C. Die mittleren Feuerraten betragen in der Kontrolle 6,0 Hz, 3,8 Hz unter Einwirkung von 10 μM und 2,9 Hz in Gegenwart von 20 μM Pentobarbital. Die Burst-Raten betragen unter Kontrollbedingungen 0,15 Hz, unter Zugabe von 10 μM bei 0,3 Hz und durch Zugabe von 20 μM Pentobarbital bei 0,2 Hz.

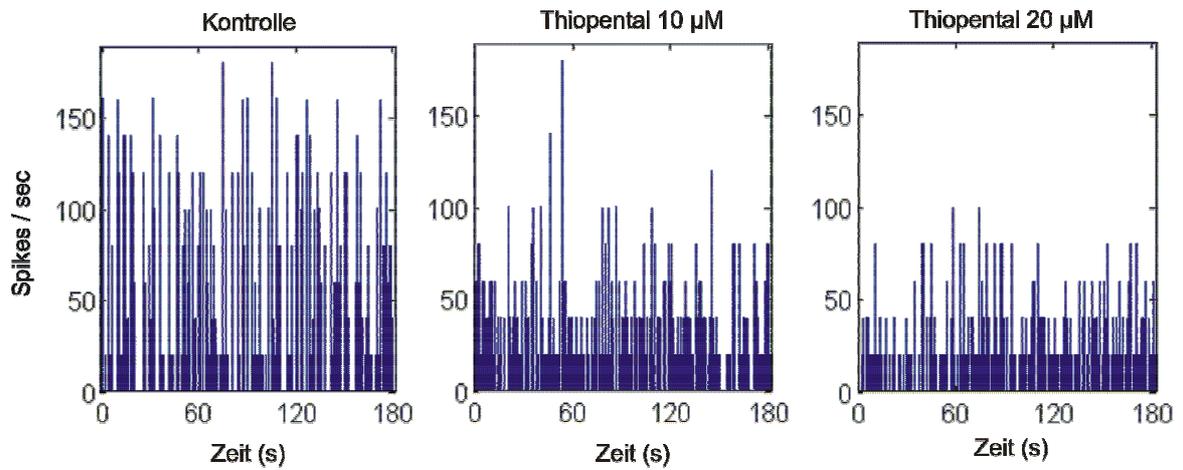


Abb. 14

Abb. 14 Wirkung von Thiopental auf die gebinnte Aktionspotential-Aktivität über den gesamten Zeitraum der Aufnahme von 180 s. Die Breite der einzelnen Bins beträgt 200 ms.

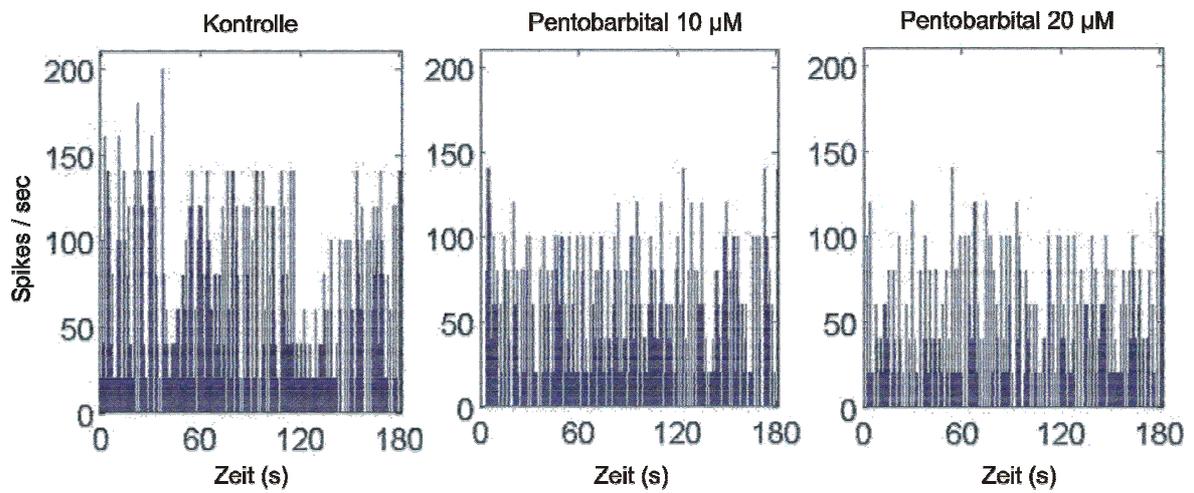


Abb. 15

Abb. 15 Wirkung von Pentobarbital auf die Aktionspotential-Aktivität über einen Zeitraum von 180 s. Die Binbreite beträgt 200 ms.

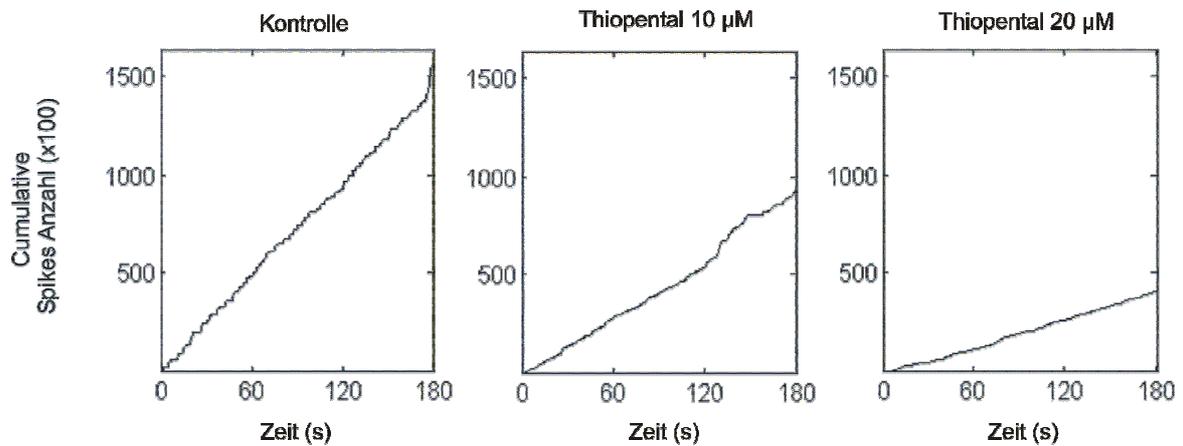


Abb. 16

Abb. 16 Wirkung von Thiopental auf die kumulierte Spike-Aktivität. Die Kurvenverläufe zeigen eine kontinuierlich hohe Aktivität über die gesamte Messdauer, wobei das Barbiturat die Feuerrate konzentrationsabhängig reduziert.

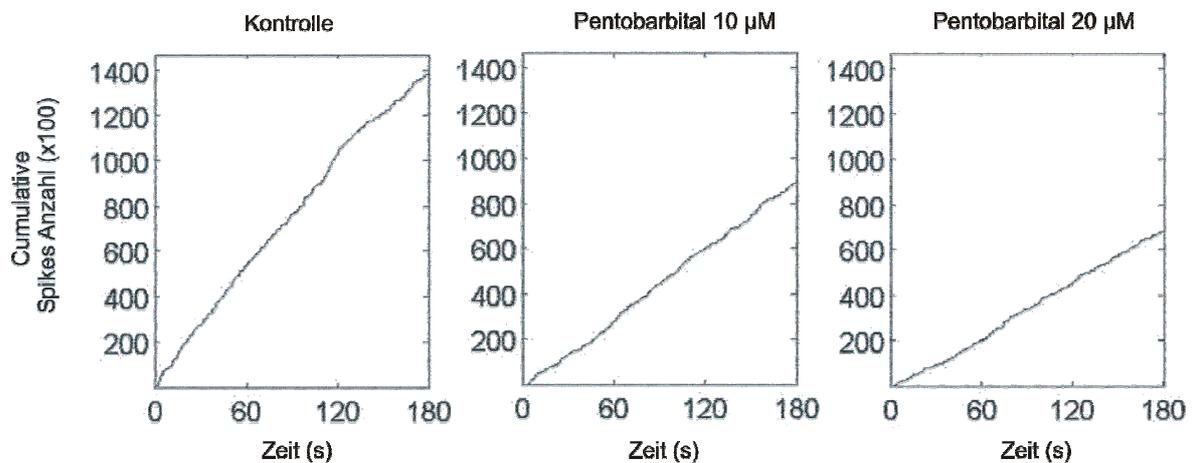


Abb. 17

Abb. 17 Effekte von Pentobarbital auf die kumulierte Spike-Aktivität. Die Wirkungen von Pentobarbital entsprechen qualitativ den in Abbildung 16 dargestellten, mit Thiopental erzielten Resultaten.

Zudem wurden die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen beider Barbiturate auf die durchschnittliche Feuerrate spinaler Interneurone untersucht. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven für Thiopental und Pentobarbital sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

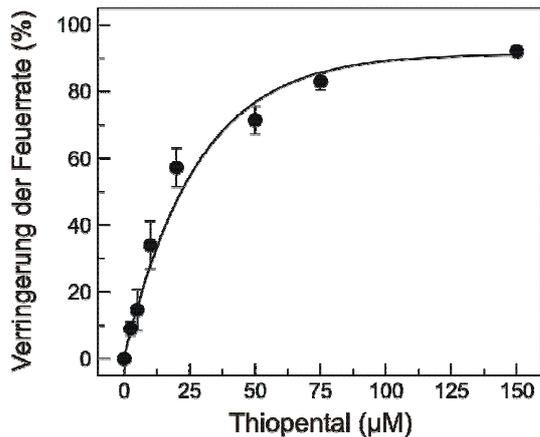


Abb.18

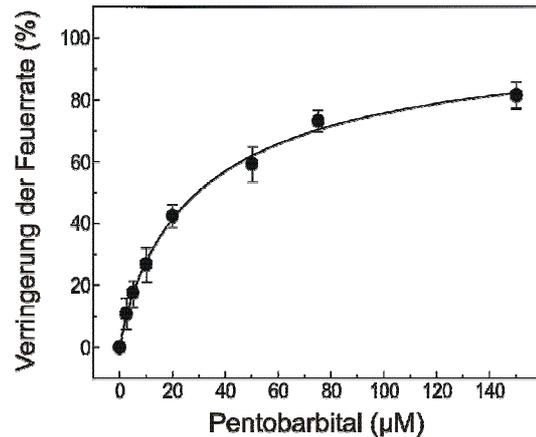


Abb.19

Abb. 18 und Abb. 19 Konzentrationsabhängige Wirkungen von Thiopental und Pentobarbital auf die spontane Aktivität von Interneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. Beide Barbiturate bewirken eine Konzentrationsabhängige Unterdrückung der Spontanaktivität, wobei im Bereich der getesteten Konzentrationen eine vollständige Hemmung nicht erreicht wird.

Für jede der untersuchten Konzentrationen von Thiopental in Abbildung 18 und von Pentobarbital in Abbildung 19 wurden der Mittelwert und der Standardfehler aus einer Anzahl von acht bis zehn erfolgreichen Messungen errechnet. Die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 18 wurde mit Hilfe der Hillgleichung gefittet ($R^2 = 0,987$). Aus der Ausgleichskurve ergibt sich für Thiopental ein EC_{50} -Wert von $16,6 \pm 2,4 \mu\text{M}$. Die maximal erreichbare Unterdrückung von Aktionspotentialen beträgt $87,3 \pm 5,0 \%$. Abbildung 19 zeigt die Dosis-Wirkungskurve, die ebenfalls über einen Hill-Fit angepasst wurde. Die Güte der Anpassung liegt bei $R^2 = 0,996$. Der EC_{50} -Wert für Pentobarbital beträgt $32 \mu\text{M}$. Dieser Wert wurde, da ein Steady-state nicht erreicht wurde, als halbmaximale Verringerung der Feuerrate definiert.

Die maximale Wirkung in der Unterdrückung von Aktionspotentialen wurde in diesem Fall auf 100 % festgelegt.

3.2 Wirkung von Barbituraten auf die abgegebenen Feuermuster spinaler Netzwerkaktivität

In Untersuchungen, die am Vorderhorn des Rückenmarks in vitro durchgeführt wurden, konnten Grasshoff und Kollegen zeigen (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff and Antkowiak, 2006), dass volatile Anästhetika nicht nur die durchschnittliche Feuerrate vermindern, sondern auch die Burst-Struktur der spontanen Netzwerkaktivität modulieren. Hierzu wurden die konzentrationsabhängigen Wirkungen auf die Peak- und Burst-Raten ermittelt. Die Ergebnisse einer entsprechenden Analyse, die für Thiopental und Pentobarbital durchgeführt wurde, sind in den Abbildungen 20 und 21 zusammenfassend dargestellt.

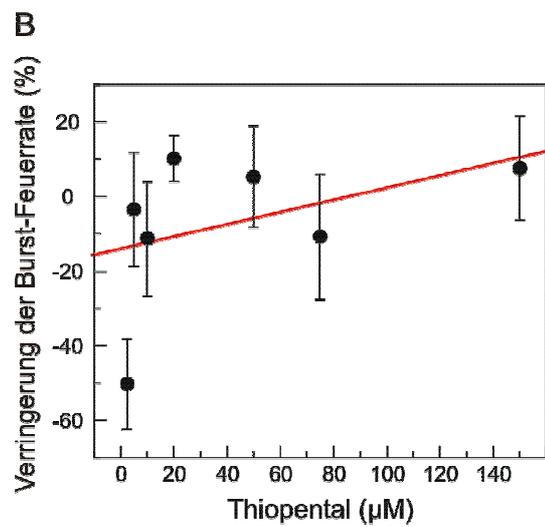
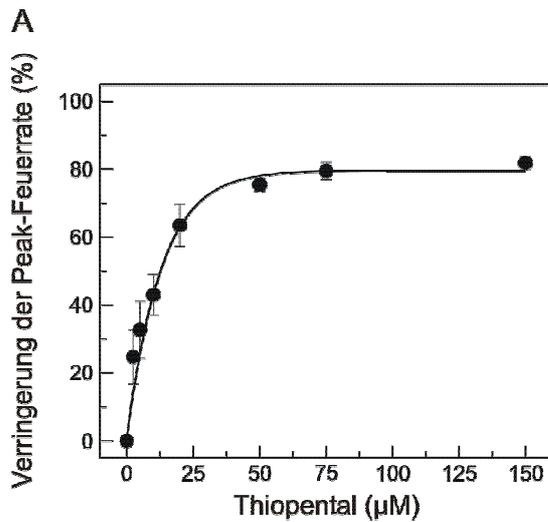


Abb. 20

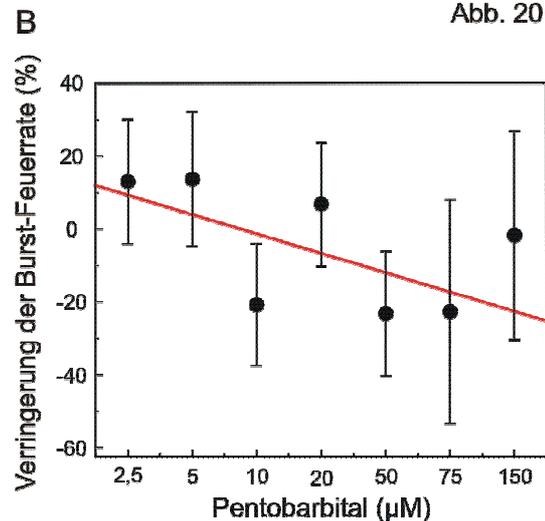
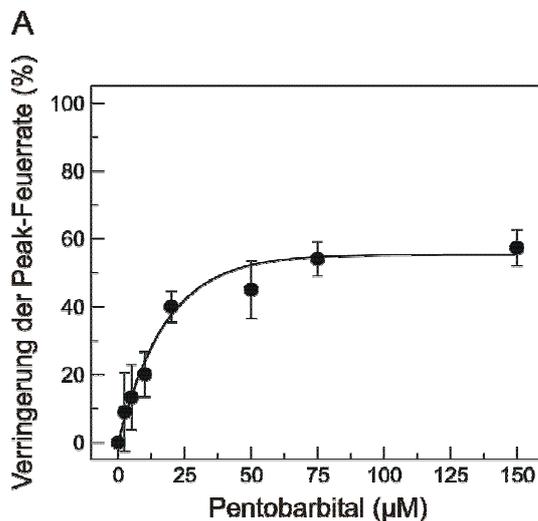


Abb. 21

Abb. 20 und 21 Konzentrationsabhängige Wirkungen von Thiopental und Pentobarbital auf die maximale Feuerrate innerhalb der Bursts (Peak-Feuerrate) und die Burstfrequenz (Burst-Feuerrate).

Die Peak-Feuerraten werden durch Thiopental (20 A) und Pentobarbital (21 A) konzentrationsabhängig vermindert, wobei die stärksten Änderungen bereits im Bereich niedriger Wirkstoffkonzentrationen eintreten. Für die mit der Hill-Gleichung angepassten Ausgleichskurven ergaben sich für Thiopental folgende Parameter: $R^2 = 0,995$; $EC_{50} = 12,5 \pm 6,4 \mu\text{M}$, $n = 8 - 10$.

Abbildung 20 B zeigt die durch Thiopental bewirkte Veränderung der Burst-Rate. Zur Approximation der Messdaten wurde eine Gerade verwendet ($R^2 = 0,181$). Die Steigung der gefitteten Geraden betrug 0,164. Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der Thiopentalkonzentration und der Burst-Rate.

Pentobarbital verminderte die Peak-Feuerraten signifikant.

Folgende Parameter wurden für die approximierten Kurvenverläufe berechnet: $R^2 = 0,984$; $EC_{50} = 17,3 \pm 21,3 \mu\text{M}$, $n = 8 - 10$ auf. In Abbildung 21 B ist die Burst-Rate als Funktion der Pentobarbital-Konzentration aufgetragen. Zur Anpassung der experimentell ermittelten Daten wurde eine Gerade verwendet ($R^2 = -0,580$). Auch Pentobarbital zeigte keine signifikante Veränderung der Burst-Rate.

3.3 Wirkungen von Barbituraten in Gegenwart von Blockern des GABA_A- und Glycin-Rezeptors

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die Wirkung von Thiopental und Pentobarbital auf die Aktionspotential-Aktivität spinaler Neurone in An- und Abwesenheit des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (Johnston, 1996) und des Glycin-Rezeptorantagonisten Strychnin ermittelt. Aus früheren Untersuchungen an organotypischen Gewebsschnitten des Neokortex war bekannt, dass eine Bicucullin-Konzentration von 20 μM nicht ausreicht, um eine vollständige Hemmung von GABA_A-Rezeptoren herbeizuführen. Deshalb wurde eine Konzentration von 100 μM gewählt, die in organotypischen Hirnschnitten die vollständige Hemmung der GABA_A-Rezeptoren bewirkte (Antkowiak, 1999). Eine quantitativ entsprechende Wirkung an Glycin-Rezeptoren wurde durch 1 μM Strychnin erreicht.

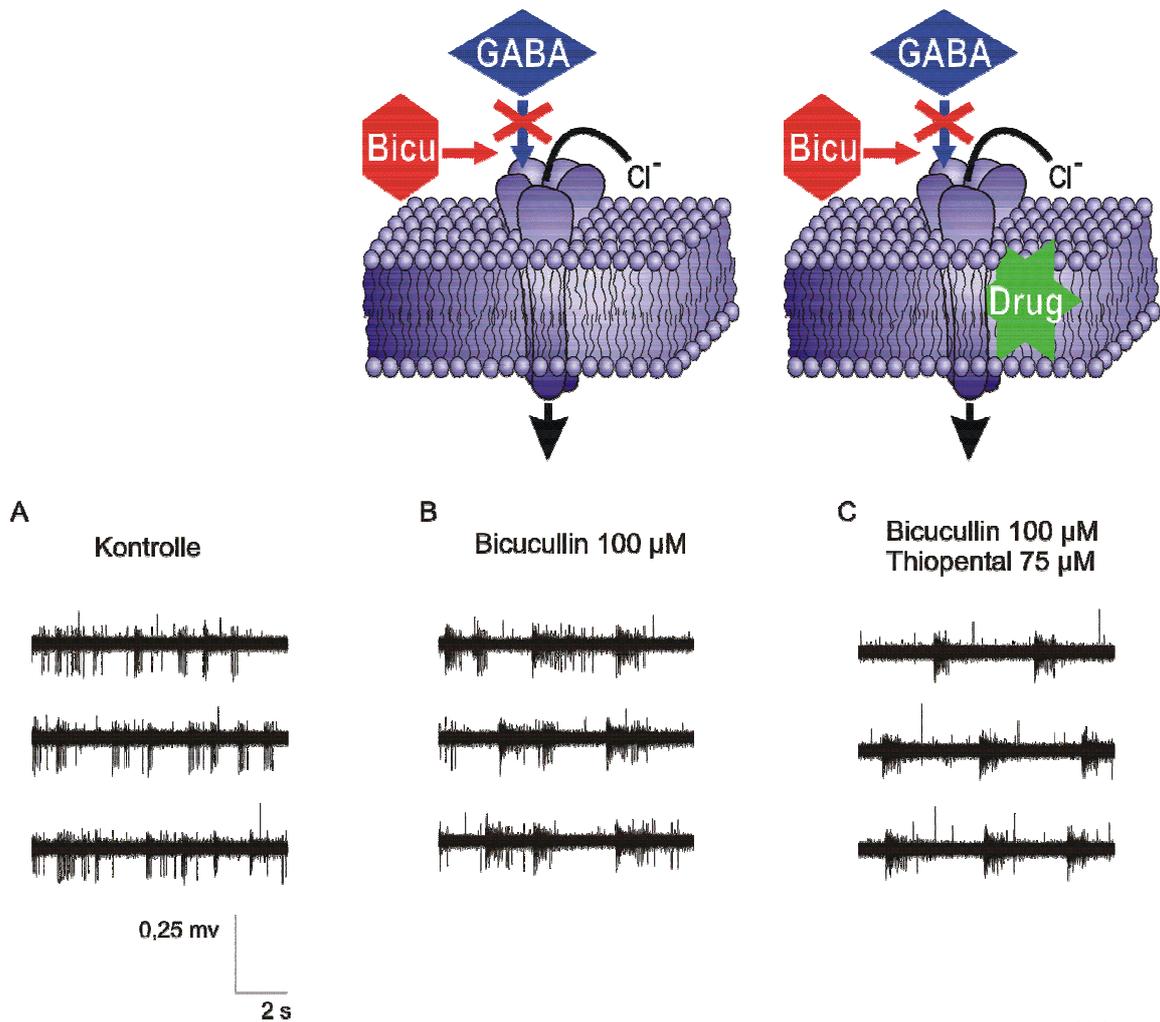


Abb. 22

Abb. 22 Identifikation der molekularen Wirkmechanismen von Thiopental mit Hilfe von GABA_A-Antagonisten.

Zur Veranschaulichung des Prinzips dieser Antagonismusversuche dienen die beiden Grafiken Abbildung 22 und Abbildung 23. Wenn der antagonisierte Rezeptor wesentlich an der Wirkung des Anästhetikums beteiligt ist, dann ist zu erwarten, dass die Wirksamkeit, mit der ein Anästhetikum neuronale Aktivität unterdrückt, durch den entsprechenden Antagonisten (Bicucullin oder Strychnin) vermindert wird. Zu beachten ist, dass die Applikation des Antagonisten den

Grundzustand der Netzwerkaktivität verändert, da Rezeptoren geblockt werden, die wesentlich an der Erregungskontrolle beteiligt sind.

In Abbildung 22 sind Originalaufzeichnungen unter Kontrollbedingungen dargestellt: in A sind die Effekte des GABA_A-Antagonisten Bicucullin auf die Spontanaktivität sind dargestellt, in B sowie in C die Wirkung von Thiopental in Anwesenheit von Bicucullin. Ein klarer Effekt von Thiopental ist in Gegenwart von Bicucullin nicht zu erkennen.

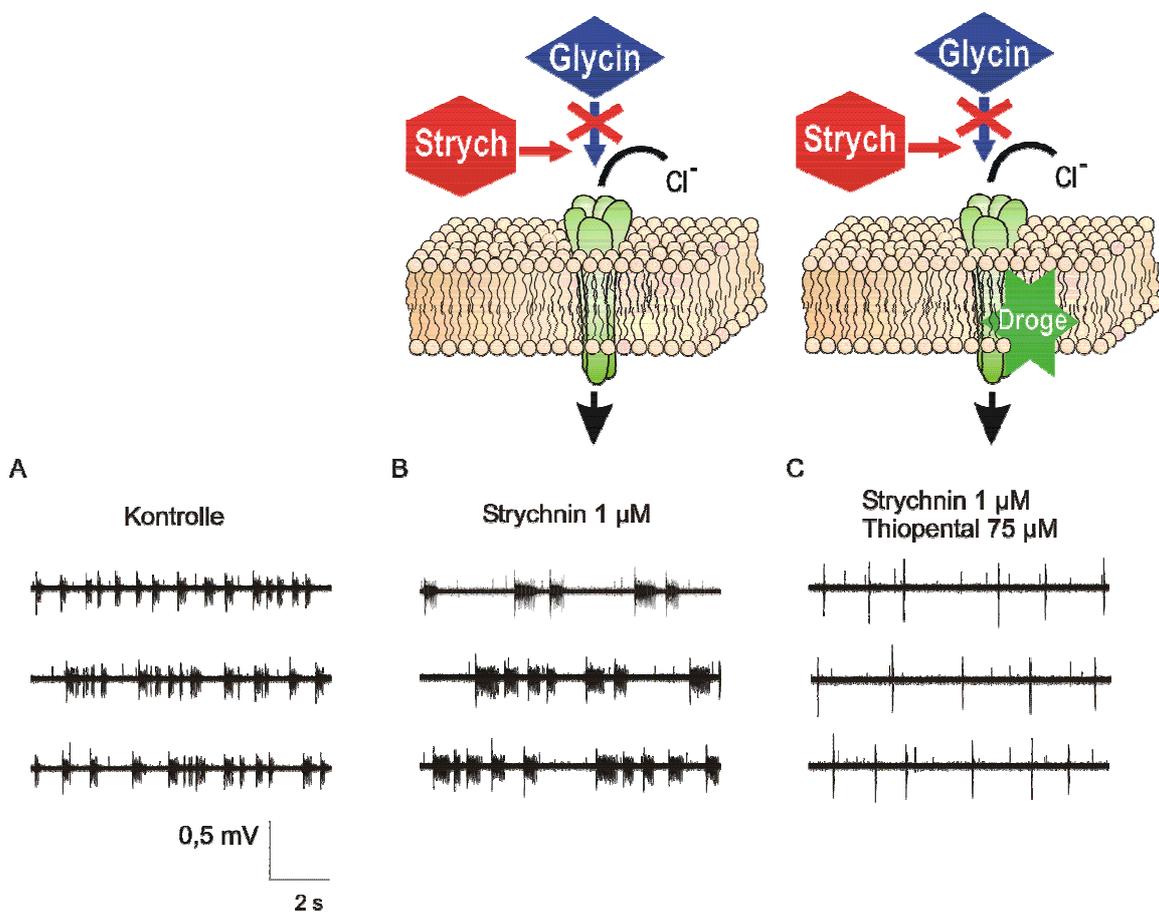


Abb. 23

Abb. 23 Identifikation der molekularen Wirkmechanismen von Thiopental mit Hilfe von Glycin-Rezeptorantagonisten.

Abbildung 23 zeigt Originalaufzeichnungen von Experimenten: in A unter Kontrollbedingungen, in B Effekte des Glycin-Rezeptor-Antagonisten Strychnin auf die Spontanaktivität und in C die Wirkungen von Thiopental in Anwesenheit von Strychnin. Es ist klar zu erkennen, dass trotz der Gegenwart von Strychnin die spontane Aktivität durch Thiopental stark reduziert wird.

Dieses Ergebnis impliziert, dass Glycin-Rezeptoren nicht wesentlich am Wirkmechanismus von Thiopental beteiligt sind (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Antkowiak, 1999; Sonner et al., 2003 a; Sonner et al., 2003 b).

GABA_A- sowie Glycin-Rezeptoren sind ein zentraler Bestandteil der synaptisch vermittelten Hemmung im Vorderhorn des Rückenmarks. Die selektive Blockade dieser Rezeptorsysteme induzierte eine signifikante Erhöhung der neuronalen Aktivität. Sowohl Bicucullin (100 µM) als auch Strychnin (1 µM) steigerten die AP- und Peak-Feuerraten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 24 und 25 dargestellt. Dabei weisen die Feuerraten mit Bicucullin und Strychnin im Medium im t-test signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle auf ($p < 0,001$).

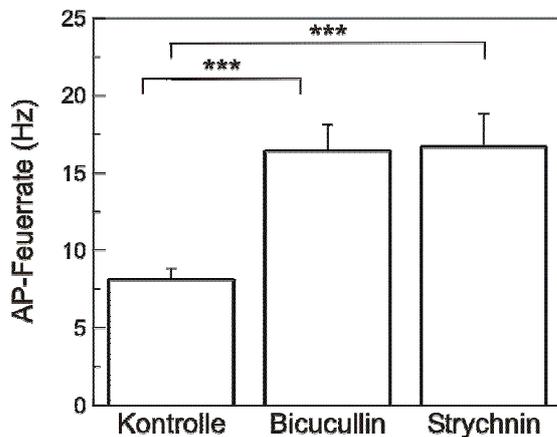


Abb. 24

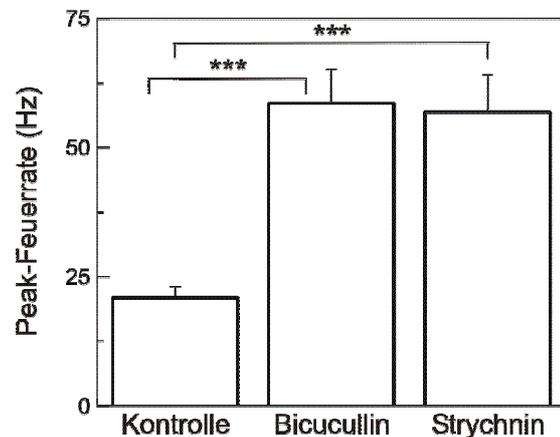


Abb. 25

Abb. 24, 25 Vergleich der Aktionspotential-Aktivität und Peak-Feuerrate unter Kontrollbedingungen, mit Bicucullin bzw. mit Strychnin im Perfusat. Getestet wurde mittels zweiseitigem t-test.

Drei Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ und zwei Sterne mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an.

Die Analyse der Burst-Raten ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in An- oder Abwesenheit von Bicucullin oder Strychnin gegenüber der Kontrolle. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

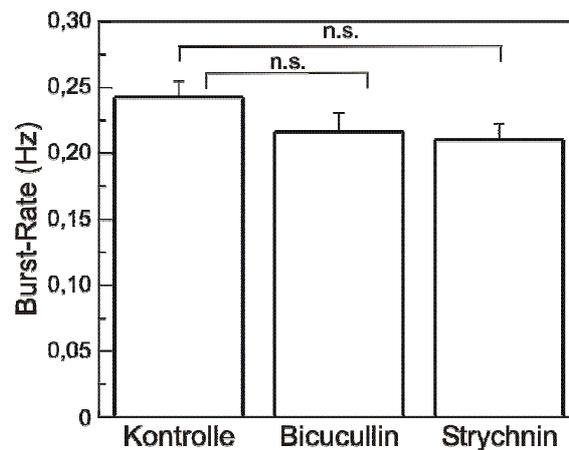


Abb. 26

Abb. 26 Vergleich der Burst-Raten unter Kontrollbedingungen, sowie mit Bicucullin oder Strychnin im Perfusat. Die Effekte auf die mittlere Burst-Rate die durch Bicucullin oder Strychnin induziert wurden waren im zweiseitigen t-test nicht signifikant (n. s.).

Im Rahmen der Versuche mit Antagonisten wurden sowohl für Thiopental als auch für Pentobarbital zwei unterschiedliche Konzentrationen getestet (20 μM und 75 μM). Gewählt wurde die Konzentration von 20 μM , da diese im Bereich des EC_{50} -Wertes lag. Die deutlich höhere Konzentration von 75 μM wurde für die Hemmversuche eingesetzt, um zu überprüfen, ob sich das Spektrum der molekularen Wirkungen konzentrationsabhängig verändert.

Leitend war dafür die Hypothese, dass Barbiturate in hohen Dosierungen über eine größere Zahl molekularer Targets wirken als im Bereich niedriger Konzentrationen.

Die Ergebnisse der zu diesem Teilprojekt durchgeführten Experimente sind in Abbildung 27 und 28 dargestellt. Abbildung 27 A zeigt in der linken Kolumne die Unterdrückung der Feuerrate durch Thiopental (20 μM) unter Kontrollbedingungen, in der rechten Kolumne unter Zugabe von Bicucullin (Mitte) und mit Strychnin. Unter Kontrollbedingungen unterdrückte 20 μM Thiopental die Feuerrate um 57 %, zeigte aber keine Wirkung nach Zugabe von Bicucullin (ANOVA und Post-Hoc-Test von Tukey, $p < 0,001$, $n = 10$).

Die Blockierung von Glycin-Rezeptoren hatte keine nachweislichen Auswirkungen auf die Unterdrückung von Aktionspotentialen durch Thiopental.

Unter den gleichen Bedingungen wie in A zeigt B die Unterdrückung der Feuerrate durch 75 μM Thiopental. Unter Einwirkung von Bicucullin 100 μM unterdrückte Thiopental 75 μM die Feuerrate nur um 22 %.

Im Vergleich hierzu lag die Unterdrückung der Feuerrate ohne Einwirkung von Bicucullin bei 75 % (ANOVA und dem Post-Hoc-Test von Tukey, $p < 0,001$, $n = 10$). Wiederum zeigte Strychnin keine Verminderung der hemmenden Wirkung von Thiopental auf die mittleren Feuerraten der Neurone.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Unterdrückung der Feuerraten durch 20 μM Thiopental fast ausschließlich, durch 75 μM Thiopental nur teilweise durch GABA_A -Rezeptoren vermittelt wird.

Abbildung 28 A zeigt die Hemmung der Feuerrate durch Pentobarbital (20 μM) unter Kontrollbedingungen, daneben die Hemmung nach Applikation von Bicucullin und Strychnin.

Unter Kontrollbedingungen unterdrückte 20 μM Pentobarbital die Feuerrate um 43 %, zeigte aber keine Wirkung nach Zugabe von Bicucullin (t-test, $p < 0,001$, $n = 10$).

Die Blockierung von Glycin-Rezeptoren hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Unterdrückung von Aktionspotentialen durch Pentobarbital.

Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie in A zeigt B die Unterdrückung der Feuerrate durch 75 μM Pentobarbital.

Unter Einwirkung von Bicucullin 100 μM unterdrückte Pentobarbital 75 μM die Feuerrate nur um 22 %. Die Unterdrückung der Feuerraten ohne Bicucullin lag bei 73 % (ANOVA und dem Post-Hoc-Test von Tukey, $p < 0,001$, $n = 10$). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Pentobarbitalkonzentrationen von 75 μM die Unterdrückung der Feuerrate nur teilweise von GABA_A -Rezeptoren vermittelt wird. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hemmende Wirkung der in dieser Studie untersuchten Barbiturate bei niedrigen Konzentrationen von 20 μM fast ausschließlich über GABA_A -Rezeptor vermittelt wird. Im Bereich höherer Konzentrationen sind jedoch weitere molekulare Zielstrukturen an der Hemmung der neuronalen Aktivität beteiligt.

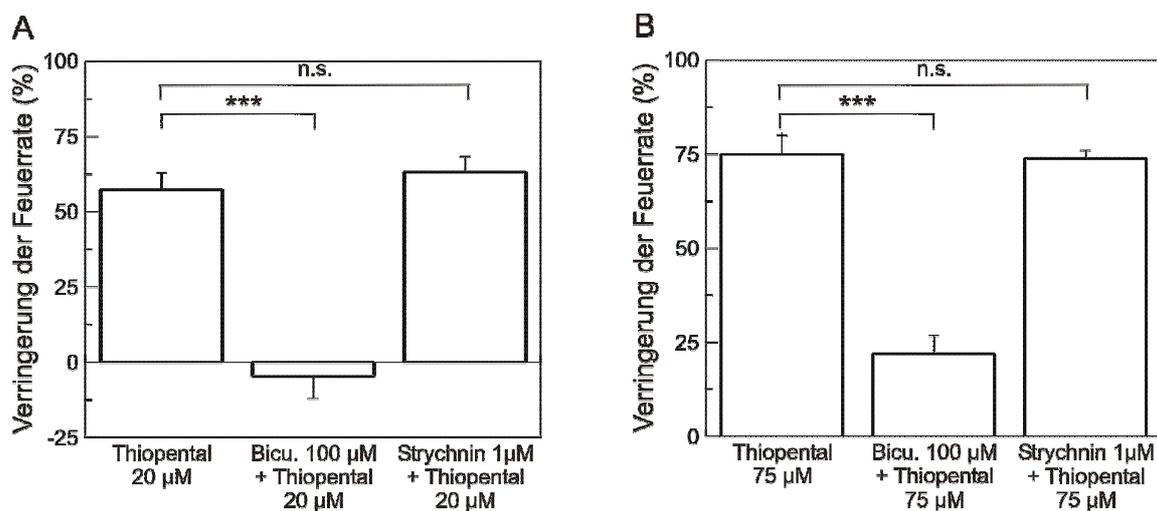


Abb. 27

Abb. 27 Auswirkungen unterschiedlicher Thiopentalkonzentrationen auf die Feuerrate in Anwesenheit von GABA_A - und Glycin-Rezeptorblockern. Getestet wurden die Mittelwerte in Gegenwart von Bicucullin und Thiopental versus Thiopental durch die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und durch den Post-Hoc-Test von Tukey, der zur Überprüfung der Testvoraussetzungen der einfaktoriellen Varianzanalyse diente. Drei Sterne zeigen hoch signifikante Unterschiede von $p < 0,001$ an. Strychnin zeigte keine signifikanten Wirkungen.

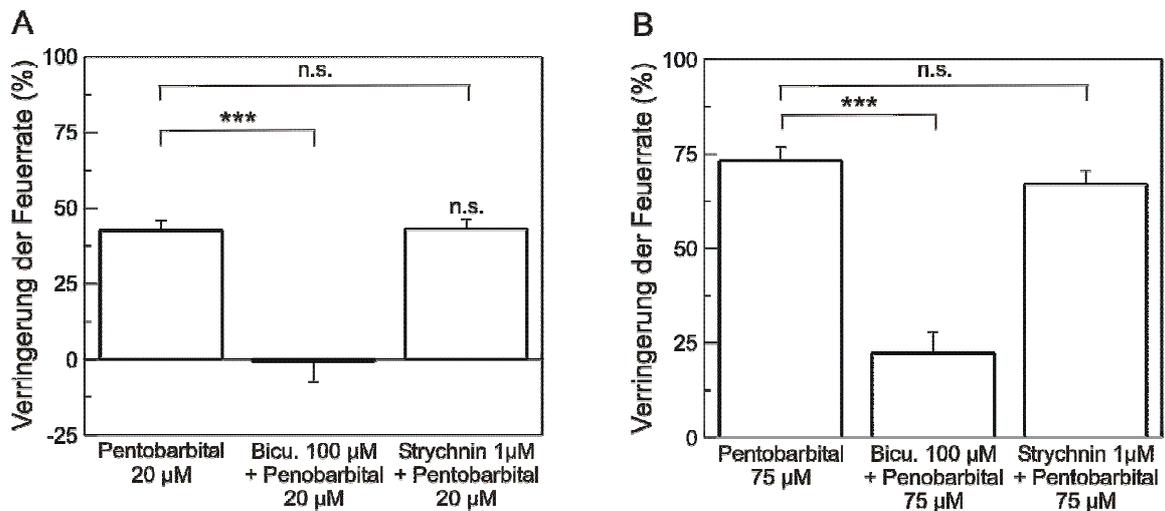


Abb. 28

Abb. 28 Wirkungen unterschiedlicher Pentobarbitalkonzentrationen auf die Feuerrate in Anwesenheit von GABA_A- und Glycin-Rezeptorblockern. Die Darstellung der Ergebnisse und die Methoden der Datenanalyse entsprechen der in Abbildung 27 erläuterten Vorgehensweise.

Im Anschluss an die Hemmversuche mit Bicucullin wurden entsprechende Untersuchungen mit dem Glycin-Rezeptorantagonisten Strychnin (1 µM) durchgeführt. Eine verminderte Wirksamkeit von Thiopental und Pentobarbital in mit Strychnin behandelten Rückenmarksschnitten spricht für eine Beteiligung von Glycin-Rezeptoren am Wirkmechanismus der Barbiturate (Zhang et al., 2003; Cheng et al., 2002).

Die durchgeführten Versuche sollten testen, ob die Wirkung der untersuchten Barbiturate durch Strychnin modifiziert wird.

Strychnin zeigte bei beiden untersuchten Konzentrationen keine signifikante Veränderung der Wirkung von Thiopental und Pentobarbital (ANOVA und Post-Hoc-Test von Tukey). Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass Glycin-Rezeptoren am Wirkmechanismus dieser Barbiturate nicht wesentlich beteiligt sind.

Die Abbildungen 29 und 30 fassen die quantitativen Ergebnisse der Antagonismusexperimente zusammen. Die gewählte Darstellung stützt die Formulierung einer Arbeitshypothese, die mit den in dieser Studie erhobenen Daten vereinbar ist.

Im Zentrum dieser Arbeitshypothese steht die Frage, inwieweit GABA_A-, Glycin- und bisher noch nicht identifizierte Rezeptoren an der Unterdrückung der Netzwerkaktivität durch Thiopental und Pentobarbital beteiligt sind.

Die in den Abbildungen 29 und 30 dargestellten relativen Fraktionen sind aus Daten errechnet worden, die in Abbildung 26 und 27 dargestellt sind.

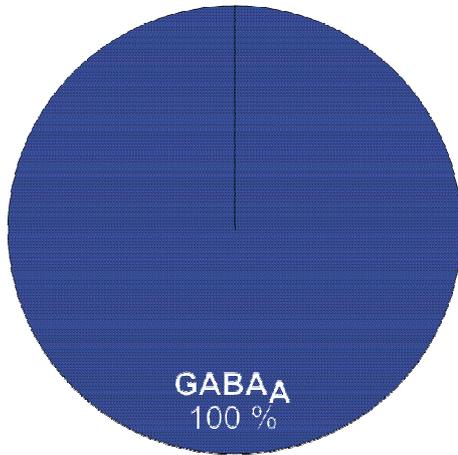
Für die Ermittlung der Effekte wurde eine additive Überlagerung der Teilwirkungen angenommen, die über verschiedene Rezeptorsysteme vermittelt werden.

Einzuräumen ist, dass ein über die Modellrechnung hinausgehender experimenteller Nachweis der berechneten Prozentzahlen noch aussteht.

Für diese kritischen Experimente sind jedoch methodische Ansätze erforderlich, die die in dieser Arbeit angewendeten Methoden überschreiten. Die Diagramme in Abbildung 29 und 30 zeigen, dass im Bereich niedriger Konzentrationen die durch Thiopental und Pentobarbital bewirkte Unterdrückung der Spontanaktivität spinaler Neurone ausschließlich über GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird.

Im Bereich der höheren Konzentrationen sind jedoch weitere, bisher weitgehend nicht identifizierte molekulare Zielstrukturen hinzu. Glycin-Rezeptoren scheinen im klinisch relevanten Konzentrationsbereich kaum an den spinalen Wirkungen von Barbituraten beteiligt zu sein.

A



B

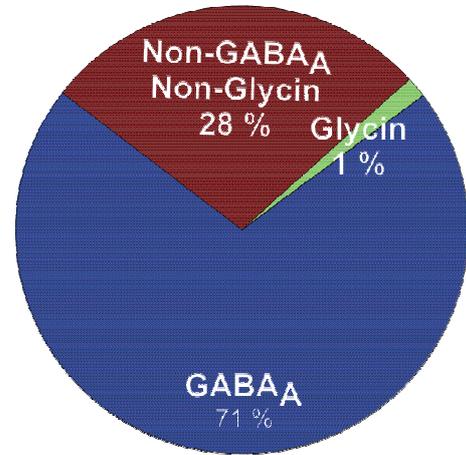
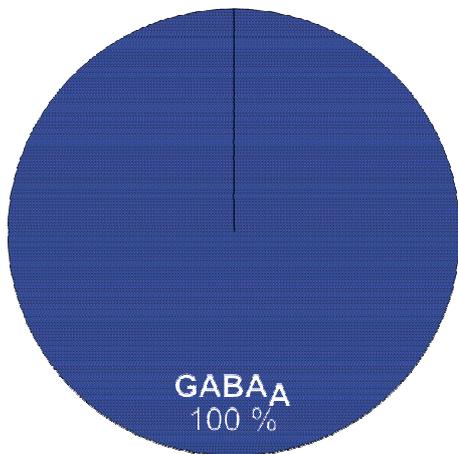


Abb. 29

Abb. 29 Geschätzter Beitrag von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren an der Wirkung von Thiopental 20 µM in A und 75 µM in B auf die Aktivität spinaler Neurone.

A



B

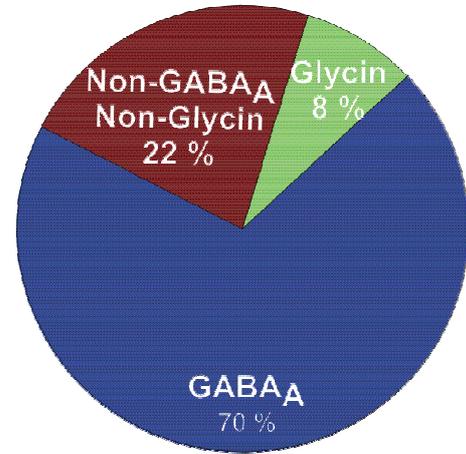


Abb. 30

Abb. 30 Geschätzter prozentualer Beitrag von GABA_A- und Glycin-Rezeptoren an den spinalen Wirkungen von Pentobarbital, in Konzentrationen von 20 µM in A und 75 µM in B.

4. Diskussion

4.1 Thiopental und Pentobarbital vermindern die Spontanaktivität von Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten zeigten, dass die Barbiturate Thiopental ($EC_{50} = 16,6 \pm 2,4 \mu\text{M}$) und Pentobarbital ($EC_{50} = 28,3 \pm 16,0 \mu\text{M}$) die spontane Aktionspotentialaktivität von Interneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks konzentrationsabhängig vermindern.

Die wirksamen in vitro-Konzentrationen der Barbiturate entsprechen denjenigen, die im Tierversuch und bei Menschen hypnotisch und immobilisierend wirken.

Hung und Mitarbeiter (Hung et al., 1992) berichten, dass Thiopental spinale Funktionen beeinträchtigt, wobei von den Autoren ein EC_{50} -Wert von $15,6 \mu\text{g/ml}$ angegeben wird. Die gleiche Studie zeigt, dass zur Unterdrückung von Schmerzreaktionen, die durch Druck auf den Trapeziusmuskel sowie durch eine Laryngoskopie und nachfolgende Intubation induziert werden, die EC_{50} -Konzentrationen für Thiopental bei $25 \mu\text{M} - 50 \mu\text{M}$ liegen (Hung et al., 1992).

Sehr ähnliche Konzentrationen unterdrücken motorische Reflexe bei Ratten.

Eine Konzentration von ca. $10 \mu\text{M}$ war notwendig, um den Aufrichtreflex auszuschalten, der im Tiermodell ein Maß für Bewusstlosigkeit ist.

Um Bewegungen der Extremitäten zu unterdrücken, die durch einen Schmerzreiz mittels einer Klemme am Schwanz von Ratten sowie durch Reizung bei der Intubation getriggert wurden, waren Konzentrationen von 25 und $42 \mu\text{M}$ erforderlich (Gustafsson et al., 1996).

Wie von Franks und Lieb (Franks and Lieb, 1994) berechnet, liegt bei Thiopental eine 85 %ige und bei Pentobarbital eine 61 %ige Proteinbindung vor.

Weiter berichten die gleichen Autoren, dass $40 \mu\text{g/ml}$ Thiopental einer wirksamen Konzentration von $25 \mu\text{M}$ in wässriger Lösung entspricht. Um bei Nagern die Antwort auf Schmerzreize zu unterbinden, waren in dieser Studie $15,4 \mu\text{g/ml}$ Pentobarbital nötig, was einer freien Konzentration in wässriger Lösung von ca. $50 \mu\text{M}$ entspricht.

Aufrichtreflexe wurden bereits bei Konzentration von 27 μM unterbunden. Diejenigen Konzentrationen, die klinisch relevant sind und den Zustand der Anästhesie herbeiführen, bewegen sich demnach für Thiopental zwischen 10 und 50 μM , für Pentobarbital zwischen 27 und 50 μM . Hieraus ergibt sich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wirkstoffkonzentrationen als klinisch relevant einzustufen sind.

4.2 Molekulare Angriffspunkte von Thiopental und Pentobarbital im Vorderhorn des Rückenmarks

Aus in vitro Studien haben sich Hinweise ergeben, dass Allgemeinanästhetika mit verschiedenen ligandengesteuerten Ionenkanälen interagieren. (Zhang et al., 2003). Barbiturate modulieren die Aktivität von GABA_A-, Glutamat- und Glycin-Rezeptoren, wobei je nach Studie sehr unterschiedliche Konzentrationen von 10 bis 1000 μM verwendet worden sind. Die molekularen Mechanismen, über die Barbiturate immobilisierend wirken, sind bis heute weitgehend unerforscht. Besonders aufschlussreich sind neueste Ergebnisse von Zeller und Mitarbeitern (Zeller et al., 2007). Die Autoren quantifizierten die Wirkungen von Pentobarbital in $\beta 3$ (N265M)-Mausmutanten, die in der $\beta 3$ -Proteinuntereinheit des GABA_A-Rezeptors eine Punktmutation tragen. Diese Tiere zeigten bei vorangegangenen Studien besonders für die intravenösen Anästhetika Etomidat und Propofol eine verminderte Sensitivität. Zeller und Mitarbeiter berichten (Zeller et al., 2007), dass bei dieser Mäusemutante ein Bolus von 50 - 75 mg/kg Pentobarbital nicht ausreicht, um die motorische Reaktionen auf einen Schmerzreiz zu unterdrücken, hingegen bei 62,5 - 75 mg/kg Pentobarbital alle Wildtypmäuse immobilisiert waren (Zeller et al., 2007). Zudem war die zur Unterdrückung des Aufrichtreflexes notwendige Barbiturat-Konzentration in der $\beta 3$ -Mutante signifikant erhöht. Diese Ergebnisse implizieren, dass die hypnotischen und immobilisierenden Eigenschaften von Pentobarbital hauptsächlich durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt werden.

Diese Hypothese stützen auch die in dieser Arbeit an organotypischen Rückenmarksschnitten erreichten Ergebnisse, denn aus den Resultaten der Antagonismusexperimente wurde geschlossen, dass Thiopental und Pentobarbital die Feuerrate von Nervenzellen im Vorderhorn des Rückenmarks in vitro hauptsächlich durch eine Potenzierung der GABA_A-Rezeptor-Funktion verringert, während Glycin-Rezeptoren von untergeordneter Bedeutung sind.

Thiopental und Pentobarbital verlängerten auch die Abklingzeit postsynaptischer GABA_A-Rezeptor-vermittelter Ströme. Dieser Effekt trat bei einer Konzentration ein, die die Netzwerkaktivität im Rückenmark um 70 % verminderte.

Eine entsprechende Wirkung der Barbiturate konnte an Glycin-Rezeptoren nicht beobachtet werden.

Die oben erläuterten Untersuchungen und die in dieser Studie erhobenen Daten ergeben ein einheitliches Bild.

Die klinische Wirkung von Barbituraten wird primär durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt, wobei im Bereich höherer Konzentrationen weitere molekulare Zielstrukturen hinzukommen. Die gleichen Schlussfolgerungen wurden auch aus Untersuchungen an akut isolierten Gewebeschnitten des Neokortex gezogen (Lukatch and MacIver, 1996; Lukatch et al., 2005).

Welche molekularen Zielstrukturen sind, abgesehen von GABA_A-Rezeptoren, im Bereich höherer Barbiturat-Konzentrationen noch relevant?

Verschiedene Autoren diskutieren eine mögliche Beteiligung von Glycin-Rezeptoren, die im Rückenmark in hohen Dichten exprimiert werden (Lu et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten jedoch darauf hin, dass Glycin-Rezeptoren im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen nicht wesentlich an den spinalen Wirkungen von Barbituraten beteiligt sind.

Weitere Ionenkanäle, die eventuell zur Unterdrückung der neuronalen Aktivität durch Barbiturate beitragen könnten, werden in der Literatur diskutiert. So zeigen Lukatch und MacIver (Lukatch and MacIver, 1996; Lukatch et al., 2005), dass eine Hemmung von NMDA-Rezeptoren durch Thiopental zur Verminderung kortikaler

Netzwerkaktivität beiträgt. Die Autoren berichteten, dass im EEG erfassbare Wirkungen, insbesondere die Induktion langsamer δ Wellen oder die Unterdrückung von Bursts, die bei einer Thiopentalkonzentration von 50 - 70 μM deutlich ausgeprägt sind, durch Glutamat-Rezeptoren vermittelt werden. Aus den Ergebnissen einer Folgestudie geht hervor, dass unter Einwirkung hoher, aber immer noch klinisch relevanter Thiopentalkonzentrationen neben dem GABA_A -Rezeptor eine Wirkung über den Glutamat-Rezeptor vermittelt wird (Lukatch and MacIver, 1996; Lukatch et al., 2005).

Diese Resultate werden durch die Arbeit von Liu und Mitarbeitern (Liu et al., 2006) zur Wirkung von Thiopental auf kortikale Pyramidenzellen bestätigt. Die Autoren legen dar, dass Thiopental mit einem EC_{50} -Wert von 33,6 μM die Amplitude von NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen verringert.

Im Gegensatz zu Liu und Kollegen (Liu et al., 2006) konnten Dickinson und Mitarbeiter im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen (Dickinson et al., 2002) keine Wirkungen von Thiopental auf glutamaterge postsynaptische Ströme in Neuronen des Hippokampus von Ratten beobachten. Die Arbeiten von Clara und Moroni (Clara and Moroni, 1992) am Kortex von Mäusen jedoch zeigen, dass hohe Thiopentalkonzentrationen (100 - 400 μM) die durch Glutamat-Rezeptoragonisten induzierten Ströme antagonisieren.

In anderen Publikationen wurde untersucht, inwieweit Thiopental die Funktion von Kalzium-Kanälen moduliert (Todorovic et al., 2000; Lingamaneni and Hemmings, 2003).

Aufgrund der Resultate dieser Arbeiten ist es unwahrscheinlich, dass im klinisch relevanten Konzentrationsbereich Kalzium-Kanäle an den immobilisierenden Wirkungen von Thiopental beteiligt sind, denn diese Ionenkanäle werden erst durch deutlich höhere Barbiturat-Konzentrationen geblockt (Dickinson et al., 2002). Untersucht wurde auch der Einfluss von Barbituraten auf Kalium-Kanäle (Friederich and Urban, 1999; Liu et al., 2004). Auch dabei konnten im klinisch relevanten Konzentrationsbereich keine herausragenden Effekte nachgewiesen werden.

Ohtsuka und Mitarbeiter (Ohtsuka et al., 2006) berichteten, dass bereits eine Konzentration von 30 μM Thiopental eine Verringerung des ATP-Abbaus in den Neuronen der Substantia nigra um 4,7 % bewirkt. Die Ursache für den veränderten ATP-Bedarf ist jedoch ungeklärt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wirkungen an GABA_A -Rezeptoren gut dokumentiert sind, sich aus dem Studium der einschlägigen Literatur aber nur eine dünne und teilweise widersprüchliche Datenlage ergibt, was die molekularen Wirkmechanismen von Barbituraten betrifft.

Gegenwärtig bleibt noch unklar, welche molekularen Strukturen, neben den GABA_A -Rezeptoren, an den hemmenden Wirkungen dieser Anästhetika im Rückenmark besonders bei hohen Konzentrationen beteiligt sind.

4.3 Vergleich der Wirkungen unterschiedlicher Anästhetika im Vorderhorn des Rückenmarks in vitro

Im folgenden Abschnitt sollen die spinalen Wirkungen von Barbituraten mit Wirkungen anderer klinisch gebräuchlicher Anästhetika miteinander verglichen werden. Grasshoff und Mitarbeiter (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff and Antkowiak, 2006; Grasshoff et al., 2006 a) haben die konzentrationsabhängige Wirkung von Etomidat, Propofol, Enfluran und Sevofluran im Vorderhorn des Rückenmarks charakterisiert. Dabei bewirkten die volatile Anästhetika Enfluran, Isofluran und Sevofluran eine vollständige Unterdrückung der spontanen Aktionspotential-Aktivität in Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff and Antkowiak, 2006).

Die volatilen Anästhetika unterscheiden sich in ihrer Wirkung von den intravenösen wie Etomidat und Propofol. Selbst im Bereich sehr hoher Konzentrationen unterdrückten intravenöse Anästhetika die Aktionspotentiale nur bis zu 60 %. Im direkten Vergleich mit den untersuchten volatilen Anästhetika einerseits und Etomidat und Propofol andererseits nimmt Thiopental eine Zwischenstellung ein. Bei relativ hohen aber noch klinisch relevanten Konzentrationen liegt die hemmende Wirkung zwischen ca. 75 und 90 %.

Die unterschiedliche Effektivität, mit der Anästhetika die neuronale Aktivität im Vorderhorn des Rückenmarks hemmen, könnte mit der Anzahl der molekularen Targets in einem kausalen Zusammenhang stehen, über die verschiedene Anästhetika wirken. Nach dieser Hypothese wäre die maximal erzielbare Unterdrückung der neuronalen Aktivität begrenzt, wenn ein Wirkstoff relativ spezifisch wirkt und nur eine Klasse von Ionenkanälen beeinflusst (z. B. GABA_A-Rezeptoren). Dies ist nachweislich bei Propofol und Etomidat der Fall. Anästhetika mit einem weiten Wirkspektrum, die über GABA_A-, Glycin- und Glutamat-Rezeptoren gleichzeitig angreifen, zeigen eine deutlich höhere Kapazität bei der Unterdrückung spinaler Neurone.

Gestützt wird diese Hypothese durch Daten von Grasshoff und Antkowiak (Grasshoff and Antkowiak, 2004), die für Etomidat und Propofol die Unterdrückung von Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks, die fast ausschließlich über GABA_A-Rezeptoren erfolgt, nachweisen konnten (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff et al., 2006 a).

Auch Versuche an β 3-Mäusemutanten stützen die Hypothese, dass klinisch verwendete Anästhetika im Rückenmark über sehr unterschiedliche Zielstrukturen wirken. So zeigte die β 3-Mäusmutante bei fast toxischen Konzentrationen von Propofol noch Reflexe der hinteren Gliedmaßen, die durch Schmerzreize getriggert wurden (Jurd et al., 2003). Die Wirkungen der hier untersuchten Barbiturate in organotypischen Rückenmarksschnitten ähneln im Bereich moderater Konzentrationen denjenigen von Etomidat und Propofol, denn in diesem Konzentrationsbereich dominieren die Effekte an GABA_A-Rezeptoren.

Hohe Barbituratkonzentrationen wirken jedoch nicht nur über GABA_A-Rezeptoren, sondern auch über weitere molekulare Mechanismen, die jedoch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht weiter charakterisiert werden konnten.

Sie ähneln den volatilen Anästhetika, die ebenfalls im Rückenmark über mehrere molekulare Zielstrukturen verfügen. Der molekulare Angriff von Enfluran, Isofluran und Sevofluran erfolgt zwar in klinisch relevanten Bereichen auch über GABA_A-Rezeptoren, jedoch tragen GABA_A-Rezeptoren nur zu einem Teil von 30 % zur

vollständigen Unterdrückung von Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks bei (Grasshoff and Antkowiak, 2004; Grasshoff and Antkowiak, 2006; Wong et al., 2001). Ähnliche Schlussfolgerungen wurden aus Experimenten an β 3-knock-in Mäusen gezogen. Die Mutation bewirkte bei einer Erhöhung der MAK-Werte für Enfluran, Halothan und Isofluran eine Unterdrückung um lediglich 10 – 20 % (Jurd et al., 2003; Lambert et al., 2005). Anders als Barbiturate potenzieren volatile Anästhetika Glycin-Rezeptor-abhängige inhibitorische Ströme (Cheng et al., 2002; Wong et al., 2001).

Grasshoff und Mitarbeiter (Grasshoff and Antkowiak, 2006) fanden durch spezifische Antagonismusversuche des Glycin-Rezeptors heraus, dass volatile Anästhetika eine 30 - 40 %ige Unterdrückung von Neuronen im Vorderhorn durch Modulation von Glycin-Rezeptoren hervorrufen. Dieser Sachverhalt entspricht Kendig und Kollegen, deren Ergebnisse an akuten Gewebeschnitten des Rückenmarks erarbeitet wurden (Wong et al., 2001). Zudem berichteten andere Autoren (Cheng and Kendig, 2000; Cheng and Kendig, 2003; Heurteaux et al., 2004), dass Glutamat-Rezeptoren sowie so genannte „Two-Pore-Domain-Kalium-Kanäle“ zur immobilisierenden Wirkung volatiler Anästhetika beitragen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Barbiturate hinsichtlich in ihrer Effektivität, spinale neuronale Netzwerkaktivität zu hemmen, zwischen volatilen und intravenösen Anästhetika anzusiedeln sind. Die Anzahl der molekularen Zielstrukturen lässt ebenfalls eine Zwischenstellung von Barbituraten erkennen und ist konform mit der Effektivitätsabstufung:

volatile Anästhetika > Barbiturate > Propofol / Etomidat.

4.4 Vergleich der immobilisierenden Wirkung verschiedenen Anästhetika

Bei Patienten, die eine Anästhesie mit dem intravenösen Anästhetikum Propofol erhalten, war die Inzidenz intraoperativer Bewegungen höher, als bei Patienten, bei denen volatile Anästhetika erhielten (Smith and Thwaites, 1999; Ashworth and Smith, 1998; Watson and Shah, 2000).

Im Fall von Propofol war die Inzidenz solcher Ereignisse doppelt so hoch als bei volatilen Anästhetika (Watson and Shah, 2000). Die Arbeitsgruppe von Ashworth (Ashworth and Smith, 1998) berichtete, dass bei spontan atmenden Patienten während der Propofol-Narkosen im Vergleich zu Isofluran-Narkosen ein dreifach höheres Auftreten unwillkürlicher Bewegungen beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse belegen die klinische Relevanz der oben zitierten in vitro-Befunde. Volatile Anästhetika wie Sevofluran und Isofluran sind wohl diejenigen Medikamente, die die höchste immobilisierende Wirkung erzielen, da sie über zahlreiche molekulare Zielstrukturen im Rückenmark verfügen, denn jedes dieser Medikamente unterdrückt die neuronale Erregung vollständig.

Das Vorderhorn des Rückenmarks ist ein wichtiges neuronales Substrat für die immobilisierenden Wirkungen von Anästhetika. Allerdings können auch andere Teile des Nervensystems an der Vermittlung von Immobilität beteiligt sein. So konnten Ma und Mitarbeiter zeigen (Ma et al., 2002), dass die fokale Verabreichung von GABA_A-Rezeptoragonisten ins Septum die immobilisierende Wirkung verschiedener Anästhetika verstärkt (Ma et al., 2002).

Zudem fand die Arbeitsgruppe von Devor heraus, dass bei Injektion von Anästhetika und GABA_A-Agonisten in bestimmte Kerngebiete des Hirnstamms ebenfalls Immobilität ausgelöst werden kann (Devor and Zalkind, 2001; Sukhotinsky et al., 2005). Die Forschungsergebnisse dieser Studien haben für intravenöse Anästhetika gezeigt, dass Immobilität ebenfalls durch Medikamentenwirkung auf supraspinale Strukturen vermittelt werden kann, was den hier vorgelegten Daten nicht widerspricht. So erscheint es wahrscheinlich, dass Propofol, Etomidat, Thiopental und Pentobarbital immobilisierend wirken, indem sie Neurone im Rückenmark und im Gehirn unterdrücken.

Die relativen Beiträge spinaler und supraspinaler Wirkungen zur Induktion von Bewegungslosigkeit sind noch nicht bekannt.

5. Zusammenfassung

Ausgangspunkt der vorliegenden Studie war die Frage, inwieweit interneuronale Netzwerke im Vorderhorn des Rückenmarks an den immobilisierenden Eigenschaften von Barbituraten beteiligt sind.

Elektrophysiologische Messungen an organotypischen Gewebekulturen des Rückenmarks wurden durchgeführt, um die Wirkungen von Thiopental und Pentobarbital auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone zu quantifizieren. Zudem wurde untersucht, inwieweit GABA_A- und Glycin-Rezeptoren die Wirkungen von Thiopental und Pentobarbital vermitteln.

Thiopental verminderte die Aktionspotentialaktivität von Neuronen des Rückenmarksvorderhorns konzentrationsabhängig (EC₅₀: 16,6 ± 2,4 µM).

Die bei den Experimenten maximal erreichte Hemmung betrug 87,3 ± 5,0 %.

Pentobarbital zeigte qualitativ die gleiche Wirkung.

Der EC₅₀ betrug 28,3 ± 16,0 µM, die maximal erreichte Hemmung 79,4 ± 4,5 %.

Aus Versuchen mit spezifischen Antagonisten des GABA_A- und Glycin-Rezeptors ergaben sich Hinweise darauf, dass die Wirkung von Barbituraten hauptsächlich über GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird. Bei Wirkstoffkonzentrationen, die 20 µM übersteigen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere molekulare Zielstrukturen am Wirkmechanismus der Barbiturate beteiligt.

Im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen sind Glycin-Rezeptoren für die spinalen Wirkungen von Barbituraten eher von untergeordneter Bedeutung.

Aus den Resultaten der vorliegenden Studie kann gefolgert werden, dass (1) die hemmende Wirkung von Barbituraten im Rückenmark limitiert ist, weshalb (2) an der immobilisierenden Wirkung dieser Anästhetika in vivo nicht ausschließlich spinale Netzwerke, sondern auch supraspinale Strukturen beteiligt sind.

6. Literaturverzeichnis

Abbott Laboratories Learn about Abbott Laboratories' history of medical expertise and pharmaceutical innovation, http://www.abbott.com/global/url/content/en_US/10.30:30/general_content/General_Content_00069.htm 22.09.07.
http://www.abbott.com/global/url/pressRelease/en_US/60.5:5/Press_Release_0118.htm 22.09.07.

Antkowiak B, Helfrich FC (1998) Effects of small concentrations of volatile anesthetics on action potential firing of neocortical neurons in vitro. *Anesthesiology* 88: 1592-1605.

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

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

Ballerini L, Galante M (1998) Network bursting by organotypic spinal slice cultures in the presence of bicuculline and/or strychnine is developmentally regulated. *Eur J Neurosci* 10: 2871-2879.

Ballerini L, Galante M, Grandolfo M, Nistri A (1999) Generation of rhythmic patterns of activity by ventral interneurons in rat organotypic spinal slice culture. *J Physiol Lond* 517: 459-475.

Banard EA, Skolnick P, Olsen RW, Möhler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291-313.

Beato M, Nistri A (1999) Interaction between disinhibited bursting and fictive locomotor patterns in the rat isolated spinal cord. *J Neurophysiol* 82: 2029-2038.

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

Betz H (1991) Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci* 14: 458–461.

Betz H (1992) Structure and function of inhibitory glycine receptors. *Q Rev Biophys* 25: 381–394.

Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Brown N, Wafford KA, Whiting PJ (1999) Theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17: 9891-9896.

Bormann J (2000) The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21: 16-19.

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

Campagna JA, Miller KW, Forman SA (2003) Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 348: 2110-2124.

Cash DJ and Subbarao K (1987) Desensitiation of gamma-aminobutyric acid receptor from rat brain: two distinguishable receptors on the same membrane. *Biochemistry* 26: 7556-7562.

Cheng G, Kendig JJ (2000) Enflurane directly depresses glutamate AMPA and NMDA currents in mouse spinal cord motor neurons independent of actions on GABAA or glycine receptors. *Anesthesiology* 93: 1075-1084.

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

Cheng G, Kendig JJ (2003) Enflurane decreases glutamate neurotransmission to spinal cord motor neurons by both pre- and postsynaptic actions. *Anesth Analg* 96: 1354-1359.

Clara V and Moroni F (1992) General anaesthetics inhibit the responses induced by glutamate receptor agonists in the mouse cortex. *Neurosci Lett* 146: 21-24.

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

Cooper E, Couturier S and Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350: 235–238.

Darbon P, Scicluna L, Tscherter A, Streit J (2002) Mechanisms controlling bursting activity induced by disinhibition in spinal cord networks. *Eur J Neurosci* 15: 671-683.

- Devor M, Zalkind V (2001)** Reversible analgesia, atonia, and loss of consciousness on bilateral intracerebral microinjection of pentobarbital. *Pain* 94: 101-112.
- Dickinson R, de Sousa SL, Lieb WR, Franks NP (2002)** Selective synaptic actions of thiopental and its enantiomers. *Anesthesiology* 96: 884-892.
- Drexler B, Grasshoff C, Rudolph U, Unertl K, Antkowiak B (2006)** The GABA_A receptor family : Possibilities for the development of better anesthetics. *Anaesthesist* 55: 287-295.
- Downie DL, Hall AC, Lieb WR and Franks NP (1996)** *Br J Pharmacol* 118: 493–502.
- Ernst M, Brauchart D, Boresch S, Sieghart W (2003)** Comparative modeling of GABA_A receptors: limits, insights, future developments. *Neurosci* 119: 933–943.
- Franks NP, Lieb WR (1994)** Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367: 607-614.
- Friederich P, Urban BW (1999)** Interaction of intravenous anesthetics with human neuronal potassium currents in relation to clinical concentrations. *Anesthesiology* 91: 1853-1860.
- Gähwiler BH (1981)** Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4: 329-342.
- Grasshoff C, Antkowiak B (2004)** Propofol and sevoflurane depress spinal neurons in vitro via different molecular targets. *Anesthesiology* 101: 1167-1176.
- Grasshoff C, Antkowiak B (2006)** Effects of isoflurane and enflurane on GABA_A and glycine receptors contribute equally to depressant actions on spinal ventral horn neurones in rats. *Br J Anaesth* 97: 687-694.
- Grasshoff C, Jurd R, Rudolph U, Antkowiak B (2006) a** Spinal Beta3-Containing GABA_A Receptors Mediate Pre- and Postsynaptic Effects of Etomidate. *Anesthesiology* 105: A1115.
- Grasshoff C, Drexler B, Rudolph U, Antkowiak B (2006) b** Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects. *Curr Pharm Des* 12: 3665-3679.
- Gustafsson LL, Ebling WF, Osaki E, Stanski DR (1996)** Quantitation of depth of thiopental anesthesia in the rat. *Anesthesiology* 84: 415-427.

Hadipour-Jahromy M, Daniels S (2003) Binary combinations of propofol and barbiturates on human alpha(1) glycine receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Eur J Pharmacol* 477: 81-86.

Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B (2005) Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* 21:93–102.

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

Hung OR, Varvel JR, Shafer SL, Stanski DR (1992) Thiopental pharmacodynamics. II. Quantitation of clinical and electroencephalographic depth of anesthesia. *Anesthesiology* 77: 237-244.

Jinks SL, Atherley RJ, Dominguez CL, Sigvardt KA, Antognini JF (2005) Isoflurane disrupts central pattern generator activity and coordination in the lamprey isolated spinal cord. *Anesthesiology* 103: 567-575.

Johnston GA (1996) GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 69: 173-198.

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

Karasowski MD and Harrison NL (1999) General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 55: 1278-1303.

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

Kuhse J, Betz H and Kirsch J (1995) The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 5: 318–323.

Lambert S, Arras M, Vogt KE, Rudolph U (2005) Isoflurane-induced surgical tolerance mediated only in part by beta3-containing GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 516: 23-27.

Langosch D, Thomas L and Betz H (1988) Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7394–7398.

Leo Levi (1957) The barbituric acids, their chemical structure, synthesis and nomenclature. UNDC: 30-40 http://www.unodc.org/unodc/en/bulletin/bulletin_1957-01-01_1_page004.html#bf31 22.09.07.

Lingamaneni R, Hemmings HC Jr (2003) Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA_A receptors. *Br J Anaesth* 90: 199-211.

Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF, Yost CS (2004) Potent activation of the human tandem pore domain K channel TREK1 with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg* 99: 1715-1722.

Liu H, Dai T, Yao S (2006) Effect of thiopental sodium on N-methyl-D-aspartate-gated currents. *Can J Anaesth* 53: 442-448.

Lu H, Xu TL (2002) The general anesthetic pentobarbital slows desensitization and deactivation of the glycine receptor in the rat spinal dorsal horn neurons. *J Biol Chem* 277: 41369-41378.

Lukatch HS, MacIver MB (1996) Synaptic mechanisms of thiopental-induced alterations in synchronized cortical activity. *Anesthesiology* 84: 1425-1434.

Lukatch HS, Kiddoo CE, MacIver MB (2005) Anesthetic-induced Burst Suppression EEG Activity Requires Glutamate-mediated Excitatory Synaptic Transmission. *Cereb Cortex* 15: 1322-1331.

Ma J, Shen B, Stewart LS, Herrick IA, Leung LS (2002) The septohippocampal system participates in general anesthesia. *J Neurosci* 22: RC200.

Marder E, Calabrese RL (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76: 687-717.

Mascia MP, Machu T and Harris RA (1996) Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br J Pharmacol* 119: 1331–1336.

McKernan RM and Whiting PJ (1996) Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143.

Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27: 569–575.

Ohtsuka T, Ishiwa D, Kamiya Y, Itoh H, Nagata I, Saito Y, Yamada Y, Sumitomo M, Andoh T (2006) Effects of barbiturates on ATP-sensitive K channels in rat substantia nigra. *Neuroscience* 137: 573-581.

Olsen RW and DeLorey TM (1999) GABA and Glycine. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects Sixth Edition Part Two. Intercellular Signaling: Chapter 16.*

Pistis M, Belelli D, Peters JA and Lambert JJ (1997) The interaction of general anaesthetics with recombinant GABA_A and glycine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: a comparative study. *Br J Pharmacol* 122: 1707–1719.

Rajendra S, Lynch JW and Schofield PR (1997) The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 73: 121-146.

Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, Hadingham KL, Hutson PH, Belelli D, Lambert JJ, Dawson GR, McKernan R, Whiting PJ, Wafford KA (2003) Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA_A receptor isoforms. *J Neurosci* 23: 8608-8617.

Smith I, Thwaites AJ (1999) Target-controlled propofol vs. sevoflurane: a double-blind, randomised comparison in day-case anaesthesia. *Anaesthesia* 54: 745-752.

Sonner JM, Zhang Y, Stabernack C, Abaigar W, Xing Y, Laster MJ (2003) a GABA_A receptor blockade antagonizes the immobilizing action of propofol but not ketamine or isoflurane in a dose-related manner. *Anesth Analg* 96: 706-712.

Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, Homanics GE, Kendig J, Orser B, Raines DE, Trudell J, Vissel B, Eger EI (2003) b Inhaled Anesthetics and Immobility: Mechanisms, Mysteries, and Minimum Alveolar Anesthetic Concentration. *Anesth Analg* 97: 718-740.

Spenger C, Braschler UF, Streit J, Luscher HR (1991) 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.

Stephenson FA (1988) Understanding the GABA_A receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem J* 249: 21-32.

Sukhotinsky I, Hopkins DA, Lu J, Saper CB, Devor M (2005) Movement suppression during anesthesia: neural projections from the mesopontine tegmentum to areas involved in motor control. *J Comp Neurol* 489: 425-448.

Todorovic SM, Perez-Reyes E, Lingle CJ (2000) Anticonvulsants but not general anesthetics have differential blocking effects on different T-type current variants. *Mol Pharmacol* 58: 98-108.

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

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

Yang CX, Xu H, Zhou KQ, Wang MY, Xu TL (2006) Modulation of gamma-aminobutyric acid A receptor function by thiopental in the rat spinal dorsal horn neurons. *Anesth Analg* 102: 1114-1120.

Zafra F, Aragon C and Gimenez C (1997) Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol Neurobiol* 14: 117-142.

Zeller A, Arras M, Jurd R, Rudolph U (2007) Identification of a molecular target mediating the general anesthetic actions of pentobarbital. *Mol Pharmacol* 71(3): 852-859.

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

IV Dankesworte

Diese Arbeit entstand zwischen April 2005 und Oktober 2007 in der Klinik für Anästhesiologie und Transfusionsmedizin Abteilung Experimentelle Anästhesiologie der Universität Tübingen.

Hiermit möchte ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Sektion Experimentelle Anästhesiologie für die Hilfsbereitschaft im Labor, für Anregungen sowie das gute Arbeitsklima meinen herzlichen Dank aussprechen.

Besonders danke ich:

Herrn Prof. Dr. Bernd Antkowiak für die herzliche Aufnahme in seine Abteilung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, unter denen ich in der Experimentellen Anästhesiologie selbständig arbeiten durfte.

Dr. Christian Grasshoff, der mich bei dieser Dissertation betreut und unterstützt hatte.

Dr. Harald Hentschke und Claudia Hold für erklärende Hilfen.

V Lebenslauf

Personalien

Name	Nicolai Daniel Netzhammer
Geburtsdatum	03.12.1980
Geburtsort	Konstanz

Schulbildung

1987 – 1991	Tegginger Grundschule Radolfzell
1991 – 2000	Friedrich-Hecker Gymnasium Radolfzell
Juni 2000	Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

August 2000	DRK Radolfzell, Ausbildung zum Rettungshelfer und Rettungssanitäter
-------------	--

Berufsausbildung

November 2002	Heilbronner Fachinstitut für notfallmedizinische Aus- und Weiterbildung, Rettungsassistenten
---------------	--

Vorsemester

November - Dezember 2002	Vorsemester für Medizin in Köln
--------------------------	---------------------------------

Medizinstudium

Dezember 2002

Aufnahme des Medizinstudiums
Carl-Gustav-Carus Universität Dresden

SS 2004

Tutor der Anatomie Medizinische Fakultät
Carl-Gustav-Carus Universität Dresden

August 2004

Vordiplom, Physikum an der Carl Gustav
Carus Universität Dresden

Oktober 2004

Universitätswechsel an die Eberhard-Karls-
Universität Tübingen und Fortsetzung des
Medizinstudiums

April 2005

Doktorand und wissenschaftlicher
Mitarbeiter in der Sektion Experimentelle
Anästhesiologie

Tutorate

November 2004

Heimrat des Studentenwohnheims Konrad
Adenauer-Str. 46

April 2005

Arbeitsgruppe Notfallmedizin Tübingen

April 2006

Skills Lab der Inneren Medizin

Mai 2006

Skills Lab Anästhesie

Famulaturen

März 2004	Anästhesie Hegau- Klinikum Singen, Baden-Württemberg
WS 2005	Innere Medizin, Intensivstation, Universität Tübingen
August 2006 - Oktober 2006	Anästhesie Middlemore und Manukau Krankenhaus, Universität Auckland, Neuseeland
November 2006	Anästhesie Krankenhaus Launceston, Universität von Tasmanien

Praktisches Jahr

August 2007 - Dezember 2007	Unterassistent Chirurgie/Orthopädie Spital Davos, Schweiz
Dezember 2007 - Februar 2008	Unterassistent Innere Medizin Spital Davos, Schweiz
Februar 2008 - März 2008	PJler Innere Medizin Marienhospital Stuttgart, Deutschland
März 2008 - Juni 2008	PJler Anästhesie Marienhospital Stuttgart, Deutschland
28.Oktober 2008	Ärztliche Prüfung

