

**Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin Tübingen**

**Effekte von Midazolam auf neuronale Erregung im
Mauskortex in Abhängigkeit von Adenosin und IL-1 β**

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

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

vorgelegt von

Krumbein, Michael Eberhard

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Grasshoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwarz

Tag der Disputation: 12.04.2018

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Midazolam.....	7
1.2 Wirkung von Benzodiazepinen an GABA _A -Rezeptoren	9
1.3 Adenosin im zentralen Nervensystem.....	10
1.4 Adenosin-Rezeptoren und ihre Wirkung auf neuronale Erregung und synaptische Übertragung	12
1.5 Adenosinausschüttung im ZNS während pathophysiologischer Zustände	14
1.6 Interleukin-1 β	16
1.7 Einfluss der Narkosetiefe auf das Überleben von Patienten	17
1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Präparation und Herstellung von Hirnschnitten	22
2.2 Elektrophysiologie.....	24
2.3 Elektrodenplatzierung und Stimulationsparadigma	25
2.4 Applikation der Testsubstanzen	29
2.5 Analyseintervalle und Berechnung der elektrophysiologischen Parameter	32
2.6 Statistische Verfahren	35
3 Ergebnisse	40
3.1 Beispielerperimente verschiedener Experimentserien.....	40
3.2 Adenosin und Midazolam verringerten die mittlere Feuerrate im Mauskortex	43
3.3 Adenosin verminderte die Wirksamkeit von Midazolam	46
3.4 Einfluss von Midazolam und Adenosin auf die räumliche Ausbreitung neuronaler Signale	52

4 Diskussion.....	54
4.1 Aktivitätshemmende Effekte von Midazolam im somatosensorischen Kortex.....	54
4.2 Effekte von Adenosin auf kortikale Netzwerke	57
4.3 Interleukin-1 β	59
4.4 Interaktion von Adenosin und Midazolam	64
4.5 Klinische Implikation und Schlussfolgerung	70
5 Zusammenfassung.....	73
6 Quellenverzeichnis	75
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	87
8 Anhang.....	88

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
BIS	Bispektral-Index
CD39	E-NTPDase1
CD73	Ecto-5' NTase
CSF	cerebrospinal fluid
dB	Dezibel
EEG	Elektroenzephalogramm
ENT	Equilibrative nucleoside transporter
EPSP	erregendes postsynaptisches Potenzial
fEPSP	Feld-EPSP
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
IL	Interleukin
ISI	Interstimulusintervall
LFP	lokales Feldpotenzial
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	minimale alveoläre Konzentration
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
PETH	Peri-Event-Time-Histogramm
SD	standard deviation / Standardabweichung

SHAM	von engl. „sham“ = vorgetäuscht; Name zur Beschreibung von Kontrollexperimenten mit Scheinapplikationen
SPX	spikes / Aktionspotenziale
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Durchführung einer Allgemeinanästhesie hat seit der ersten erfolgreichen Narkosedemonstration im Jahr 1846 durch William Morton die chirurgischen Möglichkeiten revolutioniert. Sie wird zu Recht als eine der wichtigsten medizinischen Neuerungen gewertet (1). Die Herausforderung für den Anästhesisten besteht unter anderem darin, sich auf die individuellen Charakteristika und die pathophysiologischen Veränderungen des jeweiligen Patienten einzustellen, um die Anästhesie dementsprechend anzupassen. Zu den individuellen Charakteristika gehören beispielsweise Alter und Geschlecht des Patienten, der Konsum von Genussmitteln usw. (2) (3) (4). Eine gehäuft auftretende pathophysiologische Veränderung ist das Vorliegen einer systemischen Inflammation. Eine systemische Inflammation kann verschiedene Organsysteme betreffen; häufig ist eine Mitbeteiligung des zentralen Nervensystems zu beobachten (5). Im zentralen Nervensystem der Patienten kommt es während einer Inflammation zu einer Veränderung der Ausschüttung von Neurotransmittern und Neuromodulatoren. Hierbei werden vermehrt Zytokine und Adenosin ausgeschüttet (6) (7). Es ist bekannt, dass Zytokine sowie Adenosin die Aktivität des ZNS durch eine Modulation des GABAergen Systems verändern können (8) (9). Viele Allgemeinanästhetika wirken über eine Modulation des GABAergen Systems (10). Daher habe ich in der vorliegenden Studie die Interaktionen des GABAergen Anästhetikums Midazolam mit Adenosin und dem Zytokin Interleukin-1 β untersucht.

1.1 Midazolam

Midazolam wurde erstmals 1976 synthetisiert und gehört zur Gruppe der Benzodiazepine (11). Weitere bekannte Vertreter sind Lorazepam und Diazepam. Benzodiazepine sind im klinischen Alltag weit verbreitet und werden zur Sedierung, Hypnose, Anxiolyse, Reduzierung des Muskeltonus und zur Antikonvulsion eingesetzt. In der Anästhesie werden Benzodiazepine v.a. bei

Operationen im Rahmen der Prämedikation oder zur Narkoseinduktion verwendet. Bei Intensivpatienten dienen sie außerdem zur Langzeitsedierung (12).

Die enorme Bedeutung dieser Substanzklasse zeigen auch der langjährige Einsatz und der große Forschungsaufwand. So wurden über 1000 Benzodiazepine synthetisiert, von denen weltweit 30 im klinischen Gebrauch sind. Schon seit den 1960er Jahren wurde Diazepam zur Narkoseeinleitung verwendet (13).

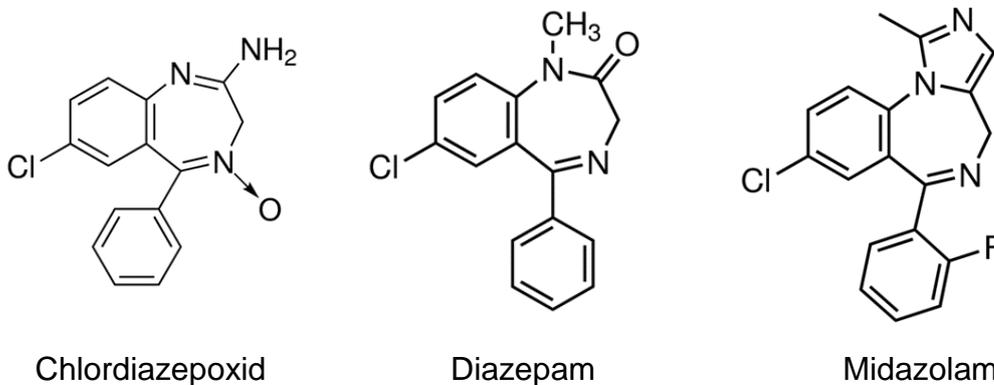


Abb. 1 Strukturformeln von Chlordiazepoxid, Diazepam und Midazolam

Für die Entwicklung der verschiedenen Benzodiazepine legten Sternbach und Randall 1957 mit der Entdeckung von Chlordiazepoxid den Grundstein. Bald erkannten sie, dass die pharmakologischen Eigenschaften durch chemische Modifikationen verändert werden konnten. Daraus resultierte die Synthese des „klassischen“ Benzodiazepins Diazepam und weiterer Vertreter wie auch des Midazolams (11).

Midazolam zeichnet sich strukturell durch einen fusionierten Imidazolring aus und gehört daher zur Gruppe der tetrazyklischen Benzodiazepine. Dieser verleiht Midazolam eine höhere Basizität, bessere Stabilität in wässrigen Lösungen und eine schnellere Abbaubarkeit im Vergleich zu Diazepam (11).

Der Metabolismus von Midazolam erfolgt überwiegend durch die Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 in der Leber (13). Quantitativ ist v.a. der pharmakologisch aktive Metabolit 1-OH-Midazolam bedeutsam. Außerdem wird Midazolam in kleineren Mengen zu 4-OH-Midazolam und 1,4-OH-Midazolam abgebaut. Die Metaboliten von Midazolam werden anschließend glukuronidiert in den Urin abgegeben (12).

1.2 Wirkung von Benzodiazepinen an GABA_A-Rezeptoren

Benzodiazepine wie Midazolam und auch andere Anästhetika wie zum Beispiel Etomidat, Propofol, Isofluran oder Barbiturate entfalten ihre Wirkung überwiegend oder teilweise über Modulation des GABA_A-Rezeptors (10). Klinisch äußert sich diese Modulation in der Regulation von Vigilanz, Angstempfinden, Muskelspannung und Gedächtnisleistung (13). Der GABA_A-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal, der eine zentrale Stellung bei der neuronalen Inhibition im ZNS einnimmt. GABA_A-Rezeptoren sind Pentamere, wobei gegenwärtig 19 unterschiedliche Untereinheiten bekannt sind (α_{1-6} ; β_{1-3} ; γ_{1-3} ; δ ; ϵ ; θ ; π ; σ_{1-3}) (14). Dementsprechend können GABA_A-Rezeptoren sehr heterogen aufgebaut sein. Dennoch gibt es bestimmte Zusammensetzungen, die besonders häufig anzutreffen sind. So sind zum Beispiel mehr als 60% aller GABA_A-Rezeptoren im Gehirn aus α_1 -, β_2 - und γ_2 -Untereinheiten zusammengesetzt. Bei Kombinationen aus α -, β - und γ -Untereinheiten nimmt man an, dass eine 2:2:1 Stöchiometrie besteht. Die verschiedene Zusammensetzung von GABA_A-Rezeptoren geht mit unterschiedlicher Kinetik, Affinität zum natürlichen Liganden (GABA), Affinität zu allosterischen Modulatoren, Desensitivierung und subzellulärer Positionierung einher (15) (10). Viele dieser Eigenschaften von GABA_A-Rezeptoren wurden mithilfe gezielter genetischer Veränderung von Untereinheiten entdeckt. Beispielsweise konnte mittels Punktmutation gezeigt werden, dass GABA_A-Rezeptoren, die α_1 -Untereinheiten besitzen, vor allem Sedierung hervorrufen, während Rezeptoren mit α_2 -Untereinheit anxiolytische Effekte vermitteln (16).

Physiologisch wird der GABA_A-Rezeptor durch γ -Aminobuttersäure (GABA) aktiviert, die zwischen α - und β -Untereinheiten bindet (17). Dadurch wird der GABA_A-Rezeptor aktiviert und Chlorid-Ionen gelangen durch den Ionenkanal des GABA_A-Rezeptors (18). Durch die resultierende Erhöhung der membranösen Leitfähigkeit und durch den Einstrom von Chlorid-Ionen sind Neuronen weniger erregbar und werden hyperpolarisiert, sodass es zu neuronaler Inhibition kommt.

Benzodiazepine modulieren GABA_A-Rezeptoren allosterisch. Dabei werden die Eigenschaften der Rezeptoren so verändert, dass die Öffnungszeiten der Kanäle bei Anwesenheit von GABA verlängert werden. Das bedeutet, dass Benzodiazepine den GABA_A-Rezeptor nicht selbst öffnen können, sondern inhibitorische Ströme verstärken (19).

Benzodiazepine können jedoch nicht alle GABA_A-Rezeptoren beeinflussen. Der Aufbau der Rezeptoren bestimmt die Sensitivität gegenüber Benzodiazepinen. So werden nur GABA_A-Rezeptoren, die eine der $\alpha_{1,2,3,5}$ -Untereinheiten enthalten, von Benzodiazepinen beeinflusst. Die sogenannte hochaffine, klassische Benzodiazepin-Bindungsstelle befindet sich zwischen der α - und γ -Untereinheit (15). Verschiedene Arbeiten zeigen, dass nanomolare Konzentrationen von Benzodiazepinen hauptsächlich ihre Wirkung über die klassische Benzodiazepin-Bindungsstelle entfalten (20). Zudem scheint zumindest eine weitere nicht-spezifische Benzodiazepin-Bindungsstelle zu existieren, die bei mikromolaren Konzentrationen zum Tragen kommt (21) (22) (20).

1.3 Adenosin im zentralen Nervensystem

Die Voraussetzung für die Wirkung von Midazolam besteht in dem Vorhandensein des natürlichen Liganden GABA und der Expressierung von GABA_A-Rezeptoren (23). Beide Aspekte unterliegen zahlreichen endogenen Regulationsmechanismen. Dem Nukleosid Adenosin kommt hierbei eine wichtige Rolle zu. Im Folgenden sollen die Eigenschaften von Adenosin im ZNS und seiner Rolle in der Modulation synaptischer Übertragung (Kapitel 1.4) erörtert werden.

Adenosin ist ein Metabolit des ubiquitären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). ATP besitzt zusätzlich einen Phosphatsäurerest und wird deshalb als Nukleotid bezeichnet. Nukleotide sind energiereiche Verbindungen, die aus einem Zuckeranteil, einem Phosphatsäurerest und einer Base bestehen (24). Funktionell sind Nukleotide von außerordentlicher Wichtigkeit und in jeder Zelle vorhanden. Zum einen sind lange Nukleotidketten in Form von DNA oder RNA Träger der genetischen Information. Zum anderen können Zellen mithilfe von Nukleotiden chemische Reaktionen ablaufen lassen, die Energie benötigen. Dabei ist vor allem ATP als Energieträger von großer Bedeutung (24).

Auch Adenosin, als Abbauprodukt von ATP, spielt sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So fördert Adenosin beispielsweise das Schlafbedürfnis (25). Dieser Zusammenhang ist weithin durch die Wirkung des Adenosin-Rezeptor-Antagonisten Koffein bekannt, der Aufmerksamkeit erhöht und Müdigkeit herabsetzt. In pathologischen Zuständen wie Hypoxie, Ischämie, Trauma oder epileptischen Anfällen wird Adenosin vermehrt im ZNS freigesetzt und kann eine neuroprotektive Wirkung entfalten (26).

Adenosin wird nicht als Neurotransmitter angesehen, da keine Synapsen bekannt sind, deren primärer Botenstoff Adenosin ist. Zudem konnte bisher nicht auf breiter Datenbasis gezeigt werden, dass Adenosin über Vesikel freigesetzt wird. Da extrazelluläres Adenosin rezeptorvermittelt dennoch potente Wirkung auf neuronales Gewebe ausüben kann, spricht man von einem Neuromodulator (27).

Die Hauptquelle von extrazellulärem Adenosin unter physiologischen Bedingungen scheint bisher jedoch unklar zu sein. Zum einen kann Adenosin über sogenannte ENTs (Equilibrative nucleoside transporter) aus dem Zellinneren freigesetzt werden. ENTs sind diffusionsgesteuerte Transporter, die Adenosin bidirektional über die Zellmembran transportieren können. In aktiven Neuronen mit erhöhtem Energie-/ATP-Metabolismus fällt intrazellulär vermehrt Adenosin an, das konzentrationsabhängig in den Extrazellulärraum gelangen kann (28). Unter physiologischen Bedingungen finden sich jedoch geringe

intrazelluläre Adenosin-Konzentrationen. Daher befördern ENTs Adenosin dem Gradienten folgend vor allem in den Intrazellulärraum (29).

Zum anderen können Astrozyten vesikulär ATP abgeben, das nachfolgend zu Adenosin abgebaut wird (30). Extrazelluläres ATP wird enzymatisch in kurzer Zeit (<1 Sekunde) durch die Ectonukleotidasen CD39 (ATP -> AMP) und CD73 (AMP -> Adenosin) metabolisiert (31) (32). Lovatt et al. beobachteten am Hippokampus und Kortex jedoch, dass trotz Blockade von CD73 die Adenosin-Wirkung nicht gehemmt werden konnte und schlossen daher extrazelluläres ATP als Hauptquelle von Adenosin aus (28).

Außerdem kann auch extrazelluläres cAMP und anschließender Umbau zu Adenosin die extrazelluläre Konzentration erhöhen (29). Allerdings scheinen erhöhte cAMP-Konzentrationen die extrazelluläre Adenosin-Konzentration nur sehr langsam zu beeinflussen (33).

Neuere Arbeiten am Kleinhirn zeigten, dass Adenosin möglicherweise direkt über Vesikel in den Extrazellulärraum gelangen könnte (34). Allerdings fehlt für diesen Modus der Adenosin-Freisetzung noch eine breite Datenbasis (35).

Interessanterweise scheint die extrazelluläre Adenosin-Konzentration innerhalb des Kortex keineswegs homogen anzusteigen. Vielmehr können aktive Neuronen die Konzentration lokal ansteigen lassen (36).

Die Entfernung von extrazellulärem Adenosin erfolgt durch Aufnahme ins Zellinnere über obengenannte ENTs. Intrazellulär kann Adenosin zu AMP phosphoryliert oder zu Inosin abgebaut werden (29).

1.4 Adenosin-Rezeptoren und ihre Wirkung auf neuronale Erregung und synaptische Übertragung

Bisher sind vier verschiedene Adenosin-Rezeptoren (A1, A2a, A2b und A3) bekannt, die zu den sogenannten P1-Rezeptoren (Purino-Rezeptoren) gehören. Alle Adenosin-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt. Hierbei unterscheiden sich die Rezeptoren in der Ligandenaffinität, der intrazellulären

Signaltransduktion und ihrer Verteilung innerhalb von Gehirnregionen (37). Die wichtigsten Rezeptoren im ZNS sind der A1- und A2a-Rezeptor (27). Unter physiologischen Adenosin-Konzentrationen werden vor allem diese aktiviert (29). Der A1-Rezeptor kommt im ZNS am häufigsten vor und besitzt zudem die höchste Affinität zu Adenosin (26). A2b- und A3-Rezeptoren konnten nur in geringem Maße im Gehirn nachgewiesen werden und scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen (38).

Aktivierung von A1-Rezeptoren führt über G-Proteine zur Absenkung von intrazellulärem cAMP, welches in zahlreichen Signaltransduktionskaskaden eine bedeutende Rolle spielt. Der genaue Zusammenhang zwischen der Signalkaskade von Adenosin-Rezeptoren und Änderungen der cAMP-Konzentration ist derzeit jedoch unklar (35).

Die Aktivierung von postsynaptischen A1-Rezeptoren erhöht die Kaliumleitfähigkeit. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation des Membranpotenzials und damit zu einer verminderten Erregbarkeit von Nervenzellen. Präsynaptisch wird der Kalziumeinstrom durch Blockade von spannungsgesteuerten N-Typ Kalziumkanälen verringert (39). Zudem wird der Exozytoseapparat, der die Freisetzung von Transmittern ermöglicht, gegenüber Kalziumionen desensitiviert (35). Dadurch wird die Transmitterausschüttung durch präsynaptische A1-Rezeptoren herabgesetzt.

Der A2a-Rezeptor besitzt eine geringere Affinität zu Adenosin und ist seltener im Gehirn zu finden. A2a-Rezeptoren sind v.a. im Striatum und Nucleus accumbens verbreitet (40). Im Kortex finden sich A2a-Rezeptoren vor allem präsynaptisch.

A2a-Rezeptoren weisen konträre Eigenschaften im Vergleich zu A1-Rezeptoren auf. Zum einen kommt es bei Aktivierung der Rezeptoren zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Zum anderen werden, vermutlich aufgrund einer zellspezifischen Verteilung der Rezeptoren, vermehrt erregende Transmitter (z.B. Glutamat) ausgeschüttet, wohingegen inhibitorische Transmitter wie GABA vermindert ausgeschüttet werden (27) (38). Aktivierung von A2a-Rezeptoren führt insgesamt zu neuronaler Erregung (29) (27).

Damit wird deutlich, dass A1- und A2a - Rezeptoren gegenläufige Effekte (Inhibition vs. Exzitation) besitzen. Somit bestimmt das Verhältnis von A1- und A2a-Rezeptoren das lokale Wirkungsprofil von Adenosin auf das neuronale Netzwerk. Im Allgemeinen ist anzunehmen, dass Adenosin im ZNS vor allem inhibitorisch wirksam ist. Dafür spricht das vermehrte Vorkommen von A1-Rezeptoren und die höhere Ligandenaffinität im Vergleich zum A2a-Rezeptor.

1.5 Adosinausschüttung im ZNS während pathophysiologischer Zustände

Pathophysiologische Zustände wie Hypoxie, Ischämie, Hypoglykämie oder Anfallsleiden führen zu vermehrter Adosinfreisetzung im zentralen Nervensystem (26). Dabei kommt es zu einem Ungleichgewicht von Energiebedarf und Energiebereitstellung, das zu einem gesteigerten intrazellulären Abbau von ATP führt. Unter physiologischen Bedingungen sorgt die Adosinkinase-Aktivität für niedrige intrazelluläre Adosin-Konzentrationen, indem sie Adosin zu AMP phosphoryliert. Dabei ist die Adosinkinase jedoch auf intrazelluläres ATP als Energieträger angewiesen, das der Zelle bei obengenannten Situationen nicht mehr ausreichend zur Verfügung steht. In der Folge steigt die intrazelluläre Adosin-Konzentration an (26). Daher wird angenommen, dass während pathophysiologischer Zustände Adosin über ENTs dem Gradienten folgend in den Extrazellulärraum gelangt (27) (28). Zudem kann ATP aus geschädigten Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, direkt nach extrazellulär gelangen und so die extrazelluläre Adosin-Konzentration erhöhen (41).

Über eine Aktivierung von A1-Rezeptoren kann, wie oben erwähnt, die intrazelluläre Kalziumkonzentration und das Ruhemembranpotenzial abgesenkt werden. Damit wird die synaptische Übertragung abgeschwächt und der neuronale Energieverbrauch gemindert. Jedoch wird nicht nur der Energieumsatz von Neuronen herabgesetzt. Knock-Out Mäuse ohne A1-Rezeptoren zeigen vermehrt Neuroinflammation und Mikrogliaaktivität (41).

Durch A1-Aktivierung entfaltet Adenosin somit eine neuroprotektive Wirkung (28).

In dieses Bild passt, dass eine Blockierung von A2a-Rezeptoren zur Neuroprotektion beiträgt. Dies unterstreicht auch hier die entgegengesetzten Wirkungsprofile von A1- und A2a-Rezeptoren (38) (27).

Nicht nur pathophysiologische Prozesse, bei denen die Energieversorgung des Gewebes vermindert bzw. überbeansprucht wird, haben einen Anstieg der Adenosin-Konzentration zur Folge. Auch während einer systemischen Inflammation nehmen ATP und Adenosin eine wichtige Rolle ein. Schon längere Zeit ist bekannt, dass erhöhte Adenosin-Konzentrationen durch Moleküle der Inflammationskaskade wie IL-1 β oder Lipopolysaccharide (LPS) induziert werden können (42) (43).

Bei einer systemischen Inflammation werden vermehrt ATP und zeitlich verzögert Adenosin im zentralen Nervensystem freigesetzt (6). Zudem kommt es auch im Blutplasma zu einer erhöhten Adenosin-Konzentration bei Sepsispatienten (44).

Interessanterweise modulieren ATP und Adenosin die Immunantwort gegensätzlich. ATP fördert die Immunantwort und aktiviert zum Beispiel neutrophile Granulozyten oder Makrophagen und führt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β . Adenosin hingegen inaktiviert Neutrophile und fördert die Funktion von immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen (32). Auch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wird durch Adenosin herabgesetzt (38). Beispielsweise dämpft Adenosin den Gewebeschaden bei LPS-induzierter Entzündung der Lunge (45).

Durch enzymatischen Abbau von ATP zu Adenosin kann also das entzündliche Milieu moduliert werden (proinflammatorisch vs. antiinflammatorisch). Wie eingangs erwähnt, erfolgt der Abbau von ATP zu Adenosin über die Enzyme CD39 und CD73. Damit nehmen CD39 und CD73 eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort ein. Interessanterweise können manche Bakterien oder auch Tumorzellen die Funktion von CD39/CD73 so beeinflussen, dass

vermehrt Adenosin anfällt. Dadurch wird eine Umgebung mit abgeschwächter Immunantwort geschaffen (32).

Zusammengenommen dient Adenosin deshalb nicht nur der Neuromodulation, sondern auch der Modulation des Entzündungsgeschehens.

1.6 Interleukin-1 β

Zentrale Moleküle im Entzündungsgeschehen sind Zytokine, zu denen Interleukine zählen. Zu ihnen gehört auch Interleukin-1 β (IL-1 β) aus der Interleukin-1-Superfamilie. Interleukin-1 β besitzt eine starke entzündungsfördernde Wirkung (46) (47). Die Ausschüttung von Interleukin-1 β kann durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen die Aktivierung durch andere Moleküle des Immunsystems und Kontakt mit körperfremdem Material wie beispielsweise Bakterien und deren Stoffwechselprodukten. Aber auch chemisch-physikalische Einflüsse wie Hitze, Hyperosmolarität und Sauerstoffmangel führen zu vermehrter Produktion von IL-1 β . Interleukin-1 β kann als Immunantwort von verschiedenen Zelltypen wie z.B. Monozyten gebildet werden (48). Im ZNS kann ebenfalls IL-1 β produziert werden. Dabei wird diskutiert, dass IL-1 β auch physiologische Funktionen im gesunden Gehirn wahrnimmt. Niedrige IL-1 β -Konzentrationen im ZNS beeinflussen beispielsweise physiologisch die Regulation von Schlaf oder Nahrungsaufnahme (49).

Es existieren zwei verschiedene Rezeptoren (IL-1R), die IL-1 β binden. Dabei findet aber nur über den Typ 1 (IL-1RI) eine Signaltransduktion statt. Bei Bindung des Liganden wird die Genexpression verschiedener Proteine, die für die Immunantwort bedeutsam sind, verstärkt oder angeschaltet. IL-1RII bindet Interleukin-1 β ebenfalls, was aber zu keiner Signalweiterleitung führt. Vielmehr scheint dieser Rezeptortyp eine Falle (englisch „scavenger“ Rezeptor) für IL-1 β darzustellen (50). Die Effekte von IL-1 β sind vielfältig und abhängig vom Zelltyp, der über den IL-1R aktiviert wird. Beispielsweise führt die Aktivierung im Knochenmark zu vermehrter Bildung von Thrombozyten und neutrophilen

Granulozyten; in der Leber werden Akute-Phase-Proteine gebildet. Ebenso werden weitere Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-6 von Endothelzellen sezerniert. Klinisch konnte gezeigt werden, dass es bei Entzündung im Rahmen einer Meningokokken-Meningitis zur Erhöhung von Interleukin-1 β im Liquor kommt (51) und das zentrale Nervensystem beeinflusst wird. Erhöhte IL-1 β -Konzentrationen im ZNS führen zu Fieber (52), Krankheitsgefühl (53) und fördern ebenso wie Adenosin das Schlafbedürfnis (54). Dabei werden sowohl Gliazellen, Endothelzellen und Neuronen durch Interleukin-1 β beeinflusst (55).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-1 β Ionenkanäle von Neuronen beeinflusst. Beispielsweise wurden Ströme von N-Typ-Kalziumkanälen in kortikalen Zellen durch Interleukin-1 β vermindert (56). Ebenfalls wurden spannungsgesteuerte Natriumkanäle von kortikalen Neuronen beeinflusst. So führte IL-1 β zu kleineren Natriumströmen mit verminderten Amplituden der Aktionspotenziale (57). Im Hippokampus junger Ratten hemmte IL-1 β die Freisetzung von Glutamat (58) und verstärkte die synaptische Hemmung von Pyramidenzellen in der CA1-Region (59).

1.7 Einfluss der Narkosetiefe auf das Überleben von Patienten

Den Grundstein der Allgemeinanästhesie legte Morton mit der ersten erfolgreichen Ether-Narkose im Jahr 1846 (60). Bereits ein Jahr später wurden für die Ether-Narkose verschiedene Narkosestadien beschrieben. Hier lag das Interesse neben der Erzielung einer ausreichend tiefen Narkose auch auf der gefürchteten Überdosierung (es standen bei Atem- und Kreislaufdepression keine ausreichenden Mittel zur Verfügung). Die Einteilung in verschiedene Narkosestadien bei Ether-Anästhesie kann als Ausgangspunkt für die Entwicklung des Begriffs der Narkosetiefe verstanden werden (61). „Narkosetiefe“ wird heutzutage unterschiedlich definiert. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die Betrachtung der verminderten Aktivität im ZNS, die durch Anästhetika ausgelöst wird (62). Eine andere Definition beschreibt „Narkosetiefe“

u.a. als Wahrscheinlichkeit einer aufgehobenen Reaktion des Patienten auf einen bestimmten Reiz (63)

Um einen Aspekt der Narkose(-tiefe), nämlich die Hypnose, klinisch zu quantifizieren, wird häufig der sogenannte Bispektral-Index (BIS) eingesetzt (64). Der Bispektral-Index untersucht dabei die Gehirnaktivität per Elektroenzephalographie (EEG) und wird einheitslos im Bereich von 0-100 angegeben. Niedrige BIS-Werte entsprechen dabei tiefer Sedierung, während hohe BIS-Werte bei Wachheit vorherrschen (65). Für eine optimale Sedierung im OP-Saal werden üblicherweise BIS-Werte zwischen 40 und 60 angestrebt (66).

Monk et al. konnten 2005 im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie an nicht-kardiochirurgischen Patienten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen niedrigen BIS-Werten (<45), also tiefer Hypnose, und erhöhter Mortalität besteht (67). Diese Arbeit stieß auf großes Interesse, da hierdurch die Frage aufgeworfen wurde, ob tiefe Hypnose im Operationssaal die Sterblichkeit von Patienten erhöhen könnte. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen, wurden in der Folge mehrere Studien durchgeführt. 3 von 4 retrospektiven Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen niedrigen BIS-Werten und erhöhter Mortalität feststellen (68) (69) (70), während eine Arbeit keine Korrelation zeigte (71).

Im Folgenden wurde der Parameter „niedriger BIS-Wert“ zur Abschätzung der Narkosetiefe um den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und geringe minimale alveoläre Konzentration (MAC) bei volatilen Anästhetika ergänzt. Sessler et al. postulierten 2012, dass die Kombination aus geringem BIS-Wert, niedrigem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und geringer minimaler alveolärer Konzentration (MAC) als Zeichen einer (zu) tiefen Narkose gewertet werden kann. Diese Kombination bezeichneten sie als „triple-low-status“. Grundgedanke des triple-low-status war, dass Patienten, die bereits bei relativ geringer Dosierung von volatilen Anästhetika (geringer MAC) Zeichen einer tiefen Hypnose (tiefe BIS-Werte) und hämodynamische Instabilität (niedriger MAP) entwickeln, besonders sensitiv auf Anästhetika reagieren und damit gefährdet sind eine zu tiefe Narkose zu erhalten. Interessanterweise zeigte diese Studie keinen Zusammenhang zwischen isoliert niedrigem BIS-Wert und erhöhter

Mortalität; allerdings bestand eine positive Korrelation zwischen triple-low-status und gesteigerter 30-Tages-Mortalität (72). Dieser Zusammenhang konnte jedoch in einer nachfolgenden Studie nicht bestätigt werden (73), wobei Willingham et al. 2015 eine erhöhte 30- und 90-Tages-Mortalität bei triple-low-status nachwies (74). Zusammengenommen liegen mehrere Studien vor, die eine positive Korrelation von erhöhter Mortalität und intraoperativer, tiefer Hypnose/Narkose nachwies. Diese Arbeiten werfen die Frage auf, ob tiefe Narkose die Sterblichkeit von Patienten erhöhen könnte. Dennoch ist nicht abschließend geklärt, ob es sich hierbei um ein Epiphänomen oder eine Kausalität handelt. Um hierauf eine eindeutige Antwort zu erhalten, sind prospektive, randomisierte, kontrollierte Studien notwendig. Eine eindeutige Handlungsempfehlung für den klinischen Alltag im Operationssaal lässt sich aus der aktuellen Studienlage derzeit nicht ableiten (75).

Anästhetika werden neben dem Operationssaal auch auf Intensivstation eingesetzt. Auch hier stellt sich, wie im OP-Saal, die Frage, ob eine tiefe und/oder langanhaltende Hypnose/Narkose das Outcome von Patienten beeinträchtigt. Im Jahr 2000 veröffentlichten Kress et al. eine Studie, bei der die kontinuierliche Sedierung bei mechanisch beatmeten Patienten täglich unterbrochen wurde, sodass Patienten das Bewusstsein erlangten und einfache Befehle befolgen konnten. Dieses Vorgehen führte zu einer verkürzten notwendigen Beatmung und schnellerer Entlassung von Intensivstation; zudem konnte der Gesamtbedarf an Benzodiazepinen verringert werden (76). In der Folge überprüften Girard et al. ebenfalls die Effekte einer Unterbrechung der Sedierung bei beatmeten Patienten. In der Kontrollgruppe wurde ein Weaning-Protokoll durchgeführt (Unterbrechen der kontrollierten Beatmung, um Patienten vom Beatmungsgerät zu entwöhnen). In der Interventionsgruppe wurde dieses Weaning-Protokoll durch eine Unterbrechung der Sedierung ergänzt. Die Unterbrechung der Sedierung führte in der Interventionsgruppe zu einer geringeren Mortalität und zu schnellerer Entlassung von Intensivstation und aus dem Krankenhaus. Zudem wurde eine längere Zeit der spontanen, nicht-unterstützten Atmung beobachtet (77). Die Ergebnisse von Girard und Kress wurden 2008 von Watson et al. unterstützt. Hier wurde ebenfalls überprüft, ob tiefe Sedierung und gesteigerte

Mortalität in einem Zusammenhang stehen. Dazu wurden mechanisch ventilerte Patienten untersucht, die eine Sedierung erhielten. Hierbei wurde als Parameter zur Quantifizierung der Narkosetiefe die sogenannte „burst suppression“ verwendet. Burst suppression ist ein Phänomen, das während tiefer Sedierung bei elektroenzephalographischer Ableitung beobachtet werden kann und als Ausdruck von stark herabgesetzter Gehirnaktivität gilt. Patienten, die eine burst suppression aufwiesen, zeigten im Vergleich einen verlängerten Krankenhausaufenthalt und eine erhöhte Mortalität (gesteigerte Mortalität auf Intensivstation und im Krankenhaus; zudem erhöhte 6-Monats-Mortalität) (78).

Insgesamt geben die oben genannten Studien Hinweise, dass tiefe Narkose im Operationsaal und auf Intensivstation die Mortalität von Patienten erhöhen könnte. Es ist daher anzunehmen, dass sich die moderne Anästhesie zukünftig häufiger fragen wird, ob eventuell eine zu tiefe Narkosetiefe besteht.

Im Gegensatz dazu sind Risiken einer „zu flachen“ Narkose besser bekannt. Beispielsweise erhöht eine insuffiziente Narkosetiefe die Wahrscheinlichkeit von intraoperativer Awareness (75). Unter Awareness versteht man eine Episode von Wachheit während einer Operation, an die sich der betroffene Patient explizit erinnern kann. Bei Awareness ist zu beachten, dass es in der Folge zu einer posttraumatischen Belastungsstörung kommen kann, die den Patienten psychisch stark beeinträchtigt (75). Um das Risiko von Awareness zu verringern, muss die moderne Anästhesie daher einer zu flachen Narkosetiefe vorbeugen. Andererseits sollte aber auch die Frage gestellt werden, ob eine (zu) tiefe Narkose notwendig ist bzw. vermieden werden sollte, da Hinweise vorliegen, dass tiefe Narkose eine erhöhte Mortalität begünstigen könnte.

1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Narkosetiefe im Operationssaal oder auf Intensivstation ist ein Parameter, der das Outcome von Patienten beeinflussen kann (67) (78) (75). Die Erreichung einer optimalen Narkosetiefe ist abhängig von Pharmakodynamik und –kinetik der eingesetzten Anästhetika (79). Pharmakodynamik und –kinetik von Anästhetika werden durch interindividuelle Eigenschaften von Patienten beeinflusst. Beispiele hierfür sind Alter (2), Geschlecht (3) oder Einnahme von Drogen und Alkohol (4). Zudem zeigen mehrere Tiermodelle, dass auch Inflammation die Sensitivität des ZNS gegenüber intravenösen und volatilen Anästhetika verändern kann (80) (81) (82) (83). Inflammation ist ein bedeutender pathologischer Zustand, der auch gegenwärtig nur unvollständig verstanden ist und gleichzeitig große Anforderungen an effiziente Therapiekonzepte stellt. Die schwere Sepsis bzw. der septische Schock, als eine Maximalform von Inflammation, sind Beispiele für wichtige und potenziell lebenslimitierende Erkrankungen. Bei systemischer (6) (7), aber auch lokaler Inflammation (z.B. bei autoimmun-entzündlichen Prozessen wie Multipler Sklerose) (84) (85) kommt es u.a. zu einem Anstieg von Adenosin und IL-1 β im ZNS. Von beiden Substanzen ist bekannt, dass sie zu Veränderungen der neuronalen Aktivität im ZNS führen (8) (26). Zudem wurde beschrieben, dass sowohl Adenosin als auch IL-1 β das GABAerge System beeinflussen (8) (9) (86), über das zahlreiche Anästhetika ihre Wirkung entfalten (10). Daher stellt sich die Frage, ob die Wirksamkeit von Anästhetika (und damit die resultierende Narkosetiefe) durch Adenosin oder IL-1 β beeinflusst werden könnte. Insgesamt ist über den Zusammenhang von Veränderungen des ZNS bei Inflammation und Narkose wenig bekannt (87). Daher untersuche ich in dieser Studie die Effekte von Adenosin und Interleukin-1 β und deren Interaktion mit dem Benzodiazepin Midazolam an Neuronen des Mäusekortex.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation und Herstellung von Hirnschnitten

Ziel der Präparationen war eine schonende und zugleich möglichst schnelle Entnahme des Gehirns, um vitale Hirnschnitte zu erhalten, die primären (S1) und sekundären (S2) somatosensorischen Kortex enthielten.

Männliche Mäuse des Typs C57/B6J im Alter von ca. 7 Wochen (Charles River Laboratories; Sulzfeld, D) wurden in einer Atmosphäre von 100% Sauerstoff mit Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG; Wiesbaden, D) bis zum Ausbleiben von Schmerzreflexen narkotisiert. Nach Dekapitation des Tiers wurde die Kopfhaut durchtrennt und abpräpariert, um die dorsale Schädelseite freizulegen. Vom Foramen magnum aus wurde der Schädel entlang der Sutura sagittalis mit einer Schere eröffnet. Die Schädelhälften konnten dann nach lateral gebrochen werden. Nach Abtrennung von Kleinhirn und frontalen Anteilen des Neokortex, wurde das Gehirn in gekühltes (3-4 °C) mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begastes Dissektionsmedium überführt (Tab. 1). Beim Entfernen des Kleinhirns

Tab. 1 Zusammensetzung Dissektionsmedium

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mmol/l]</i>
NaCl	110,00
KCl	2,50
NaH ₂ PO ₄	1,13
MgCl ₂	10,00
NaHCO ₃	20,00
CaCl ₂	0,50
D-Glucose	10,00
HEPES	10,00

wurde ein Winkel zur Vertikalen von ca. 5-10° gewählt, um das Gehirn später in entsprechend geneigter Lage auf dem Schneideblock aufzubringen. Anschließend wurde das Gehirn mit Sekundenkleber mit der kaudalen Schnittfläche auf einem Schneidblock fixiert, wobei die dorsale Seite des Gehirns der Klinge zugewandt war. Der Schneidblock besaß

eine Neigung von 20° zur Horizontalen in Richtung Klinge, sodass die

Längsachse des Gehirns insgesamt um etwa 25° zur Klinge hingeneigt war. Dieser Schnittwinkel war in etwa parallel zur Ausrichtung der Dendriten von Pyramidenzellen im somatosensorischen Kortex und gewährleistete eine optimale neuronale Konnektivität und Signalausbreitung innerhalb koronarer Schnitte (88). Die Schnittgewinnung erfolgte per Microslicer DTK 1000 (Diversified Equipment Company, Inc.; Lorton, USA); gewählt wurde eine Schnittdicke von 500 µm. Danach wurden die Schnitte über 30 Minuten in begaster „Post-Präparation“-ACSF (Tab. 2) bei ca. 31-33 °C aufbewahrt. Diese

enthielt unter anderem Ascorbinsäure zur Reduktion von freien Radikalen (89).

Tab. 2 Zusammensetzung ACSF nach Präparation

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mmol/l]</i>
NaCl	120,00
KCl	3,50
NaH ₂ PO ₄	1,13
MgCl ₂	1,00
NaHCO ₃	26,00
CaCl ₂	1,20
D-Glucose	11,00
HEPES	10,00
Na-Pyruvat	0,20
L-Glutamin	0,40
Ascorbinsäure	0,45

Nach 30 Minuten wurde die „Post-Präparation“-ACSF ausgetauscht und durch ACSF ersetzt, die für eine Präinkubations-Phase und die anschließenden Messungen verwendet wurde. Die Temperatur dieser „Präinkubations-/Mess“-ACSF (Tab. 3) betrug initial ebenfalls 31-33 °C; wurde aber nicht konstant gehalten, sodass sich Raumtemperatur einstellte. Die Schnitte verweilten für ca. 90 Minuten in dieser ACSF. Diese Zeit diente der Regeneration der Schnitte, als auch der Habituation an die abgesenkte

Magnesiumkonzentration. Denn im Vergleich zur „Post-Präparations“-ACSF enthielt die „Präinkubations-/Mess“-ACSF einen geringeren Magnesiumgehalt (0,5 mM), um neuronale Netzwerkaktivität zu erhöhen (90). Dies schien aus zweierlei Gründen angebracht. Zum einen ist in akuten Schnitten des Neokortex präparationsbedingt das Verhältnis erregender glutamaterger Verbindungen zu hemmenden GABAergen Verbindungen zugunsten Letzterer verschoben (91). Zum anderen war zu erwarten, dass die applizierten Substanzen (insbesondere Midazolam) neuronale Aktivität senkten. Um eventuelle Sättigungseffekte der

pharmakologischen Manipulation (komplette Unterdrückung der Aktivität) zu vermeiden, erschien es daher sinnvoll, Grundbedingungen leicht erhöhter Aktivität zu schaffen. Außerdem enthielten beide ACSF-Formulierungen einige der zahlreichen Substanzen, die in physiologischer CSF vorkommen, die der Vitalität und Langlebigkeit neuronalen Gewebes *in vitro* dienlich sind. Pyruvat ist eine Energiequelle für Neuronen und besitzt neuroprotektive Eigenschaften (92). L-Glutamin stabilisiert synaptische Übertragung und neuronale Spontanaktivität über lange Zeiträume (59) (60).

Tab. 3 Zusammensetzung ACSF
Präinkubation / Messung

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [mmol/l]</i>
NaCl	120,00
KCl	3,50
NaH ₂ PO ₄	1,13
MgCl ₂	0,50
NaHCO ₃	26,00
CaCl ₂	1,20
D-Glucose	11,00
HEPES	10,00
Na-Pyruvat	0,20
L-Glutamin	0,40

Zur Herstellung der ACSF-Lösungen wurden Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Merck (Darmstadt, D) verwendet.

2.2 Elektrophysiologie

Die Experimente wurden an einer Messstation mit dem Mikroskop Axioskop 2 FS Plus (Carl Zeiss AG; Oberkochen, D) durchgeführt. Die Ableitkammer des Messsystems (Volumen 2,5-3 ml) wurde kontinuierlich mit begaster ACSF (Tab. 3) bei einer Flussrate von 4 ml/min durchspült. Alle Messungen fanden bei 31,5-33 °C

statt. In der Ableitkammer wurde ein Sockel platziert, der eine mechanische Fixierung des Gehirnschnittes erlaubte. Der Sockel besaß ein Nylonnetz, das mit einem U-förmigen Platindraht (0,7 mm) unterlegt war; darauf wurde der Hirnschnitt positioniert. Von oben wurde ein passendes Gitter aus Platin aufgelegt, das den Hirnschnitt fixierte. Dieses Gitter besaß ebenfalls einen Abstandshalter in U-Form, um den Hirnschnitt keiner mechanischen Belastung auszusetzen. Diese Anordnung erlaubte, dass das Gewebe von allen Seiten mit ACSF umspült werden konnte.

Messelektroden wurden durch Verwendung des Elektrodenziehers P-2000 (Sutter Instrument Co.; Novato, USA) aus Glasröhrchen des Typs 1BBL W/FIL 1,5MM 31N (World Precision Instruments, Inc.; Sarasota, USA) hergestellt. Die Elektroden waren mit ACSF gefüllt und wiesen in der Regel einen ohmschen Widerstand von 0,5-1,0 M Ω auf. Die neuronalen Signale wurden mit einem Verstärker (MultiClamp 700A, Molecular Devices; Sunnyvale, USA) um den Faktor 1000 verstärkt, mit einem Analogwandler (Digidata 1440A, Molecular Devices) mit einer Rate von 10 kHz digitalisiert und mit einem handelsüblichen Computer aufgezeichnet. Zur Aufzeichnung und Stimulation kam die Software Clampex 10.4 (Molecular Devices) zum Einsatz.

Zur Stimulation wurden selbst angefertigte bipolare Wolframelektroden (Science Products GmbH; Hofheim, D) verwendet, die über einen Widerstand von 0,1 M Ω verfügten. Strompulse wurden mit einem Stimulator (STG 4002, Multichannel Systems; Reutlingen, D) in Kombination mit der Software MC Stimulus 3.4.4. (Multichannel Systems) generiert.

Zur Positionierung von Mess- und Stimulationselektroden wurde auf einen Hirnatlas (95) zurückgegriffen. Per Mikroskopkamera (VX45, PCO AG; Kehlheim, D) und dazugehöriger Software IP Capture 2.2. (The Imaging Source GmbH; Bremen, D) wurden Mikroskopbilder digitalisiert. Damit konnte die Position der Elektroden am Computer erfasst und gespeichert werden.

2.3 Elektrodenplatzierung und Stimulationsparadigma

Nach Identifizierung der kortikalen Gebiete S1 und S2 wurden zuerst zwei Stimulationselektroden, danach zwei Messelektroden, in Schicht 5 des Kortex platziert. Die Stimulationselektroden befanden sich in S1 bzw. S2; dazwischen die Messelektroden (Abb. 2). Bei Platzierung der Messelektroden erwies sich die akustische Ausgabe der Messsignale als hilfreich. So konnte hörbar gemacht werden, wenn die Elektroden das Gewebe berührten und dann vorsichtig in spitzem Winkel eingestochen wurden.



Abb. 2 Elektrodenplatzierung und Benennung der Stimulations- und Messelektroden

Bei der Elektrodenplatzierung waren drei Faktoren wichtig. Erstens wurde darauf geachtet, dass mit beiden Messelektroden bei Stimulation in S1 und in S2 nach Möglichkeit sowohl Aktionspotenziale als auch Feldpotenziale erfasst wurden, da beide Signalkomponenten ausgewertet werden sollten (Kapitel 2.5 enthält eine detaillierte Beschreibung der elektrophysiologischen Signale und Parameter, die ausgewertet wurden).

Zweitens wurden Ableitorte vermieden, an denen überwiegend antidromisch erzeugte Aktionspotenziale auftraten (d.h. mit Latenzen von weniger als 2 ms). Der Grund hierfür war, dass die hier angewandten pharmakologischen Behandlungen überwiegend synaptische Übertragung, nicht aber direkt erzeugte Aktionspotenziale und ihre axonale Weiterleitung beeinflussten, und daher nicht zu erwarten war, dass antidromische Signale eine Aussagekraft besäßen (vgl. Abb. 18).

Zuletzt durften Stimulations- und Messelektroden nicht zu nahe beieinanderliegen, da ansonsten langanhaltende Stimulationsartefakte auftraten.

In der Praxis ließen sich nicht immer alle Kriterien an beiden Messelektroden erfüllen. Die Messelektroden wurden zu Beginn im Abstand von $\geq 400 \mu\text{m}$ voneinander platziert, um die neuronale Signalausbreitung innerhalb Schicht 5 des Kortex (über mehrere synaptische Verbindungen) zu erfassen (vgl. Abb. 18). Systematische Vorversuche zeigten, dass sich neuronale Signale mit zunehmender Distanz zwischen Mess- und Stimulationselektrode abschwächten. Abb. 3 illustriert diesen Zusammenhang.

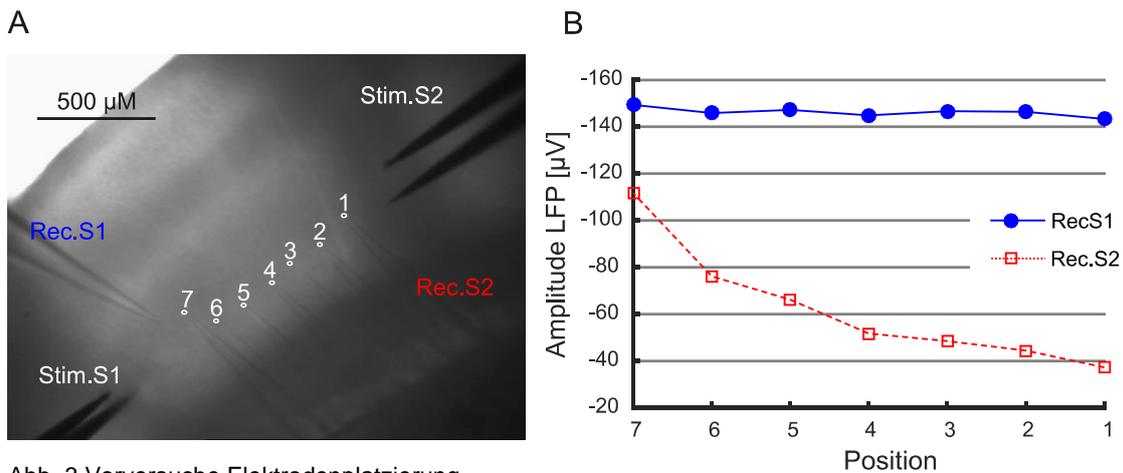


Abb. 3 Vorversuche Elektrodenplatzierung

A Mikroskopisches Bild der Versuchsanordnung. Beide Stimulationselektroden und Messelektrode Rec.S1 verblieben stationär an derselben Stelle. Die Position von Rec.S2 wurde verändert. 1-7 zeigt die verschiedenen Ableitorte von Rec.S2. Bei jeder Position wurde stimuliert und die resultierenden Signale aufgezeichnet. Die Abbildung wurde aus 7 Einzelbildern mit Adobe Photoshop angefertigt.

B Resultierende Amplituden der lokalen Feldpotenziale (LFP) auf Stimulation durch Stim.S1. Je negativer die abgebildeten Werte sind, desto größer waren die gemessenen Amplituden des LFP. Das Signal von Rec.S1 blieb konstant, da die Position dieser Messelektrode nicht verändert wurde.

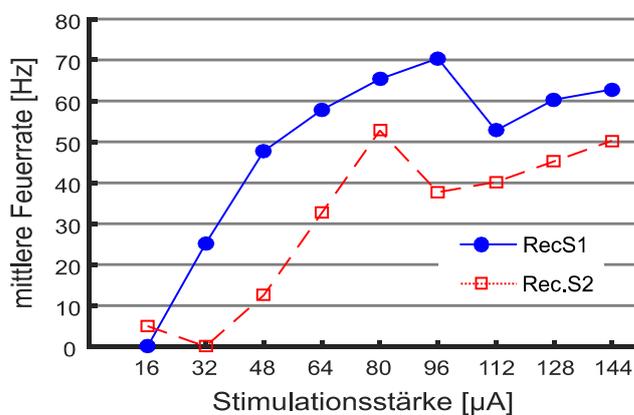


Abb. 4 Wahl der Stimulationsstärke

Das Diagramm zeigt beispielhaft die resultierende mittlere Feuerrate in Abhängigkeit der Stimulationsstärke bei Stimulation im kortikalen Gebiet S1.

Die Stimulationsstärke wurde so gewählt, dass etwa 50-70 % der maximalen Signalamplitude erreicht wurde. Damit waren die Signale ausreichend groß und weit genug entfernt von einer Sättigung der Netzwerke. Abb. 4 zeigt beispielhaft den Zusammenhang zwischen Stimulationsstärke und mittlerer Feuerrate nach Stimulation in S1. Hier führte eine

zunehmende Stromstärke zu stärkeren neuronale Antworten.

Erschienen auf der entfernteren Elektrode die Signale zu schwach für eine aussagekräftige Auswertung (LFP Amplitude $<30 \mu\text{V}$; Abwesenheit von Aktionspotenzialen), musste die Distanz verringert werden, sodass zum Teil

400 μm zwischen den Messelektroden unterschritten wurde. Daher befanden sich die Messelektroden teilweise im Grenzgebiet S1/S2.

Das Stimulationsparadigma sowie exemplarische Rohdaten sind in Abb. 5 dargestellt. Die Aufnahme der Signale erfolgte in sogenannten Episoden oder Stimulationsdurchläufen (englisch "sweeps") mit einer Dauer von 30 s, die ohne Pause aufeinander folgten. Innerhalb eines Durchlaufs wurden im Abstand von 15 s durch die Stimulationselektroden Stim.S1/S2 abwechselnd die Gebiete S1 und S2 stimuliert (Abb. 5A).

Durch diese abwechselnde Stimulation wurde das neuronale Gewebe an jeder Messelektrode pro Durchlauf einmal aus der Nähe (proximal) und einmal aus der Ferne (distal) stimuliert. Um diesen Zusammenhang zu verdeutlichen, wurden in der vorliegenden Arbeit Messelektroden und ihr abgeleitetes Signal (proximal vs. distal) eindeutig gekennzeichnet: Die Messelektrode in S1 (Rec.S1) wurde immer durch blaue Kreise symbolisiert; Messelektrode Rec.S2 durch rote Quadrate. Lieferte die Messelektrode Information über die proximale Stimulation, wurde dies mit einem ausgefüllten Quadrat/Kreis gekennzeichnet. Distale Stimulationen wurden durch Quadrate oder Kreise, die nicht ausgefüllt sind, gekennzeichnet (Abb. 5B).

Ein Stimulus bestand aus zwei Einzelpulsen im Abstand von 20 ms. Ein Einzelpuls besaß eine symmetrische, bipolare Rechteckkonfiguration. Dabei konnte die Amplitude der Stromstärke variiert werden ($\leq 160 \mu\text{A}$); die Pulsgesamtdauer betrug 400 μs (Abb. 5C). Abbildung 5D zeigt beispielhaft resultierende Signale bei Stimulation in S2.

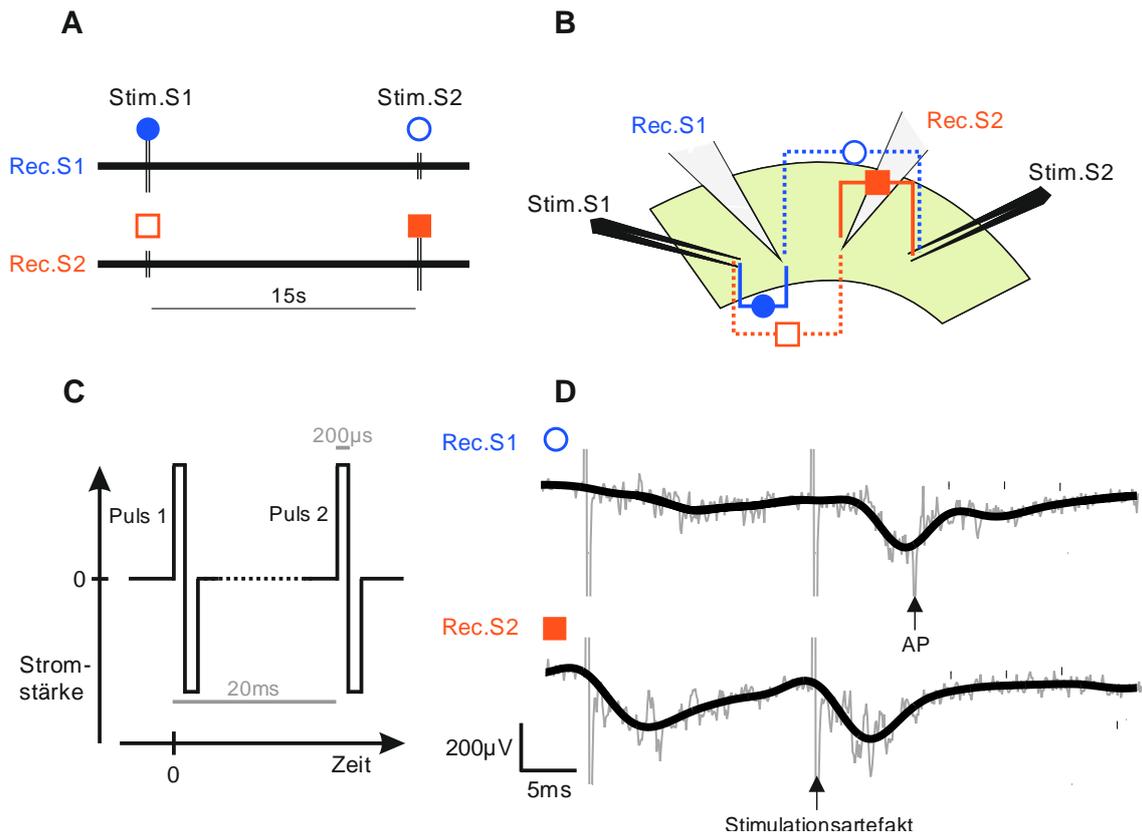


Abb. 5 Stimulation des somatosensorischen Kortex und Beispielsignal

A Schema des Zeitverlaufs des Stimulationsparadigmas. **B** Rec.S1 wird durch blaue Kreise; Rec.S2 durch rote Quadrate signalisiert. Befand sich die Messelektrode bei abwechselnder Stimulation proximal sind die Symbole ausgefüllt. Bei distalen Ableitungen wurden nicht-ausgefüllte Symbole verwendet. **C** Ein Stimulus beinhaltete zwei Einzelpulse im Abstand von 20 ms. Die Polarität und Stromapplikationsdauer (200 μ s) der Pulse war in allen Experimenten konstant; die Stromstärke konnte im Bereich von 20 – 180 μ A variiert werden. **D** Messbeispiel bei Stimulation durch Stim.S2. Grau: Rohsignal, Schwarz: Bandpass-gefiltertes Signal (Butterworth -3 dB Eckfrequenz 1 und 90 Hz). AP = Aktionspotenzial.

2.4 Applikation der Testsubstanzen

Alle Testsubstanzen wurden in ACSF gelöst und mithilfe einer Peristaltikpumpe über Teflonschläuche in die Badkammer geleitet. Die Lösungen wurden gewechselt, indem der Zuleitungsschlauch der Peristaltikpumpe zwischen begasten und auf etwa 30 °C erwärmten Reservoirs mit verschiedenen Lösungen gewechselt wurde.

Es wurden insgesamt vier verschiedene Experimentserien (I-IV) durchgeführt. Allen Experimentserien gemeinsam waren eine Akkomodationsphase, die nicht aufgezeichnet wurde, eine Kontrollphase über 20 min, sowie zwei oder drei Lösungswechsel zu den Zeitpunkten 20 min, 60 min und 90 min nach Beginn der Kontrollphase (Abb. 6). Die Akkomodationsphase war notwendig, da die Hirnschnitte direkt nach Einbringen der Elektroden sehr variable Signale zeigten. Deshalb wurde das Standard-Stimulationsparadigma (Abb. 5A) zunächst für 15-30 min angewendet. Nur Hirnschnitte, deren Antworten in diesem Zeitraum auf ein stabiles Niveau gelangten, wurden für Versuche verwendet und aufgezeichnet.

In der Experimentserie I (SHAM) wurden zur Beschreibung der Langzeitstabilität der neuronalen Antworten unabhängig von pharmakologischen Manipulationen Scheinapplikationen mit reiner ACSF durchgeführt. Die Wechsel zwischen verschiedenen ACSF-Reservoirs erfolgten 20 und 60 min nach Beginn der Kontrollmessungen (Abb. 6). Auf die Auswaschphase/Drogenbedingung 4 wurde hier verzichtet, da keine Substanzen angewendet wurden und dieser Messzeitraum später nicht ausgewertet wurde.

In Versuchsreihe II (Midazolam) wurde nach 20 min das ACSF-Reservoir gewechselt und nach 60 min Midazolam (200 nM) eingewaschen, um den alleinigen Midazolam-Effekt zu bestimmen. Im Anschluss erfolgte ein 30-minütiger Auswasch (Abb. 6). Insgesamt wurden 22 Experimente durchgeführt. Zur Bestimmung der Zeit, die bei gewählter Hirnschnittdicke und Perfusionsrate benötigt wurde, um die maximale Midazolam-Wirkung zu erreichen, wurde bei 7 Experimenten über 60 Minuten Midazolam appliziert. Hier zeigte sich, dass eine Applikationsdauer von 30 Minuten ausreichend war, um den vollständigen Midazolam-Effekt zu erreichen. Deshalb wurde als Standardapplikationsdauer von Midazolam 30 Minuten gewählt. Im Datensatz sind die genannten 7 Experimente enthalten, allerdings wurde die Auswaschbedingung/Drogenbedingung 4 verworfen und nicht in die Datenauswertung übernommen, da diese nicht mit dem üblichen Applikationsschema kompatibel waren.

Experimentserien III und IV waren Kombinationsexperimente, bei denen vor Einwasch von Midazolam entweder Adenosin (5 μ M, Sigma-Aldrich) oder IL-1 β (5ng/ml IL-1 β mouse-recombinant, R&D Systems, Minneapolis, USA und PromoKine, Heidelberg, D) oder appliziert wurde. Bei Kombination von Adenosin und Midazolam (Experimentserie III) erfolgte zuerst eine Vorbehandlung mit Adenosin. Anschließend wurde Midazolam zusammen mit Adenosin gegeben, da hier akute Effekte von Adenosin von Interesse waren (96). Außerdem ist die Wirkdauer von Adenosin sehr kurz. Umbau oder Aufnahme in Zellen erfolgen sehr rasch, wodurch die extrazelluläre Konzentration schnell abfällt (31). Deshalb wurde Adenosin nicht nur vor Midazolam, sondern auch gleichzeitig appliziert, um mögliche Interaktionen zu beleuchten (Abb. 6).

In Experimentserie IV wurde IL-1 β beim Einwasch von Midazolam ausgewaschen, da von einem langanhaltenden Effekt durch die Interleukin-Vorbehandlung ausgegangen wurde (Abb. 6).

Zusammengefasst wurden also vier verschiedene Drogenbedingungen definiert. Alle Experimente besaßen eine 20-minütige Kontrollphase; daraufhin folgte bei den Experimentserien III und IV eine Präinkubationsphase mit Adenosin oder Interleukin-1 β . Dieser Präinkubationsphase folgte (abgesehen von Serie I/SHAM) die Applikation von Midazolam. Bei den Experimenten mit Substanzapplikation wurde zudem noch ein Auswasch durchgeführt. Daher wurden die Drogenbedingungen folgendermaßen benannt: 1-Kontrolle; 2-Präinkubation; 3-Midazolam; 4-Auswasch.

Um die Effekte der Substanzapplikationen zu quantifizieren, wurden verschiedene Zeitabschnitte gewählt, innerhalb derer die ausgewerteten Parameter gemittelt wurden. Um Zustände im Äquilibrium, d.h. bei konstanter Substanzkonzentration im Gewebe zu beschreiben, wurden jeweils die letzten 10 Minuten der Applikation gewählt (bei Drogenbedingung 1/Kontrolle jeweils die letzten 5 Minuten). Die schwarz markierten Bereiche in Abb. 6 symbolisieren die Zeitabschnitte, die weiterverarbeitet wurden.

Experimentserie:

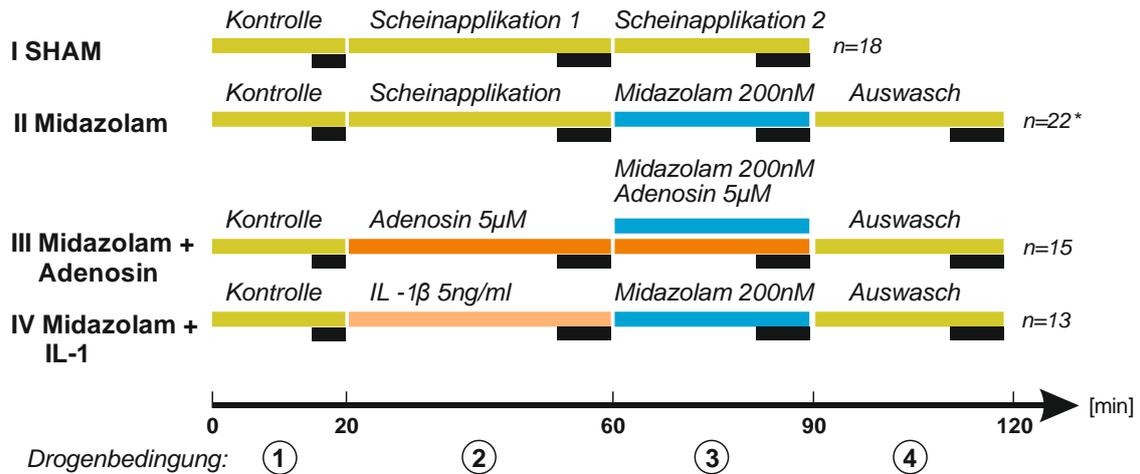


Abb. 6 Übersicht Experimentserien

Benennung der Drogenbedingungen: 1 – Kontrolle; 2 – Präinkubation; 3 – Midazolam; 4 – Auswasch. Schwarz unterlegte Bereiche zeigen Experimentabschnitte, die in die Datenauswertung einfließen. Beispielsweise wurden bei Drogenbedingung 3 die letzten 10 Minuten (Minuten 80-90) akquiriert und für die weitere Berechnung gespeichert.

* insgesamt 22 Experimente; bei 7 davon wurde die Drogenbedingung 4 verworfen.

2.5 Analyseintervalle und Berechnung der elektrophysiologischen Parameter

Die Auswertung erfolgte mit einer Reihe von Auswerterroutinen für elektrophysiologische Signale in MATLAB. Da die Stimulationsartefakte teils erhebliche Amplituden aufwiesen, mussten sie vor jeglicher Verarbeitung der Daten entfernt werden. Hierzu wurde in einem Intervall von 10 ms vor jedem Puls eine lineare Regression der Datenspur berechnet und sodann für die Dauer des Artefakts (üblicherweise 1,5 ms) fortgesetzt. Nach Entfernung der Artefakte wurden die Rohdaten durch digitale Filterung in die Komponenten Aktionspotenziale (AP) und lokale Feldpotenziale (LFP) aufgegliedert. Bei der Detektion von Aktionspotenzialen wurde ein Butterworth Bandpassfilter mit -3 dB Eckfrequenzen von 200 und 4000 Hz angewendet. Signale, die einen manuell festgelegten Schwellenwert überschritten, wurden als Aktionspotenziale definiert und in eine Datenstruktur geschrieben, die den Zeitpunkt des Auftretens der APs speicherte (Abb. 7). Der Schwellenwert war etwa 3,5–3,8

Standardabweichungen vom Mittelwert des Grundrauschens entfernt (und je nach Ableitung positiv oder negativ). Da die Messelektroden relativ niedrigohmig waren und nicht gezielt an einzelne Neuronen herangeführt wurden, repräsentieren die so gewonnenen Daten in der Regel die Aktivität mehrerer Neuronen ("multi-unit-activity, MUA").

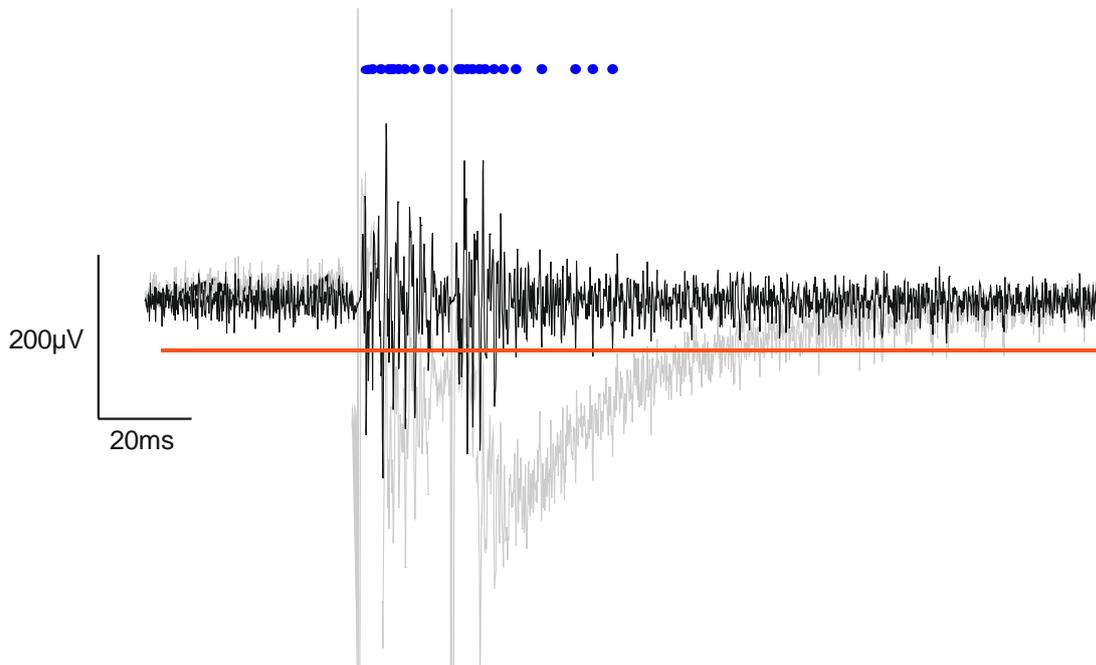


Abb. 7 Erfassung von Aktionspotenzialen

Das Rohsignal ist grau dargestellt. Schwarz zeigt das gefilterte Signal; rot den manuell einstellbaren Schwellenwert. Die blauen Punkte signalisieren die detektierten Aktionspotenziale.

Manche Gehirnschnitte zeigten relativ langanhaltende Signale bis circa 150 ms nach Stimulation. Daher wurde das Intervall 1-200 ms nach Stimulation zur Auswertung der Aktionspotenziale gewählt („Analyseintervall Aktionspotenziale“). Dadurch konnten langanhaltende Aktivität und Antworten auf ersten und zweiten Stimulationspuls untersucht werden.

Um Aktionspotenziale zu quantifizieren, wurde die sogenannte „mittlere Feuerrate“ errechnet. Diese gibt an, wie viele Aktionspotenziale in einem definierten Zeitabschnitt auftreten. In dem vorliegenden Fall wurde also die

Anzahl der detektierten Aktionspotenziale durch 0,2 s (=200 ms) geteilt, wodurch sich Hertz [$\text{Hz}=1/\text{s}$] als Einheit ergab (Abb. 8A).

Feldpotenziale wurden durch Filterung des Rohsignals mit einem Butterworth Bandpassfilter (mit -3 dB Eckfrequenzen von 1 und 90 Hz) extrahiert. Zur Auswertung der Feldpotenziale wurde ausschließlich die Antwort auf den ersten Stimulationspuls gewählt (entspricht 1-19 ms nach Stimulation; „Analyseintervall LFP“).

Zur Charakterisierung des lokalen Feldpotenziales wurde die sogenannte LFP-Steilheit ausgewählt (in der Literatur üblicherweise „slope“ genannt). In der Elektrophysiologie ist die LFP-Steilheit ein verbreiteter Parameter um qualitativ Feldpotenziale zu beschreiben, die durch transmembranöse Ionenverschiebungen vor allem bei synaptischer Übertragung entstehen. Um die LFP-Steilheit zu berechnen, wurde durch die absteigende Flanke des gefilterten Signals eine Regressionsgerade gelegt. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dabei der Potenzialänderung pro Zeiteinheit; die Einheit ist daher „ $[\mu\text{V}/\text{ms}]$ “ (Abb. 8B).

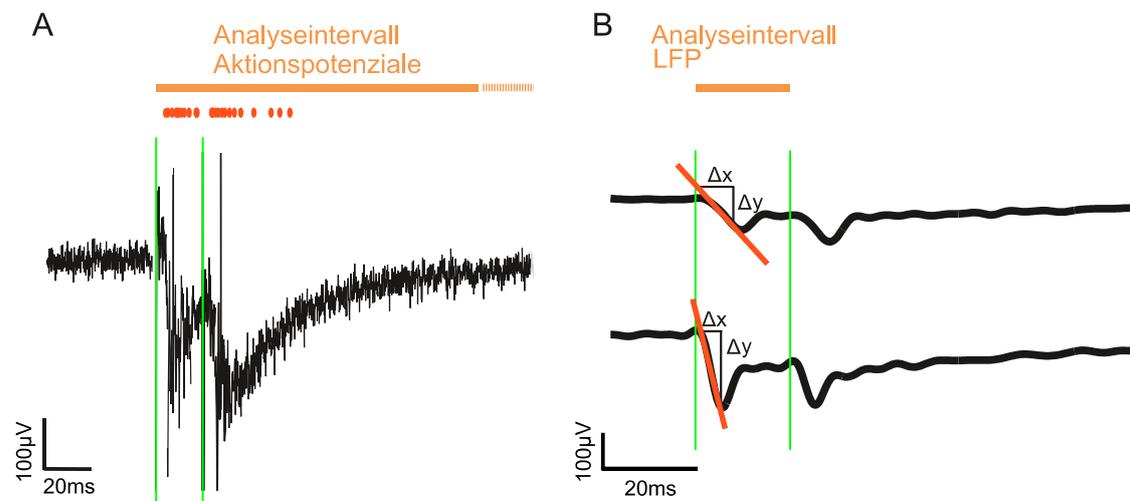


Abb. 8 Analyseintervalle und Beschreibung der electrophysiologischen Parameter

A Beispielaufzeichnung mit detektierten Aktionspotenzialen (rote Punkte). Die hellgrünen Balken zeigen den Doppelstimulus. **B** Gefilterte Signale, die das entstehende LFP darstellen. Die roten Linien zeigen die Regressionsgeraden. Die LFP-Steilheit entspricht dabei der Steigung der Regressionsgeraden ($\Delta y / \Delta x$).

2.6 Statistische Verfahren

Bei der Zusammenfassung von verschiedenen Experimenten innerhalb einer Experimentserie wurden Mittelwerte und zugehörige Standardabweichung berechnet (Abb. 12). Diese Berechnung wurde durchgeführt, nachdem die Verteilung der Datenpunkte untersucht wurde und von einem normal-verteilten Datensatz ausgegangen wurde.

Vor Zusammenfassung der einzelnen Experimente zu Mittelwert und Standardabweichung wurden die Datenpunkte auf statistische Ausreißer untersucht. Ausreißer waren Datenpunkte innerhalb eines Experiments, die außerhalb eines bestimmten Grenzwert-Bereichs lagen. Die Entfernung von statistischen Ausreißern wurde zudem vor Berechnung von Effektstärkemaßen (Abb. 15 und Abb. 16) sowie bei der Untersuchung der Substanzeffekte auf die räumliche Ausbreitung von neuronaler Aktivität (Abb. 17) durchgeführt. Das verwendete Verfahren zur Entfernung von statistischen Ausreißern wird

modifizierte Thompson-Tau-Methode genannt (97). Um statistische Ausreißer zu erkennen, wurde ein Grenzwert-Bereich aus den einzelnen Datenpunkten berechnet. Der Grenzwert-Bereich tau (τ) war dabei abhängig von Anzahl der Datenpunkte (n) und vom kritischen Wert des Student-t-Tests (t). Der kritische Wert des Student-t-Tests war von der Anzahl der untersuchten Datenpunkte (n) und entsprechenden Freiheitsgraden ($df=n-2$) und des ausgewählten Signifikanz-Levels ($\alpha=0,005$) abhängig. Entsprechende Zahlenwerte für den kritischen Wert des Student-t-Tests t konnten berechnet oder nachgeschlagen werden (98).

$$\tau = \frac{t_{\alpha/2} \times (n - 1)}{\sqrt{n} \times \sqrt{n - 2 + t_{\alpha/2}^2}}$$

Anschließend wurde jeder einzelne Datenpunkt (X) überprüft, indem aus dem zu untersuchenden Datensatz Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) berechnet wurden. Für jeden Datenpunkt X wurde δ berechnet.

$$\delta = \frac{(X - \bar{x})}{SD}$$

statistische Ausreißer: $\delta > \tau$

War δ dabei außerhalb des Grenzwert-Bereichs, wurde der Datenpunkt als statistischer Ausreißer definiert. Erfolgte die Entfernung eines Datenpunkts, wurden wiederum Mittelwert und Standardabweichung der verbleibenden Datenpunkte errechnet. Dieses Vorgehen wurde so lange wiederholt bis keine statistischen Ausreißer mehr detektiert wurden.

Wurde in einem Experiment mindestens ein statistischer Ausreißer detektiert, wurde das ganze Experiment aus der Auswertung ausgeschlossen. Wenn beispielsweise ein statistischer Ausreißer in der Ableitung Stim.S1-Rec.S2 gefunden wurde, wurden auch die übrigen drei Stimulations-Ableitungs-Kombinationen von weiteren statistischen Untersuchungen ausgeschlossen. Die Detektion von Ausreißern beschränkte sich auf die Drogenbedingungen 1-3, da der Auswasch statistisch nicht beschrieben werden sollte. Die Anzahl von

entfernten Experimenten pro Experimentserie wurde im Ergebnis-Teil bei den jeweiligen Berechnungen angegeben.

Zur Berechnung der relativen Änderung der mittleren Feuerrate durch Midazolam wurde eine Normalisierung durchgeführt. Dabei wurden Datenpunkte der 3. Drogenbedingung (Anwesenheit von Midazolam) auf Werte der 1. Drogenbedingung (Abb. 13) oder 2. Drogenbedingung (Abb. 14) normalisiert.

$$\text{normalisierter Datenpunkt} = \frac{\text{Datenpunkt Drogenbedingung 3}}{\text{Datenpunkt Drogenbedingung 1 bzw. 2}}$$

Die relative Änderung durch Midazolam wurde mit Boxplots dargestellt, da durch die Normalisierung teilweise keine Normalverteilung der Daten mehr gegeben war. Da die relative Änderung durch Midazolam rein der qualitativen Abschätzung des Substanzeffekts diene und keine weitere Statistik berechnet wurde, wurde hierbei auf die Eliminierung von Ausreißern verzichtet.

Zur weiteren Analyse wurde als Verfahren eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA; englisch „analysis of variance“) mit verbundenen Stichproben gewählt. Die zwei untersuchten Faktoren waren hier „Drogenbedingung“ und „Ableitort“ (proximale vs. distale Ableitungen). Die zweifaktorielle Varianzanalyse erlaubte dabei verschiedene Fragen zu beantworten:

- Unterschieden sich die gemessenen neuronalen Signale über die verschiedenen Drogenbedingungen? D.h. waren Substanzeffekte vorhanden?
- Waren die gemessenen neuronalen Signale durch ihren Ableitort (proximale vs. distale Ableitung?) unterscheidbar?
- Waren Interaktionseffekte zwischen Drogenbedingungen und Ableitorten vorhanden?

Die zwei untersuchten Faktoren enthielten mehrere verschiedene Faktorstufen/Gruppen. Der Faktor „Drogenbedingung“ enthielt 3

Faktorstufen/Gruppen (Drogenbedingung 1, 2 und 3) und der Faktor „Ableitort“ 4 Faktorstufen/Gruppen (2 proximale und 2 distale Ableitungen). Dementsprechend wurde der Datensatz auf folgende Weise in MATLAB angeordnet (Abb. 9):

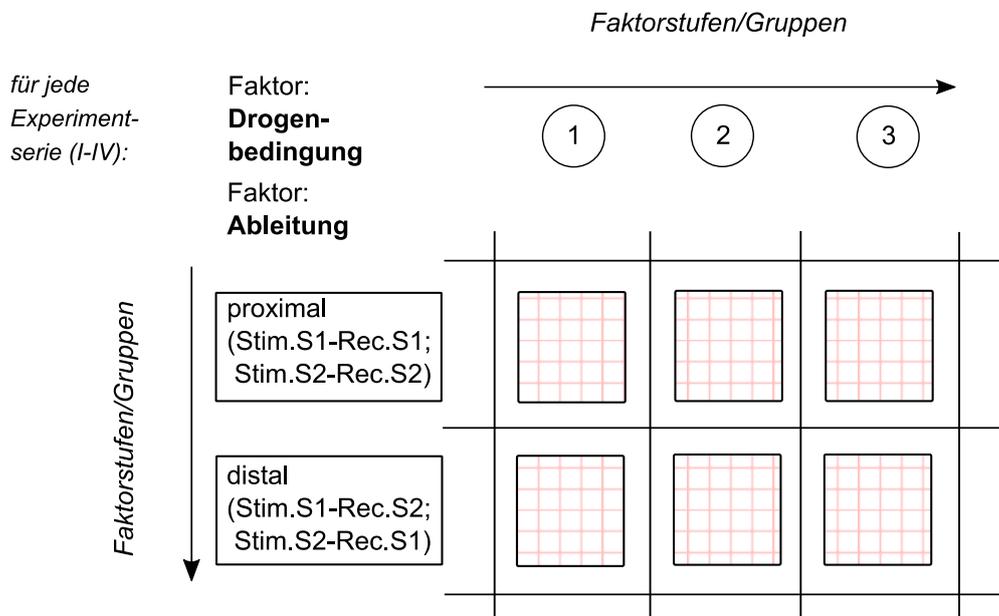


Abb. 9 Struktur der zweifaktoriellen ANOVA

Anordnung des Datensatzes zur Berechnung der zweifaktoriellen ANOVA in MATLAB. Die karoförmigen Muster symbolisieren einzelne Datenpunkte der untersuchten Experimente. Beachte: Der Faktor „Ableitung“ beinhaltet 4 Faktorstufen; in einigen Analysen wurden diese 4 Faktorstufen auf die 2 Gruppen „proximal“ und „distal“ reduziert.

Das Grundprinzip der Varianzanalyse besteht darin, dass die Variabilität innerhalb einer Faktorstufe/Gruppe („Fehlervarianz“) mit der Variabilität zwischen verschiedenen Faktorstufen/Gruppen („systematische Varianz“) verglichen wird (99).

Um Unterschiede zwischen spezifischen Faktorstufen zu untersuchen, wurden das Effektstärkemaß g_ψ („g-psi“) mit 95% Konfidenzintervallen sowie zugehörige p-Werte berechnet. g_ψ ist ein Effektstärkemaß, das Differenzen (ψ) von Mittelwerten der zu untersuchenden Faktorstufen/Gruppen berechnet und diese anhand des gepoolten Standardfehlers (SE) standardisiert. Der Vorteil dieser Untersuchung bestand darin, dass sogenannte Kontraste gewählt werden

konnten, um dadurch spezifische Gruppen gegeneinander zu vergleichen (z.B. besteht ein Unterschied zwischen Drogenbedingung 1 und 2?).

$$g\psi = \frac{\psi}{SE}$$

wobei:

$$\psi = \sum_{i=1}^a c_i m_i$$

(m_i = i-ter Mittelwert der untersuchten Faktorstufe/Gruppe i; a = Anzahl der untersuchten Faktorstufen/Gruppen; c_i = gewählte Kontrastierungen zwischen untersuchten Faktorstufen/Gruppen)

Der gepoolte Standardfehler (SE) wurde anhand der Datenpunkte aller Gruppen auf übliche Weise errechnet. Das heißt, dass auch Datenpunkte aus Gruppen, die nicht kontrastiert wurden, zur Berechnung des gepoolten Standardfehlers verwendet wurden. Sollte zum Beispiel der Unterschied zwischen Drogenbedingung 1 und 2 errechnet werden, wurden dafür sowohl die proximalen als auch die distalen Ableitungen für die Kontrastierung verwendet.

η_p^2 (englisch „partial eta squared“) ist ein Effektstärkemaß, das berechnet, wie stark die Gruppenzugehörigkeit von Messwerten die Variabilität im gesamten Datensatz erklärt. Ein Wert von $\eta_p^2 = 0$ bedeutet, dass die Gruppenzugehörigkeit von Datenpunkten keinen Einfluss besitzt; Werte die gegen 1 gehen, zeigen hingegen, dass die Gruppenzugehörigkeit von Datenpunkten die komplette Variabilität im Datensatz erklärt. η_p^2 ist daher ein geeigneter Parameter zur Omnibus-Untersuchung einer ANOVA (vgl. Abb. 15A).

Die Berechnung der zweifaktoriellen ANOVA und der Effektstärkemaße wurde in MATLAB mithilfe einer speziellen Statistik-Toolbox von Hentschke und Stüttgen durchgeführt (100).

3 Ergebnisse

Die beiden Kernfragen der vorliegenden Arbeit sind zum einen, ob die Wirksamkeit von Midazolam durch Anwendung von Adenosin oder Interleukin-1 β verändert wurde, zum anderen, ob unter einer Ko-Applikation von Adenosin/IL-1 β und Midazolam die Feuerraten von den Ausgangsbedingungen differieren. Dazu musste zuerst das Modellsystem durch Kontrolluntersuchungen und Scheinapplikationen beschrieben werden. Später wurde durch alleinige Midazolam-Gabe die Midazolam-Wirkung untersucht. Durch Vergleich von reinen Midazolam-Experimenten mit Kombinationsexperimenten konnte anschließend überprüft werden, ob und inwieweit Adenosin oder Interleukin-1 β die Wirksamkeit von Midazolam veränderten.

3.1 Beispielexperimente verschiedener Experimentserien

Zur Charakterisierung des Modellsystems unter Kontrollbedingungen diente Experimentserie I / SHAM (vgl. Abb. 6). Hier wurden an 18 Hirnschnitten eine Kontrollmessung und zwei Scheinapplikationen über einen Zeitraum von 90 Minuten durchgeführt. Abb. 10 zeigt ein Beispielexperiment aus dieser Experimentserie, dessen neuronales Antwortverhalten für die meisten übrigen Experimente repräsentativ war. Dargestellt ist hier das gemittelte und gefilterte lokale Feldpotenzial (LFP) mehrerer sweeps beider Messelektroden (Abb. 10A). Das lokale Feldpotenzial besaß am proximalen Ableitort (in diesem Fall Rec.S2) größere Amplituden und eine höhere LFP-Steilheit als am distalen Ableitort. Zudem war die Latenz, mit der neuronale Signale auftraten, am proximalen Ableitort geringer. Neben den Feldpotenzialen wurden auch Aktionspotenziale untersucht. Zur Darstellung von Aktionspotenzialen wurde ein sogenanntes Peri-Event-Time-Histogramm (PETH) verwendet (Abb. 10B). Dieses erlaubte den Zeitpunkt des Auftretens von Aktionspotenzialen (x-Achse) und deren Frequenz (y-Achse) graphisch darzustellen. Der Vergleich des PETH und der lokalen Feldpotenziale bei den abgebildeten Drogenbedingungen „Kontrolle“ und

„Scheinapplikation 2“ verdeutlicht, dass die neuronalen Signale über den Beobachtungszeitraum relativ stabil waren (zwischen den untersuchten sweeps lagen 60 Minuten Beobachtungszeit). Das stabile Antwortverhalten zeigte sich auch bei kontinuierlicher Untersuchung der mittleren Feuerrate und LFP-Steilheit über die gesamte Experimentdauer (Abb. 10C und D).

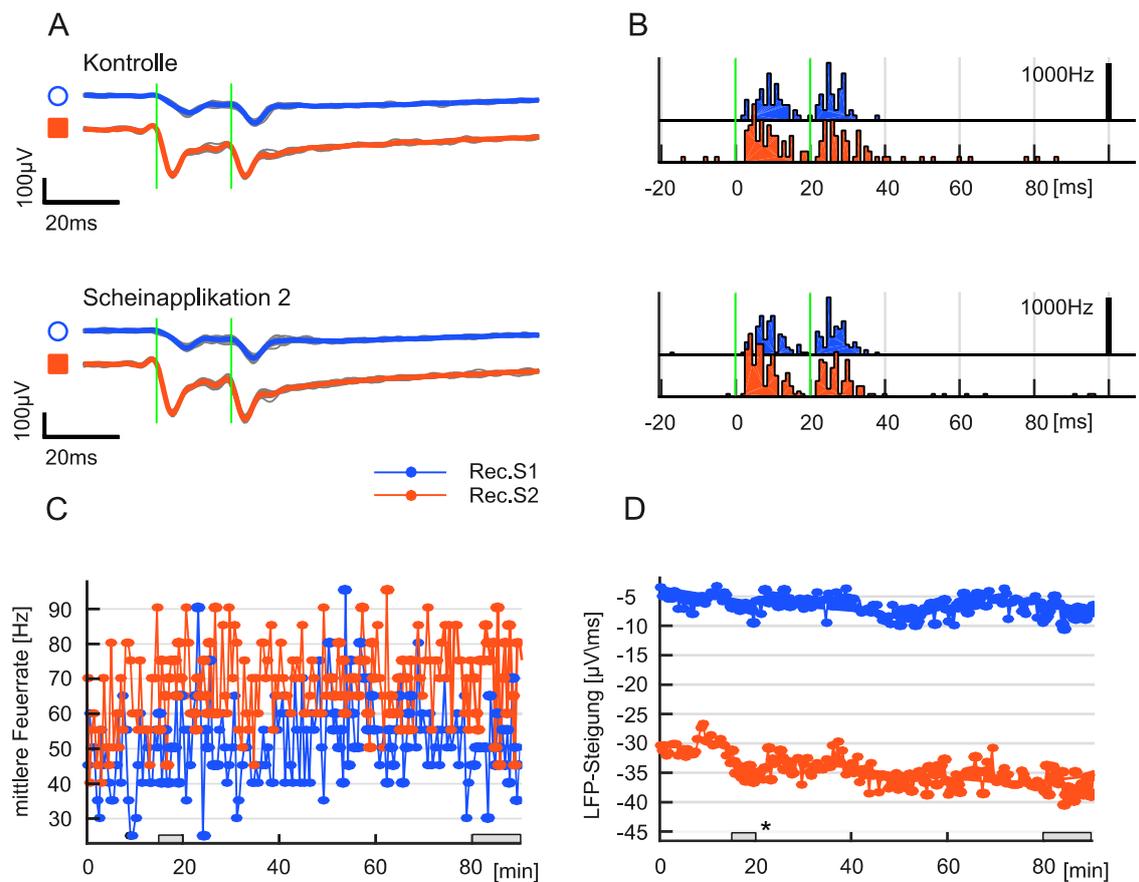


Abb. 10 Neuronales Antwortverhalten bei Stimulation an einem Beispiexperiment

Repräsentatives Beispiexperiment der Experimentserie I und dessen neuronaler Aktivität bei Stimulation in S2 (hellgrüne vertikale Linien). **A** Rot dargestellt sind LFPs, die an Ableitelektrode Rec.S2 (*hier*: proximal) abgeleitet wurden; blaue Signale wurden mit Ableitelektrode Rec.S1 (*hier*: distal) aufgezeichnet. Die farbigen Spuren zeigen die gemittelten Signale aus mehreren sweeps (graue Spuren). Oben gemittelte LFPs der Drogenbedingung „Kontrolle“; unten LFPs der „Scheinapplikation 2“. **B** PETH bei Drogenbedingung „Kontrolle“ (oben) und „Scheinapplikation 2“ (unten). **C +D** Kontinuierliche Berechnung von mittlerer Feuerrate (C) und LFP-Steilheit (D) über den gesamten Experimentzeitraum.

* graue Balken auf der x-Achse der Teilabbildungen C und D markieren die Zeiträume, deren sweeps in Teilabbildungen A und B zusammengefasst wurden.

Der Beschreibung des alleinigen Midazolam-Effekts diente Messserie II. Hier wurde Midazolam nach Kontrollphase und einer Scheinapplikation eingesetzt. Abb. 11 (A und C) illustriert Veränderungen der neuronalen Antworten durch Midazolam an einem weiteren Beispielexperiment.

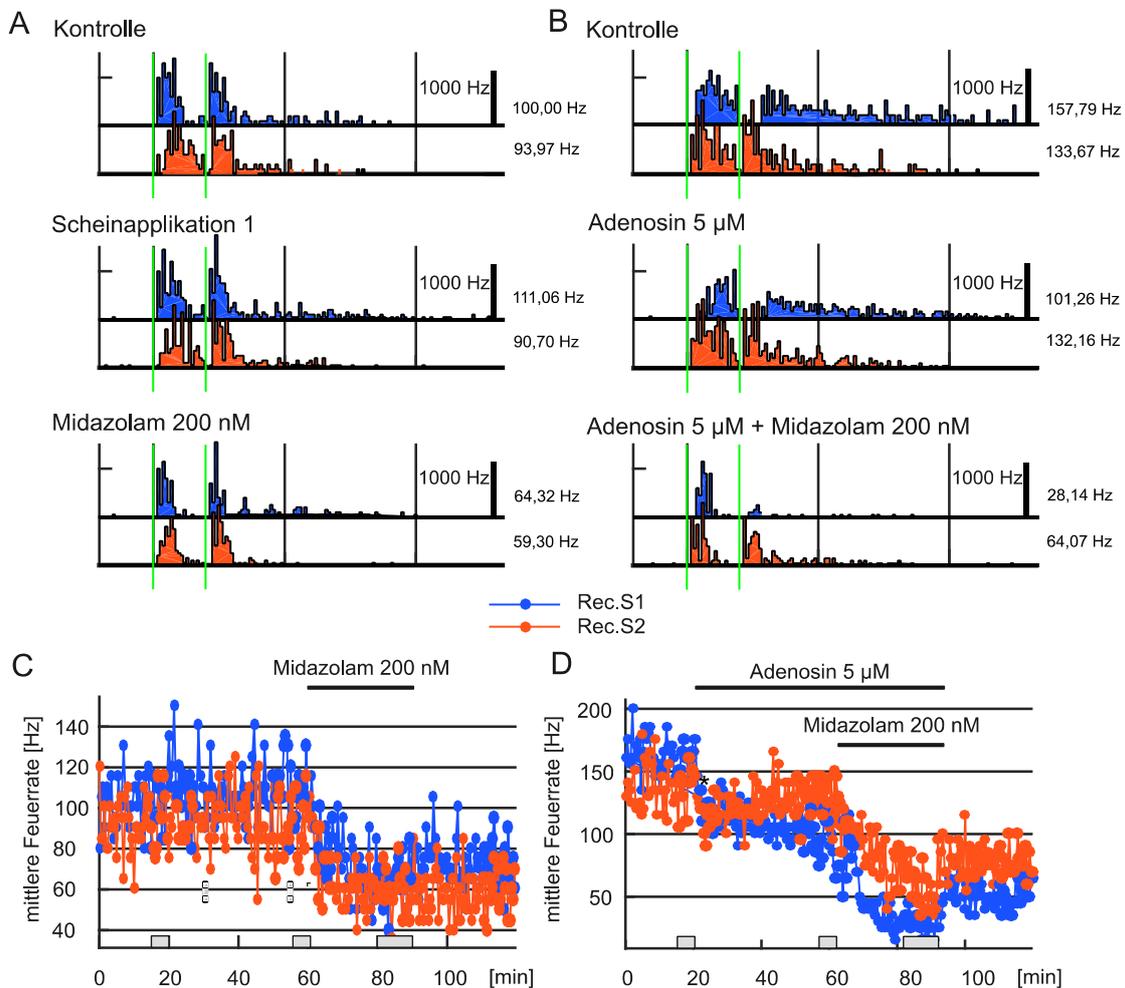


Abb. 11 Das Auftreten von Aktionspotenzialen wurde durch Midazolam und Adenosin verringert

Zwei Beispielexperimente und deren neuronale Aktivität bei Stimulation in S1. **A, C** Midazolam (200 nM) führte zu geringerer neuronaler Aktivität nach Stimulation und hatte eine rasche Abnahme der mittleren Feuerrate zur Folge; Rechts der PETH finden sich die Zahlenwerte der mittleren Feuerrate im Beobachtungszeitraum 0-200 ms nach Stimulation **C, D** Adenosin (5 μ M) verminderte die mittlere Feuerrate. Bei Zugabe von Midazolam (200 nM) verstärkte sich dieser Effekt.

* graue Balken auf der x-Achse der Teilabbildungen C und D markieren die Zeiträume, deren sweeps in Teilabbildungen A und B zusammengefasst wurden.

Hier führte die Applikation von 200 nM Midazolam zu einem verminderten Auftreten von Aktionspotenzialen im PETH und einer Abnahme der mittleren Feuerrate. Abb. 11B und D zeigen ein Beispielexperiment aus der Experimentserie III / Adenosin+Midazolam. Hier konnte beobachtet werden, dass

Adenosin (5 μ M) relativ rasch zur Abnahme der mittleren Feuerrate führte. Zusätzliche Gabe von Midazolam senkte die mittlere Feuerrate weiter ab.

3.2 Adenosin und Midazolam verringerten die mittlere Feuerrate im Mauskortex

Zur Darstellung von gesamten Experimentserien wurden die einzelnen Experimente zu Mittelwerten mit zugehöriger Standardabweichung zusammengefasst (Abb. 12). Um etwaige Unterschiede des Effekts der applizierten Substanzen auf verschiedene Ableitorte zu erfassen, wurden alle vier verschiedenen Stimulations- und Ableitkombinationen abgebildet. Auf der Basis objektiver Kriterien zur Identifikation von statistischen 'Ausreißern' (siehe Methoden) wurden einige Experimente von der Berechnung ausgeschlossen. (Experimentserie I: 3 von 18; II: 3 von 22; III: 2 von 15; IV: 1 von 13).

Abb. 12A zeigt die mittlere Feuerrate von Experimentserie I / SHAM. Wie bereits im Beispielexperiment (Abb. 10) beobachtet, konnten bei Stimulation über die gesamte Experimentdauer von 90 Minuten stabile Antworten erreicht werden. Zudem zeigte sich, dass an proximalen Ableitungen eher höhere mittlere Feuerraten gemessen werden konnten, als an distalen (dies galt auch für die Steilheit und Amplitude des lokalen Feldpotenzials; nicht dargestellt). In den vorliegenden Daten gab es keine Hinweise darauf, dass der Stimulationsort eine Auswirkung auf die mittlere Feuerrate besaß. Unabhängig davon, ob in S1 oder S2 stimuliert wurde, ergaben sich vergleichbare Signale. Daher wurde in nachfolgenden Analysen lediglich zwischen proximalen und distalen Ableitungen unterschieden und nicht weiter nach Stimulationsort differenziert.

Aus Abb. 12B-D geht hervor, dass Midazolam unabhängig von einer Vorbehandlung (mit Adenosin oder Interleukin-1 β) zu verringerten mittleren Feuerraten führte.

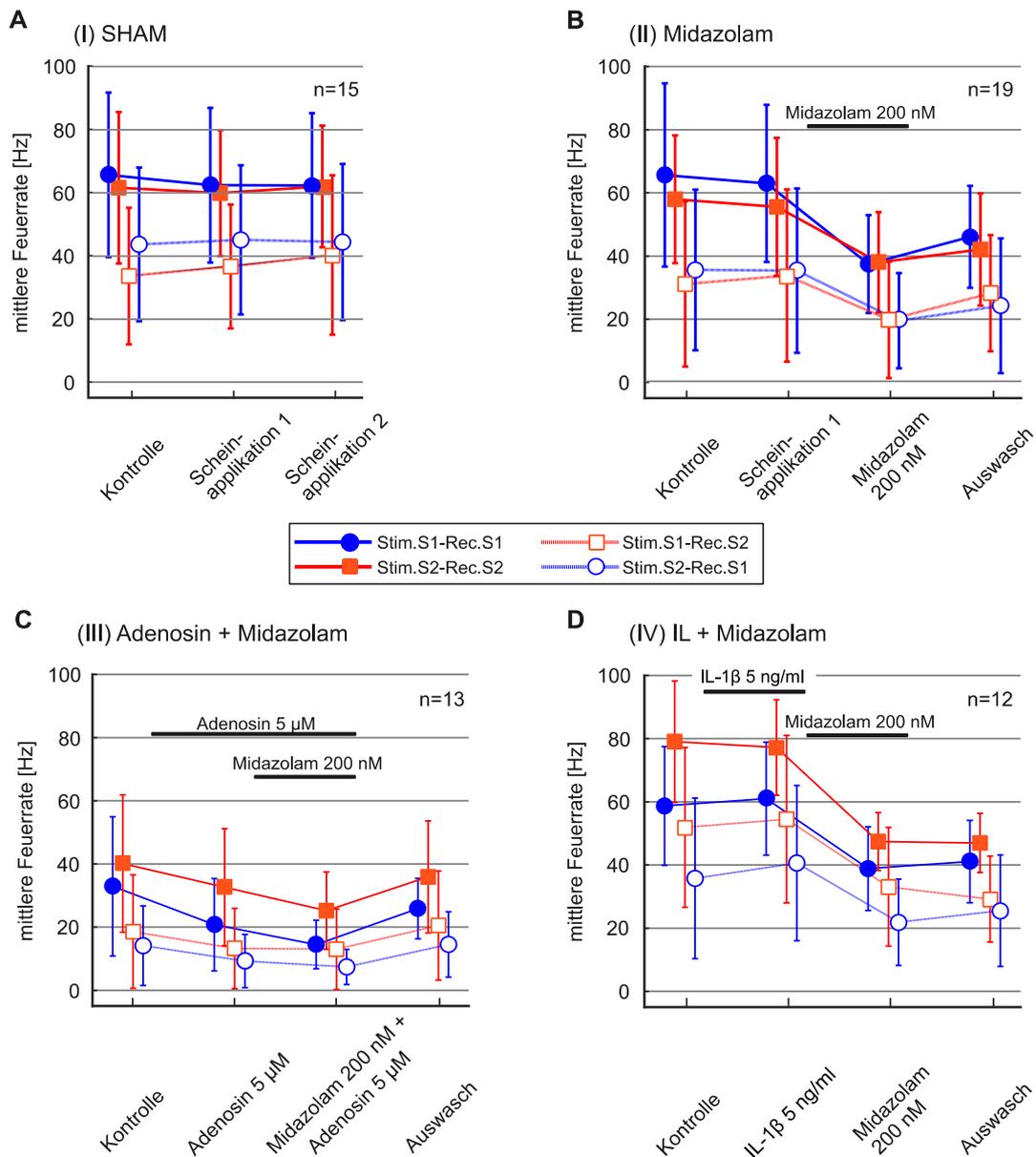


Abb. 12 Änderung der mittleren Feuerrate bei Substanzapplikation

Angegeben sind Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung bei der jeweiligen Drogenbedingung. Experimente mit statistischen Ausreißern wurden nicht berücksichtigt. Farbige, ausgefüllte Symbole markieren proximale Ableitungen, während distale nicht ausgefüllt sind **A** Experimentserie I/SHAM **B** Experimentserie II/Midazolam **C** Experimentserie III/Adenosin+Midazolam **D** Experimentserie IV/IL+Midazolam

In den Experimentserien II und IV war die mittlere Feuerrate durch Midazolam langanhaltend vermindert und konnte auch in der Auswaschphase das Ausgangsniveau nicht mehr erreichen. Interessanterweise galt dies nicht für Kombinationsexperimente mit Adenosin (Experimentserie III). Hier verminderte

Midazolam zwar ebenfalls die mittlere Feuerrate. Allerdings erholte sich die mittlere Feuerrate in der Auswaschphase deutlich effektiver als bei den übrigen Substanzexperimenten; vermutlich aufgrund des raschen Abbaus von Adenosin.

Bei Betrachtung der Adenosin-Experimente wurde deutlich, dass eine Monoapplikation von Adenosin (wie im Beispielexperiment bereits dargestellt) zu einer Minderung der mittleren Feuerrate führte. Bei Zugabe von Midazolam wurde die mittlere Feuerrate noch weiter abgeschwächt.

Zusammengefasst zeigt Abb. 12 qualitativ, dass die Substanzen Adenosin und Midazolam die mittlere Feuerrate verminderten. Der Parameter „mittlere Feuerrate“ ist ein Ausdruck der neuronalen Aktivität; da Midazolam die neuronale Aktivität absenkt (101), kann eine abnehmende mittlere Feuerrate daher als Grad der Sedierung angesehen werden. In Kapitel 1.7 wurde deutlich, dass eine tiefe Narkose die Mortalität der Patienten erhöht. Da sowohl Adenosin als auch Midazolam die neuronale Aktivität verminderten, stellte sich die Frage, ob die Kombination aus Adenosin und Midazolam die mittlere Feuerrate im Vergleich zur Monoapplikation von Midazolam stärker absenkte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Datenpunkte von Drogenbedingung 3 (Anwesenheit von Midazolam) auf Werte der Drogenbedingung 1 (Kontrolle) normalisiert (Abb. 13).

Interessanterweise waren die normalisierten mittleren Feuerraten der Experimentserien II-IV nicht sicher unterscheidbar. Die Streuung der Datenpunkte bei Adenosin-Experimenten war zwar im Vergleich vermehrt; die Betrachtung der Mediane ließ aber keine qualitative Unterscheidbarkeit zu (vgl. Anhang 8.1). Eine Vorbehandlung mit Adenosin oder IL-1 β bei nachfolgender Anwendung von Midazolam führte also, ausgehend vom Kontrollzustand, zu keiner Unterscheidbarkeit im Vergleich zur Monoapplikation von Midazolam. Dieses Ergebnis war überraschend, da die vorhandenen Daten (Abb. 12C) und auch die Literaturrecherche zeigten, dass sowohl Adenosin als auch Midazolam die mittlere Feuerrate verminderten. Dieser Zusammenhang führte zu der Schlussfolgerung, dass die Midazolam-Wirkung durch Adenosin verringert wurde.

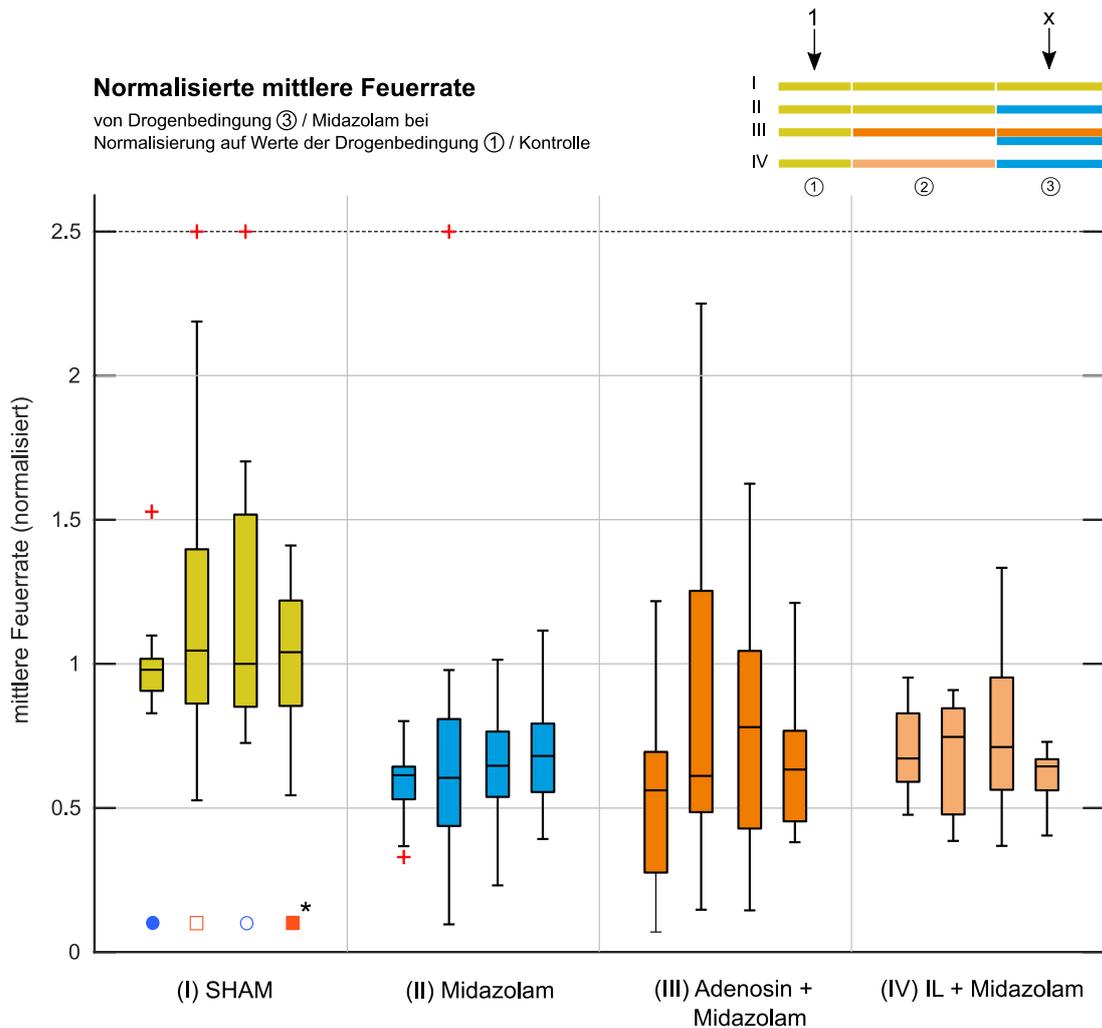


Abb. 13 Die Kombination von Adenosin/IL-1 β mit Midazolam führte ausgehend vom Kontrollzustand zu keiner vermehrten Abnahme der mittleren Feuerrate im Vergleich zur Monoapplikation von Midazolam

Daten der Drogenbedingung 3 (Anwesenheit von Midazolam) normalisiert auf Werte der Drogenbedingung 1 (Kontrolle); verdeutlicht durch das Piktogramm rechts oben: Gezeigt sind die 4 verschiedenen Experimenterserien und deren Drogenbedingungen. Vergleiche Abb. 6. Bei Experimenterserien mit Midazolam-Applikation (II-IV) zeigte sich eine verminderte mittlere Feuerrate ausgehend vom Kontrollzustand. Die relative Abnahme der mittleren Feuerrate durch Midazolam ließ sich in den Experimenterserien III und IV (Kombinationsexperimente) nicht von Experimenterserie II (Monoapplikation von Midazolam) unterscheiden.

* blaue Kreise: Rec.S1. Rote Quadrate: Rec.S2. Ausgefüllte Symbole signalisieren proximale Ableitungen; nicht-ausgefüllte distale Ableitungen. Die Reihenfolge gilt in der Abbildung für alle Experimenterserien (I-IV).

3.3 Adenosin verminderte die Wirksamkeit von Midazolam

Zur Untersuchung dieser Schlussfolgerung wurden daher analog zu Abb. 13 Datenpunkte der Drogenbedingung 3 auf Werte der Vorbedingung (Anwesenheit von Adenosin oder IL-1 β) normalisiert (Abb. 14). Hierdurch konnte der Effekt von

Midazolam auf die mittlere Feuerrate (mit oder ohne Vorbehandlung) qualitativ dargestellt werden:

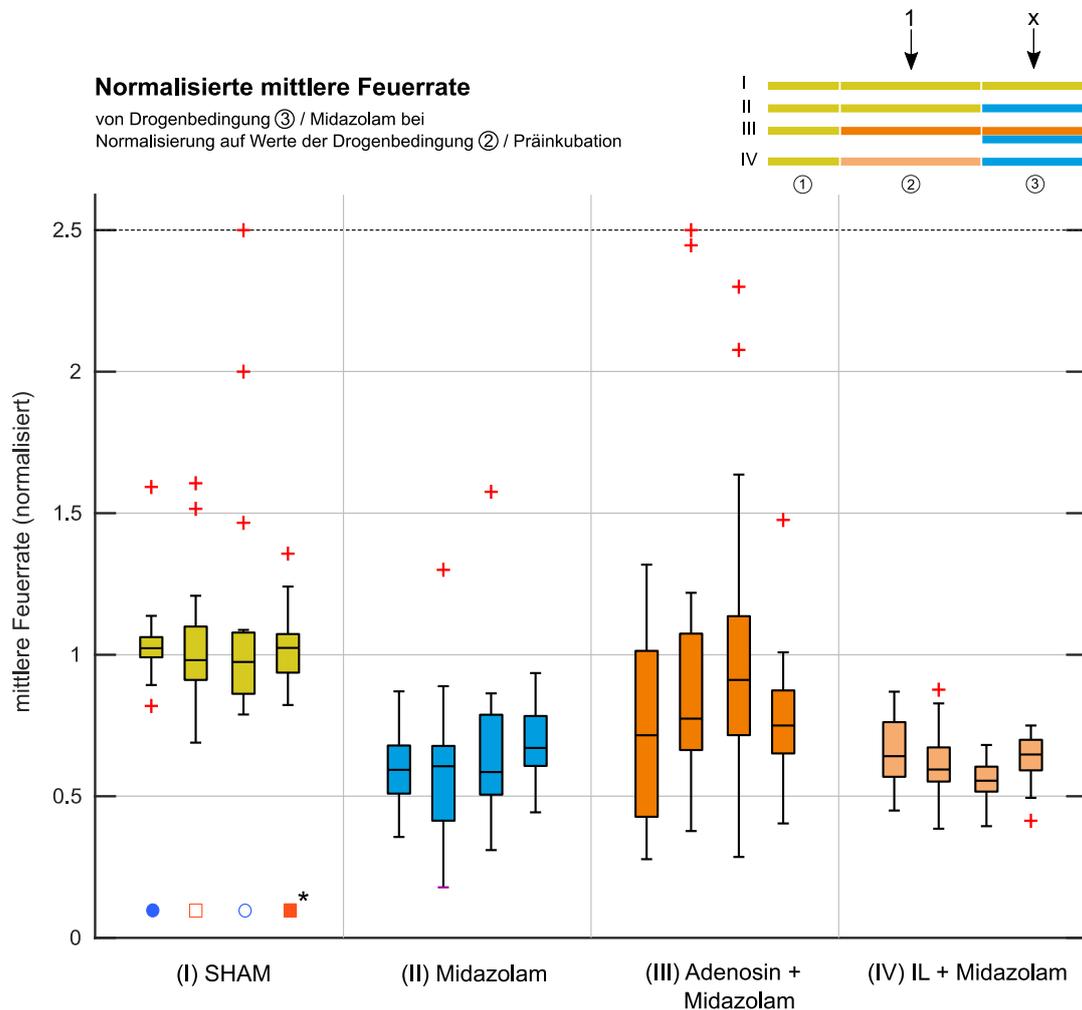


Abb. 14 Die Anwesenheit von Adenosin führte zu tendenziell geringerer Abnahme der normalisierten mittleren Feuerrate durch Midazolam

Daten der Drogenbedingung 3 (Anwesenheit von Midazolam) normalisiert auf Werte der Drogenbedingung 2 (Präinkubation); verdeutlicht durch das Piktogramm rechts oben: Gezeigt sind die 4 verschiedenen Experimentserien und deren Drogenbedingungen. Vergleiche Abb. 6. Bei Experimentserien mit Midazolam-Applikation (II-IV) zeigte sich eine verminderte mittlere Feuerrate ausgehend von der vorherigen Drogenbedingung. Die Mediane der Adenosin-Experimente (Experimentserie III) lagen konsistent über denen bei Monoapplikation von Midazolam oder bei Kombinationsexperimenten mit IL-1 β . Die Abnahme der normalisierten mittleren Feuerrate durch Midazolam schien bei Anwesenheit von Adenosin verringert.

* blaue Kreise: Rec.S1. Rote Quadrate: Rec.S2. Ausgefüllte Symbole signalisieren proximale Ableitungen; nicht-ausgefüllte distale Ableitungen. Die Reihenfolge gilt in der Abbildung für alle Experimentserien (I-IV).

Die alleinige Midazolam-Anwendung (Experimentserie II) führte zu einer Reduktion der normalisierten mittleren Feuerrate auf Werte von 0,59 – 0,67 (Minimal- und Maximalwert der 4 verschiedenen Mediane aus Abb. 14 für

Experimentserie II). In Gegenwart von Adenosin führte die Midazolam-Anwendung einerseits zu einer vermehrten Streuung der Datenpunkte als auch zu einer geringeren Reduktion der mittleren Feuerrate (0,71 – 0,91; Minimal- und Maximalwert der 4 verschiedenen Mediane aus Abb. 14 für Experimentserie III; vgl. Anhang 8.2).

Diese zunächst nur qualitativ dargestellten Unterschiede legten nahe, dass Adenosin den Midazolam-Effekt verminderte. Zur statistischen Klärung dieser Frage wurden alle vier Experimentserien mithilfe einer Zweizeige-ANOVA untersucht und die Effektstärkemaße η^2_p und g_ψ berechnet. Es flossen pro Datensatz alle im Experiment erfassten Daten als verbundene Stichproben ein; die Faktoren waren Drogenbedingung (mit drei Faktorstufen/Gruppen, entsprechend Drogenbedingungen 1-3) und Stimulations- und Ableitkombination (mit vier Faktorstufen/Gruppen: proximal: Stim.S1-Rec.S1+Stim.S2-Rec.S2; distal: Stim.S1-Rec.S2+Stim.S2-Rec.S1). Zuvor wurden die Daten (analog zum Verfahren wie für Abb. 12 beschrieben) auf statistische Ausreißer untersucht und dieselben Experimente aus der Auswertung entfernt. Detaillierte Ergebnisse aller ANOVA-Berechnungen finden sich im Anhang.

Abb. 15A zeigt das Effektstärkemaß η^2_p („partial eta squared“) für den Faktor Drogenbedingung. η^2_p ist ein Resultat einer Omnibus-Testung, die ähnlich wie ein Korrelationsmaß quantifiziert, in welchem Maße die mittleren Feuerraten von der Applikation der verschiedenen Substanz abhängen (siehe Methoden). Hier flossen die mittleren Feuerraten der Drogenbedingungen 1, 2 und 3 ein. Bei Experimentserie I / SHAM war η^2_p mit 0,022 nahe Null. Die übrigen Experimentserien mit Substanz-Anwendung zeigten hingegen starke Effekte (η^2_p bewegte sich zwischen 0,53 und 0,93; vgl. Anhang 8.3). Die Analyse bestätigte somit die Beobachtung, dass die mittleren Feuerraten über die Zeit stabil waren (Experimentserie I / SHAM), sich jedoch bei Anwendung der verschiedenen Substanzen deutlich veränderten.

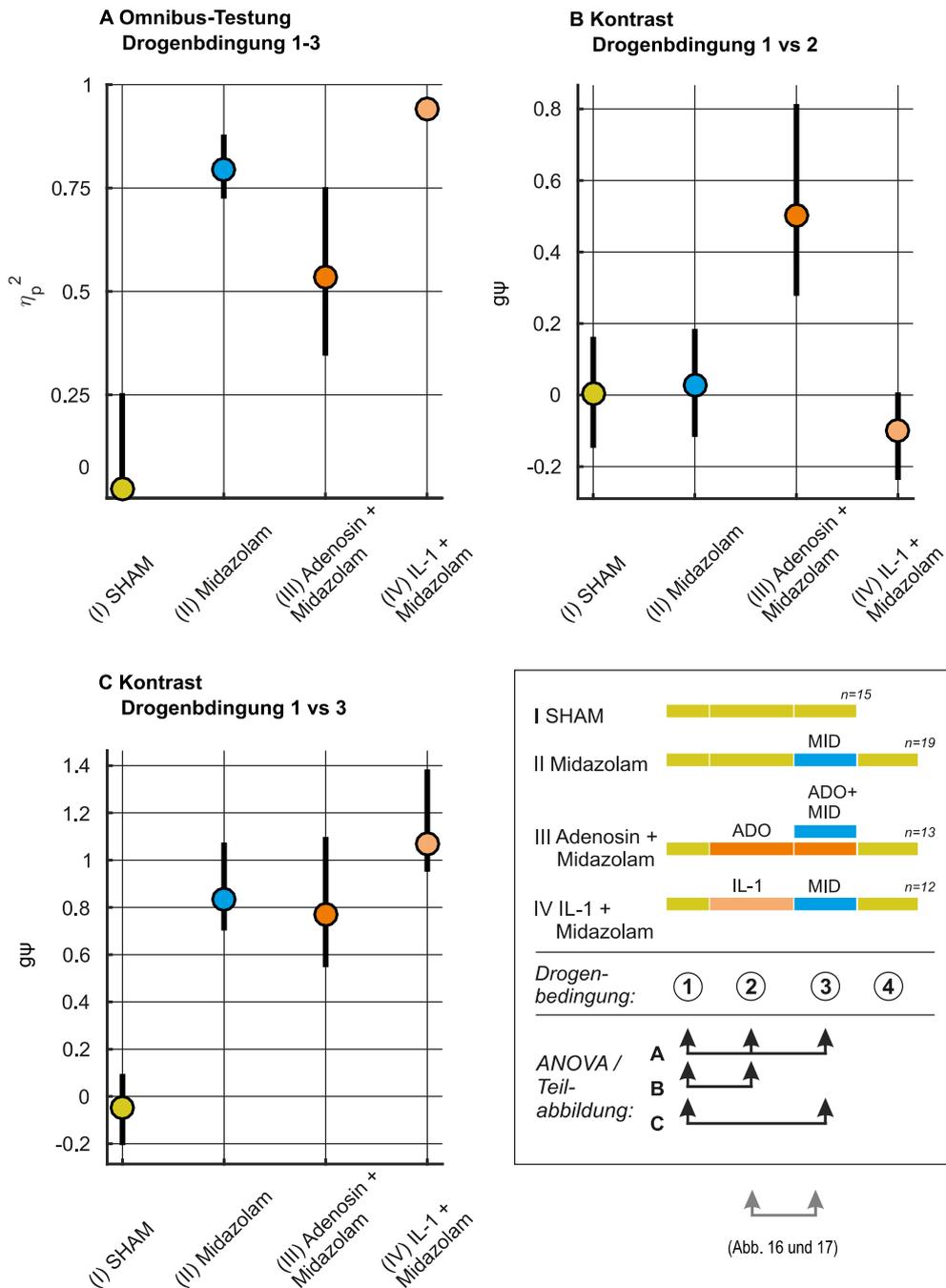


Abb. 15 Adenosin und Midazolam führten zu einer verminderten mittleren Feuerrate

A Omnibus-Testung per η_p^2 . Substanzapplikationen erklärten einen Großteil der vorhandenen Variabilität im Datensatz. **B** Die Anwendung von Adenosin (5 μ M) führte zu einer Verminderung der mittleren Feuerrate ($g\psi=0,50$). **C** Die Anwesenheit von IL-1 β oder Adenosin führte zu keiner nennenswerten Änderung des Midazolam-Effekts (im Vergleich zur alleinigen Midazolam-Anwendung) ausgehend von der Kontrollbedingung. **Kasten:** Übersicht über Experimentserien und zugehörige Drogenbedingungen/Substanzapplikationen. Die Pfeile zeigen, welche Drogenbedingungen in den Berechnungen der Teilabbildungen A, B und C untersucht wurden.

Die Berechnung von Kontrasten mit dem Effektstärkemaß g_{ψ} („g psi“) erlaubte die Substanzeffekte weiter zu spezifizieren. Zunächst wurden Drogenbedingungen 1 und 2 miteinander verglichen; dadurch konnten Effekte von Adenosin und Interleukin-1 β untersucht werden. Erwartungsgemäß waren die Effektstärken in jenen Experimentserien nahe Null, in denen in Drogenbedingung 2 keine Substanz appliziert wurde (Experimentserien I / SHAM und II / Midazolam). Die Vorbehandlung mit Interleukin-1 β bewirkte eine sehr geringe Zunahme der mittleren Feuerrate. Die Bedeutsamkeit dieses schwachen Effekts bei vorliegender Anzahl der Experimente ist jedoch fraglich, da das Konfidenzintervall von g_{ψ} hier knapp den Zahlenwert Null umfasst. Wie jedoch schon das Beispiexperiment (Abb. 11) nahelegte, führte die Anwendung von 5 μ M Adenosin zu einer Abnahme der mittleren Feuerrate. Hierfür ergab sich mit $g_{\psi} = 0,50$ (Konfidenzintervall 0,27- 0,83) ein starker Effekt.

Teilabbildung C stellt den Vergleich der Drogenbedingung 1 und 3 dar. Motivation für die Auswertung dieses Kontrastes war die Hypothese, dass Midazolam in Kombination mit Adenosin oder IL-1 β vom Kontrollzustand ausgehend andere Effekte zeigen könnte als bei Abwesenheit dieser Substanzen. Im Experiment waren die Effektstärkemaße der Experimentserien II-IV jedoch kaum unterscheidbar (siehe Überlappung der Konfidenzintervalle in Abb. 15C). Midazolam hatte also mit oder ohne Vorbehandlung (mit Adenosin beziehungsweise Interleukin-1 β) vom Kontrollzustand ausgehend annähernd die gleiche Hemmung der mittleren Feuerrate zur Folge (vgl. Abb. 13).

Abb. 14 legte qualitativ nahe, dass Anwesenheit von Adenosin die Wirksamkeit von Midazolam abschwächte. Um dies quantitativ zu belegen, wurden Drogenbedingungen 2 und 3 ebenfalls per Kontrast (g_{ψ}) verglichen (Abb. 16). Hier ließ sich deutlich erkennen, dass die Anwendung von Midazolam bei Anwesenheit von Adenosin ein weitaus geringeres Effektstärkemaß aufwies. Dieser Befund zeigt, dass Adenosin die Wirksamkeit von Midazolam einschränkte. Um diesen Effekt auf der Basis eines weiteren elektrophysiologischen Parameters (neben der mittleren Feuerrate) zu verifizieren, wurde zudem g_{ψ} für die LFP-Steilheit berechnet (Abb. 16B).

Insgesamt zeigte sich, dass Midazolam alleine ebenfalls die LFP-Steilheit abschwächte. Wie auch bei Betrachtung der mittleren Feuerrate, konnte Midazolam jedoch bei Anwesenheit von Adenosin die LFP-Steilheit deutlich weniger stark beeinflussen.

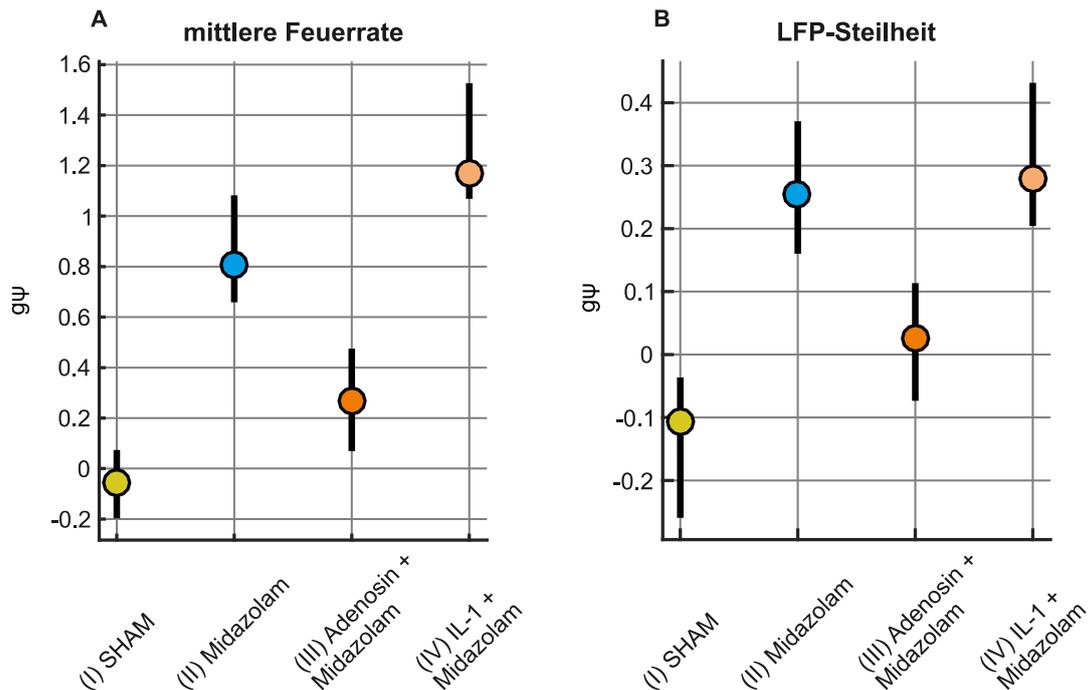


Abb. 16 Die Anwesenheit von Adenosin verminderte die Wirksamkeit von Midazolam

Effektstärkemaß g_{ψ} bei Kontrast von Drogenbedingung 2 vs. 3 für mittlere Feuerrate (**A**) und LFP-Steilheit (**B**). Der Effekt von Midazolam führte bei Anwesenheit von Adenosin (Experimentserie III) zu kleineren g_{ψ} -Werten, als bei alleiniger Midazolam-Anwendung (Experimentserie II). Dies galt sowohl für die mittlere Feuerrate als auch die LFP-Steilheit. Für die Kombination aus Interleukin-1 β und Midazolam (Experimentserie IV) zeigte sich keine sichere Änderung im Vergleich zur alleinigen Midazolam-Behandlung.

Beim Vergleich der Effektstärkemaße der mittleren Feuerrate von Experimentserie II / Midazolam und Experimentserie IV / IL-1+Midazolam ließ sich erkennen, dass die Interleukin-Vorbehandlung zu tendenziell stärkeren Midazolam-Effekten führte, als bei alleiniger Midazolam-Anwendung. In der Steilheit der LFP-Antworten (Abb. 16B) war jedoch kein Unterschied festzustellen. Die Frage, ob Interleukin-1 β tatsächlich den Midazolam-Effekt verstärkte, bleibt in Anbetracht dieses unsicheren Bildes offen (vgl. Kapitel 4.4).

3.4 Einfluss von Midazolam und Adenosin auf die räumliche Ausbreitung neuronaler Signale

Mit dem gewählten Versuchsaufbau konnte zudem untersucht werden, ob die verwendeten Substanzen die neuronale Aktivität proximal oder distal des Stimulationsortes auf unterschiedliche Weise beeinflussten. Zur Klärung dieser Frage wurde eine weitere ANOVA berechnet, die das Effektstärkemaß g_{ψ} getrennt für proximale (Stim.S1-Rec.S1 und Stim.S2-Rec.S2) und distale Ableitungen (Stim.S1-Rec.S2 und Stim.S2-Rec.S1) bestimmte (Abb. 17).

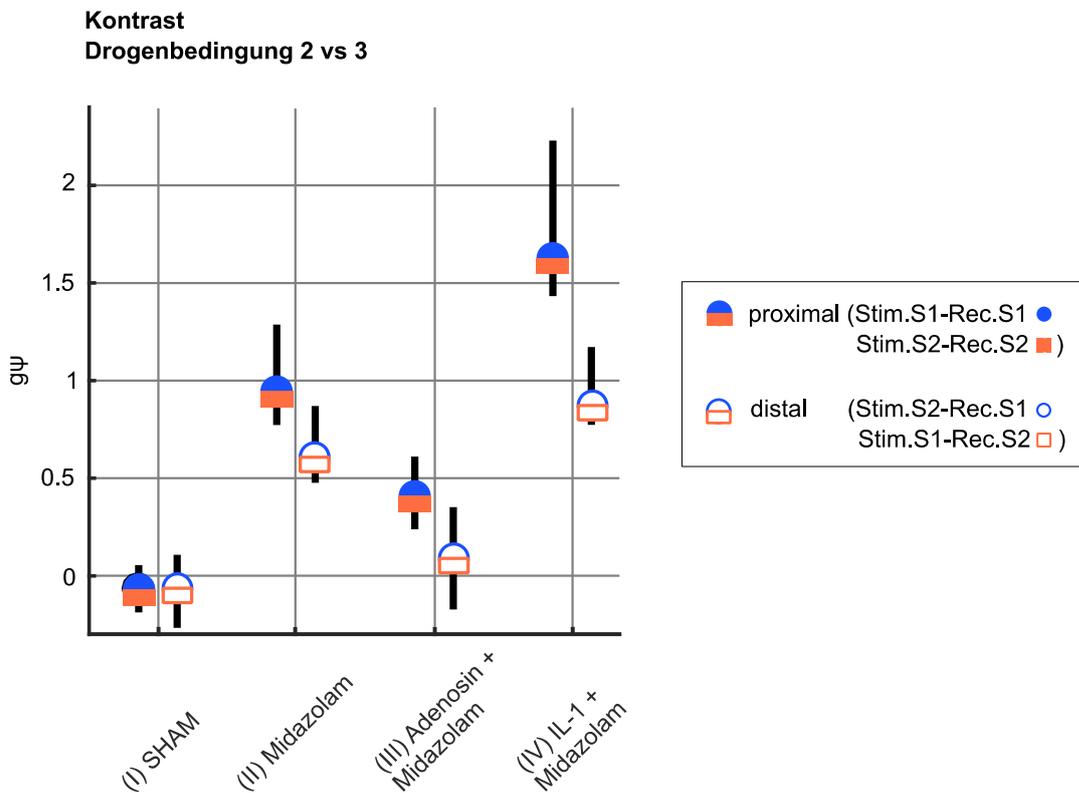


Abb. 17 Midazolam führte an proximalen Messelektroden zu einer stärkeren Abnahme der mittleren Feuerrate

Getrennte Berechnung von g_{ψ} für proximale (ausgefüllte Symbole) und distale Ableitorte (nicht-ausgefüllte Symbole) bei Kontrastierung von Drogenbedingung 2 und 3. Untersucher Parameter: Mittlere Feuerrate. Bei Experimentserien (II-IV) mit Midazolam-Anwendung ergaben sich konsistent größere g_{ψ} -Werte an proximalen Ableitungen im Vergleich zu distalen.

Dabei zeigte sich für die Experimentserien II-IV bei welchen Midazolam verwendet wurde, dass die Effektstärke an proximalen Ableitungen größer war als an distalen. Zwar überlappten die Konfidenzintervalle für g_{ψ} von proximalen und distalen Ableitungen in zwei von drei Experimentserien, jedoch besaßen die Effektstärkemaße aller Experimentserien mit Midazolam-Anwendung auf der proximalen Ableitung konsistent höhere Werte für g_{ψ} . Daher konnte davon ausgegangen werden, dass Midazolam an proximalen Ableitorten effektiver die mittlere Feuerrate hemmte, als an distalen Ableitorten.

Dieselbe Berechnung wurde zudem für den Kontrast Drogenbedingung 1 vs. 2 durchgeführt, um mögliche räumliche Effekte von Adenosin oder Interleukin-1 β zu untersuchen (siehe Anhang 8.9). Hier zeigte sich aber kein relevanter, eindeutiger Unterschied der Effektstärken der beiden untersuchten Substanzen/Experimentserien. D.h. in der vorliegenden Arbeit lagen keine eindeutigen Hinweise vor, dass Adenosin oder Interleukin-1 β an proximalen oder distalen Ableitorten verschieden effektiv wirkten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass Adenosin bzw. Interleukin-1 β die Effekte von Midazolam auf die Aktionspotenzialaktivität in akuten organotypischen Schnitten des Mausekortex modulieren. Motivation dieses Vorgehens waren Beschreibungen in der Literatur, dass Adenosin bzw. IL-1 β das GABAerge System (8) (9) (86) beeinflussen, über das Midazolam und zahlreiche andere Anästhetika ihre Wirkung entfalten (10). Die wichtigsten Ergebnisse der Studie haben gezeigt, dass eine Ko-Applikation von Midazolam und Adenosin die Potenz von Midazolam, die Aktionspotenzialaktivität und LFP-Steilheit zu hemmen, verringerte (Abb. 16). Gleichzeitig reduzierte Adenosin selbst die Aktionspotenzialaktivität erheblich (Abb. 15B). Interessanterweise war die Summe der Effekte bei Kombination von Adenosin und Midazolam nicht zu unterscheiden von den Effekten bei Monoapplikation von Midazolam (Abb. 15C). Im Folgenden möchte ich die einzelnen Versuchsansätze diskutieren und abschließend in einen klinischen Zusammenhang bringen.

4.1 Aktivitätshemmende Effekte von Midazolam im somatosensorischen Kortex

Die alleinige Anwendung von Midazolam in einer Konzentration von 200 nM führte zu einer Absenkung der mittleren Feuerrate auf etwa 60 % (Mediane 0,59 – 0,67; Abb. 14). Auch bei Ko-Applikation mit Adenosin oder Interleukin-1 β senkte Midazolam charakteristischerweise die mittlere Feuerrate (Abb. 12). Diese Ergebnisse verdeutlichen die inhibitorischen Eigenschaften von Midazolam an akuten Hirnschnitten des Mausekortex. Die Literatur zeigt, dass Midazolam in Neokortex-Kulturen in einer Konzentration von 500 nM ebenfalls einen Abfall der spontanen Feuerrate auf etwa 60% zur Folge hatte (20). Bei Verwendung von Diazepam, einem Benzodiazepin mit großer struktureller Ähnlichkeit zu Midazolam (vergleiche Abb. 1), führte eine Konzentration von 1 μ M zu einem Abfall der spontanen kortikalen Feuerrate auf etwa 80% der

Ausgangsaktivität (22). In der vorliegenden Arbeit wurde neben der mittleren Feuerrate ebenfalls die LFP-Steilheit durch Midazolam verringert (Abb. 16). Dieser Befund konnte von anderen Gruppen am Hippokampus beschrieben werden. An akuten Hirnschnitten des Hippokampus leiteten Narimatsu et al. extrazellulär-gemessene erregende postsynaptische Potenziale (EPSP) am Gyrus dentatus und in der CA1-Region ab. Hier führte 1 μ M Midazolam zu einer Minderung der LFP-Steilheit dieser Potenziale auf etwa 75% (102). Zusammengenommen belegen diese Arbeiten die inhibitorische Wirksamkeit von Benzodiazepinen in organotypischen Kulturen und akuten Schnitten innerhalb verschiedener Gehirnareale.

Verschiedene Arbeiten geben Aufschluss darüber, auf welche Weise Benzodiazepine wie Midazolam die neuronale Aktivität verändern. Experimente an akuten Hirnschnitten des auditorischen Kortex zeigten eine Verstärkung von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSC) durch Anwendung von Midazolam (103). Ebenso konnte Midazolam in Neuronen der Schicht 5 des Rattenkortex inhibitorische tonische Ströme verstärken (104). Walters et al. zeigten zudem an Oozyten, dass Midazolam die GABAergen Ströme verstärkte (21). Diese elektrophysiologischen Arbeiten untermauern die weit akzeptierte Ansicht, dass Benzodiazepine ihre Effekte hauptsächlich über den GABA_A-Rezeptor ausüben. Dabei erhöhen Benzodiazepine die Affinität von endogenem GABA gegenüber dem GABA_A-Rezeptor, was zu erhöhtem Einstrom von Chlorid-Ionen und verstärkter Hyperpolarisation von Neuronen führt (15). Das bedeutet, dass die Wirkung von Midazolam vom Vorhandensein von GABA_A-Rezeptoren und inhibitorischen Interneuronen, die GABA ausschütten, abhängig ist. Es ist anzunehmen, dass diese Wirkungsweise zu der im Experiment beobachteten Reduktion von mittlerer Feuerrate und LFP-Steilheit durch Midazolam führte (Abb. 16).

Es zeigte sich, dass Midazolam eine größere Wirksamkeit an proximalen Ableitorten besaß, als an distalen (Abb. 17). Es ist anzunehmen, dass am proximalen Ableitort die neuronalen Antworten in hohem Maße auf direkter Aktivierung von Axonen (105) (monosynaptische Übertragung) beruhten,

während am distalen Ableitungsort polysynaptische Verbindungen zwischen (durch Stimulation) erregten Axonen und abgeleiteten Neuronen einen vergleichsweise größeren Anteil an den neuronalen Antworten hatten (vergleiche Abb. 18). Dies ist der Tatsache geschuldet, dass die synaptische Verknüpfungswahrscheinlichkeit zwischen kortikalen Neuronen mit der Distanz stark abnimmt, insbesondere in akuten Schnitten (91). Nahe der Stimulationselektrode ist daher das Verhältnis stimulationsinduzierter synaptischer Hemmung zu Erregung zumindest teilweise ein Abbild der relativen Dichte (und Erregbarkeit) GABAerger Axone. Je weiter der Ableitort vom Stimulationsort entfernt ist, umso stärker sollten die Spezifität kortikaler Verknüpfungen, inklusive Disinhibition (106), als auch die Eigendynamik kortikaler Netzwerke (107) neuronale Antworten bestimmen. Die Beobachtung, dass es nahe des Stimulationsorts zu stärkerer Inhibition kam und der Einfluss von Inhibition über weitere Distanzen (mit vorwiegend polysynaptischen Verbindungen) abnahm, könnte daher auf Integrationsprozesse durch zwischengeschaltete Neuronen zurückgehen, die Inhibition in geringerem Maße rekrutieren als in unmittelbarer Nähe der Stimulationselektrode.

Klinisch werden Benzodiazepine oftmals vorsichtig appliziert, um die gewünschte Wirkung zu erreichen und Nebenwirkungen (wie zum Beispiel Atemdepression) zu vermeiden. Dabei fällt auf, dass manche Patienten deutlich höhere Dosierungen benötigen als andere, um die gewünschten Effekte zu erzielen. Passend dazu wurde gezeigt, dass gleiche Plasmakonzentrationen von Midazolam bei verschiedenen Patienten zu unterschiedlichen Sedierungszuständen führen können (108). Daher ist die Angabe von bestimmten Midazolam-Konzentrationsbereichen und deren Effekte durch interindividuelle Unterschiede im Hinblick auf die Sensibilität gegenüber Midazolam schwierig. Dennoch können grobe Konzentrationsbereiche von Midazolam im ZNS und deren Effekte ungefähr errechnet werden. So geht man davon aus, dass bei leichter Sedierung etwa 50 nM Midazolam vorliegen, während bei starker Sedierung ungefähr 2 µM Midazolam benötigt werden (20). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchte Konzentration von 200 nM Midazolam in einem klinisch relevanten Bereich liegt.

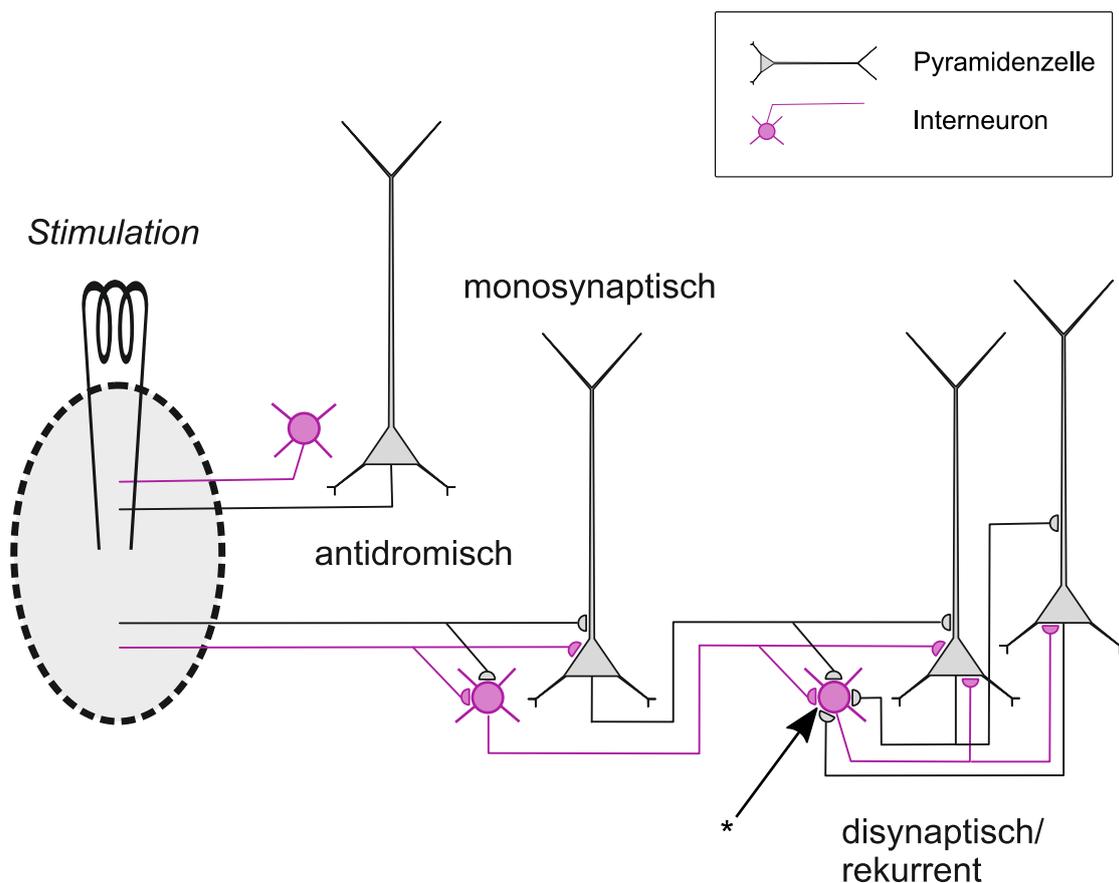


Abb. 18 Die Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungsort bestimmt im neuronalen Netzwerk die vorherrschende synaptische Übertragung

Schemazeichnung von möglichen synaptischen Verknüpfungen im Kortex. In der vorliegenden Arbeit erfolgten proximale und distale Ableitungen. Es ist davon auszugehen, dass bei proximalen Ableitungen vermehrt monosynaptische Übertragung stattfand, während an distalen Ableitungen polysynaptische Übertragung vorherrschte. Antidrome Ableitung von Neuronen, deren Axone direkt erregt wurden, wurde durch ausreichende Distanz zwischen Stimulations- und Messelektrode weitgehend vermieden.

* Beispielhaftes Interneuron, dessen (inhibitorische) Aktivität sowohl von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen abhängig ist.

4.2 Effekte von Adenosin auf kortikale Netzwerke

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von 5 μM Adenosin auf kortikale Signale nach Stimulation untersucht. Hierfür wurde Adenosin vor und während Midazolam-Applikation angewendet. Die alleinige Anwendung von Adenosin führte zu einer signifikanten Verminderung der mittleren Feuerrate ($g_{\psi}=0,50$; Abb.

15B). Dieser Befund wird durch verschiedene elektrophysiologische Arbeiten unterstützt. Beispielsweise wurden am Kortex Pyramidenzellen der Schicht 5 untersucht (96). Hier führte Adenosin zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotenzials und einer Senkung des Eingangswiderstandes. Interessanterweise sprachen Pyramidenzellen je nach kortikaler Schicht unterschiedlich ausgeprägt auf Adenosin an. So reagierten Pyramidenzellen in Schicht 2/3 weniger sensitiv auf Adenosin als Neuronen in Schicht 5 (96). Im visuellen Kortex führte Applikation von Adenosin zu verringerten Amplituden des erregenden postsynaptischen Potenzials (EPSP) (109). Auch die spontane Feuerrate im Kortex und Hippokampus wurde durch Adenosin vermindert (110) (111).

Die beobachtete Minderung der mittleren Feuerrate durch Adenosin (Abb. 15B) wurde am wahrscheinlichsten durch den A1-Rezeptor vermittelt. Aktivierung des A1-Rezeptors führt zu Hyperpolarisation, vermindertem präsynaptischen Einstrom von Kalzium-Ionen und herabgesetzter Transmitterausschüttung (112). A2a-Rezeptoren hingegen haben im ZNS neuronale Erregung durch erhöhte Ausschüttung von Glutamat und Acetylcholin zur Folge (38). Dementsprechend liegt nahe, dass vor allem der A1-Rezeptor für die Verminderung der mittleren Feuerrate bei Adenosin-Applikation verantwortlich war. Diese Hypothese wird durch eine mRNA-Untersuchung unterstützt, die eine hohe A1-Rezeptor-Ausstattung im Ratten-Kortex nachwies (40). Weitere Arbeiten zeigten zudem besonders hohe Konzentrationen von A1-Rezeptoren in Schicht 5 des Ratten-Kortex (113), wohingegen A2a-Rezeptoren nur in geringem Maß nachgewiesen werden konnten (27). Zudem besitzt der A1-Rezeptor die höchste Affinität gegenüber Adenosin (26).

Die verwendete Konzentration von 5 μ M Adenosin scheint auf den ersten Blick relativ hoch. Die physiologische, extrazelluläre Adenosin-Konzentration im ZNS wird auf 10-250 nM geschätzt (26) (38). Einschränkend gilt hier jedoch, dass dabei oft das Verfahren der Mikrodialyse eingesetzt wurde. Dieses verursacht im Rahmen der Probeentnahme einen Gewebeschaden, der die Adenosin-Konzentration verändern kann. Entscheidend ist jedoch, dass im ZNS punktuell

inhomogene Adenosin-Konzentrationen vorherrschen, die selbst mit räumlich und zeitlich weitaus besser auflösenden Biosensoren auf Enzymbasis nicht aufgelöst werden können (36). Alle bisher verwendeten Verfahren unterschätzen somit extrazelluläre Konzentrationsmaxima von Adenosin, die zwar zeitlich-räumlich begrenzt sind, aber dennoch von physiologischer Relevanz für Adenosin-Rezeptoren sind (36). Kerr et al. verwendeten ein mathematisches Modell zur Abschätzung der physiologischen Adenosin-Konzentration im somatosensorischen Rattenkortex. Anhand einer Analyse von EPSPs in der Gegenwart von exogen-applizierten Adenosin-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten, wurde eine physiologische, lokale Adenosin-Konzentration im niedrigen mikromolaren Bereich ($\sim 1 \mu\text{M}$) errechnet (114). In aktuellen in-vitro-Arbeiten wurden teilweise Adenosin-Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich verwendet, um erhöhte/pathologische Adenosin-Konzentrationen nachzubilden (z.B. bis zu $150 \mu\text{M}$; (115)). Begründet werden kann dies durch einen relativ niedrigen Adenosin-Anteil von circa 5-6 %, der im Gewebe bei Einwasch über eine Badkammer zur Verfügung steht (116). Dieser niedrige verfügbare Adenosin-Anteil ist am wahrscheinlichsten durch den schnellen und effizienten Abbau von Adenosin zu erklären. Auch für pathologische Bedingungen scheint die Angabe von genauen, eindeutigen Konzentrationsbereichen methodisch schwierig zu sein. Eine klinische Arbeit zeigte im Blutplasma jedoch, dass Patienten mit septischem Schock im Vergleich zu Patienten mit hämorrhagischem Schock etwa 8-fach erhöhte Adenosin-Konzentrationen im Plasma besaßen (44). In Zusammenschau erschien die verwendete Konzentration von $5 \mu\text{M}$ Adenosin daher geeignet, um pathologisch erhöhte Adenosin-Konzentrationen nachzubilden.

4.3 Interleukin-1 β

Die Monoapplikation von Interleukin-1 β konnte die mittlere Feuerrate zwar tendenziell erhöhen, dennoch war dieser Effekt relativ klein und mit einiger Unsicherheit behaftet; das 95%-Konfidenzintervall der Effektstärke g_{ψ} umfasste mit 0,0048 knapp den Nullwert (Abb. 15B). Andere elektrophysiologische

Arbeiten hingegen wiesen nach, dass Interleukin-1 β die neuronale Aktivität verändern kann. An Hirnschnitten des Kortex führte die Anwendung von Interleukin-1 β zu geringerer neuronaler Aktivität mit verminderter Ausbreitung des Signals über den Kortex (117). Am dorsalen Raphe-Kern konnte Interleukin-1 β neuronale Feuerraten vermindern und GABAerge inhibitorische postsynaptische Potenziale verstärken (118). Im Hippokampus verminderte IL-1 β die Dichte von AMPA-Rezeptoren (119), die glutamaterge synaptische Übertragung (42) und die Langzeit-Potenzierung (LTP) (120). Diese Arbeiten legen eine inhibitorische Funktion von IL-1 β bei der neuronalen Übertragung nahe. Andererseits liegen ebenfalls Arbeiten vor, die erregende Eigenschaften von IL-1 β zeigten. So führte IL-1 β an Neuronen des Hippokampus zu verminderten GABA-induzierten Strömen (121). Diese konträren Ergebnisse zeigten sich auch in anderer Hinsicht. So wurden neurotoxische Eigenschaften von IL-1 β beschreiben, während auch neuroprotektive Effekte diskutiert wurden (122). Allan et al. vermuteten, dass IL-1 β konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte vermitteln kann (55). Auch für die vorliegende Arbeit scheint die verwendete Interleukin-Konzentration von Bedeutung zu sein. Möglicherweise konnten keine deutlichen Effekte durch Interleukin-1 β beobachtet werden, da die gewählte Konzentration von 5 ng/ml zu gering gewählt war. Verschiedene Untersuchungen legen relativ hohe Konzentrationen von IL-1 β in pathologischen Zuständen nahe. So wurde beispielsweise bei Multiple-Sklerose-Patienten mit aktivem Schub eine IL-1 β -Konzentration von etwa 20 ng/ml im Liquor festgestellt. Bei gesunden Patienten hingegen wurden circa 10 ng/ml IL-1 β im physiologischen Zustand nachgewiesen (84). Mina et al. induzierten durch Blinddarm-Punktion bei Ratten ein septisches Geschehen. 24 Stunden nach dieser Punktion wurde das Hirngewebe entnommen und die IL-1 β -Konzentration in verschiedenen Gehirnarealen untersucht. Hier zeigte sich ein inhomogener Anstieg der IL-1 β -Konzentration: Im Hippokampus konnte eine IL-1 β -Konzentration von etwa 17,5 ng/ml nachgewiesen werden, während die Konzentration im präfrontalen Kortex nur etwa 7,5 ng/ml betrug. Auch ohne Blinddarm-Punktion zeigten diese Hirnareale im physiologischen Zustand verschiedene und relativ hohe IL-1 β -Konzentrationen (Hippokampus circa 5

ng/ml; präfrontaler Kortex ca. 1 ng/ml) (7). Andere Arbeiten bedienten sich daher oftmals deutlich höheren Konzentrationen. Andererseits konnten auch geringere Konzentrationen von IL-1 β zu elektrophysiologisch-messbaren Effekten führen. So hemmte 1 ng/ml IL-1 β die Ausbreitung von neuronaler Aktivität am Neokortex (117). Daher bleibt zu spekulieren, weshalb in anderen Arbeiten auch bei noch geringeren Konzentrationen Effekte nachweisbar waren.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Einwaschzeit von 40 Minuten zu kurz gewählt war. Dafür würde eine Arbeit an Kulturen des Ratten-Kortex sprechen. Hier wurde der Effekt von IL-1 β auf spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle untersucht. Ein Effekt von IL-1 β (Konzentration 10 ng/ml) auf den Natriumkanal konnte erst nach 8 Stunden mit IL-1 β -Vorbehandlung festgestellt werden (57). Allerdings führte IL-1 β in einer anderen Publikation bei Verwendung der gleichen Konzentration bereits nach 15 Minuten zu einer messbaren Änderung der Ausbreitung des neuronalen Signals am Kortex (117). Eine Arbeit an akuten Schnitten des Raphe-Kerns zeigte sogar nach 3 Minuten eine verminderte Feuerrate von serotonergen Neuronen durch IL-1 β (Konzentration 25 ng/ml) (118). Auch Aspekt der Einwaschzeit kann daher nicht abschließend erklären, weshalb IL-1 β in der vorliegenden Arbeit keine deutlichen Effekte zeigte.

Eine Arbeit von Brambilla et al. (118) enthält einen interessanten Nebenbefund. Hier besaßen nur knapp 70% der intrazellulär untersuchten Neuronen eine Sensitivität gegenüber IL-1 β . Eine Arbeit am orbitofrontalen Kortex bei extrazellulärer Messung von einzelnen Neuronen zeigte ein ähnliches Phänomen. Hier führte IL-1 β nur bei etwa der Hälfte der untersuchten Neuronen zu einer Änderung der Feuerrate. Von diesen IL-1 β -sensitiven Neuronen zeigte die Mehrheit eine Steigerung der Feuerrate, während knapp ein Drittel eine verminderte Feuerrate nach IL-1 β -Applikation aufwies (123). Diese Beobachtung legt nahe, dass Interleukin-1 β spezifische und teils entgegengesetzte Effekte auf verschiedene Neuronen-Typen ausübt (ähnlich wie klassische Neuromodulatoren wie Acetylcholin). In der vorliegenden Arbeit wurden nicht einzelne, sondern mehrere Neuronen extrazellulär abgeleitet („Multi-Unit-Activity“). Möglicherweise könnte dies dazu geführt haben, dass sich eventuelle

IL-1 β -Effekte auf individuelle Neuronen durch gleichzeitige Ableitung von mehreren Neuronen in der vorliegenden Arbeit aufhoben.

Des Weiteren muss betont werden, dass das verwendete Testsystem mit großer Sicherheit den Interleukin-1- beziehungsweise den Zytokin-Haushalt im Gewebe beeinflusste. Bei Verwendung von akuten Hirnschnitten entsteht bei Präparation ein erhebliches Gewebetrauma. Da bekannt ist, dass Gewebeläsion zu erhöhter Freisetzung von Interleukin-1 β führt (55), muss davon ausgegangen werden, dass im akuten Hirnschnitt bereits vor Interleukin-1-Applikation erhöhte IL-1 β -Konzentrationen vorlagen. Dies kann dazu beitragen, dass die Anwendung von geringen IL-1 β -Konzentrationen die IL-1 β -Konzentration im Gewebe nur noch relativ schwach anhub und so zu keinen messbaren Unterschieden der neuronalen Aktivität führte. Allerdings bleibt offen, welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist, dass andere Arbeiten, die ebenfalls akute Hirnschnitte und auch geringe IL-1 β -Konzentrationen verwendeten, spezifische IL-1 β -Effekte nachweisen konnten. Für zukünftige Arbeiten sollten daher höhere Konzentrationen von IL-1 β und gegebenenfalls eine verlängerte Inkubationszeit getestet werden, um den Einfluss von Interleukin-1 β im gewählten Versuchsaufbau zu untersuchen.

Zusammengefasst konnte die Monoapplikation von IL-1 β in der vorliegenden Arbeit keinen sicheren Effekt auf die mittlere Feuerrate ausüben. Auch die Frage nach einer veränderten Wirksamkeit von Midazolam durch IL-1 β lässt sich statistisch nicht eindeutig beantworten. Tendenziell zeigte sich allerdings, dass IL-1 β die Midazolam-Wirkung verstärkte (Abb. 16A). Dieser Trend zeigte sich jedoch nur bei Betrachtung der mittleren Feuerrate (und nicht für die LFP-Steilheit). Für die mittlere Feuerrate überlappten die 95%-Konfidenzintervalle (KI) der Effektstärkemaße der Experimentserien II und IV nur knapp (II/Midazolam: oberes KI g_{ψ} 1,0799; IV/IL-1+Midazolam: unteres KI g_{ψ} 1.0623. Abb. 16A). Die Beobachtung, dass IL-1 β tendenziell die Wirksamkeit von Midazolam steigern könnte, ist interessant, da andere Studien dieses Phänomen nahelegen.

An Schweinen zeigten verschiedene Arbeiten, dass Inflammation zu einer erhöhten Sensitivität der Tiere gegenüber Propofol (80), Isofluran (83) oder

Sevofluran (81) führte. Bei Ratten führte ein septisches Geschehen ebenfalls zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Isofluran (82). Komatsubara et al. wiesen zudem an septischen Ratten eine erhöhte Anzahl von GABA_A-Rezeptoren nach (124). Diese Tierexperimente legten einen Zusammenhang zwischen Inflammation und erhöhter Wirksamkeit von Anästhetika nahe; der Wirkmechanismus blieb aber unklar. Avramescu et al. zeigten 2016 an Verhaltensstudien der Maus, passend zu den vorherigen Arbeiten, dass eine Injektion von Lipopolysaccharid (LPS; bakterielles Endotoxin, das häufig bei Sepsis-/Inflammationsmodellen verwendet wird) die hypnotischen Effekte von Etomidat und Isofluran verstärkte. Sie spekulierten, dass dieser Effekt durch IL-1 β hervorgerufen wurde und untersuchten daher die Effekte von IL-1 β an Kulturen des Hippokampus und Kortex in vitro. Dabei zeigte sich, dass die Monoapplikation von IL-1 β zu verstärkten GABAergen Strömen führte. Im Folgenden untersuchten sie die Kombination aus IL-1 β und Etomidat bzw. Isofluran an kultivierten Neuronen. Hier führte Etomidat und Isofluran zu verstärkten GABAergen Strömen bei vorheriger Anwesenheit von IL-1 β . Als zugrundeliegendem Mechanismus vermuteten Avramescu et al. dabei eine erhöhte Expression von GABA_A-Rezeptoren (8). Damit scheint die Annahme gerechtfertigt, dass die Beobachtungen der Tierversuche (Inflammation führte zu erhöhter Sensitivität gegenüber Anästhetika) durch IL-1 β vermittelt wurden.

Als Randnotiz ist hier zu erwähnen, dass Avramescu et al. deutlich höhere Konzentrationen von IL-1 β und längere Einwaschphasen verwendeten (60 ng/ml IL-1 β über 3 Stunden (8); in der vorliegenden Arbeit 5 ng/ml IL-1 β über 40 min; vgl. Kap. 2.4). Daher wirkt der beobachtete Trend (IL-1 β verstärkte tendenziell die Midazolam-Wirkung; Abb. 16) im Gesamtzusammenhang plausibel. Zur Überprüfung dieser Beobachtung sollten verlängerte Einwaschzeiten und/oder erhöhte Konzentrationen von IL-1 β im vorliegenden Versuchsaufbau getestet werden. Alternativ könnte eine größere Anzahl von Experimenten den eventuell bestehenden (schwachen) Effekt der verwendeten Konzentration von IL-1 β bestätigen.

4.4 Interaktion von Adenosin und Midazolam

Es zeigte sich, dass die Monoapplikation von Adenosin (Abb. 15B) oder Midazolam (Abb. 16A) die mittlere Feuerrate verminderte. Interessanterweise senkte die Ko-Applikation von Adenosin und Midazolam die mittlere Feuerrate ebenso weit ab, wie bei alleiniger Midazolam-Anwendung (Abb. 15C). Dieser Befund war überraschend, da angenommen wurde, dass die Kombination der zwei hemmenden Substanzen (Midazolam, Adenosin) zu einer verstärkten Absenkung der mittleren Feuerrate führen würde (positiver Kombinationseffekt*). Daher wurde vermutet, dass die Anwesenheit von Adenosin die Wirksamkeit von Midazolam abschwächte. Qualitativ (Abb. 14) und quantitativ (Abb. 16) wurde diese Vermutung bestätigt: Adenosin verringerte die Potenz von Midazolam, die mittlere Feuerrate und die LFP-Steilheit zu vermindern.

Diese Ergebnisse aus vorhergehenden Berechnungen wurden in Abb. 19A zusammengefasst. Die isolierte Betrachtung der Ergebnisse lassen auf den ersten Blick verschiedene (klinische) Schlussfolgerungen zu:

1. Der Bedarf an Midazolam ist unverändert, da die Summe der Effekte von Adenosin und Midazolam ($E_{\text{ado+mid_ado}}$) den Effekten bei Monoapplikation von Midazolam (E_{mid}) entsprach.
2. Der Bedarf an Midazolam ist bei Anwesenheit von Adenosin erhöht, da Adenosin zu einem herabgesetzten Midazolam-Effekt ($E_{\text{mid_ado}}$) führte (im Vergleich zur Monoapplikation von Midazolam (E_{mid})).

* siehe Anhang 8.10; hier finden sich Definitionen der verwendeten Begriffe hinsichtlich der pharmakologischen Interaktion

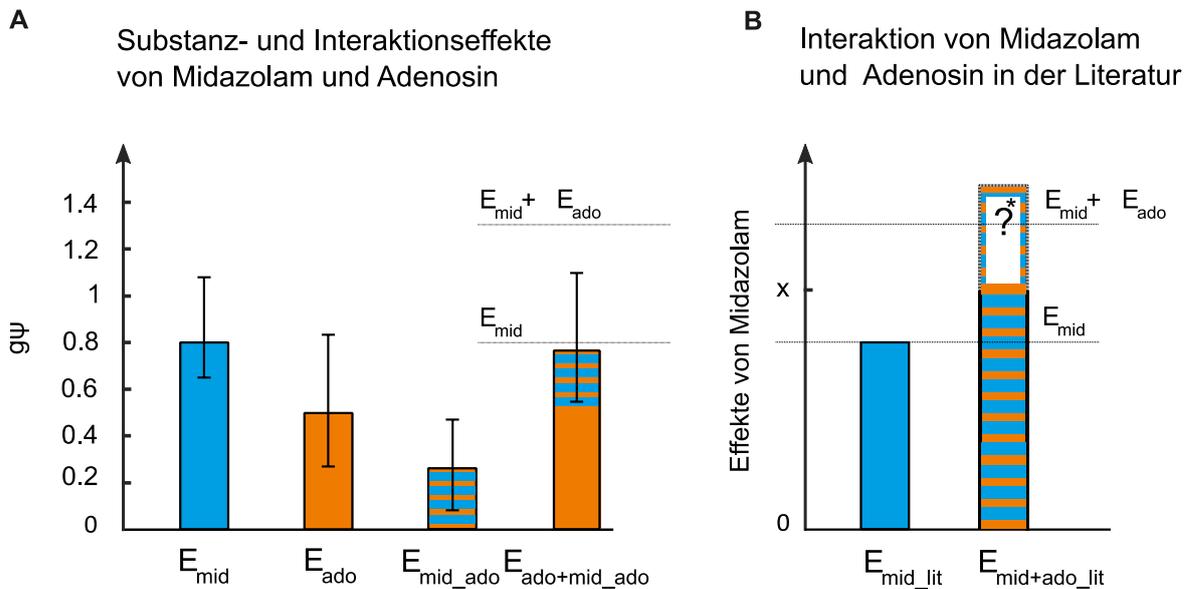


Abb. 19 Substanz- und Interaktionseffekte von Midazolam und Adenosin in der vorliegenden Arbeit und in der recherchierten Literatur

A Effekte der Substanzen Adenosin und Midazolam auf die mittlere Feuerrate in der vorliegenden Arbeit; abgebildet ist das Effektstärkemaß g_{ψ} mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall. E_{mid} =Effekt bei Monoapplikation von Midazolam 200 nM; (Abb. 16A). E_{ado} = Effekt bei Monoapplikation von Adenosin 5 μ M; (Abb. 15B). E_{mid_ado} = Midazolam-Effekt bei Anwesenheit und vorheriger Präinkubation mit Adenosin; (Abb. 16A). $E_{ado+mid_ado}$ = Gesamteffekt bei Präinkubation von Adenosin und anschließender Ko-Applikation von Adenosin und Midazolam; (Abb. 15C). **B** Zusammenfassung der Interaktionsstudien von Midazolam und Adenosin in der Literatur. Die y-Achse ist einheitslos und stellt beispielsweise die Sedierungstiefe (Sakurai et al. 2014 (128)) oder -dauer (Kaputlu et al. 1998 (127)) dar, die durch Midazolam (E_{mid_lit}) bzw. durch die Kombination aus Midazolam und Adenosin ($E_{mid+ado_lit}$) hervorgerufen wurde. Es ist zu beachten, dass $E_{mid+ado_lit}$ den Effekt der gleichzeitigen Anwendung von Midazolam und Adenosin abbildet ($E_{ado+mid_ado}$ aus Teilabbildung A zeigt den Gesamteffekt aus Adenosin-Präinkubation und nachfolgender Ko-Applikation von Adenosin und Midazolam). Die recherchierte Literatur legt einen positiven Kombinationseffekt bei gleichzeitiger Applikation von Midazolam und Adenosin nahe.

* Aus den Arbeiten kann jedoch nicht geschlossen werden, ob ein additiver- bzw. supra-additiver Interaktionseffekt vorlag; u.a. weil der alleinige Adenosin-Effekt häufig nicht quantifiziert wurde. Vgl. Anhang 8.10.

Die Beobachtung, dass die Kombination von Adenosin und Midazolam ($E_{ado+mid_ado}$) die mittlere Feuerrate nicht stärker hemmen konnte, als die Monoapplikation von Midazolam (E_{mid}) (Abb. 15, Abb. 19) war bemerkenswert. Im Versuch zeigten sich relativ große Effektstärkemaße für die Monoapplikation von Adenosin (E_{ado} : $g_{\psi}=0,50$; Abb. 15B) bzw. von Midazolam (E_{mid} : $g_{\psi}=0,81$; Abb. 16A). Für die Kombination von Adenosin und Midazolam ergab sich mit $g_{\psi}=0,77$ ($E_{ado+mid_ado}$) (Abb. 15C) hingegen keine Unterscheidbarkeit zur Monoapplikation von Midazolam. Die Schlussfolgerung, dass daher kein veränderter Bedarf von

Midazolam bei Anwesenheit von Adenosin im Allgemeinen besteht, scheint jedoch unzulässig. Es ist nicht bekannt, ob dieses Phänomen nur bei den verwendeten Konzentrationen, sondern auch bei anderen Konzentrationen von Adenosin oder Midazolam auftritt. Zur Beantwortung dieser Frage, könnten beispielsweise Versuche mit veränderter Adenosin-Konzentration bei gleichbleibender Midazolam-Konzentration durchgeführt werden.

Die Literatur beschreibt erstaunlicherweise einen positiven Kombinationseffekt von Midazolam und Adenosin; diese Ergebnisse legen auf den ersten Blick die Schlussfolgerung eines verminderten Midazolam-Bedarfs bei erhöhten Adenosin-Konzentrationen nahe (vgl. Abb. 19B). So zeigten beispielsweise 1984 Barraco et al., dass die Kombination von Adenosin und Diazepam die lokomotorische Aktivität von Mäusen stärker einschränkte, als die Monoapplikation dieser Substanzen (125). Zudem führte bei Katzen die Gabe eines Adenosin-A1-Rezeptor-Agonisten zu einer verstärkten Wirkung des Anästhetikums Halothans an der *Formatio reticularis* (126). Auch am Menschen konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe von Adenosin zu einem geringeren Isofluran-Bedarf führte (127). Wie in der vorliegenden Arbeit, wurde zudem die Interaktion von Adenosin und Midazolam untersucht. Kaputlu et al. führten dazu Verhaltensversuche an Mäusen durch. Hier zeigte sich, dass die gleichzeitige Gabe von Adenosin und Midazolam zu einer verlängerten und schneller einsetzenden Hypnose führte, als bei Monoapplikation von Midazolam (128). In einer weiteren Arbeit wurde überprüft, ob ATP zu einer veränderten Sedierung des Menschen durch Midazolam führte. Hier wurde unter Verwendung eines Bispektral-Index-Monitors (vgl. Kapitel 1.7) festgestellt, dass eine intravenöse Gabe von ATP (das schnell zu Adenosin degradiert wird; (31)) eine vertiefte Sedierung bei Midazolam-Applikation zur Folge hatte (129).

Die genannten Arbeiten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Anwesenheit von Adenosin den Bedarf an Anästhetika verringert. Dies scheint einen Widerspruch zur vorliegenden Arbeit darzustellen (die Wirksamkeit von Midazolam war bei Anwesenheit von Adenosin herabgesetzt; zudem konnte kein positiver Kombinationseffekt beobachtet werden. Abb. 19A). Eine naheliegende

Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass sich der positive Kombinationseffekt beider Substanzen nicht in den *Raten* neuronaler Aktivität äußert, sondern in anderen Aspekten wie neuronaler Synchronisation und interarealer Kommunikation (130), die hier nicht untersucht wurden. Ebenso plausibel erscheint es, dass trotz der Bedeutung des Neokortex als Zielstruktur für GABAerge Anästhetika andere Gehirnregionen bei Gabe der Substanzen für einen Teil der in der Literatur beschriebenen positiven Kombinationseffekte verantwortlich waren.

Zudem zeigten sich bei genauer Betrachtung deutliche Unterschiede hinsichtlich Fragestellung und Studiendesigns der vorliegenden Arbeit und der recherchierten Literatur.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zwar nur eine Konzentration von Adenosin bzw. von Midazolam. Dennoch waren die verwendeten Konzentrationen bekannt und lassen somit eine Vergleichbarkeit zu anderen Arbeiten zu. In den genannten Studien ist diese Vergleichbarkeit allerdings eingeschränkt, da keine Konzentrationsmessungen von Adenosin oder Midazolam im ZNS durchgeführt wurden. Daher können mögliche konzentrationsabhängige Phänomene nicht beurteilt werden. Bei Adenosin scheint die vorhandene Konzentration jedoch eine bedeutende Rolle zu spielen. Der A1-Rezeptor besitzt im Vergleich zu A2a-Rezeptoren eine deutlich erhöhte Affinität gegenüber Adenosin (26). Das bedeutet, dass erst bei höheren Konzentrationen vermehrt A2a-Rezeptoren aktiviert werden. Da die A1- und A2a-Rezeptoren teilweise gegensätzliche Wirkprofile besitzen (27), könnten verschiedene Adenosin-Effekte bei verschiedenen Adenosin-Konzentrationen beobachtet werden.

Der wichtigste Unterschied im Studiendesign von vorliegender Arbeit und Literatur war jedoch der Zeitpunkt der Adenosin-Applikation. In den genannten Studien wurde Adenosin gleichzeitig oder nach Anästhetika-Gabe appliziert; es fand keine Präinkubation statt. Grund hierfür war, dass sich diese Arbeiten zumeist der Frage widmeten, ob Adenosin eine geeignete therapeutische Adjuvant bei Narkose darstellen könnte (129) (127). Daher können diese Studien keine Aussage treffen, ob eine langanhaltende Vorbehandlung mit

Adenosin zu einer veränderten Midazolam-Wirksamkeit führt. Die Anzahl und Konsistenz der Ergebnisse in der Literatur, berechtigt jedoch die Annahme, dass die gleichzeitige Anwendung von Adenosin und Anästhetika (ohne vorherige Adenosin-Präinkubation) zu einem positiven Kombinationseffekt führt. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 19B dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit verminderte Adenosin die Wirksamkeit von Midazolam deutlich. Bei Anwesenheit von Adenosin verringerte sich der Effekt, den Midazolam auf die mittlere Feuerrate ausübte, auf ungefähr 33 % ausgehend von der Midazolam-Monoapplikation (g_{ψ} : $E_{mid} = 0,8055$; $E_{mid_ado} = 0,2671$; vgl. Abb. 19A). Im Vergleich der zu recherchierten Literatur wurden eine relativ lange Adenosin-Präinkubation über 40 Minuten und anschließende Ko-Applikation von Adenosin und Midazolam durchgeführt (vgl. Abb. 6). Der Grund für die lange Adenosin-Anwendung war, dass eine länger anhaltende erhöhte Adenosin-Konzentration nachgebildet werden sollte, wie sie bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen auftreten kann (u.a. Inflammation; (26) (85)). Da bei relativ langer Adenosin-Präinkubation kein positiver Kombinationseffekt von Adenosin und Midazolam vorhanden war (der aber in der Literatur bei gleichzeitiger Anwendung von Adenosin und Midazolam beschrieben wurde; Abb. 19), kann spekuliert werden, dass Adenosin akute und chronische Interaktionseffekte mit Midazolam aufweisen könnte. Einen Hinweis lieferten hierfür Rombo et al., die den Einfluss eines Adenosin-A1-Agonisten auf GABAerge Ströme des Hippokampus untersuchten. Hier führte die Aktivierung von A1-Rezeptoren erst nach 40 Minuten Einwaschzeit zu einer signifikanten Reduktion von GABAergen Strömen; im Immunoblot wurde zudem festgestellt, dass es zu einer verminderten Expression von GABA_A-Rezeptoren kam (9). Langanhaltende A1-Aktivierung konnte demnach die GABAerge Übertragung beeinflussen. Passend dazu konnte schon 1995 gezeigt werden, dass Adenosin über den A1-Rezeptor im Thalamus inhibitorische postsynaptischen Ströme (IPSC) verminderte (131). Ebenso vermuteten Centonze et al., dass Adenosin für Ischämie-induzierte Verringerung von IPSCs in striato-kortikalen Hirnschnitten verantwortlich war (132). Diese Arbeiten sind interessant, da der Einfluss von Adenosin auf das GABAerge System weit weniger bekannt ist, als der Adenosin-Effekt auf exzitatorische

Transmittersysteme (vgl. Kap. 1.4). Der Nachweis der Modulation des GABAergen Systems durch Adenosin ist jedoch bedeutsam, da Midazolam die Affinität von endogenem GABA gegenüber GABA_A-Rezeptoren verstärkt und dadurch zu verstärkter Inhibition führt (15). Die Midazolam-Wirkung ist also zwingend von der Anwesenheit von GABA und GABA_A-Rezeptoren abhängig. Die verminderte Expression von GABA_A-Rezeptoren durch langanhaltende A1-Aktivierung (9) könnte daher erklären, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit von Midazolam (E_{mid_ado}) herabgesetzt war und kein positiver Kombinationseffekt von Adenosin und Midazolam beobachtet werden konnte (Abb. 19).

Ein davon abweichender Erklärungsansatz besteht in der verminderten exzitatorischen Übertragung durch Adenosin (26). Es ist bekannt, dass eine enge Verknüpfung zwischen erregenden und hemmenden Neuronen im Neokortex besteht (133) (134). Daher kann theoretisch eine verminderte exzitatorische Aktivität indirekt zu einer verminderten inhibitorischen Aktivität führen. Ein sehr vereinfachtes Beispiel wäre hierfür eine Gruppe von inhibitorischen Interneuronen, z.B. Basketzellen, deren Aktivität überwiegend von exzitatorischen, synaptischen Verbindungen mit Pyramidenzellen abhängig ist (135) (vergleiche Abb. 18). Fällt die exzitatorische synaptische Übertragung durch die Anwesenheit von Adenosin geringer aus, emittieren diese Interneuronen weniger Aktionspotenziale und schütten weniger GABA an den Synapsen ihrer Zielneuronen aus. Bei verminderter Ausschüttung von GABA würde daher die Midazolam-Wirkung an diesen Zielneuronen geringer ausfallen. Insgesamt ist mit extrazellulären Messungen jedoch nur schwer abzuschätzen, welche Effekte verminderte Exzitation (durch Adenosin) auf neuronale Inhibition im Kortex ausübt.

Zusammenfassend kann anhand der von mir durchgeführten Versuche nicht beurteilt werden, auf welche Weise Adenosin die Wirksamkeit von Midazolam einschränkte. Adenosin könnte sowohl durch verminderte Inhibition (herabgesetzte Ausschüttung von GABA, geringere Expression von GABA_A-Rezeptoren) oder verminderte Exzitation (geringere Ausschüttung von Glutamat

bei entsprechender kortikaler Verknüpfung) zu einer geringeren Wirksamkeit von Midazolam führen. Ein Zusammenspiel beider Komponenten (oder weiteren unbekanntem Mechanismen im somatosensorischen Kortex) erscheint durchaus möglich.

4.5 Klinische Implikation und Schlussfolgerung

In verschiedenen pathophysiologischen Zuständen liegen die Moleküle Adenosin und IL-1 β im ZNS in erhöhter Konzentration vor. Eine erhöhte Adenosin-Konzentration ist bei einer Vielzahl von klinisch wichtigen Krankheitsbildern beschrieben. Dazu gehören epileptisches Anfallsleiden, Hypoxie, Ischämie, Hypoglykämie (26) und Inflammation (85). Inflammation wird hauptsächlich durch Zytokine vermittelt. Ein zentrales Molekül ist IL-1 β , das pro-inflammatorisch wirksam ist und bei Inflammation im ZNS vermehrt zur Verfügung steht. (48). Von Adenosin und IL-1 β ist bekannt, dass sie die neuronale Aktivität im ZNS verändern (26) (8). Am ZNS entfalten ebenfalls Anästhetika ihre Wirkung. Es stellt sich daher klinisch die Frage, ob Patienten, die z.B. auf Intensivstation oder im OP Anästhetika erhalten und gleichzeitig hohe Adenosin- oder IL-1 β -Konzentration im ZNS besitzen, eine veränderte Sensitivität gegenüber Anästhetika aufweisen. Diese Frage ist deshalb relevant, weil eine veränderte Sensitivität gegenüber Anästhetika in einer veränderten Narkosetiefe resultieren kann. Seit längerem ist bekannt, dass eine zu geringe Narkosetiefe das Risiko von Awareness steigert (75). Neuere Untersuchungen zeigen zudem mögliche negative Effekte einer tiefen bzw. langanhaltenden Narkose auf das Outcome von Patienten (75) (67) (78) (vgl. Kapitel 1.7).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob Adenosin bzw. IL-1 β Interaktionseffekte mit Midazolam aufwies (wodurch eine veränderte Narkosetiefe beim Einsatz von Midazolam resultieren könnte).

Für Interleukin-1 β zeigte sich keine sichere Interaktion mit Midazolam. Tendenziell schien IL-1 β jedoch die Wirkung von Midazolam zu verstärken (Abb. 16A). Diese Beobachtung unterstützen verschiedene in-vivo und in-vitro-

Untersuchungen. Inflammation führte im Tiermodell zu erhöhter Sensitivität gegenüber volatilen und intravenösen Anästhetika (80) (81) (82) (83). Avramescu et al. legten nahe, dass dieser Effekt durch IL-1 β hervorgerufen wurde (8). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der klinische Bedarf an Anästhetika, die das GABAerge System modulieren, bei Inflammation bzw. erhöhter Konzentration von IL-1 β vermindert ist.

Die Summe der Effekte bei Kombination von Adenosin und (vermindert wirksamem) Midazolam waren nicht zu unterscheiden von den Effekten bei Monoapplikation von Midazolam (Abb. 19A). Die Schlussfolgerung, dass der Midazolam-Bedarf daher allgemein bei erhöhten Adenosin-Konzentrationen unbeeinflusst ist, scheint aufgrund fehlender Untersuchungen mit anderen Konzentrationen von Midazolam und Adenosin nicht zulässig (vgl. Kap 4.4). Dennoch zeigt diese Beobachtung, dass bei bestimmten Konzentrations-Kombinationen von Adenosin und Midazolam kein veränderter Midazolam-Bedarf bestehen könnte. Die Literatur belegt einen positiven Kombinationseffekt bei gleichzeitiger Anwendung von Midazolam und Adenosin (128) (129). Die vorliegende Arbeit zeigte hingegen, dass eine langanhaltende Vorbehandlung mit Adenosin zu einer deutlich herabgesetzten Wirksamkeit von Midazolam führte; zudem lag hier kein positiver Kombinationseffekt von Adenosin und Midazolam vor (vgl. Abb. 19). Langanhaltend erhöhte Adenosin-Konzentrationen bei pathophysiologischen Veränderungen könnten daher klinisch mit einem gesteigerten Midazolam-Bedarf einhergehen.

Zusammengefasst zeigen die vorliegende Arbeit und die recherchierte Literatur, dass pathophysiologische Zustände zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Anästhetika führen können. Bei Inflammation überwiegt dabei scheinbar der Effekt von IL-1 β , der zu einer gesteigerten Sensitivität des ZNS gegenüber Anästhetika führt (8) (80) (81) (82) (83) . Bei anderen pathophysiologischen Vorgängen wie z.B. Hypoxie, Hypoglykämie oder Anfallsleiden könnte hingegen die erhöhte Adenosin-Konzentration (26) in einer geringeren Wirksamkeit von Anästhetika resultieren. Die Betrachtung von nur zwei Substanzen (Adenosin und IL-1 β), die offenbar gegensätzliche Effekte auf die Wirksamkeit von

Anästhetika besitzen, macht deutlich, dass im klinischen Alltag nur schwer abzuschätzen ist, ob beim individuellen Patienten ein veränderter Bedarf an Anästhetika besteht. Umso wichtiger ist hingegen die Kenntnis darüber, dass die Wirksamkeit von Anästhetika in pathophysiologischen Situationen verändert sein kann, was in einer umsichtigen Applikation von Anästhetika resultieren sollte. Weitere klinische Studien hinsichtlich veränderter Anästhetika-Wirksamkeit bei bestimmten Krankheitsbildern scheinen daher sinnvoll. Zudem sollten geeignete Monitoring-Verfahren eingesetzt werden, um die Narkosetiefe bei Patienten abzuschätzen. Dadurch könnte bei veränderter Sensitivität des ZNS gegenüber Anästhetika deren Dosierung angepasst werden, um eine optimale Narkosetiefe zu gewährleisten.

5 Zusammenfassung

Das Benzodiazepin Midazolam ist ein wichtiges Medikament in der klinischen Praxis. Es wird unter anderem zu Sedierung, Narkoseinduktion oder Anxiolyse verwendet. Experimentell ist Midazolam im Tierversuch und in klinischen Studien gut untersucht. Zudem besteht eine langjährige klinische Erfahrung mit Midazolam und Benzodiazepinen im Allgemeinen. Allerdings ist weniger darüber bekannt, wie besondere klinische Situationen die Wirksamkeit von Midazolam beeinflussen. Inflammation und insbesondere Sepsis als systemische Maximalvariante stellen auch heutzutage kritische Situationen, mit immer noch hoher Mortalität, dar. In der Literatur sind Beschreibungen vorhanden, dass Inflammation die Sensitivität des ZNS gegenüber Anästhetika modulieren kann. Dieser Aspekt ist wichtig, da eine veränderte Sensitivität gegenüber Anästhetika in einer veränderten Narkosetiefe (die das Outcome von Patienten beeinflusst) resultieren kann. Bei Inflammation kommt es unter anderem zu erhöhten Konzentrationen von Adenosin und IL-1 β im ZNS. Daher wurden Hirnschnitte mit dem Zytokin Interleukin-1 β und Adenosin behandelt, um experimentell einen Aspekt von Inflammation nachzubilden, und deren Einfluss auf die Wirkung von Midazolam untersucht. Charakteristischerweise führte Midazolam zu einer Verringerung der neuronalen Aktivität im Mausekortex, was sich an einer Absenkung der mittleren Feuerraten und verminderter LFP-Steilheit zeigte. Bei Kombinations-Experimenten verminderte die langanhaltende Anwesenheit von Adenosin die Wirksamkeit von Midazolam. Dieser Befund ist interessant, da viele Studien zeigen, dass Adenosin hauptsächlich die Ausschüttung von exzitatorischen Transmittern verringert und zu Hyperpolarisation von Nervenzellen führt. Midazolam seinerseits besitzt ebenfalls inhibitorische Eigenschaften, da die Affinität von GABA_A-Rezeptoren gegenüber endogenem GABA gesteigert wird. Da Adenosin den Midazolam-Effekt abschwächte, wurde spekuliert, dass langanhaltende erhöhte Anwesenheit von Adenosin das GABAerge System veränderte. Andere Studien unterstützen diese Hypothese, indem sie zeigten, dass Adenosin nicht nur die Ausschüttung von exzitatorischen

Transmittern, sondern auch von GABA vermindern kann. Zudem wurde beschrieben, dass Adenosin die Ausstattung mit GABA_A-Rezeptoren verringerte. Diese Veränderungen des GABAergen Systems durch Adenosin könnten die beobachtete Abschwächung des Midazolam-Effekts erklären. Diese Beobachtungen erlauben die Annahme, dass Patienten mit erhöhten Adenosin-Konzentrationen im ZNS zum Teil einen erhöhten Midazolam-Bedarf aufweisen. Interleukin-1 β führte in der verwendeten Konzentration zu keinen deutlichen Veränderungen der neuronalen Aktivität. Es zeigte sich zwar ein Trend, der eine erhöhte Sensitivität der untersuchten Neuronen gegenüber Midazolam bei Vorbehandlung mit IL-1 β nahelegt. Dieser muss jedoch in weiteren Untersuchungen bestätigt oder widerlegt werden.

6 Quellenverzeichnis

1. Looking Back on the Millennium in Medicine. *New England Journal of Medicine*. 2000 Jan 6;342(1):42–9.
2. Mapleson WW. Effect of age on MAC in humans: a meta-analysis. *Br J Anaesth*. 1996 Feb 1;76(2):179–85.
3. Schopper M, Bäuml PI, Fleckenstein J, Irnich D. Gender-Aspekte in der Anästhesie. *Anaesthesist*. 2012 Apr 1;61(4):288–98.
4. Kuczkowski KM. Anesthetic implications of drug abuse in pregnancy. *Journal of Clinical Anesthesia*. 2003 Aug 1;15(5):382–94.
5. Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2004 Sep 1;18(5):407–13.
6. Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov DM, Spyer KM, Gourine VN. Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol*. 2007 Nov 15;585(Pt 1):305–16.
7. Mina F, Comim CM, Domingui D, Cassol-Jr OJ, Dall' Igna DM, Ferreira GK, et al. IL-1 β Involvement in Cognitive Impairment after Sepsis. *Mol Neurobiol*. 2013 Nov 15;49(2):1069–76.
8. Avramescu S, Wang D-S, Lecker I, To WT, Penna A, Whissell PD, et al. Inflammation Increases Neuronal Sensitivity to General Anesthetics. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2016;124(2):417–427.
9. Rombo DM, Dias RB, Duarte ST, Ribeiro JA, Lamsa KP, Sebastião AM. Adenosine A1 Receptor Suppresses Tonic GABAA Receptor Currents in Hippocampal Pyramidal Cells and in a Defined Subpopulation of Interneurons. *Cereb Cortex*. 2016 Jan 3;26(3):1081–95.
10. Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Sep;5(9):709–20.
11. Gerecke M. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *Br J Clin Pharmacol*. 1983;16 Suppl 1:11S–16S.
12. Reves JG, Fragen RJ, Vinik HR, Greenblatt DJ. Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology*. 1985 März;62(3):310–24.
13. Olkkola KT, Ahonen J. Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(182):335–60.

14. Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*. 2009 Jan;56(1):141–8.
15. Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A New Benzodiazepine Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jan 1;300(1):2–8.
16. Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy J-M, et al. Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acidA receptor subtypes. *Nature*. 1999 Okt;401(6755):796–800.
17. Ernst M, Brauchart D, Boresch S, Sieghart W. Comparative modeling of GABAA receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience*. 2003 Jul 16;119(4):933–43.
18. Rogers CJ, Twyman RE, Macdonald RL. Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol*. 1994 Feb 15;475(1):69–82.
19. Sigel E, Buhr A. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1997 Nov 1;18(11):425–9.
20. Balk M. GABAA-Rezeptoren vermitteln unterschiedliche Wirkungen von Midazolam und dessen Hauptmetaboliten 1 OH Midazolam in organotypischen Gewebekulturen des Neokortex. Medizinische Dissertationsschrift Universität Tübingen; 2015.
21. Walters RJ, Hadley SH, Morris KDW, Amin J. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci*. 2000 Dez;3(12):1274–81.
22. Drexler B, Zinser S, Hentschke H, Antkowiak B. Diazepam decreases action potential firing of neocortical neurons via two distinct mechanisms. *Anesth Analg*. 2010 Dez;111(6):1394–9.
23. Olkkola K T. Midazolam and other benzodiazepines. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008;(182):335–60.
24. Sengbusch P von. (1985), Einführung in die Allgemeine Biologie. Seite 126-127. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
25. Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjørkum AA, Greene RW, McCarley RW. Adenosine: A Mediator of the Sleep-Inducing Effects of Prolonged Wakefulness. *Science*. 1997 Mai 23;276(5316):1265–8.
26. Dunwiddie TV, Masino SA. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*. 2001;24(1):31–55.

27. Fredholm BB, Chen J-F, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois J-M. Adenosine and brain function. *International review of neurobiology*. 2005;63:191–270.
28. Lovatt D, Xu Q, Liu W, Takano T, Smith NA, Schnermann J, et al. Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 17;109(16):6265–70.
29. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry*. 2001 Nov 1;79(3):463–84.
30. Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul J-Y, et al. Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science*. 2005 Jul 10;310(5745):113–6.
31. Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. Adenine Nucleotides Undergo Rapid, Quantitative Conversion to Adenosine in the Extracellular Space in Rat Hippocampus. *J Neurosci*. 1997 Okt 15;17(20):7673–82.
32. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013 Jun;19(6):355–67.
33. Brundage JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. The Role of Cyclic AMP as a Precursor of Extracellular Adenosine in the Rat Hippocampus. *Neuropharmacology*. 1997 Sep;36(9):1201–10.
34. Klyuch BP, Richardson MJE, Dale N, Wall MJ. The dynamics of single spike-evoked adenosine release in the cerebellum. *J Physiol*. 2011 Jan 15;589(Pt 2):283–95.
35. Burnstock G, Verkhratsky A. (2012), *Purinergic Signalling and the Nervous System*, Seiten 466-469, Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
36. Wall MJ, Richardson MJE. Localized adenosine signaling provides fine-tuned negative feedback over a wide dynamic range of neocortical network activities. *Journal of Neurophysiology*. 2015 Feb 1;113(3):871–82.
37. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994 Jan 6;46(2):143–56.
38. Sperlagh B, Vizi ES. The Role of Extracellular Adenosine in Chemical Neurotransmission in the Hippocampus and Basal Ganglia: Pharmacological and Clinical Aspects. *Curr Top Med Chem*. 2011 Apr;11(8):1034–46.

39. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*. 2001 Feb;38(2):107–25.
40. Dixon AK, Gubitzi AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol*. 1996 Jul;118(6):1461–8.
41. Fiebich BL, Akter S, Akundi RS. The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:260.
42. Luk WP, Zhang Y, White TD, Lue FA, Wu C, Jiang C-G, et al. Adenosine: a Mediator of Interleukin-1 β -Induced Hippocampal Synaptic Inhibition. *J Neurosci*. 1999 Jan 6;19(11):4238–44.
43. Wang YS, White TD. The Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide Causes Rapid Inappropriate Excitation in Rat Cortex. *Journal of Neurochemistry*. 1999 Feb 1;72(2):652–60.
44. Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, Guieu R. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2000 Sep;28(9):3198–202.
45. Morote-Garcia JC, Köhler D, Roth JM, Mirakaj V, Eldh T, Eltzschig HK, et al. Repression of the Equilibrative Nucleoside Transporters Dampens Inflammatory Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Aug 1;49(2):296–305.
46. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720–32.
47. Cantarini L, Lopalco G, Cattalini M, Vitale A, Galeazzi M, Rigante D. Interleukin-1: Ariadne's Thread in Autoinflammatory and Autoimmune Disorders. *Isr Med Assoc J*. 2015 Feb;17(2):93–7.
48. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095–147.
49. Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. "Inflammatory" Cytokines. *Journal of Neurochemistry*. 2000 Feb 1;74(2):457–71.
50. O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological Reviews*. 2008 Dez;226(1):10–8.
51. Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*. 1989 Dez 1;170(6):1859–67.

52. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*. 2005 Feb 5;201(9):1355–9.
53. McCusker RH, Kelley KW. Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. *Journal of Experimental Biology*. 2013 Jan 1;216(1):84–98.
54. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 1991 Apr 15;77(8):1627–52.
55. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):629–40.
56. Zhou C, Ye H-H, Wang S-Q, Chai Z. Interleukin-1 β regulation of N-type Ca²⁺ channels in cortical neurons. *Neuroscience Letters*. 2006 Jul;403(1–2):181–5.
57. Zhou C, Qi C, Zhao J, Wang F, Zhang W, Li C, et al. Interleukin-1 β Inhibits Voltage-Gated Sodium Currents in a Time- and Dose-Dependent Manner in Cortical Neurons. *Neurochem Res*. 2011 März 30;36(6):1116–23.
58. Murray CA, McGahon B, McBennett S, Lynch MA. Interleukin-1 β Inhibits Glutamate Release in Hippocampus of Young, But Not Aged, Rats. *Neurobiology of Aging*. 1997 Mai;18(3):343–8.
59. Zeise ML, Madamba S, Siggins GR. Interleukin-1 beta increases synaptic inhibition in rat hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Regul Pept*. 1992 Apr 29;39(1):1–7.
60. Robinson DH, Toledo AH. Historical Development of Modern Anesthesia. *Journal of Investigative Surgery*. 2012 Mai 22;25(3):141–9.
61. Schneider G. „Narkosetiefe “–Grenzen und Möglichkeiten. 2015 [zitiert am 20.6.2017]; Verfügbar unter: <http://www.ai-online.info/abstracts/pdf/dacAbstracts/2015/2015-06-RC103.2.pdf>
62. Rani DD, Harsoor S. Depth of general anaesthesia monitors. *Indian J Anaesth*. 2012;56(5):437–41.
63. Shafer SL, Stanski DR. Defining depth of anesthesia. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(182):409–23.
64. Kempe L. Anästhesie-Trends: Bessere Vorhersagen der Narkosetiefe. 2012 [zitiert am 20.7.2017]. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/132197/Anaesthesie-Trends-Bessere-Vorhersagen-der-Narkosetiefe>
65. Liu J, Singh H, White PF. Electroencephalographic bispectral index correlates with intraoperative recall and depth of propofol-induced sedation. *Anesthesia & Analgesia*. 1997;84(1):185–189.

66. Punjasawadwong Y, Boonjeungmonkol N, Phongchiewboon A. Bispectral index for improving anaesthetic delivery and postoperative recovery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Okt 17;(4):CD003843.
67. Monk TG, Saini V, Weldon BC, Sigl JC. Anesthetic Management and One-Year Mortality After Noncardiac Surgery: *Anesthesia & Analgesia.* 2005 Jan;100(1):4–10.
68. Lindholm M, Träff S, Granath F, Greenwald SD, Ekbom A, Lennmarken C, et al. Mortality Within 2 Years After Surgery in Relation to Low Intraoperative Bispectral Index Values and Preexisting Malignant Disease. *Anesthesia & Analgesia.* 2009 Feb 1;108(2):508–12.
69. Kertai MD, Pal N, Palanca BJA, Lin N, Searleman SA, Zhang L, et al. Association of perioperative risk factors and cumulative duration of low bispectral index with intermediate-term mortality after cardiac surgery in the B-Unaware Trial. *Anesthesiology.* 2010 Mai;112(5):1116–27.
70. Leslie K, Myles PS, Forbes A, Chan MTV. The effect of bispectral index monitoring on long-term survival in the B-aware trial. *Anesth Analg.* 2010 März 1;110(3):816–22.
71. Kertai MD, Palanca BJA, Pal N, Burnside BA, Zhang L, Sadiq F, et al. Bispectral index monitoring, duration of bispectral index below 45, patient risk factors, and intermediate-term mortality after noncardiac surgery in the B-Unaware Trial. *Anesthesiology.* 2011 März;114(3):545–56.
72. Sessler DI, Sigl JC, Kelley SD, Chamoun NG, Manberg PJ, Saager L, et al. Hospital Stay and Mortality Are Increased in Patients Having a “Triple Low” of Low Blood Pressure, Low Bispectral Index, and Low Minimum Alveolar Concentration of Volatile Anesthesia. *Anesthes.* 2012 Jun 1;116(6):1195–203.
73. Kertai MD, White WD, Gan TJ. Cumulative duration of “triple low” state of low blood pressure, low bispectral index, and low minimum alveolar concentration of volatile anesthesia is not associated with increased mortality. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists.* 2014;121(1):18–28.
74. Willingham MD, Karren E, Shanks AM, O’Connor MF, Jacobsohn E, Kheterpal S, et al. Concurrence of intraoperative hypotension, low minimum alveolar concentration, and low bispectral index is associated with postoperative death. *Anesthesiology.* 2015 Okt;123(4):775–85.
75. Drexler B, Grasshoff C. [Is deep anesthesia dangerous?]. *Anaesthesist.* 2012 Aug;61(8):678–81, 684–5.

76. Kress JP, Pohlman AS, O'Connor MF, Hall JB. Daily Interruption of Sedative Infusions in Critically Ill Patients Undergoing Mechanical Ventilation. *New England Journal of Medicine*. 2000 Mai 18;342(20):1471–7.
77. Girard TD, Kress JP, Fuchs BD, Thomason JW, Schweickert WD, Pun BT, et al. Efficacy and safety of a paired sedation and ventilator weaning protocol for mechanically ventilated patients in intensive care (Awakening and Breathing Controlled trial): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2008 Jan 12;371(9607):126–34.
78. Watson PL, Shintani AK, Tyson R, Pandharipande PP, Pun BT, Ely EW. Presence of electroencephalogram burst suppression in sedated, critically ill patients is associated with increased mortality. *Crit Care Med*. 2008 Dez;36(12):3171–7.
79. Gambús PL, Trocóniz IF. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling in anaesthesia. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Jan;79(1):72–84.
80. Bollen PJA, Nielsen BJ, Toft P. Influence of Endotoxin-Induced Sepsis on the Requirements of Propofol-Fentanyl Infusion Rate in Pigs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2007 Sep 1;101(3):192–6.
81. Allaouchiche B, Duflo F, Tournadre J-P, Debon R, Chassard D. Influence of sepsis on sevoflurane minimum alveolar concentration in a porcine model. *Br J Anaesth*. 2001 Jun 1;86(6):832–6.
82. Gill R, Martin C, McKinnon T, Lam C, Cunningham D, Sibbald WJ. Sepsis reduces isoflurane MAC in a normotensive animal model of sepsis. *Can J Anaesth*. 1995 Jul 1;42(7):631–5.
83. Kurita T, Takata K, Morita K, Uraoka M, Sato S. The Influence of Endotoxemia on the Electroencephalographic and Antinociceptive Effects of Isoflurane in a Swine Model: *Anesthesia & Analgesia*. 2010 Jan;110(1):83–8.
84. Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Motta C, Studer V, Mori F, et al. Interleukin-1 β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2012 Jan 1;71(1):76–83.
85. Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, Keir G, Belli A, et al. Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clinical Biochemistry*. 2009 Jul;42(10–11):1001–6.
86. Saransaari P, Oja SS. GABA Release Modified by Adenosine Receptors in Mouse Hippocampal Slices under Normal and Ischemic Conditions. *Neurochem Res*. 2005 Apr 1;30(4):467–73.
87. Khanna AK, Laudanski K. Septic shock and anesthesia: Much ado about nothing? *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2014;30(4):481–3.

88. Xu H, Jeong H-Y, Tremblay R, Rudy B. Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron*. 2013 Jan 9;77(1):155–67.
89. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*. 2000 Mai;23(5):209–16.
90. Flint AC, Connors BW. Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *Journal of Neurophysiology*. 1996 Feb 1;75(2):951–7.
91. Stepanyants A, Martinez LM, Ferecskó AS, Kisvárdy ZF. The fractions of short- and long-range connections in the visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 März 3;106(9):3555–60.
92. Hodgkins PS, Schwarcz R. Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate. *Eur J Neurosci*. 1998 Jun;10(6):1986–94.
93. Hájos N, Mody I. Establishing a physiological environment for visualized in vitro brain slice recordings by increasing oxygen supply and modifying aCSF content. *J Neurosci Methods*. 2009 Okt 15;183(2):107–13.
94. Tani H, Dulla CG, Huguenard JR, Reimer RJ. Glutamine is required for persistent epileptiform activity in the disinhibited neocortical brain slice. *J Neurosci*. 2010 Jan 27;30(4):1288–300.
95. Paxinos G, Franklin K. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. Edition, Academic Press, San Diego.
96. Aerde KI van, Qi G, Feldmeyer D. Cell Type-Specific Effects of Adenosine on Cortical Neurons. *Cereb Cortex*. 2013 Okt 9;bht274.
97. Anbarasi M, Kamaleswari R, Ghaayathri S, Abirami I. Outlier detection for multidimensional medical data. *J Comp Sci Info Tech*. 2011;2.Jg.:512–6.
98. Mendenhall W, Beaver RJ, Beaver BM (2013). *Introduction to probability and statistics* 4. Edition, Seite 667, Brooks/Cole, Boston.
99. Lewis DG (1971). *The Analysis of Variance*. Seiten 1-13. Manchester University Press, Oxford.
100. Hentschke H, Stüttgen MC. Computation of measures of effect size for neuroscience data sets. *Eur J Neurosci*. 2011 Dez;34(12):1887–94.
101. Drexler B, Balk M, Rudolph U, Hentschke H, Antkowiak B. Midazolam und dessen Metabolit 1-OH-Midazolam verändern die kortikale Netzwerkaktivität bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen. *Anesthesiologie und Intensivmedizin*. 2011;52(7):468.

102. Narimatsu E, Aoki M. Involvement of the adenosine neuromodulatory system in the benzodiazepine-induced depression of excitatory synaptic transmissions in rat hippocampal neurons in vitro. *Neuroscience Research*. 1999 Jan;33(1):57–64.
103. Verbny YI, Merriam EB, Banks MI. Modulation of gamma-aminobutyric acid type A receptor-mediated spontaneous inhibitory postsynaptic currents in auditory cortex by midazolam and isoflurane. *Anesthesiology*. 2005 May;102(5):962–9.
104. Yamada J, Furukawa T, Ueno S, Yamamoto S, Fukuda A. Molecular Basis for the GABAA Receptor-Mediated Tonic Inhibition in Rat Somatosensory Cortex. *Cereb Cortex*. 2007 Aug 1;17(8):1782–7.
105. Nowak LG, Bullier J. Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter. I. Evidence from chronaxie measurements. *Exp Brain Res*. 1998 Feb;118(4):477–88.
106. Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, et al. Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):aac9462.
107. Silva LR, Amitai Y, Connors BW. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science*. 1991 Jan 25;251(4992):432–5.
108. Bremer F, Reulbach U, Schwilden H, Schüttler J. Midazolam therapeutic drug monitoring in intensive care sedation: a 5-year survey. *Ther Drug Monit*. 2004 Dez;26(6):643–9.
109. Bannon NM, Zhang P, Ilin V, Chistiakova M, Volgushev M. Modulation of synaptic transmission by adenosine in layer 2/3 of the rat visual cortex in vitro. *Neuroscience*. 2014 Feb 28;260:171–84.
110. Phillis JW, Kostopoulos GK, Limacher JJ. A potent depressant action of adenine derivatives on cerebral cortical neurones. *Eur J Pharmacol*. 1975 Jan;30(1):125–9.
111. Kostopoulos GK, Phillis JW. Purinergic depression of neurons in different areas of the rat brain. *Exp Neurol*. 1977 Jun;55(3 PT. 1):719–24.
112. Fredholm BB, Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends in Pharmacological Sciences*. 1988 Apr;9(4):130–4.
113. Ochiishi T, Chen L, Yukawa A, Saitoh Y, Sekino Y, Arai T, et al. Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: Immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *J Comp Neurol*. 1999 Aug 23;411(2):301–16.

114. Kerr MI, Wall MJ, Richardson MJE. Adenosine A1 receptor activation mediates the developmental shift at layer 5 pyramidal cell synapses and is a determinant of mature synaptic strength. *J Physiol*. 2013 Jul 1;591(Pt 13):3371–80.
115. Zhang P, Bannon NM, Ilin V, Volgushev M, Chistiakova M. Adenosine effects on inhibitory synaptic transmission and excitation-inhibition balance in the rat neocortex. *J Physiol (Lond)*. 2015 Feb 15;593(4):825–41.
116. Dunwiddie TV, Diao L. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Feb;268(2):537–45.
117. D’Arcangelo G, Dodt HU, Zieglgänsberger W. Reduction of excitation by interleukin-1 beta in rat neocortical slices visualized using infrared-darkfield videomicroscopy. *Neuroreport*. 1997 Mai 27;8(8):2079–83.
118. Brambilla D, Franciosi S, Opp MR, Imeri L. Interleukin-1 inhibits firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and enhances GABAergic inhibitory post-synaptic potentials. *European Journal of Neuroscience*. 2007 Oktober;26(7):1862–9.
119. Lai AY, Swayze RD, El-Husseini A, Song C. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *Journal of Neuroimmunology*. 2006 Jun;175(1–2):97–106.
120. Bellinger FP, Madamba S, Siggins GR. Interleukin 1 β inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Research*. 1993 Nov 19;628(1–2):227–34.
121. Wang S, Cheng Q, Malik S, Yang J. Interleukin-1 β Inhibits γ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptor Current in Cultured Hippocampal Neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Jan 2;292(2):497–504.
122. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oktober;2(10):734–44.
123. Lukáts B, Egyed R, Karádi Z. Single neuron activity changes to interleukin-1 β in the orbitofrontal cortex of the rat. *Brain Research*. 2005 März;1038(2):243–6.
124. Komatsubara T, Kadoi Y, Saito S. Augmented sensitivity to benzodiazepine in septic shock rats. *Can J Anaesth*. 1995 Okt 1;42(10):937–43.
125. Barraco RA, Phillis JW, DeLong RE. Behavioral interaction of adenosine and diazepam in mice. *Brain Research*. 1984 Dez;323(1):159–63.

126. Tanase D, Baghdoyan HA, Lydic R. Dialysis Delivery of an Adenosine A1Receptor Agonist to the Pontine Reticular Formation Decreases Acetylcholine Release and Increases Anesthesia Recovery Time. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2003;98(4):912–920.
127. Segerdahl M, Ekblom A, Sandelin K, Wickman M, Sollevi A. Peroperative adenosine infusion reduces the requirements for isoflurane and postoperative analgesics. *Anesthesia & Analgesia*. 1995;80(6):1145–1149.
128. Kaputlu İ, Şadan G, Özdem S. Exogenous adenosine potentiates hypnosis induced by intravenous anaesthetics. *Anaesthesia*. 1998 Mai;53(5):496–500.
129. Sakurai S, Fukunaga A, Ichinohe T, Kaneko Y. IV ATP Potentiates Midazolam Sedation as Assessed by Bispectral Index. *Anesth Prog*. 2014;61(3):95–8.
130. Alkire MT, Hudetz AG, Tononi G. Consciousness and anesthesia. *Science*. 2008 Nov 7;322(5903):876–80.
131. Ulrich D, Huguenard JR. Purinergic inhibition of GABA and glutamate release in the thalamus: Implications for thalamic network activity. *Neuron*. 1995 Okt 1;15(4):909–18.
132. Centonze D, Saulle E, Pisani A, Bernardi G, Calabresi P. Adenosine-mediated inhibition of striatal GABAergic synaptic transmission during in vitro ischaemia. *Brain*. 2001 Sep 1;124(9):1855–65.
133. Isaacson JS, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*. 2011 Okt 20;72(2):231–43.
134. Okun M, Lampl I. Instantaneous correlation of excitation and inhibition during ongoing and sensory-evoked activities. *Nat Neurosci*. 2008 Mai;11(5):535–7.
135. Yoshimura Y, Callaway EM. Fine-scale specificity of cortical networks depends on inhibitory cell type and connectivity. *Nat Neurosci*. 2005 Nov;8(11):1552–9.
136. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 Jun;3(3):e00149.
137. Geary N. Understanding synergy. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2013 Feb 1;304(3):E237–53.
138. Berthoud H-R. Synergy: A Concept in Search of a Definition. *Endocrinology*. 2013 Nov 1;154(11):3974–7.

139. Shafer SL. All models are wrong. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2012;116(2):240–241.
140. Lehár J, Zimmermann GR, Krueger AS, Molnar RA, Ledell JT, Heilbut AM, et al. Chemical combination effects predict connectivity in biological systems. *Mol Syst Biol*. 2007;3:80.
141. Hendrickx JFA, Eger EI, Sonner JM, Shafer SL. Is Synergy the Rule? A Review of Anesthetic Interactions Producing Hypnosis and Immobility: *Anesthesia & Analgesia*. 2008 Aug;107(2):494–506.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde an der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen unter Betreuung von Professor Grasshoff durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Grasshoff und Dr. Hentschke.

Die Herstellung der akuten Hirnschnitte und die Durchführung sämtlicher Experimente wurden von mir nach Einarbeitung durch Dr. Hentschke durchgeführt.

Die Datenanalyse erfolgte durch mich nach Einarbeitung von Dr. Hentschke. Die statistische Auswertung wurde unter Anleitung durch Dr. Hentschke mit dessen selbst programmierter MATLAB Software durchgeführt.

Abb. 18 wurde von Dr. Hentschke erstellt und durch mich entsprechend angepasst. Die übrigen Abbildungen wurden von mir angefertigt.

Das vorliegende Manuskript wurde von mir selbst verfasst und es wurden keine anderen Quellen, als die angegebenen, verwendet. Inhaltlich oder wörtlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Professor Grasshoff und Dr. Hentschke haben die Arbeit abschließend korrigiert.

Rutesheim, den 22.08.2017

Michael Eberhard Krumbein

8 Anhang

8.1 Mediane Abb. 13

Experimentserie:	II Midazolam	III Adenosin + Midazolam	IV IL-1 β + Midazolam
Stim.S1-Rec.S1	0.613	0.561	0.672
Stim.S1-Rec.S2	0.604	0.611	0.746
Stim.S2-Rec.S1	0.646	0.780	0.711
Stim.S2-Rec.2	0.681	0.633	0.644

8.2 Mediane Abb. 14

Experimentserie:	II Midazolam	III Adenosin + Midazolam	IV IL-1 β + Midazolam
Stim.S1-Rec.S1	0.593	0.715	0.641
Stim.S1-Rec.S2	0.606	0.774	0.595
Stim.S2-Rec.S1	0.585	0.911	0.555
Stim.S2-Rec.2	0.671	0.750	0.648

8.3 ANOVA Tabelle Abb. 15A (Omnibus Testung η^2 p)

Experimentserie I/SHAM	SS	dF	MS	F	p
Drogenbedingung	54.8806	2	27.4403	0.3171	0.7309
Ableitort	2.2564e+04	3	7.5213e+03	12.6144	5.1393e-06
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	438.2770	6	73.0462	2.4459	0.0315
	η^2 p	Unteres KI η^2 p	Oberes KI η^2 p	Verwendete Experimente	
Drogenbedingung	0.0221	0.0036	0.2571	15 von 18	
Ableitort	0.4740	0.3826	0.6324	*dF= Freiheitsgrade KI = Konfidenzintervall SS= Quadratsumme MS= mittlere Quadrats.	
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	0.1487	0.1143	0.3954		

Experimentserie II/Midazolam	<u>SS</u>	<u>dF</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>	<u>p</u>
Drogenbedingung	1.7491e+04	2	8.7455e+03	69.5686	4.2921e-13
Ableitort	3.2862e+04	3	1.0954e+04	13.2147	1.3877e-06
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	1.5724e+03	6	262.0750	3.7694	0.0019
	<u>η^2 p</u>	<u>Unteres</u> <u>KI η^2 p</u>	<u>Oberes</u> <u>KI η^2 p</u>	Verwendete Experimente	
Drogenbedingung	0.7944	0.7153	0.8794	19 von 22	
Ableitort	0.4233	0.3343	0.5895	*dF= Freiheitsgrade KI = Konfidenzintervall SS= Quadratsumme MS= mittlere Quadrats.	
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	0.1731	0.1330	0.3651		

Experimentserie III/Ado+Mld	<u>SS</u>	<u>dF</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>	<u>p</u>
Drogenbedingung	3.4993e+03	2	1.7497e+03	13.7715	1.0387e-04
Ableitort	1.1239e+04	3	3.7462e+03	10.1932	5.3236e-05
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	804.6682	6	134.1114	2.9033	0.0136
	<u>η^2 p</u>	<u>Unteres</u> <u>KI η^2 p</u>	<u>Oberes</u> <u>KI η^2 p</u>	Verwendete Experimente	
Drogenbedingung	0.5344	0.3481	0.7428	13 von 15	
Ableitort	0.4593	0.3378	0.6959	*dF= Freiheitsgrade KI = Konfidenzintervall SS= Quadratsumme MS= mittlere Quadrats.	
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	0.1948	0.1230	0.4426		

Experimentserie IV/IL+Mid	SS	dF	MS	F	p
Drogenbedingung	1.5623e+04	2	7.8115e+03	171.8113	3.7415e-14
Ableitort	2.2987e+04	3	7.6622e+03	7.1000	8.2614e-04
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	1.0404e+03	6	173.4002	2.5572	0.0275
	$\eta^2 p$	<u>Unteres</u> KI $\eta^2 p$	<u>Oberes</u> KI $\eta^2 p$	Verwendete Experimente	
Drogenbedingung	0.9398	0.9245	0.9647	12 von 13	
Ableitort	0.3923	0.2939	0.6507	*dF= Freiheitsgrade KI = Konfidenzintervall SS= Quadratsumme MS= mittlere Quadrats.	
Interaktion Drogenbedingung* Ableitort	0.1886	0.0809	0.4615		

8.4 g_{ψ} Kontrast Drogenbedingung 1 vs 2 Abb. 15B

Experimentserie	g_{ψ}	<u>Unteres</u> KI g_{ψ}	<u>Oberes</u> KI g_{ψ}	<u>Verwendete Experimente</u>
I SHAM	-0.0060	-0.1606	0.1518	15 von 18
II Midazolam	0.0288	-0.1227	0.1767	19 von 22
III Ado+Mid	0.5039	0.2706	0.8341	13 von 15
IV IL+Mid	-0.1001	-0.2258	0.0048	12 von 13

8.5 g_{ψ} Kontrast Drogenbedingung 1 vs 3 Abb. 15C

Experimentserie	g_{ψ}	<u>Unteres</u> KI g_{ψ}	<u>Oberes</u> KI g_{ψ}	<u>Verwendete Experimente</u>
I SHAM	-0.0475	-0.2103	0.0889	15 von 18
II Midazolam	0.8342	0.6982	1.0923	19 von 22
III Ado+Mid	0.7710	0.5472	1.0985	13 von 15
IV IL+Mid	1.0672	0.9573	1.4197	12 von 13

8.6 g_{ψ} Kontrast Drogenbedingung 2 vs 3 – mittlere Feuerrate Abb. 16A

<u>Experimentserie</u>	<u>g_{ψ}</u>	<u>Unteres KI g_{ψ}</u>	<u>Oberes KI g_{ψ}</u>	<u>Verwendete Experimente</u>
I SHAM	-0.0535	-0.1805	0.0675	15 von 18
II Midazolam	0.8055	0.6507	1.0799	19 von 22
III Ado+Mid	0.2671	0.0827	0.4710	13 von 15
IV IL+Mid	1.1673	1.0623	1.5482	12 von 13

8.7 g_{ψ} Kontrast Drogenbedingung 2 vs 3 – LFP-Steilheit Abb. 16B

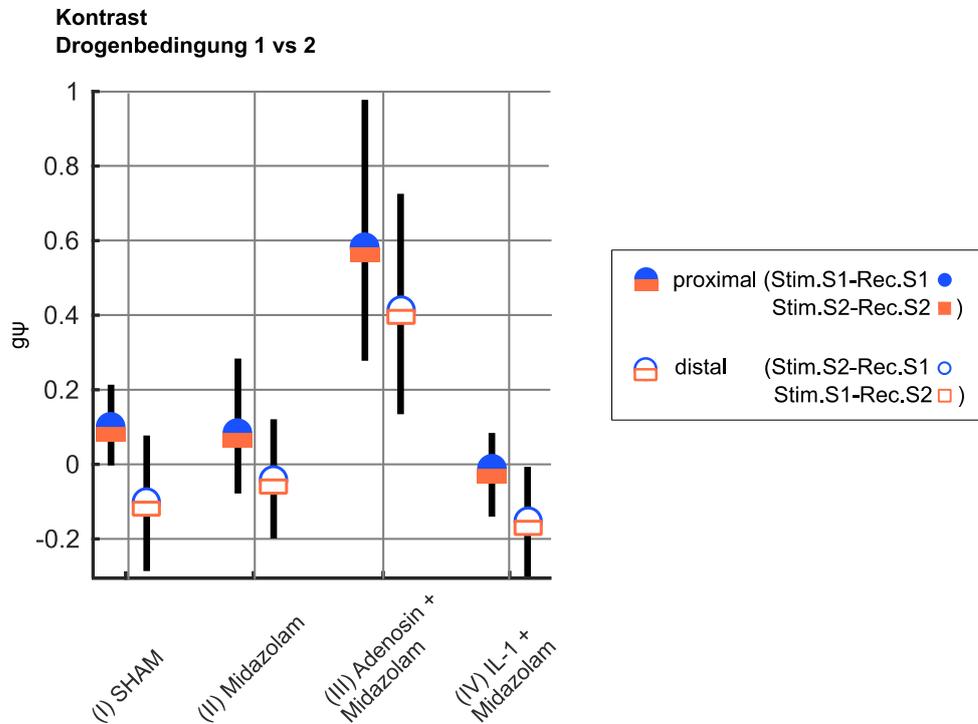
<u>Experimentserie</u>	<u>g_{ψ}</u>	<u>Unteres KI g_{ψ}</u>	<u>Oberes KI g_{ψ}</u>	<u>Verwendete Experimente</u>
I SHAM	-0.1073	-0.2422	-0.0335	14 von 18
II Midazolam	0.2547	0.1594	0.3734	18 von 22
III Ado+Mid	0.0256	-0.0800	0.1095	13 von 15
IV IL+Mid	0.2794	0.2073	0.4387	11 von 13

8.8 Midazolam führt an proximalen Messelektroden zu einer stärkeren Abnahme der mittleren Feuerrate - Abb. 17

<u>proximale Ableitungen</u>	<u>g_{ψ}</u>	<u>Unteres KI g_{ψ}</u>	<u>Oberes KI g_{ψ}</u>	<u>Verwendete Experimente</u>
I SHAM	-0.0599	-0.1886	0.0493	17 von 18
II Midazolam	0.9482	0.7663	1.2912	20 von 22
III Ado + Mid	0.4047	0.2275	0.6117	13 von 15
IV IL + Mid	1.6253	1.4196	2.2386	12 von 13

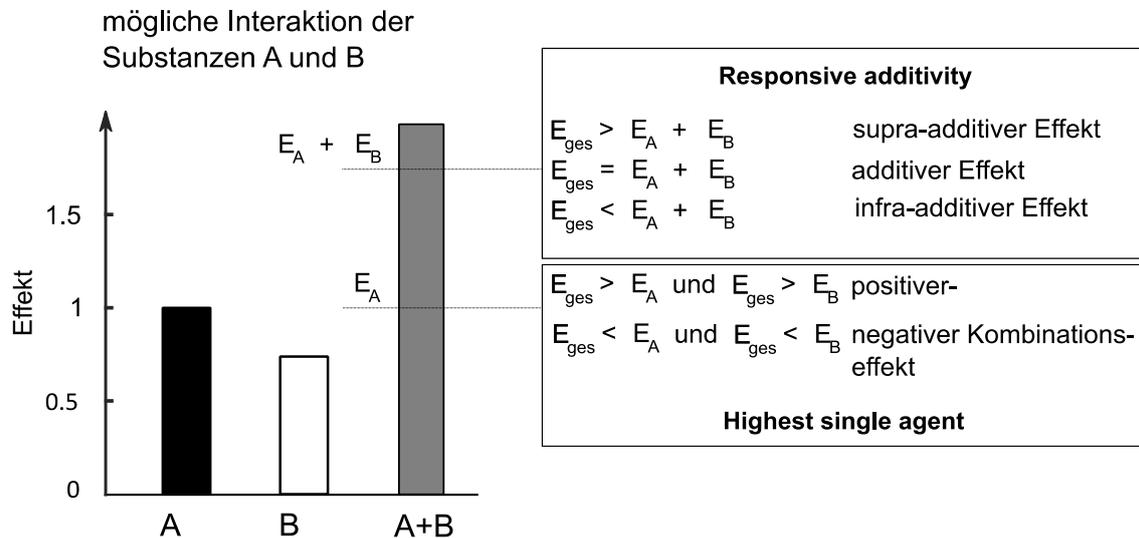
<u>distale Ableitungen</u>	<u>g_{ψ}</u>	<u>Unteres KI g_{ψ}</u>	<u>Oberes KI g_{ψ}</u>	<u>Verwendete Experimente</u>
I SHAM	-0.0635	-0.2712	0.1098	15 von 18
II Midazolam	0.6104	0.4581	0.8654	20 von 22
III Ado + Mid	0.0856	-0.2091	0.3590	13 von 15
IV IL + Mid	0.8695	0.7596	1.1711	13 von 13

8.9. Kontrast Drogenbedingung 1 vs 2. Aufteilung in proximale und distale Signale (Berechnung analog zu Abb. 17)



proximale Ableitungen	g_{ψ}	Unteres KI g_{ψ}	Oberes KI g_{ψ}	Verwendete Experimente
I SHAM	0.1010	0.0062	0.2279	17 von 18
II Midazolam	0.0819	-0.0848	0.2787	20 von 22
III Ado + Mid	0.5788	0.2794	0.9905	13 von 15
IV IL + Mid	-0.0144	-0.1385	0.0907	12 von 13
distale Ableitungen	g_{ψ}	Unteres KI g_{ψ}	Oberes KI g_{ψ}	Verwendete Experimente
I SHAM	-0.0947	-0.2849	0.0714	15 von 18
II Midazolam	-0.0410	-0.1892	0.1325	20 von 22
III Ado + Mid	0.4158	0.1461	0.7148	13 von 15
IV IL + Mid	-0.1509	-0.3105	0.0015	13 von 13

8.10 pharmakologische Interaktion; Begriffsdefinition



In der vorliegenden Arbeit wurden vornehmlich Begriffe des „highest single agent“-Ansatzes (HSA) zur Beschreibung von pharmakologischen Interaktionen verwendet. Hierbei wird untersucht, ob der Gesamteffekt (E_{Ges}) bei Kombination von 2 Substanzen größer ist, als der stärkste Einzeleffekt (im Beispiel (E_a)). Ist dies der Fall, spricht man von einem positiven Kombinationseffekt (136) (entspricht dem Terminus „kooperativer synergistischer Effekt“ (137)). Der Ansatz der „Responsive/Effect additivity“ ist ebenfalls zur Beschreibung von pharmakologischer Interaktion gebräuchlich und wurde daher zur Übersicht abgebildet; dieser Ansatz wird jedoch zunehmend kritisch betrachtet (138). Für weitere Informationen siehe (136) (137) (138) (139) (140) (141). Abbildung erstellt in Anlehnung an (136).