



Technische Universität München

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Gerhard Schneider)

Die Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf die Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone – Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik im vitalen Hirnschnittpräparat

Stefan Martin Schwerin

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Haseneder
2. Prof. Dr. Thomas Misgeld

Die Dissertation wurde am 18.02.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.09.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis:	IV
Tabellenverzeichnis:	V
Abkürzungsverzeichnis:	VI
1. Einleitung	1
1.1. Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran	1
1.1.1. Entwicklungsgeschichte.....	1
1.1.2. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften.....	2
1.1.3. Klinischer Einsatz als Anästhetikum.....	3
1.2. Die Wirkung von Anästhetika auf das thalamokortiale Netzwerk	5
1.2.1. Aufbau des Thalamus.....	5
1.2.2. Bedeutung des Thalamus.....	6
1.2.3. Anästhetika und das thalamokortiale Netzwerk.....	8
1.3. Molekulare Wirkmechanismen von Anästhetika	11
1.3.1. HCN-Kanäle.....	12
1.3.2. GABA _A -Rezeptoren.....	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Versuchstiere	20
2.2. Herstellung der Hirnschnittpräparate	20
2.3. Infrarot-Videomikroskopie	21
2.4. Elektrophysiologie	22
2.4.1. Versuchsaufbau.....	22
2.4.2. Ganzzelleableitung.....	23
2.4.3. Pipetten und Intrazellulärlösungen.....	24
2.4.4. Charakterisierung von TK-Schaltneuronen.....	25
2.4.5. HCN-Kanal.....	26
2.4.6. Strom-Spannungsbeziehung und Membraneigenschaften.....	28
2.4.7. GABA _A -R: Miniatur inhibitorische postsynaptische Ströme und tonische Inhibition.....	29
2.5. Applikation und Konzentrationsbestimmung von Sevofluran	31
2.6. Auswertung und Statistik	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Konzentrationsbestimmung von Sevofluran	34
3.2. Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit	35
3.3. Die Wirkung von Sevofluran auf HCN-Kanäle	43
3.3.1. Die Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag.....	43
3.3.2. Die Wirkung von Sevofluran auf den Rebound Delay.....	45
3.3.3. Die Wirkung von Sevofluran auf den Kationenstrom I _h	47
3.3.4. Die Wirkung von Sevofluran auf die Aktivierungszeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow}	50
3.3.5. Die Wirkung von Sevofluran auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung V _{1/2}	51
3.4. Die Wirkung von Sevofluran auf GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme	53
3.4.1. Die Wirkung von Sevofluran auf mIPSCs in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen.....	53
3.4.2. Die Wirkung von Sevofluran auf die tonische Inhibition in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen.....	57

4.	<i>Diskussion</i>	61
4.1.	Klinische Relevanz der Sevofluran-Konzentration.....	61
4.2.	Die Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit	63
4.3.	Die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal-vermittelten <i>Voltage Sag</i> und <i>Rebound Delay</i>	65
4.4.	Die Wirkung von Sevofluran auf die HCN-Kanal vermittelten I_h , $V_{1/2}$ und τ_{fast}	67
4.5.	Die Wirkung von Sevofluran auf die GABA _A -R-vermittelte Inhibition.....	72
4.5.1.	Phasische Inhibition.....	74
4.5.2.	Tonische Inhibition.....	75
5.	<i>Zusammenfassung</i>	82
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	84
	<i>Danksagung</i>	A

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Strukturformeln volatiler Anästhetika (Wilhelm 2018)	3
Abb. 2: Aktivitätsmuster im thalamokortikalen Netzwerk (Pape et al. 2005)	8
Abb. 3: Synaptische und extrasynaptische GABA_A-R (Bonin und Orser 2008)	15
Abb. 4: Infrarot-Videomikroskopie und Gradientenkontrastmethode (Dodt et al. 2002)	22
Abb. 5: Etablierung der Ganzzelleableitung bei einem TK-Schaltneuron	24
Abb. 6: Elektrophysiologische Charakterisierung von TK-Schaltneuronen	26
Abb. 7: Spannungsprotokoll: HCN-Kanal-vermittelter I_h	27
Abb. 8: Strom-Spannungsbeziehung (IV)	29
Abb. 9: Nicht-lineare Regressionsanalyse und Interpolation der Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq})	35
Abb. 10: Vergleich Kontrollgruppen und relative Veränderung RMP	36
Abb. 11: Einfluss von Sevofluran auf den Membranwiderstand (R_M)	37
Abb. 12: Einfluss von Sevofluran auf das Schwellenpotential	39
Abb. 13: Einfluss von Sevofluran auf die Aktionspotential-Frequenz	41
Abb. 14: IV-Kurve Sevofluran 690 µM	42
Abb. 15: Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag	44
Abb. 16: Wirkung von Sevofluran auf den Rebound Delay und Korrelation mit Voltage Sag	46
Abb. 17: Die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal-vermittelten Kationenstrom I_h	48
Abb. 18: Die Wirkung von Sevofluran auf τ_{fast} und τ_{slow}	50
Abb. 19: Die Wirkung von Sevofluran auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung (V_{1/2})	51
Abb. 20: Einfluss von Sevofluran auf die spannungsabhängige Aktivierung p(V) und das Potential der halbmaximalen Aktivierung (V_{1/2})	52
Abb. 21: Die Wirkung von Sevofluran auf mIPSCs in WT-TK-Schaltneuronen	54
Abb. 22: Wirkung von Sevofluran auf mIPSCs in α4^{-/-}-TK-Schaltneuronen	56
Abb. 23: Die Wirkung von Sevofluran auf die tonische Inhibition in WT-TK- Schaltneuronen	58
Abb. 24: Die Wirkung von Sevofluran auf die tonische Inhibition in α4^{-/-}-TK- Schaltneuronen	59
Abb. 25: Vergleich der tonischen Inhibition unter Kontrollbedingungen sowie nach Sevofluran-Applikation (690 µM) in WT- und α4^{-/-}-TK-Schaltneuronen	60

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Masse- und Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq}) von Sevofluran (Headspace-GC/MS)	34
Tabelle 2: Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq}) Sevofluran	35
Tabelle 3: Die Wirkung von Sevofluran auf das RMP (Absolutwerte)	36
Tabelle 4: Die Wirkung von Sevofluran auf das R_M (Absolutwerte)	38
Tabelle 5: Wirkung von Sevofluran auf das Schwellenpotential (Absolutwerte)	40
Tabelle 6: Die Wirkung von Sevofluran auf die Aktionspotential-Frequenz (Absolutwerte)	42
Tabelle 7: Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag (Absolutwerte)	45
Tabelle 8: Wirkung von Sevofluran auf den Rebound Delay (Absolutwerte)	47
Tabelle 9: Vergleich der mIPSC-Parameter in WT- und $\alpha 4^{-/-}$-TK-Schaltneuronen unter Kontrollbedingungen	57

Abkürzungsverzeichnis:

95%-KI	95 % Konfidenzintervall
AC	Adenylylcyclase
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
AP	Aktionspotential
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
c_{aq}	aqueous concentration
EC ₅₀	half maximal effective concentration
EEG	Elektroenzephalographie
EPSC	excitatory postsynaptic current
EPSP	excitatory postsynaptic potential
GABA	gamma-aminobutyric acid
GABA _A -R	gamma-aminobutyric acid Typ A Rezeptor
GC	gradient contrast
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GD	Gyrus dentatus
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IPSC	inhibitory postsynaptic current
IR	Infrarot
IZ	Intrazellulärlösung
K _{2P}	Kalium-Tandemporen-Kanal
MAC	minimal alveolar concentration
mIPSC	miniature inhibitory postsynaptic current
Na _v	spannungsaktivierter Natrium-Kanal
Ncl.	Nucleus
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NRT	Ncl. reticularis thalami
POCD	postoperative cognitive dysfunction
R _M	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
SEM	standard error of the mean

sIPSC	spontaneous inhibitory postsynaptic current
TK	thalamokortikal
TTX	Tetrodotoxin
UV	ultraviolett
$V_{1/2}$	Potenzial der halbmaximalen Aktivierung
VB	ventrobasal
VPL	Ncl. ventralis posterolateralis
VPM	Ncl. ventralis posteromedialis
VSDI	voltage-sensitive dye imaging
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Seitdem es William Thomas Green Morton am 16. Oktober 1846 zum ersten Mal gelang, unter den Augen der Öffentlichkeit im Massachusetts General Hospital die Wirksamkeit einer Äthernarkose zu demonstrieren (Kopp Lugli, Yost und Kindler 2009), hat die Anästhesie den klinischen Alltag revolutioniert und ist zu einem unverzichtbaren Bestandteil moderner Medizin geworden. Wiederholt wurde die Entwicklung der Anästhesie zu den bedeutendsten Meilensteinen der Medizingeschichte überhaupt gezählt, vergleichbar etwa mit Errungenschaften in den Bereichen Genetik, Immunologie oder Bildgebungsverfahren (Angell 2000; Snow 2007). Doch wie führen Anästhetika zum Bewusstseinsverlust? Trotz ihrer weit verbreiteten Anwendung und intensiver Forschungsanstrengungen sind viele Fragen bezüglich der Wirkmechanismen von Anästhetika noch nicht zufriedenstellend beantwortet (Hemmings et al. 2019). Einige grundlegende Prinzipien der Wirkmechanismen von Anästhetika sind zwischenzeitlich allgemein anerkannt. So entfalten Anästhetika ihre Wirkung auf molekularer Ebene durch Interaktionen mit spezifischen Proteinen, wie etwa Ionenkanäle oder Rezeptoren (Rudolph und Antkowiak 2004; Franks 2008). Die einzelnen Anästhetika unterscheiden sich dabei zum Teil deutlich bezüglich der von ihnen beeinflussten molekularen Zielstrukturen (Grasshoff et al. 2006). Eine zentrale Rolle spielt außerdem die Identifizierung von neuronalen Korrelaten des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts (Alkire, Hudetz und Tononi 2008; Antkowiak und Grasshoff 2015; Palanca, Avidan und Mashour 2017). Um dabei ein besseres Verständnis von Netzwerk-Effekten zu erlangen, ist eine differenzierte, substanzspezifische Betrachtung anästhesiologischer Wirkmechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene notwendig (Hemmings et al. 2019). Ziel dieser Arbeit ist es, hierzu einen Beitrag zu leisten, indem der Einfluss von Sevofluran auf die Erregbarkeit von thalamokortikalen (TK)-Schaltneuronen untersucht wird.

1.1. Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran

1.1.1. Entwicklungsgeschichte

Grundlagenforschung zur Entwicklung sicherer inhalativer Anästhetika auf Basis von Chloroform begann in den 1930er-Jahren, in denen insbesondere die günstigen physikochemischen Eigenschaften von Verbindungen entdeckt wurden, die durch die Substitution mit dem Halogen Fluor entstehen (Booth 1932). Im Verlauf wurden über 700 fluoridierte Verbindungen mit anästhetischem Potenzial synthetisiert (Wilhelm 2018), dabei flossen auch Erkenntnisse aus dem Manhattan-Projekt zum Bau der Atombombe in die Entwicklung ein (Smith, Nathanson und White 1996). Nachdem Forschungsbemühungen mit der Entdeckung von Halothan durch Charles Suckling 1951 einen neuen Schub erhielten, wurde Sevofluran erstmals 1968 durch Bernard Regan synthetisiert, 1971 publiziert sowie im

weiteren Verlauf pharmakologisch und toxikologisch charakterisiert (Wallin et al. 1975). Obwohl in einer ersten klinischen Phase-1-Studie mit Freiwilligen ein überaus positives Fazit gezogen wurde (Holaday und Smith 1981), gestaltete sich die Entwicklung insgesamt als schwierig und konkurrierenden Anästhetika (z. B. Halothan, Isofluran) wurde lange der Vorzug gegeben. So zeigten sich anfangs in tierexperimentellen Studien toxische Effekte, diese sind aber nach heutiger Auffassung auf ein mangelhaftes Studiendesign zurückzuführen (Smith, Nathanson und White 1996; De Hert und Moerman 2015). Des Weiteren wurden die relativ hohe Biotransformations-Rate sowie chemische Reaktionen mit Natrium- und Barium-haltigen Atemkalk als kritisch bewertet (Brown und Frink 1992). Nach Erwerb der Rechte brachte schließlich das japanische Unternehmen *Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd.* Sevofluran zur Marktreife (Smith, Nathanson und White 1996). Die klinische Einführung erfolgte im Jahr 1990 in Japan (Rossaint, Werner und Zwißler 2019). Gegenwärtig zählt Sevofluran neben Desfluran zu den klinisch am häufigsten verwendeten Inhalationsanästhetika (Wilhelm 2018).

1.1.2. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften

Als dampfförmiges Inhalationsanästhetikum zählt Sevofluran (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-(fluoromethoxy)propan) neben Desfluran, Enfluran, Halothan und Isofluran zu den sog. volatilen Anästhetika. Diese Substanzen lassen sich unter der chemischen Gruppe der halogenierten Kohlenwasserstoffe subsumieren, im Falle von Sevofluran handelt es sich um einen ausschließlich mit Fluor halogenierten Methylpropyläther (Rossaint, Werner und Zwißler 2019). Sevofluran ist farblos, nicht entzündlich und besitzt einen Dampfdruck von 157 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) bei 20 Grad Celsius (°C) sowie einen Siedepunkt von 58,5 °C bei 760 mmHg (Wilhelm 2018). Sevofluran liegt somit bei Raumtemperatur in flüssiger Form vor, weshalb es für die klinische Anwendung mittels spezieller Verdampfvorrichtungen in den dampfförmigen Zustand überführt werden muss (Patel und Goa 1996).

Der sog. *minimal alveolar concentration* (MAC)-Wert dient als Maß zur Quantifizierung der anästhetischen Potenz verschiedener Inhalationsanästhetika. Er korreliert invers mit der Wirkungsstärke und wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst (Rossaint, Werner und Zwißler 2019). Der MAC₅₀-Wert¹ beträgt im Fall von Sevofluran für ein Patientenkollektiv von Menschen mittleren Alters in Sauerstoff 2,05 Vol.-% (im Folgenden als % bezeichnet) (Scheller, Saidman und Partridge 1988). Die Wirkungsstärke von Sevofluran ist im Vergleich höher als von Desfluran und niedriger als von Halothan und Isofluran (Wilhelm 2018).

¹ Definition MAC₅₀-Wert: „Der MAC₅₀-Wert ist die alveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, die bei 50 % der Patienten Abwehrbewegungen auf einen definierten Schmerzreiz (Hautinzision) unterdrückt.“ (Wilhelm 2018)

Aufgrund der alleinigen Halogenierung mit Fluor (siehe **Abbildung 1**) weist Sevofluran einen niedrigen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten (0,69 bei 37 °C) und somit eine verminderte Blutlöslichkeit auf (Strum und Eger 1987). Im Vergleich mit Isofluran, Enfluran und Halothan ermöglicht diese Eigenschaft eine schnellere Gleichgewichtseinstellung von Partialdrücken in unterschiedlichen Kompartimenten (Wilhelm 2018), was in einer schnelleren An- und Abflutungskinetik resultiert (Yasuda et al. 1991).

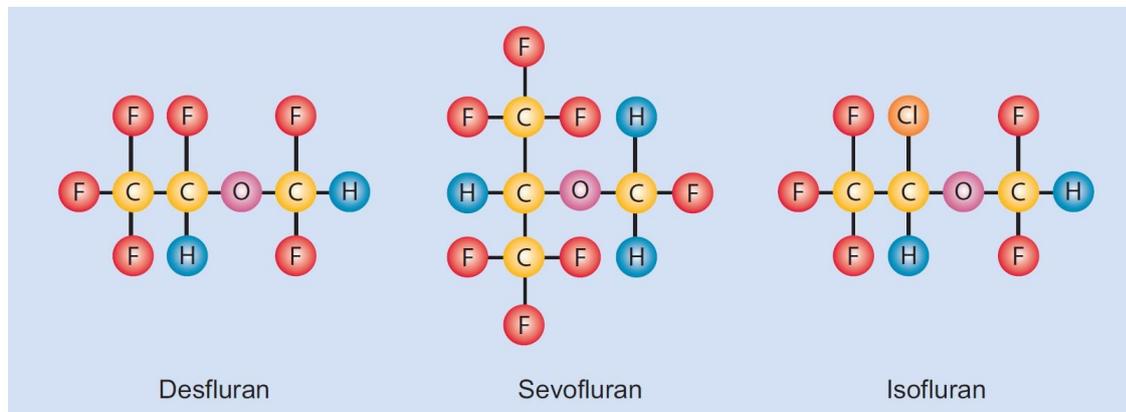


Abb. 1: Strukturformeln volatiler Anästhetika (Wilhelm 2018)

Im Gegensatz zu Isofluran, welches vor allem in den 1980er und 1990er Jahren klinische Verwendung fand, führt die ausschließliche Substitution der neueren volatilen Anästhetika Sevofluran und Desfluran mit dem Halogen Fluor zu einer Reduzierung der Blutlöslichkeit und damit zu einer genaueren Steuerbarkeit in der Narkoseführung. Text verändert nach Wilhelm (2018).

Nach Beendigung der Zufuhr wird Sevofluran überwiegend pulmonal eliminiert, die Biotransformationsrate beträgt 3–5 %. Die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich hepatisch via Cytochrom P₄₅₀ 2E1 zu anorganischem Fluorid und Hexafluoroisopropanol, wobei Letzteres nach Glucuronidierung zügig über die Nieren ausgeschieden wird (Kharasch 1995).

Kommt Sevofluran mit natrium-, kalium- oder bariumhaltigen Atemkalk von Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Absorbern in Kontakt, können verschiedene Abbauprodukte entstehen, u. a. das in tierexperimentellen Studien nephrotoxische Compound A (Gonsowski et al. 1994). Jedoch wird seit der Einführung von neuartigen Absorbern (Marini et al. 2007) der Einsatz von Sevofluran auch bei Niedrigflussnarkosen als bedenkenlos möglich beurteilt (Gentz und Malan 2001; De Hert und Moerman 2015; Wilhelm 2018).

1.1.3. Klinischer Einsatz als Anästhetikum

Seit seiner Einführung im Jahr 1990 konnte die Wirksamkeit und Sicherheit von Sevofluran in zahlreichen Studien für unterschiedliche Patientenkollektive nachgewiesen werden (Brioni et al. 2017).

Zu den typischen Nebenwirkungen, die im Rahmen einer großen Phase-III-Studie auftraten, zählen – in absteigender Reihenfolge der Häufigkeit ihres Auftretens – Übelkeit, Somnolenz, Erbrechen, Kältegefühl, Benommenheit und verstärkter Hustenreiz (Campbell et al. 1996). In älteren Patientenkollektiven kommt es nach Operationen und Narkosen gehäuft zu Delir und kognitiven Leistungseinschränkungen (sog. *postoperative cognitive dysfunction*, POCD), insbesondere bei großen chirurgischen Eingriffen (Mashour, Woodrum und Avidan 2015). Ob die Allgemeinanästhesie überhaupt einen unabhängigen Risikofaktor für POCD darstellt, ist aufgrund der aktuellen Datenlage fraglich (Guay 2011). Auch eine diesbezügliche Über- oder Unterlegenheit von einzelnen Anästhetika ist bisher nicht eindeutig geklärt und Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Studien (Tang et al. 2014; Geng, Wu und Zhang 2017; Miller et al. 2018). Ebenso umstritten ist die Frage, ob Sevofluran eventuell einen neurotoxischen Effekt bei Neugeborenen und sehr jungen pädiatrischen Patienten hat: entsprechende Ergebnisse tierexperimenteller Studien spiegeln sich bisher nicht in den veröffentlichten Daten großangelegter klinischer Studien wider (Sun et al. 2016; McCann et al. 2019).

Die Effekte von Sevofluran auf das menschliche Organsystem sind vielfältig und können im Folgenden nur cursorisch dargestellt werden. Dosisabhängig kommt es zu einer Atemdepression bis hin zur Apnoe ab Werten der 1,5–2-fachen MAC (De Hert und Moerman 2015). Zudem wirkt Sevofluran bronchodilatatorisch und antiinflammatorisch (Shen et al. 2015), sein Einsatz bei Patienten mit Asthma bronchiale wird nicht nur als sicher beurteilt, sondern stellt in schweren Fällen auch eine therapeutische Option dar (Schutte et al. 2013). Sevofluran wirkt dosisabhängig blutdrucksenkend durch eine Reduzierung des totalen peripheren Widerstandes (Brioni et al. 2017). Herzfrequenz (Nishiyama 2005) sowie Herzzeitvolumen (De Hert und Moerman 2015) werden in klinisch relevanten Dosierungen nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt. Ein potenziell kardioprotektiver Effekt von volatilen Anästhetika, u. a. auch Sevofluran, wird seit Längerem postuliert und ihr Einsatz in herzchirurgischen Eingriffen wird in amerikanischen Guidelines empfohlen (Hillis et al. 2012). Aufgrund zum Teil widersprüchlicher Studienergebnisse wird die Thematik aber nach wie vor kontrovers diskutiert (De Hert und Moerman 2015; Brioni et al. 2017). Hinsichtlich des zerebrovaskulären Systems wirkt Sevofluran vasodilatatorisch und scheint erst in höheren Dosierungen die zerebrale Autoregulation zu beeinträchtigen (Conti et al. 2006). Tierexperimentelle Untersuchungen weisen auf einen möglichen neuroprotektiven Effekt von Sevofluran hin, z. B. im Rahmen einer anästhesiologischen Präkonditionierung vor Induktion zerebraler Ischämien. Diese Ergebnisse konnten aber bisher nicht in klinischen Studien repliziert werden und haben daher keinen Einzug in die klinische Praxis gefunden (Kitano et al. 2007; Brioni et al. 2017).

Als vorteilhaft im klinischen Einsatz erweist sich der – im Vergleich zu anderen volatilen Anästhetika – angenehmere Geruch von Sevofluran und eine fehlende Reizung der Atemwege

(Rossaint, Werner und Zwißler 2019), weshalb Sevofluran auch zur Inhalationseinleitung verwendet werden kann und dabei eine mit Propofol vergleichbar Wirksamkeit erzielt (Joo und Perks 2000). Insbesondere in der Kinderheilkunde ist die Inhalationseinleitung sowie die inhalative Anästhesie mit Sevofluran das vorherrschende Narkoseverfahren und zeichnet sich neben der einfachen technische Handhabung durch ein vorteilhaftes hämodynamisches Profil und eine geringe Rate an Komplikationen aus (De Hert und Moerman 2015; Jahr 2016).

Auch der Einsatz von Sevofluran zur Narkose-Aufrechterhaltung sowie der Einfluss auf die Aufwachphase wurden in zahlreichen Studien untersucht (Brioni et al. 2017). Dabei zeigte sich zwar, dass Patienten unter Desfluran schneller erwachen und zügiger extubiert werden können, signifikante Unterschiede im weiteren postoperativen Verlauf konnten jedoch nicht festgestellt werden (Saros et al. 2006; White et al. 2009). Gelegentlich wird eine höhere Inzidenz von Agitation während der Aufwachphase nach Sevofluran-Narkosen bei Kindern beschrieben (Picard, Dumont und Pellegrini 2000). Diese Nebenwirkung scheint aber auf einer früheren Wahrnehmung postoperativer Schmerzen im Vergleich zu anderen Anästhetika zu beruhen und lässt sich durch eine adäquate analgetische Therapie positiv beeinflussen (Davis et al. 1999).

1.2. Die Wirkung von Anästhetika auf das thalamokortiale Netzwerk

Entscheidend für die Betrachtung der Frage, wie Anästhetika ihre Wirkung auf das Bewusstsein entfalten, ist die Identifizierung der durch sie beeinflussten neuronalen Strukturen und Regionen im zentralen Nervensystems (ZNS) (Palanca, Avidan und Mashour 2017). Hierbei wird dem Thalamus sowie dem TK-Netzwerk eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Hudetz 2012).

1.2.1. Aufbau des Thalamus

Der Thalamus ist eine bilaterale Kernstruktur des Dienzephalons, die aus einem dorsalen Thalamus und einem ventralen Thalamus besteht. Den Hauptbestandteil des Thalamus bildet der dorsale Thalamus, wohingegen der ventrale Thalamus insbesondere dem Nucleus reticularis thalami (NRT) entspricht (Herrero, Barcia und Navarro 2002). Im Falle des menschlichen Gehirns werden weiterhin bis zu 60 verschiedene thalamische Kerne sowie Unterkerne unterschieden, wobei eine Vielzahl an konkurrierenden und teilweise konfligierenden Klassifikationssystemen mit uneinheitlicher Nomenklatur existiert (Mai und Majtanik 2018).

Klassischerweise werden die Kerne des dorsalen Thalamus in spezifische und unspezifische Kerne eingeteilt. Spezifische Kerne projizieren topographisch organisiert auf Neurone der

Lamina IV bestimmter sensorischer Areale des Kortex und bilden die kleinste Gruppe. Weitaus häufiger finden sich unspezifische Kerne, die Verbindungen mit mehreren kortikalen Arealen aufweisen und diffus auf Neurone aller kortikaler Schichten (Lamina I bis Lamina VI, insbesondere Lamina V und VI) projizieren (Jones 2009). Da aber auch Kerne existieren, die aus unterschiedlichen Neuronenpopulationen mit sowohl spezifischen als auch unspezifischen kortikalen Projektionen zusammengesetzt sind, wird die Bedeutung dieser Unterscheidung zunehmend in Frage gestellt (Yuan et al. 2016). Eine Hauptpopulation von Neuronen aller Kerne des dorsalen Thalamus bilden die sog. exzitatorischen TK-Schaltneurone, denen eine zentrale Rolle im TK-Netzwerk zukommt (Pape et al. 2005; Jones 2009).

Der NRT legt sich schalenförmig als dünne Schicht um anteriore und laterale Anteile des dorsalen Thalamus. Als zytoarchitektonische Besonderheit finden sich hier – örtlich getrennt von den exzitatorischen TK-Schaltneuronen – die meisten inhibitorischen Interneurone des Thalamus (Buzsáki 2006). Die Interneurone des NRT erhalten exzitatorische Afferenzen aus Axonkollateralen von thalamokortikalen sowie kortikothalamischen Verbindungen, seine inhibitorischen Efferenzen projizieren auf Neurone aller Kerne des dorsalen Thalamus (Ferrarelli und Tononi 2011). Aus dieser speziellen bidirektionalen Konnektivität resultieren inhibitorische Feedback- und Feedforward-Schleifen, welche die Grundlage thalamischer Schaltkreise bilden (Jones 2009; Grant, Hoerder-Suabedissen und Molnar 2012). Auch hier offenbart eine genauere Betrachtung ein überaus hohes Maß an Komplexität: so scheint der NRT aus unterschiedlichen Teilnetzwerken zu bestehen, die eine differenzierte Inhibition auf spezifische thalamische Kerne in Abhängigkeit von Erregungs- und verhaltensbezogenen Zuständen des Gehirns ausüben (Halassa et al. 2014).

Im Rahmen dieses Promotionsprojekts sollen TK-Schaltneurone des Nucleus (Ncl.) ventralis posterior (VP), auch als ventrobasaler (VB)-Kernkomplex bezeichnet, untersucht werden. Der VP besteht aus dem Ncl. ventralis posterolateralis (VPL) und dem Ncl. ventralis posteromedialis (VPM). Beide Kerne projizieren auf primäre und sekundäre somatosensorische Areale des Kortex. Der VPL erhält Afferenzen aus Nervenfasern des Lemniscus medialis und des Lemniscus spinalis, die Afferenzen des VPM entstammen v. a. aus den Ncll. principalis und spinalis des Nervus trigeminus (Benninghoff 2014).

1.2.2. Bedeutung des Thalamus

In spezifischen Kernen des Thalamus werden – mit Ausnahme des olfaktorischen Systems – alle peripheren somatosensorischen Afferenzen neuronal verschaltet, bevor sie entsprechend ihrer Modalität zu einem spezifischen Kortexareal gelangen. So handele es sich beim Thalamus nach einem vielzitierten Bonmot um das „Tor zum Bewusstsein“ (Pape et al. 2005; Benninghoff 2014). Allerdings stellt der Thalamus keine bloße Relaisstation von sensorischer

Information auf dem Weg zum Kortex dar, sondern bildet mit diesem eine hochgradig vernetzte Einheit zur dynamischen Modulierung und Prozessierung sensorischer Signale (Sherman und Guillery 2002; Grant, Hoerder-Suabedissen und Molnar 2012). Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass die Zahl der rücklaufenden, kortikothalamischen Nervenfasern die thalamokortikalen Verbindungen um das Fünf- bis Zehnfache übersteigt (Mitrofanis und Guillery 1993; Jones 1998). Insbesondere der komplexen und diffusen Verschaltung unspezifischer thalamischer Kerne, u. a. mit Assoziationskortex und dem limbischen System, wird eine essenzielle Bedeutung für multimodale Informationsverarbeitung und Integration kortikokortikaler Kommunikation zugeschrieben (Mashour und Alkire 2013; Palanca, Avidan und Mashour 2017).

In diesem Zusammenhang ist schon seit Längerem der Einfluss des Thalamus auf die physiologischen Zustände von Wachheit und Schlaf von Interesse. Auf zellulärer Ebene zeigt sich, dass TK-Schaltneurone zwei unterschiedliche Funktionszustände einnehmen können. Im sog. „tonischen Modus“ generieren TK-Schaltneurone in schneller Abfolge viele Aktionspotenziale in einem tonischen Erregungsmuster. Dies scheint eine wichtige Grundlage für Signalverarbeitung im Zustand der Wachheit zu sein (Pape et al. 2005; Franks 2008). Demgegenüber wechseln TK-Schaltneurone mit zunehmender Schlaftiefe in den sog. „Burst-Modus“, welcher durch die langsame, rhythmische Produktion von Aktionspotenzialfolgen charakterisiert ist. Grundlage hierfür ist die spontane Schrittmacheraktivität von TK-Schaltneuronen im Burst-Modus (Pape et al. 2005). Im Zusammenspiel mit inhibitorischen Neuronen des NRT entstehen Oszillationen, die in der Folge im TK-Netzwerk synchronisieren und mittels Elektroenzephalographie (EEG) in Abhängigkeit vom Schlafstadium als sog. Schlafspindeln² und δ -Wellen³ abgeleitet werden können (Steriade, McCormick und Sejnowski 1993; McCormick und Bal 1997). Diesen synchronisierten Oszillationen wird eine Filterfunktion durch Dekorrelation der sensorischen Signaltransmission zwischen Thalamus und Kortex zugeschrieben. (Le Masson et al. 2002; Pape et al. 2005). Maßgebliche Determinante der unterschiedlichen Funktionszustände ist das Membranpotenzial der TK-Schaltneurone. Durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials auf Werte ab -75 mV kommt es zum Burst-Modus, wohingegen eine Depolarisation auf Werte ab -55 mV zum tonischen Modus führt (McCormick und Bal 1997), siehe **Abbildung 2**. Die Regulierung des Membranpotenzials und somit des Funktionszustandes von TK-Schaltneuronen wiederum unterliegt verschiedenen Einflüssen. Hierzu zählen insbesondere exzitatorischer Input von kortikothalamischen Projektionen sowie dem Arousal-System (Hemmings et al. 2019), wohingegen die inhibitorische Komponente vor allem durch Neurone des NRT ausgeübt wird (Sherman und Guillery 1996). Darüber hinaus

² Schlafspindeln: Oszillationen mit einer Frequenz von 12–14 Hertz, die während des Übergangs von Wachheit zu Schlaf im Abstand von wenigen Sekunden auftreten (Buzsáki 2006)

³ δ -Wellen: Oszillationen mit einer Frequenz von 0,5–4 Hertz mit hoher Amplitude, die typischerweise während Tiefschlafphasen abgeleitet werden können (Buzsáki 2006)

existiert eine extraretikuläre Inhibition von TK-Schaltneuronen, etwa durch Neurone der Zona incerta oder des Ncl. preectalis anterior (Bartho, Freund und Acsady 2002; Bokor et al. 2005). Zudem spielt die Ausstattung von TK-Schaltneuronen mit spezialisierten Ionenkanälen eine wichtige Rolle für die Regulierung ihres Ruhemembranpotenzials (RMP) (Meuth et al. 2006).

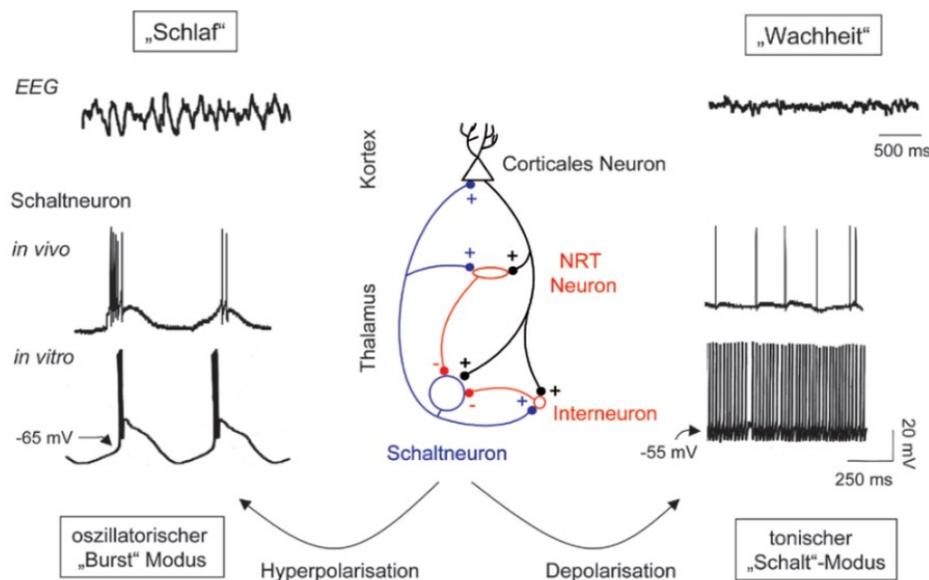


Abb. 2: Aktivitätsmuster im thalamokortikalen Netzwerk (Pape et al. 2005)

Vereinfacht dargestellt sind die Bestandteile des TK-Netzwerks, die durch ihre reziproke Verschaltung Netzwerkoszillationen ermöglichen. Hyperpolarisation der TK-Schaltneurone führt zu einem rhythmischen Erregungsmuster mit Aktionspotential-Salven (sog. Burst-Modus) und bedingt synchronisierte Oszillationen im TK-Netzwerk. Diese lassen sich als typische Schlafwellen im EEG ableiten. Tonische Serien von Aktionspotentialen kennzeichnen den sog. tonischen Modus und werden durch Depolarisation von TK-Schaltneuronen induziert. Im EEG zeigt sich ein niedrigamplitudiges, hochfrequentes Erregungsmuster, welches unter Wachheit abgeleitet werden kann. (+: exzitatorische Verbindungen; -: inhibitorische Verbindungen; EEG-Spuren und Einzelleitungen von TK-Schaltneuronen im Corpus geniculatum laterale pars dorsalis des Thalamus bei Ratten in vivo und in Schnittpräparaten in vitro). Text verändert nach Pape et al. 2005.

1.2.3. Anästhetika und das thalamokortiale Netzwerk

Die Vermutung, der anästhetikavermittelte Bewusstseinsverlust könnte zumindest teilweise den Thalamus involvieren, wird schon allein durch die Beobachtung gestützt, dass die meisten Anästhetika schlafähnliche EEG-Veränderungen induzieren und dies eine Hyperpolarisation von TK-Schaltneuronen voraussetzt (Franks 2008). So führen Sevofluran und Propofol während und nach Eintritt des Bewusstseinsverlusts zu einer Verschiebung des EEG-Frequenzbandes Richtung niederfrequenter und hochamplitudiger δ - und θ -Wellen⁴ (Gugino et al. 2001; Chander et al. 2014). Bei genauerer Betrachtung bleibt jedoch vieles umstritten: so könnte niederfrequente EEG-Aktivität weder notwendig noch ausreichend für den

⁴ θ -Wellen: Oszillationen mit einer Frequenz von 0,5 – 4 Hertz, die insbesondere bei Schläfrigkeit und während der frühen Schlafstadien zu beobachten sind (Buzsáki 2006)

Bewusstseinsverlust sein, da sich zum einen unter Ketamin- und Distickstoffmonoxid-Narkose ein aktiviertes EEG zeigt, zum anderen pathologische Zustände der Wachheit mit Delta-Aktivität beschrieben wurden (Voss und Sleight 2007). Somit ist trotz intensiver Forschungsbemühungen die genaue Bedeutung des Thalamus im Rahmen des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts nach wie vor umstritten und es werden verschiedene Hypothesen diskutiert (Mashour und Alkire 2013).

Funktionelle Bildgebungsstudien des Gehirns zeigten wiederholt, dass volatile und intravenöse Anästhetika den relativen Glukosemetabolismus und die regionale Durchblutung im Thalamus signifikant reduzieren (Alkire et al. 1999; Fiset et al. 1999; Kaisti et al. 2002; Alkire, Hudetz und Tononi 2008).⁵ Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass Anästhetika mittels unterschiedlicher Mechanismen eine Blockade von TK-Schaltneuronen durch Hyperpolarisation bewirken und der Thalamus somit gleichsam als Schalter für den anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlust fungieren könnte (Alkire, Haier und Fallon 2000). Als weitere Belege für diese Theorie werden tierexperimentelle Studien an Ratten herangezogen, in denen jeweils durch Injektion von Nikotin sowie einen Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle in den zentromedialen Thalamus die Wirkung von Narkosen mit volatilen Anästhetika (Sevofluran und Desfluran) aufgehoben werden konnte (Alkire et al. 2007; Alkire et al. 2009). Umgekehrt induzierte die Injektion von direkten und indirekten *gamma-aminobutyric-acid* Typ A Rezeptor (GABA_A-R)-Agonisten in die intralaminäre Kerngruppe des Thalamus von Ratten schnelle Bewusstlosigkeit und entsprechende EEG-Veränderungen (Miller und Ferrendelli 1990). Zudem gibt es Hinweise, dass Patienten mit schweren Hirnschäden, die sich in einem Zustand minimalen Bewusstseins oder einem vegetativen Zustand befinden, von Tiefenhirnstimulation des Thalamus profitieren können (Giacino et al. 2012; Magrassi et al. 2016). Allerdings ist die Hypothese, Anästhetika würden thalamokortikale Konnektivität einfach abschalten oder abschwächen, aufgrund neuerer Studienergebnisse einer deutlich differenzierteren Betrachtungsweise gewichen. Daten aus einer funktionellen Bildgebungstudie ergaben, dass es unter Sevofluran sogar zu einer verstärkten thalamischen Konnektivität mit der supplementär-motorischen Rinde und der Inselrinde kommt (Martuzzi et al. 2010). Zudem scheint Propofol weitaus stärker die funktionelle Konnektivität zwischen nichtspezifischen thalamischen Kernen und dem Kortex zu reduzieren, als es bezüglich der – für die sensorische Transmission verantwortlichen – spezifischen thalamischen Kerne der Fall ist (Liu et al. 2013). Entsprechend konnte demonstriert werden, dass unter Sevoflurannarkose insbesondere die thalamische Konnektivität mit frontoparietalen Kortexarealen und der Pars posterior des Gyrus cinguli

⁵ Diese Aussage gilt jedoch nicht für Ketamin, welches zu einer Erhöhung des Glukosemetabolismus im Thalamus führt (Langsjo et al. 2005)

dosisabhängig beeinträchtigt wird, wohingegen die thalamische Konnektivität mit sensorischen Kortexarealen erhalten bleibt (Ranft et al. 2016).

Demgegenüber könnten Anästhetika auch primär Prozesse im Kortex induzieren, die zu Bewusstlosigkeit führen. Veränderungen im Thalamus wären in diesem Fall lediglich die Folge verminderter kortikaler Aktivität als Ausdruck eines *Top-Down*-Mechanismus. (Mashour und Alkire 2013; Jordan et al. 2013; Raz et al. 2014). Hierfür sprechen etwa simultane elektrophysiologische Ableitungen von kortikalen und subkortikalen Signalen bei Parkinson-Patienten, die bei Narkoseinduktion mittels Sevofluran oder Propofol hauptsächlich kortikal abgeleitete Signalveränderungen zeigten (Velly et al. 2007). Andererseits existieren Erkenntnisse aus einer neueren tierexperimentellen Studie an Ratten, in der die Auswertung lokaler Feldpotenziale ergab, dass bei Narkoseinduktion mit Propofol Aktivitätsveränderungen im zentromedialen Thalamus Veränderungen im Neokortex vorausgehen (Baker et al. 2014). Auf Grundlage von EEG-Daten wurden verschiedene *Top-Down*-Ansätze postuliert. So könne Sevofluran beispielsweise mittels Unterbrechung von sog. Phasen-Amplituden-Kopplung im Bereich des parietalen Kortex zu Bewusstlosigkeit führen (Blain-Moraes et al. 2015). Ein weiterer kortikaler Mechanismus könnte in der Dämpfung frontaler Feedback-Projektionen liegen, was zu einer gestörten Interaktion zwischen frontalen und parietalen Regionen der Großhirnrinde führen soll (Blain-Moraes et al. 2015; Ranft et al. 2016). Die Beurteilung der Bedeutung von *Top-Down*-Mechanismen im Gegensatz zu *Bottom-Up*-Prozessen für den anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlust bleibt in der Zusammenschau letztlich umstritten (Hemmings et al. 2019).

Schließlich wird die Bedeutung des Thalamus für die Aufrechterhaltung von Bewusstsein durch tierexperimentelle Studien in Frage gestellt, in denen Katzen (Villablanca 2004) und Ratten (Fuller et al. 2011) der Thalamus entfernt wurde. In beiden Fällen zeigte sich, dass athalamische Tiere noch zu Interaktion und Verhaltensweisen fähig sind sowie ein aktiviertes EEG-Signal aufweisen. Allerdings bleibt das Ausmaß des Wahrnehmungsvermögens dieser Tiere unklar und beobachtete Veränderungen in thalamischer Aktivität durch Anästhetika lediglich als Epiphänomen zu betrachten, wäre wohl zu kurz gegriffen (Mashour und Alkire 2013).

Insgesamt bleibt die Feststellung, dass dem Thalamus im Zusammenspiel mit kortikalen Prozessen eine bedeutende Funktion im Rahmen des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts zuzukommen scheint. Insbesondere die Funktion unspezifischer TK-Netzwerke rückt zunehmend in den Fokus der Wissenschaft (Liu et al. 2013). Hingegen bleibt es aufgrund der komplexen Vernetzung methodisch schwierig, thalamische von kortikalen Einflüssen zu isolieren und somit Fragen nach Kausalität oder Bedeutung einzelner Komponenten zu beantworten (Palanca, Avidan und Mashour 2017).

1.3. Molekulare Wirkmechanismen von Anästhetika

Doch wie lässt sich die Wirkweise von Anästhetika auf neuronaler Ebene erklären? Historisch wurden mindestens 17 verschiedene Versuche unternommen, eine vereinheitlichte Theorie über die zelluläre Grundlage des pharmakologisch induzierten Bewusstseinsverlusts zu formulieren. Ausgehend von der sog. Meyer-Overton-Regel über die Korrelation der anästhesiologischen Wirkstärke von chemischen Verbindungen mit ihrer Fettlöslichkeit wurde zumeist postuliert, dass Anästhetika durch unspezifische Interaktionen mit der Lipid-Doppelschicht von Nervenzellen deren physikochemische Eigenschaften verändern (Krasowski 2003).

Demgegenüber setzte sich die Erkenntnis durch, dass Anästhetika über eine Interaktion mit Proteinen an spezifischen molekularen Zielstrukturen wirken (Franks und Lieb 1982; Rudolph und Antkowiak 2004; Franks 2008). Über die Jahre konnten verschiedene Rezeptor- und Ionenkanal-Klassen identifiziert werden, welche theoretisch formulierten Kriterien genügen (Hemmings et al. 2005) und in das Zentrum wissenschaftlicher Forschung rückten. So konnten im Fall von Sevofluran elektrophysiologische Effekte auf GABA_A-R, N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDA-R), nikotinerge Acetylcholinrezeptoren, spannungsabhängige Natriumkanäle, K⁺-Tandemporen (K_{2P})-Kanäle, Glycinrezeptoren sowie *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN)-Kanäle in unterschiedlichen Neuronenpopulationen nachgewiesen werden (Kopp Lugli, Yost und Kindler 2009; Palanca, Avidan und Mashour 2017).

Dabei hat sich inzwischen mehrheitlich die Ansicht durchgesetzt, dass nicht eine einzelne molekulare Zielstruktur allein oder überwiegend für die Induktion von Narkose verantwortlich ist, wie beispielsweise zwischenzeitlich postuliert für NMDA-R (Flohr, Glade und Motzko 1998) oder GABA_A-R (Zimmerman, Jones und Harrison 1994), sondern Anästhetika unterschiedliche Rezeptoren und Ionenkanäle substanzspezifisch pharmakologisch beeinflussen (Franks 2008). Eine differenzierte Modulation auf molekularer Ebene entspricht auch der Beobachtung, dass sich gebräuchliche Anästhetika in ihrer klinischen Wirkungsweise unterscheiden (Grasshoff et al. 2006).

Im Folgenden soll auf die beiden Zielstrukturen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, genauer eingegangen werden: HCN-Kanäle und GABA_A-R.

1.3.1 HCN-Kanäle

Die HCN-Kanalfamilie (für *hyperpolarisation-activated, cyclic nucleotide-gated*) besteht aus den vier Isoformen HCN Typ 1–4 (HCN1–HCN4) und wird zur Superfamilie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle gerechnet. HCN-Kanäle unterscheiden sich aber in vielen Eigenschaften deutlich von den übrigen Vertretern dieser Gruppe (Biel et al. 2009; Riegelhaupt, Tibbs und Goldstein 2018). Als heteromultimere Ionenkanäle, die jeweils aus sechs Transmembransegmenten (S1–S6) bestehen und schwach selektiv für Natrium- und Kaliumionen sind, werden HCN-Kanäle durch Hyperpolarisation – nicht Depolarisation – der Zellmembran über das RMP hinaus aktiviert und demonstrieren keine spannungsabhängige Inaktivierung (Biel et al. 2009; He et al. 2014). Als weitere namensgebende Besonderheit weisen HCN-Kanäle am Carboxy-terminalen Ende von S6 eine Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide des Intrazellulärraums auf. Die Bindungsdomäne wirkt dabei in Abwesenheit von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) inhibitorisch auf die HCN-Kanal-Aktivierung, dieser Effekt kann durch die Bindung von cAMP aufgehoben werden (Wainger et al. 2001). Dabei demonstrieren insbesondere HCN2 und HCN4 eine besonders hohe Sensitivität gegenüber cAMP (Wang, Chen und Siegelbaum 2001; Stieber et al. 2003). Weiterhin findet sich eine relevante Modulation der HCN-Kanal-Funktion durch die vorherrschende Wasserstoffionenkonzentration bzw. den pH-Wert (Stevens et al. 2001), Phosphatid- und Arachidonsäure (Fogle et al. 2007) sowie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Pian et al. 2007).

Die Aktivierung von HCN-Kanälen durch Hyperpolarisation resultiert in einem einwärts gerichteten, gemischten Kationenstrom, der im Fall von Neuronen als I_h (für *hyperpolarisation-activated*) bezeichnet wird (Pape 1996; Goldstein 2015). Der Grad der Aktivierung ist spannungsabhängig, wobei die Aktivierungskinetik von der jeweils regional exprimierten Isoform-Zusammensetzung abhängt (He et al. 2014). Dabei konnte mittels In-situ-Hybridisierung in einer Studie an Mäusen demonstriert werden, dass die Transkripte jeder HCN-Kanal-Isoform eine einzigartige Verteilung im Gehirn aufweisen (Moosmang et al. 1999). Im Fall von TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes dominieren HCN2 und HCN4 (Moosmang et al. 1999). Eine genauere Betrachtung der neuronalen Kompartimente ergab zudem, dass HCN2 und HCN4 sich nicht einheitlich auf der Zellmembran von TK-Schaltneuronen verteilen. Vielmehr zeigt sich eine deutliche Immunmarkierung von HCN2 und HCN4 im Bereich des Somas mit ausgeprägter Kolo-kalisation, wohingegen dendritische Dornfortsätze nur HCN2 und Axonterminale gar keine HCN-Kanäle exprimieren (Abbas, Ying und Goldstein 2006). Quantitativ scheinen HCN2, die eine mittelschnelle Aktivierungskinetik aufweisen (He et al. 2014), den größten Anteil an der Generierung von somatischem I_h in TK-Schaltneuronen zu haben (Ludwig et al. 2003; Abbas, Ying und Goldstein 2006), wobei HCN4

als langsamste Kanäle (Wahl-Schott und Biel 2009) eine modulierende Funktion einnehmen könnten (Pape et al. 2005).

I_h vermittelt eine Depolarisation der Zellmembran, bis das Schwellenpotenzial spannungsabhängiger Kalziumkanäle erreicht wird. Diese vermitteln den sog. T-Typ Kalziumstrom („T“ steht für transient), der in einer schnellen Aktionspotenzialfolge (sog. *Bursts*) resultiert (Pape et al. 2005). Somit fungieren HCN-Kanäle als molekularer Schrittmachermechanismus für rhythmische Oszillationen und bestimmen deren Periodizität, sowohl im TK-Netzwerk als auch in anderen neuronalen Netzwerken (Luthi und McCormick 1998; Pape et al. 2005; Abbas, Ying und Goldstein 2006). Dabei werden diese Oszillationen als ein zentraler Mechanismus für eine Reihe von grundlegenden Prozessen angesehen (Wahl-Schott und Biel 2009), u. a. Wahrnehmung und Verarbeitung von sensorischen Reizen sowie Lernen und Gedächtnis. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle im Zusammenhang von Wachheit und Schlaf (Buzsáki 2006; Calabro et al. 2015). Im Zusammenspiel mit anderen Ionenkanälen regulieren HCN-Kanäle u. a. den Membranwiderstand R_M (*Input-Resistance*), die zeitliche Integration von synaptischer Transmission an Dendriten, die Erregbarkeit und das RMP von Neuronen (Pape 1996; Abbas, Ying und Goldstein 2006; He et al. 2014), wobei im Fall von TK-Schaltneuronen Interaktionen zwischen HCN2-Kanälen und sog. TASK3- K_{2P} -Kanälen maßgebend für die Einstellung des RMPs sind (Meuth et al. 2006).

In den vergangenen Jahren rückten HCN-Kanäle verstärkt als potenzielle molekulare Zielstrukturen für Anästhetika in den Fokus der Wissenschaft, insbesondere wegen ihres Einflusses auf TK-Schaltneurone (Franks 2008; Goldstein 2015). Im Fall von TK-Schaltneuronen zeigten Studien bereits eine Wirkung von Propofol (Ying et al. 2006), Halothan (Budde et al. 2008) sowie von Xenon (Mattusch et al. 2015) auf HCN2-Kanäle. Der Einfluss der volatilen Anästhetika Isofluran und Sevofluran in klinisch relevanten Dosierungen wurde insbesondere im Zusammenhang mit HCN1-Kanälen in unterschiedlichen neuronalen Kontexten nachgewiesen (Chen et al. 2005; Chen et al. 2009; Zhou et al. 2015).

1.3.2 GABA_A-Rezeptoren

In jeder Säugetierart stellt *Gamma-aminobutyric acid* (GABA) den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des adulten ZNS dar. Die Wirkung wird hauptsächlich über ubiquitär vorkommende GABA_A-R, die insbesondere für Chlorid-Ionen durchlässig sind, vermittelt (Olsen und Sieghart 2009). Durch Bindung des endogenen Liganden GABA an GABA_A-R kommt es in Abhängigkeit vom RMP und des transmembranösen elektrochemischen Chlorid-Gradienten in den meisten adulten Neuronen zu einem Einwärtsfluss von Anionen mit konsekutiver Hyperpolarisation, wodurch neuronale Aktivität inhibiert wird (Speigel, Bichler und Garcia 2017). Selbstverständlich existieren von diesem Lehrbuchdogma auch

Ausnahmen. Denn in unreifen, sich entwickelnden Neuronen, die noch nicht den K^+ -Cl⁻-Kotransporter exprimieren und somit keinen transmembranösen, elektrochemischen Gradienten etablieren können, wirkt GABA depolarisierend (Rivera, Voipio und Kaila 2005; Ben-Ari 2015). Und selbst im Fall von adulten Neuronen gibt es Hinweise auf eine depolarisierende und somit exzitatorische GABA_A-R-Aktivierung (Stein und Nicoll 2003).

GABA_A-R sind ionotrope Rezeptoren und bestehen als Heteropentamere aus fünf verschiedenen Untereinheiten, die einen zentralen Ionenkanal formen. Bisher wurden 19 verschiedene Untereinheiten beschrieben (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π und ρ 1–3) (Franks 2008; Olsen und Sieghart 2009). Theoretisch wäre somit eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten denkbar, allerdings werden lediglich neun Konfigurationen in signifikantem Umfang im ZNS exprimiert (Olsen und Sieghart 2008). Die Zusammensetzung scheint bestimmten Regeln zu folgen und die meisten natürlich vorkommenden GABA_A-R enthalten zwei α -, zwei β - und entweder eine γ - oder eine δ -Untereinheit, die eine bestimmte Anordnung zueinander einnehmen (Farrant und Nusser 2005; Spiegel, Bichler und Garcia 2017). Dabei zeigt sich ein differenziertes Expressionsmuster von GABA_A-R Untereinheiten und Konfigurationen in Abhängigkeit von der Hirnregion (Wisden et al. 1992; Pirker et al. 2000), des Neuronentyps (Lee und Maguire 2014) und des betrachteten neuronalen Zellkompartiments (Sieghart und Sperk 2002).

Im Zusammenhang mit GABA_A-R-vermittelter Transmission werden zwei unterschiedliche Formen der Inhibition unterschieden: eine Aktivierung synaptischer GABA_A-R führt zu phasischer Inhibition, wohingegen extrasynaptische GABA_A-R tonische Inhibition vermitteln (Farrant und Nusser 2005; Bonin und Orser 2008). Auch hier spielt die Untereinheiten-Zusammensetzung eine entscheidende Rolle (Spiegel, Bichler und Garcia 2017).

1.3.2.1 Phasische Aktivierung von GABA_A-R

Diese Form der GABA_A-R-vermittelten Inhibition findet an GABAergen Synapsen statt. Die Aktionspotenzial-abhängige Freisetzung von hohen GABA-Konzentrationen aus Vesikeln des präsynaptischen Nervenendes in den synaptischen Spalt führt zu einer kurzen Aktivierung von postsynaptischen GABA_A-R-Clustern, die eine eher geringe Affinität für GABA und eine schnelle Desensitisierungszeit aufweisen (Mody und Pearce 2004). In den meisten adulten Neuronen kommt es aufgrund des nach intrazellulär gerichteten Flusses von Anionen zu einer hyperpolarisierenden Antwort, dem sog. *inhibitory postsynaptic potential* (IPSP) (Bonin und Orser 2008). Sowohl die Erhöhung der Leitfähigkeit der Zellmembran für Anionen als auch die konsekutive Hyperpolarisation des Transmembranpotentials reduzieren die unmittelbare Auftretenswahrscheinlichkeit für Aktionspotentiale und wirken somit inhibitorisch (Farrant und Nusser 2005). Zudem werden die funktionellen Eigenschaften des GABA_A-R durch seine

Rezeptorkinetik beeinflusst. Man nimmt an, dass der synaptische GABA_A-R Konformationsänderungen durchläuft und zwischen verschiedenen offenen, desensibilisierten und geschlossenen Zuständen wechselt (Burkat, Yang und Gingrich 2001). Unterschiede der Rezeptorkinetik in verschiedenen Zelltypen werden dabei auf spezifische Untereinheiten-Konfigurationen von synaptischen GABA_A-R zurückgeführt (Bacci et al. 2003). Siehe auch **Abbildung 3**.

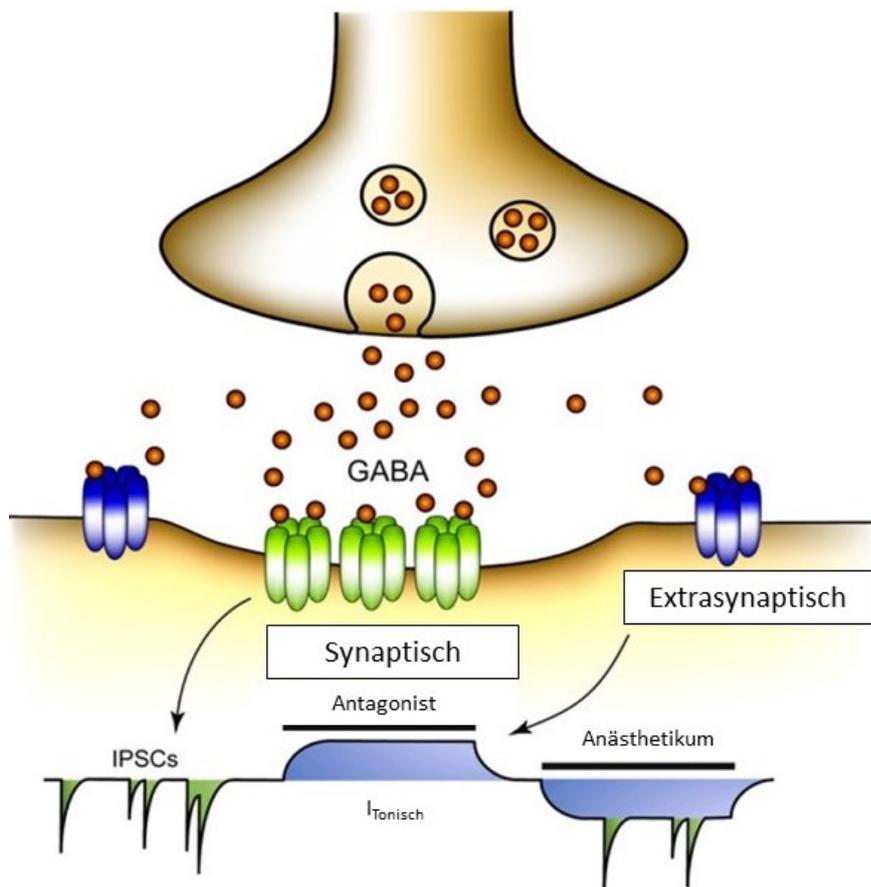


Abb. 3: Synaptische und extrasynaptische GABA_A-R (Bonin und Orser 2008)

GABA wird auf Aktionspotenziale hin in den synaptischen Spalt freigesetzt und führt zu einer kurzen Aktivierung von GABA_A-R in der postsynaptischen Membran. Hieraus resultiert ein sog. inhibitorischer postsynaptischer Strom (*inhibitory postsynaptic current*, IPSC) von kurzer Dauer, da GABA diffundiert oder wieder in die Präsynapse aufgenommen wird. Zudem unterliegen synaptische GABA_A-R einer Desensibilisierung. Extrasynaptische GABA_A-R werden von GABA niedriger Konzentration im Extrazellulärraum aktiviert, das aus Synapsen „überläuft“ oder unabhängig von synaptischen Mechanismen freigesetzt wird. Diese Rezeptoren zeigen nur eine schwache Desensibilisierung und produzieren eine kontinuierliche, tonische Inhibition. Diese tonische Inhibition kann durch die Applikation von GABA_A-R-Antagonisten demaskiert werden. Viele Anästhetika verstärken in klinisch relevanten Dosierungen die tonische Inhibition. Text und Abbildung verändert nach Bonin und Orser (2008).

Hinsichtlich der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens untersuchten TK-Schaltneurone des VB-Kernkomplexes finden sich vor allem synaptische GABA_A-R vom Typ $\alpha 1\beta\gamma 2$ als Vermittler der phasischen Inhibition (Peden et al. 2008; Herd et al. 2013).

Insgesamt erlaubt die phasische Aktivierung von GABA_A-R in zeitlicher und räumlicher Hinsicht eine präzise und schnelle Form der inhibitorischen Transmission, was als Grundvoraussetzung für die Generierung rhythmischer Aktivität in neuronalen Netzwerken gilt (Farrant und Nusser 2005; Buzsáki 2006). Im Kontext des TK-Netzwerks konnte die Bedeutung phasischer Inhibition für die Regulierung oszillatorischer Synchronität demonstriert werden (Huntsman et al. 1999; Fogerson und Huguenard 2016).

1.3.2.2 Tonische Aktivierung GABA_A-R

Bereits früh wurde postuliert, dass GABA nicht nur an schneller synaptischer Transmission beteiligt sei, sondern mittels tonischer Aktivierung extrasynaptischer Rezeptoren auch eine langsamere Form der Zellkommunikation vermitteln könnte (Mody 2001). Dem liegt die Beobachtung zugrunde, dass sich GABA_A-R nicht nur in postsynaptischen Membranen inhibitorischer Synapsen finden, sondern auch in erheblichem Umfang in extrajunktionalen Membranen des neuronalen Somas sowie von Axonen oder Dendriten (Kullmann et al. 2005). In adulten Neuronen des ZNS⁶ gelang der Nachweis von tonischer, GABA_A-R-vermittelter Inhibition erstmals in Körnerzellen des Cerebellums von Ratten (Kaneda, Farrant und Cull-Candy 1995). Seitdem konnte für eine Vielzahl von Hirnregionen und Neuronenpopulationen die Existenz einer tonischen Inhibition via GABA_A-R demonstriert werden (Farrant und Nusser 2005; Bonin und Orser 2008). Klassischerweise wird angenommen, dass auch die Aktivierung der extrasynaptischen GABA_A-R durch die Bindung von GABA erfolgt. Dieses findet sich als sog. „Umgebungs-“ oder „Überlauf-“GABA (*ambient* oder *spillover* GABA) in niedrigerer Konzentration im Interzellularraum des Nervengewebes, wohin es durch unterschiedliche Mechanismen gelangen soll. So wurde postuliert, es würde aus „überlaufenden“ Synapsen dorthin entweichen (Farrant und Nusser 2005) oder aktiv von Astrozyten sezerniert werden (Kozlov et al. 2006), aber auch verwandte Neurotransmitter-Analoga wie Taurin oder β -Alanin könnten anteilig tonische Inhibition vermitteln (Cavelier et al. 2005). Die Bedeutung von GABA-unabhängigen, sich spontan öffnenden extrasynaptischen GABA_A-R ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten, ihr Anteil an der GABA_A-R-vermittelten tonischen Inhibition soll aber signifikant sein (O'Neill und Sylantsev 2019). Extrasynaptische GABA_A-R demonstrieren eine höhere Affinität für GABA sowie wenig bis keine Desensibilisierung in Anwesenheit hoher GABA-Konzentrationen (Yeung et al. 2003), so dass sie eine kontinuierliche Inhibition generieren können (Speigel, Bichler und Garcia 2017). Siehe auch **Abbildung 3**.

Auch im Fall der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes konnte die Existenz einer bedeutenden tonischen Inhibition durch

⁶ Der erste Nachweis von tonischer Inhibition durch extrasynaptische GABA_A-R erfolgte im peripheren Nervensystem (Brown et al. 1979).

extrasynaptische GABA_A-R nachgewiesen werden, die zudem den größten Anteil an der gesamten inhibitorischen Transmission zu haben scheint (Belelli et al. 2005; Cope, Hughes und Crunelli 2005; Jia et al. 2005). Dabei finden sich extrasynaptische GABA_A-R vom Typ $\alpha 4\beta 2/3\delta$ sowie $\alpha 4\beta 2/3\gamma 2$, wobei Typ $\alpha 4\beta 2\delta$ dominiert (Sur et al. 1999; Peden et al. 2008; Herd et al. 2013).

Funktional beeinflusst tonische Inhibition insbesondere die Leitfähigkeit einer Zelle für exzitatorischen Input. Durch erhöhte tonische Inhibition kommt es zur Abnahme von Größe und Dauer des sog. exzitatorischen postsynaptischen Potenzials (EPSP), welches durch sog. exzitatorische postsynaptische Ströme (*excitatory postsynaptic currents*, EPSCs) hervorgerufen wird. Somit wird die Generierung eines konsekutiven Aktionspotentials weniger wahrscheinlich (Farrant und Nusser 2005). Erhöhte Aktivität extrasynaptischer GABA_A-R im Thalamus führt zu einer Hyperpolarisation von TK-Schaltneuronen und bahnt somit den Übergang in den Burst-Modus (Cope, Hughes und Crunelli 2005; Herd et al. 2013). Auf diese Weise könnte verstärkte tonische Inhibition zu Rhythmogenese und erhöhter Synchronität von Oszillationen im TK- sowie anderen neuronalen Netzwerken, etwa dem Hippocampus, beitragen (Mann und Mody 2010; Fogerson und Huguenard 2016). Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von extrazellulärem GABA im Hippocampus von Ratten auch durch psychologische Stressoren beeinflusst wird (de Groote und Linthorst 2007). Dies könnte einen Mechanismus darstellen, wie lokalisierte Prozesse als Folge von Verhalten und Physiologie durch parakrine Effekte zu einer globaleren Modulation neuronaler Netzwerke beitragen können (Speigel, Bichler und Garcia 2017).

1.3.2.3 Untereinheiten-Zusammensetzung und Anästhetika

GABA_A-R werden als eine der pharmakologischen Hauptangriffspunkte für Anästhetika angesehen (Franks 2008; Garcia, Kolesky und Jenkins 2010). Auch bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber dieser Arzneimittelklasse zeigen sich profunde Unterschiede zwischen synaptisch-phasischen Rezeptoren und extrasynaptisch-tonischen Rezeptoren (Olsen und Sieghart 2008; Spiegel, Bichler und Garcia 2017). So werden zwar so gut wie alle Untereinheiten von Anästhetika beeinflusst, allerdings scheinen extrasynaptische GABA_A-R deutlich sensitiver auf Anästhetika zu reagieren (Bonin und Orser 2008). In klinisch relevanten Dosierungen wirken Anästhetika in der Regel als positive allosterische Modulatoren des GABA_A-R (Garcia, Kolesky und Jenkins 2010). Dabei weisen unterschiedliche Anästhetika teilweise spezifische Rezeptor-Bindungsstellen auf und demonstrieren ein hohes Maß an Selektivität, was die überaus differenzierte pharmakologische Wirkung einzelner Substanzen in Abhängigkeit von der Untereinheiten-Zusammensetzung erklären könnte (Woll et al. 2018). Sowohl für die volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran und Isofluran (Kotani und Akaike 2013) als auch für Sevofluran (Wu, Harata und Akaike 1996; Sebel et al. 2006) konnte eine Verstärkung von GABA_A-R-

vermittelter phasischer Inhibition nachgewiesen werden. Bezüglich der Effekte von Sevofluran auf die tonische Inhibition ist die Datenlage bisher äußerst dürftig. So weisen Ableitungen von mechanisch isolierten CA1 Neuronen des Hippocampus von Ratten (Ogawa et al. 2011) sowie von postnatalen Neuronen im Striatum von Mäusen (Ando et al. 2014) auf eine Verstärkung der tonischen Inhibition durch Sevofluran hin. Verwandte Studien zeigten, dass Isofluran in Pyramidenzellen des Hippocampus von Mäusen die tonische Inhibition verstärkt, welche von GABA_A-R mit der Untereinheit $\alpha 5$ vermittelt wird (Caraiscos et al. 2004). Im Fall von TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes konnte ein ähnlicher Effekt auf die tonische Inhibition durch Etomidat festgestellt werden (Belelli et al. 2005).

Im Rahmen dieses Promotionsprojekts soll u. a. die Rolle der GABA_A-R-Untereinheit $\alpha 4$ für die Wirkung von Sevofluran auf phasische und tonische Inhibition in TK-Schaltneuronen des thalamischen VB-Kernkomplexes genauer eruiert werden. Hierfür kommen Mäuse mit einem konventionellen $\alpha 4$ -Knockout ($\alpha 4^{-/-}$) zum Einsatz. Die $\alpha 4$ -Untereinheit weist eine hohe Expression im Thalamus auf, wo sie in Assoziation mit der δ -Untereinheit und einer β -Untereinheit maßgeblich an der Vermittlung tonischer Inhibition beteiligt ist (Pirker et al. 2000; Farrant und Nusser 2005; Peng et al. 2014). Hierfür spricht auch, dass es in Ableitungen von TK-Schaltneuronen bei $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen nicht mehr gelang, tonische Inhibition nachzuweisen (Chandra et al. 2006). Erwartungsgemäß befinden sich GABA_A-R mit der $\alpha 4$ - und δ -Untereinheit hauptsächlich peri- und extrasynaptisch (Sun, Sieghart und Kapur 2004; Jia et al. 2005). Beide Untereinheiten weisen nicht nur eine hohe Rate an Kolo-kalisation im Wildtyp auf (Jia et al. 2005), sondern zeichnen sich darüber hinaus durch eine bevorzugte Partnerschaft aus: in δ -Knockout-Mäusen kommt es zu einer starken Abnahme der $\alpha 4$ -Expression (Peng et al. 2002), umgekehrt vermindert sich die δ -Expression in $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen (Peng et al. 2014). Funktionell wurde eine erhöhte $\alpha 4$ -Expression im Zusammenhang mit unterschiedlichen Epilepsie-Modellen (Brooks-Kayal et al. 1998; Rajasekaran et al. 2010) sowie chronischem Alkoholkonsum (Mahmoudi et al. 1997; Cagetti et al. 2003) festgestellt. Zudem deuten Studienergebnisse darauf hin, dass $\alpha 4\beta\delta$ -GABA_A-R über ein besonderes pharmakologisches Profil verfügen: die meisten Benzodiazepine binden nicht an diese Rezeptoren (Olsen und Sieghart 2008), dafür demonstrieren sie eine hohe Sensitivität gegenüber Alkohol (Wallner, Hanchar und Olsen 2003; Liang et al. 2008), Neurosteroiden sowie den intravenösen Anästhetika Propofol und Etomidat (Meera et al. 2009). Außerdem könnte die $\alpha 4$ -Untereinheit eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des amnestischen Effekts von volatilen Anästhetika spielen, da dieser bei $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen nach Isofluran-Narkosen vermindert war (Rau et al. 2009). Vor diesem Hintergrund erscheint eine genauere Analyse des Einflusses der $\alpha 4$ -Untereinheit auf die Wirkung von Sevofluran durchaus vielversprechend.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens soll die Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen im VB-Kernkomplex des Thalamus untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine Neuronenpopulation, der eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts zugeschrieben wird. Die Wirkmechanismen von Sevofluran sind in diesem neuronalen Kontext bisher nicht ausreichend charakterisiert. Hierfür werden elektrophysiologische Patch-Clamp-Ableitungen von TK-Schaltneuronen in Akut-Hirnschnittpräparaten verwendet, die einen weitgehenden Erhalt der Neuronen in ihrer anatomischen und funktionellen Einbettung gewährleisten.

Dabei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst Sevofluran die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen?
2. Wie wirkt Sevofluran auf die HCN-Kanal vermittelten Ströme in TK-Schaltneuronen?
3. Besteht bezüglich der Wirkung auf HCN-Kanäle eine Dosisabhängigkeit?
4. Wie wirkt Sevofluran auf die GABA_A-R-vermittelte tonische und phasische Inhibition in TK-Schaltneuronen?
5. Welchen Einfluss hat die GABA_A-R-Untereinheit $\alpha 4$ auf die Wirkung von Sevofluran in TK-Schaltneuronen?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens wurden weibliche C57Bl6/N Wildtyp-Mäuse sowie männliche und weibliche $\alpha 4^{-/-}$ -Mäuse in einem Alter zwischen 21 und 49 Tagen verwendet. Bei den $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen handelte es sich um Mäuse mit einem konventionellen Knockout der $\alpha 4$ -Untereinheit des GABA_A-R (Chandra et al. 2006). Da die Tötung aller Tiere ausschließlich erfolgte, um deren Gehirne zu wissenschaftlichen Zwecken (Herstellung von Akut-Hirnschnittpräparaten) zu verwenden, handelte es sich nicht um Tierversuche im Sinne des Gesetzes (vergleiche hierzu § 7 Abs. 2 Satz 3 Tierschutzgesetz⁷). Die entsprechende Tierhaltung wurde von der Regierung von Oberbayern sowie dem Atlanta Veterans Affairs Medical Center Institutional Animal Care and Use Committee (USA) genehmigt. Dabei erfolgte die Haltung der C57Bl6/N Wildtyp-Mäuse und die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen an den Gehirnen von C57Bl6/N Wildtyp-Mäusen in den Räumlichkeiten der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, wohingegen die Haltung der $\alpha 4^{-/-}$ -Mäuse sowie die entsprechenden elektrophysiologischen Untersuchungen an den Gehirnen von $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen in Räumlichkeiten des Neuroanesthesia Laboratory der Emory University im Atlanta Veterans Affairs Medical Center (USA) durchgeführt wurden.

2.2. Herstellung der Hirnschnittpräparate

Die Herstellung von Akut-Hirnschnittpräparaten für elektrophysiologische Messungen stellt eine weitverbreitete und wichtige Methodik im Bereich der Neurowissenschaften dar, im Detail unterscheiden sich angewandte Protokolle jedoch deutlich und werden häufig den spezifischen Anforderungen der jeweiligen Fragestellung entsprechend modifiziert (Papouin und Haydon 2018). Nachdem die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert worden waren, erfolgte die Dekapitation mit Hilfe einer Guillotine. Die anschließende Präparation des Hirngewebes wurde in eisgekühlter künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF: *artificial cerebrospinal fluid*) vorgenommen, welche folgende Zusammensetzung aufwies (Konzentrationen in mM): NaCl: 125; KCl: 2,5; NaH₂PO₄-Monohydrat: 1,25; D(+)-Glucose-Monohydrat: 25; NaHCO₃: 25; MgCl₂-Hexahydrat: 6; CaCl₂-Dihydrat: 0,5. Eine ausreichende Oxygenierung und die Einstellung eines physiologischen pH-Wertes von 7,4 wurden durch kontinuierliche Sättigung der aCSF mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) sichergestellt. Nach Entnahme des Gehirns aus der Schädelhöhle wurde eine modifizierte Schnittführung nach Agmon und Connors (1991) angewandt, die eine sichere Identifizierung des VB-

⁷ Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 280 der Verordnung vom 19. Juni 2020 (BGBl. I S. 1328) geändert worden ist.

Kernkomplexes des Thalamus erlaubt und sich durch eine erhaltene funktionelle Konnektivität mit dem sensomotorischen Kortex auszeichnet. Hierfür wurde das Gehirn in Bezug zu seiner anterior-posterioren Achse um 55° nach rechts gedreht und mit einer um 10° geneigten Rasierklinge vertikal durchschnitten. Das Hirngewebe rostral von der Schnittfläche wurde entsorgt und das verbleibende Hirngewebe mittels Auftragen eines Gewebeklebers (Histoacryl®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) auf die Schnittfläche an einem Metallblock fixiert und in ein Schneidebecken eingelegt, welches mit eisgekühlter und Carbogengas-gesättigter aCSF in oben genannter Zusammensetzung befüllt war. Anschließend erfolgte das horizontale Schneiden des Hirngewebes mittels Vibratom (HM 650 V, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: Leica VT-1000 S, Leica Biosystems, Buffalo Grove, USA), wobei nach Erreichen der Zielregion i. d. R. drei bis vier Hirnschnitte mit einer Schichtdicke von $350\ \mu\text{m}$ gewonnen werden konnten.

Anschließend wurden die Hirnschnitte in ein Aufbewahrungsgefäß verbracht, welches ebenfalls mit Carbogengas-gesättigter aCSF enthält. Die hierfür verwendete aCSF unterschied sich in ihrer Zusammensetzung von der für die Präparation verwendeten aCSF wie folgt (Konzentrationen in mM): NaCl: 125; KCl: 2,5; NaH_2PO_4 -Monohydrat: 1,25; D(+)-Glucose-Monohydrat: 25; NaHCO_3 : 25; MgCl_2 -Hexahydrat: 1; CaCl_2 -Dihydrat: 2. Die Hirnschnitte wurden zunächst 30 Minuten bei 35°C gelagert und dann frühestens nach weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur ($20\text{--}24^\circ\text{C}$) in die Messkammer des Patch-Clamp-Messaufbaus transferiert. Während der Lagerung im Aufbewahrungsgefäß wurde eine kontinuierliche Carbogengas-Zufuhr sichergestellt.

2.3. Infrarot-Videomikroskopie

Die Visualisierung einzelner Neurone im vitalen und ungefärbten Hirnschnittpräparat erfolgte mittels Infrarot (IR)-Videomikroskopie, da Standard-Lichtmikroskopie hierfür nicht geeignet ist. Hirnschnittpräparate in der verwendeten Schichtdicke weisen eine hohe Neuronen-Dichte auf, wodurch das Phänomen der Doppelbrechung begünstigt wird (Dodt und Zieglgansberger 1994; Dodt et al. 2002). Um die hohe Lichtstreuung zu reduzieren, wurde IR-Strahlung mit einer Wellenlänge (λ) von $780\ \text{nm}$ sowie die sog. Gradientenkontrast (GC)-Methode eingesetzt (Dodt und Zieglgansberger 1990; Dodt, Becker und Zieglgansberger 2013). Durch die Kombination dieser Ansätze lassen sich Neurone in einer Tiefe von bis zu $100\ \mu\text{m}$ im vitalen Hirnschnitt gut darstellen (Dodt und Zieglgansberger 1994). Zum schematischen Versuchsaufbau der IR-Videomikroskopie und zur GC-Methode siehe **Abbildung 4**.

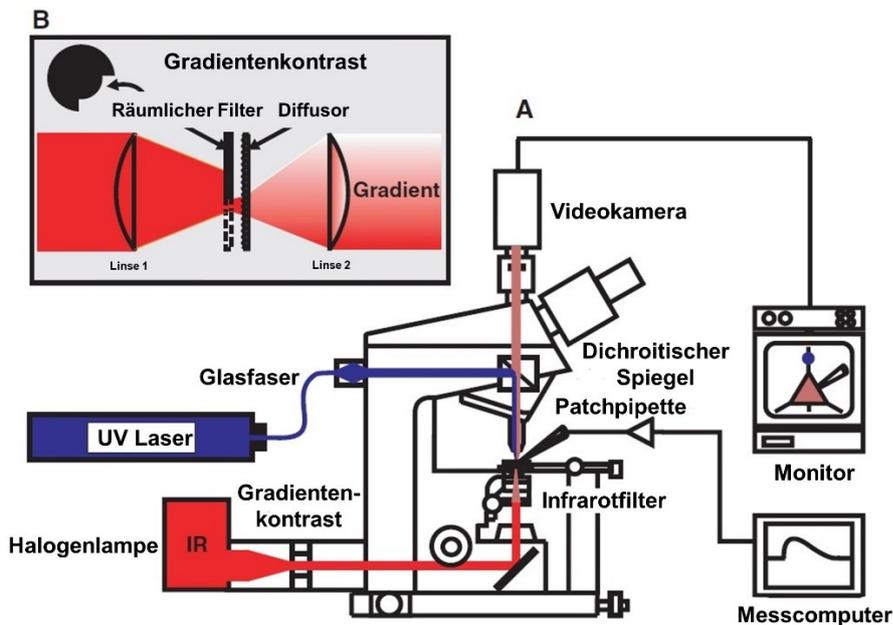


Abb. 4: Infrarot-Videomikroskopie und Gradientenkontrastmethode (Dodt et al. 2002)

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Visualisierung von Neuronen mittels Infrarot (IR)-Videomikroskopie. Die Visualisierung wird durch Verwendung von IR-Strahlung, der Gradientenkontrast (GC)-Methode sowie kontrastverstärkender Videotechnik erzielt. Die hier abgebildete Versuchsanordnung beinhaltet auch einen UV-Laser, der eine Stimulation von Neuronen ermöglicht und im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Anwendung kam. (B) Funktionsweise der GC-Methode. Die Blendenebene des Kondensators wird durch ein Linsensystem zwischen Lichtquelle und Mikroskop abgebildet, um räumliche Filterung zu ermöglichen. Dies erfolgt durch eine Blende mit Viertelringspalt im Strahlengang, so dass nur ein Teil des Lichtkegels passiert. Mit einem konsekutiven Diffusor wird ein Beleuchtungsgradient über der Blendenebene erzeugt. Dies führt zu weniger Streulicht und einer verbesserten Visualisierungstiefe. Text und Abbildung verändert nach Dodt et al. (2002).

Für die Inspektion der Hirnschnitte wurden Durchlichtmikroskope (Axioscop FS, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: BX51WI, Olympus, Center Valley, USA) verwendet, die über Wasser-Immersionsojektive mit 60facher Vergrößerung (Numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland) bzw. 40facher Vergrößerung (für $\alpha 4^{-/-}$: Numerische Apertur: 0,65; Olympus, Center Valley, USA) verfügten. Nachdem ein IR-Interferenzfilter ($\lambda = 780 \pm 5 \text{ nm}$) im Strahlengang platziert wurde, konnte das vergrößerte Bild mit Hilfe von IR-empfindlichen Digitalkameras, sog. CCD (für *charged coupled device*)-Kameras (ORCA-Flash4.0 LT, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: ORCA-05G, Hamamatsu Photonics, Bridgewater Township, USA) in Echtzeit auf einen Monitor übertragen werden.

2.4. Elektrophysiologie

2.4.1. Versuchsaufbau

Nach dem Transfer der Hirnschnitte in die Messkammer des Patch-Clamp-Messaufbaus erfolgte die Fixierung am Kammerboden mit Hilfe einer mit Nylonfäden bespannten Platinspange, die in Eigenfertigung hergestellt wurde. Hierdurch konnten Strömungsartefakte infolge der pulsierenden Pumpenförderung reduziert werden. Zur Steuerung der Patch-Pipette

kamen Mikromanipulatoren zum Einsatz (Remote Control SM7, Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: MPC-200/ROE 200, Sutter Instrument, Novato, USA). Der Versuchsaufbau befand sich auf einem schwingungs isolierten Labortisch mit pneumatischer Niveauregelung und innerhalb eines faradayschen Käfigs zur Abschirmung gegen äußere elektrische Felder. Alle Versuche dieser Arbeit wurden bei Raumtemperatur (20–24 °C) durchgeführt.

2.4.2. Ganzzellaufleitung

Die elektrophysiologischen Ableitungen der TK-Schaltneurone erfolgte mit der Patch-Clamp-Technik (Neher, Sakmann und Steinbach 1978). Dabei kamen feine Glaspipetten zum Einsatz, die eine Messelektrode und Pipettenlösung enthielten. Als Messelektrode fungierte chlorierter Silberdraht, der mit einem Patch-Clamp-Verstärker (SEC-10L, npi electronic, Tamm, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: MultiClamp 700B, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verbunden war. Zunächst wurde die Pipettenspitze unter Sichtkontrolle der Zellmembran des Neuronensomas angenähert. Dabei wurden auftretende Offsetpotentiale und das Übergangspotential (sog. *liquid junction potential*) korrigiert. Sobald die Pipettenspitze die Zellmembran leicht berührte, konnte durch die Applikation von Unterdruck ein sehr hoher Abdichtwiderstand zwischen dem Pipettenrand und der Zellmembran erzeugt werden, der im Gigaohm-Bereich (G Ω) liegt und als „Gigaseal“ bezeichnet wird (sog. „Cell-Attached“-Konfiguration, Hamill et al. (1981)). Der an der Ausbildung des Gigaseals beteiligte Membranabschnitt, auch „Patch“ genannt, wurde durch erneute Anwendung von Sog in der Pipettenöffnung rupturiert, wodurch eine Ganzzellaufleitung hergestellt werden konnte (sog. „Whole-Cell“-Konfiguration). So entstand ein Zugang mit geringem Widerstand zum Zytoplasma des intakten Neurons, was die exakte Messung des Membranpotenzials im sog. Current-Clamp-Modus sowie des Summationsstroms von membranständigen Ionenkanälen im sog. Voltage-Clamp-Modus ermöglichte (Sakmann und Neher 1984; Blanton, Lo Turco und Kriegstein 1989). Zudem konnte über die Pipettenöffnung die zytoplasmatische Lösung durch die Pipettenlösung modifiziert werden (Rettinger, Schwarz und Schwarz 2018). Zum Ablauf der Etablierung einer Ganzzellaufleitung siehe **Abbildung 5**. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Messungen als Ganzzellaufleitungen in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt.

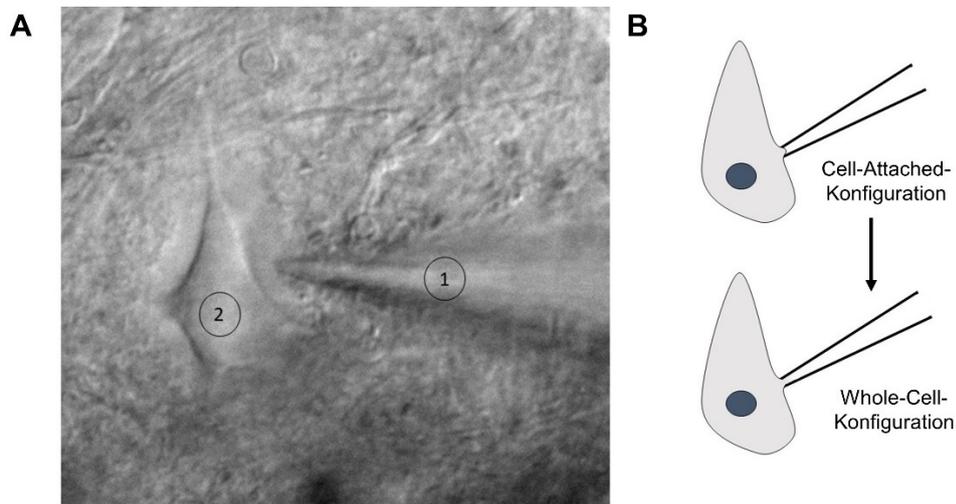


Abb. 5: Etablierung der Ganzzelleableitung bei einem TK-Schaltneuron

(A) Zu sehen ist, wie unter IR-Videomikroskopie die Patch-Pipette **(1)** dem Soma eines TK-Schaltneurons **(2)** angenähert wird. Ein zuvor angelegter Überdruck wird in dieser Phase des Patch-Vorgangs reduziert. Dieser soll eine Verunreinigung der Pipettenspitze verhindern und für bessere Sichtverhältnisse im Hirnschnittpräparat sorgen. **(B)** Sobald die Pipettenspitze Kontakt zur Zellmembran hat, kann durch vorsichtige Applikation von Unterdruck die sog. Cell-Attached-Konfiguration hergestellt werden. Diese zeichnet sich durch einen Abdichtwiderstand im $G\Omega$ -Bereich aus (sog. Gigaseal). Durch erneuten Sog kann die Zellmembran eröffnet werden. Dies wird als Whole-Cell-Konfiguration bezeichnet und ermöglicht eine Ganzzelleableitung des Neurons.

2.4.3. Pipetten und Intrazellulärlösungen

Zur Herstellung der Pipetten für die Patch-Clamp-Messungen wurden extradünne Kapillaren aus Borosilikatglas mit Filament verwendet (Innendurchmesser: 1,17 mm; Außendurchmesser: 1,5 mm; GB150EFT-10, Science Products, Hofheim, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: Innendurchmesser: 1,12 mm; Außendurchmesser: 1,5 mm; TW150F-4, World Precision Instruments, Sarasota, USA). Mit Hilfe von Mikropipetten-Zuggeräten (DMZ Universal Electrode Puller, Zeitz-Instrumente, Martinsried, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: P-1000 Flaming/Brown, Sutter Instrument, Novato, USA) wurden die Glaskapillaren ausgezogen, bis die Pipettenspitzen einen Öffnungsdurchmesser von ca. 1 μm mit einem korrespondierenden Gleichstromwiderstand von 4 bis 7 M Ω im befüllten Zustand aufwiesen. Das anschließende Hitzepolieren der Pipettenspitze förderte die Entstehung eines Gigaseals (Rubaiy 2017; Rettinger, Schwarz und Schwarz 2018).

Die in der Pipette befindliche Lösung wird als Intrazellulärlösung (IZ) bezeichnet. Für optimale Bedingungen zur Ableitung bestimmter Ionenkanal-Klassen wurde die Zusammensetzung der IZ entsprechend angepasst. Die IZ zur Ableitung der HCN-Kanal-vermittelten Ströme wies folgende Zusammensetzung auf (Konzentrationen in mM): K-Gluconat: 130; NaCl: 5; MgCl₂-Hexahydrat: 2; HEPES: 10; EGTA: 0,5; ATP-K₂: 2; GTP-Na₂: 0,3. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,25 erfolgte mit Kaliumhydroxid (KOH). Die IZ zur Ableitung der GABA_A-R-vermittelten Ströme wies demgegenüber die folgende Zusammensetzung auf

(Konzentrationen in mM): KCl: 140; NaCl: 5; EGTA: 0,1; HEPES: 10 mM; ATP-Mg²⁺: 2; GTP-Na₂: 0,3; Phosphokreatin TRIS: 20 bzw. Phosphokreatin Natriumsalzhydrat: 5 mM (für $\alpha 4^{-/-}$). Die Titration des pH-Wertes auf 7,2 erfolgte mit KOH.

2.4.4. Charakterisierung von TK-Schaltneuronen

Nach Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration wurde frühestens nach fünf Minuten mit der Stimulation der Zelle begonnen, um stabile Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Aufgrund ihrer spezifischen intrinsischen Eigenschaften konnten TK-Schaltneurone elektrophysiologisch identifiziert werden. Im Current-Clamp-Modus wurden pro Messpunkt jeweils acht hyperpolarisierende Strompulse mit einer Stärke von -350 pA für eine Dauer von 500 ms in die abgeleitete Zelle injiziert. Hierunter demonstrierten TK-Schaltneurone eine atypische Rektifizierung des Membranpotenzials (sog. *Voltage Sag*), die HCN-Kanal-abhängig durch den Kationenstrom I_h vermittelt wird (Datunashvili et al. 2018). Zur Berechnung des *Voltage Sags* wurde die Differenz zwischen dem Punkt der maximalen Deflexion der Spannungskurve sowie der stationären Plateauphase des Membranpotenzials am Ende des hyperpolarisierenden Stromimpulses ermittelt (Datunashvili et al. 2018). Die resultierenden acht Spannungsantworten wurden im Anschluss graphisch gemittelt und ausgewertet. Durch die Repolarisation werden T-Typ-Calciumkanäle aktiviert, die eine Salve von Aktionspotenzialen (sog. *Rebound Burst*) induzieren (Zeldenrust, Chameau und Wadman 2018). Anschließend zeigt sich eine langsame Nachdepolarisation (ADP: Afterdepolarization), die ebenfalls durch den Kationenstrom I_h vermittelt wird (Bal und McCormick 1996). Siehe hierzu auch **Abbildung 6**.

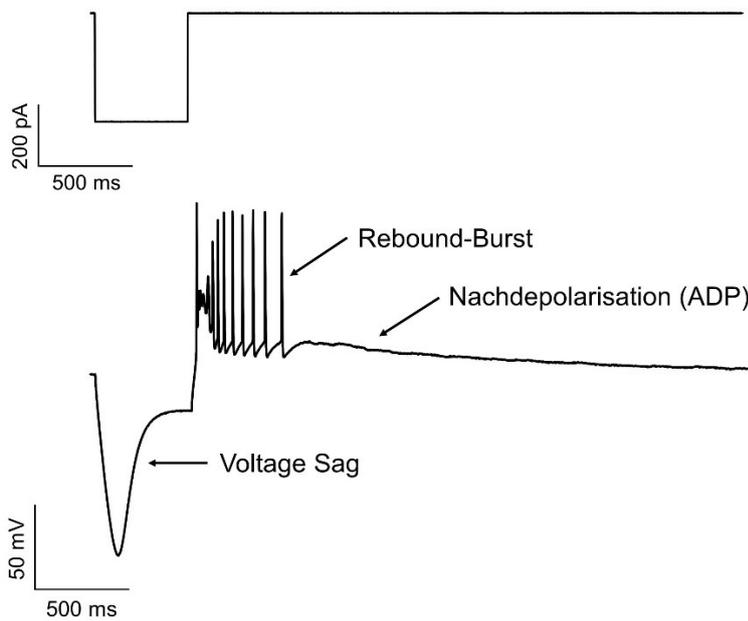


Abb. 6: Elektrophysiologische Charakterisierung von TK-Schaltneuronen

Durch Injektion eines hyperpolarisierenden Strompulses von -350 pA für 500 ms können im Fall von TK-Schaltneuronen spezifische Ionenkanal-abhängige Effekte induziert werden, die ihre elektrophysiologische Identifizierung erlauben. Zunächst kommt es zu einer rektifizierenden Depolarisation, auch *Voltage Sag* genannt. Im Anschluss folgen eine als *Rebound Burst* bezeichnete Salve von Aktionspotenzialen sowie eine Nachdepolarisation (ADP: *afterdepolarization*). Sowohl *Voltage Sag* als auch ADP werden maßgeblich durch den Kationenstrom I_h vermittelt und können durch den HCN-Kanal-Blocker Caesium aufgehoben werden (Bal und McCormick 1996). Ableitung im Current-Clamp-Modus unter Zugabe von 150 μM Ba^{2+} .

Alle HCN-Kanal-bezogenen Messungen erfolgten unter Zugabe von 150 μM Ba^{2+} zur Extrazellulärlösung. In dieser Konzentration blockiert Ba^{2+} sog. einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle (K_{ir}) und K_{2P} -Kanäle, wie TASK- und TREK-Kanäle (Meuth et al. 2003). Hierdurch lässt sich der durch HCN-Kanäle vermittelte Kationenstrom I_h pharmakologisch isolieren (Budde et al. 2008). Dabei kommt es durch Ba^{2+} zu einer Depolarisation des RMPs und einer Erhöhung des Membranwiderstands (R_M). Darüber hinaus bewirkt Ba^{2+} eine Demaskierung des *Voltage Sags* und führt zu einer Erhöhung der Aktionspotenzial-Frequenz unter Stimulation (Datanashvili et al. 2018).

2.4.5. HCN-Kanal

Die Messung des HCN-Kanal-vermittelten Kationenstroms I_h erfolgte im Voltage-Clamp-Modus. Ausgehend von -43 mV wurde I_h durch eine stufenweise Hyperpolarisation des Membranpotenzials der abgeleiteten Zelle um 10 mV bis zu maximal -133 mV aktiviert. Jeder Spannungssprung ging mit einer Verkürzung der Pulslänge um $1,5$ s einher, ausgehend von $15,5$ s bei -43 mV bis zu 2 s bei -133 mV. Durch die Verkürzung konnten stabile Messbedingungen gewährleistet werden. Gleichzeitig wurde die Aussagekraft der Ableitungen hierdurch nicht beeinträchtigt, da HCN-Kanäle mit zunehmender Hyperpolarisation eine

schnellere Aktivierungskinetik aufweisen (Mattusch et al. 2015). Zum Ende jedes Spannungsintervalls erfolgte ein Spannungssprung auf -103 mV, um deaktivierende Ströme zu messen (sog. *tail currents* oder I_{Tail}). Siehe hierzu **Abbildung 7**.

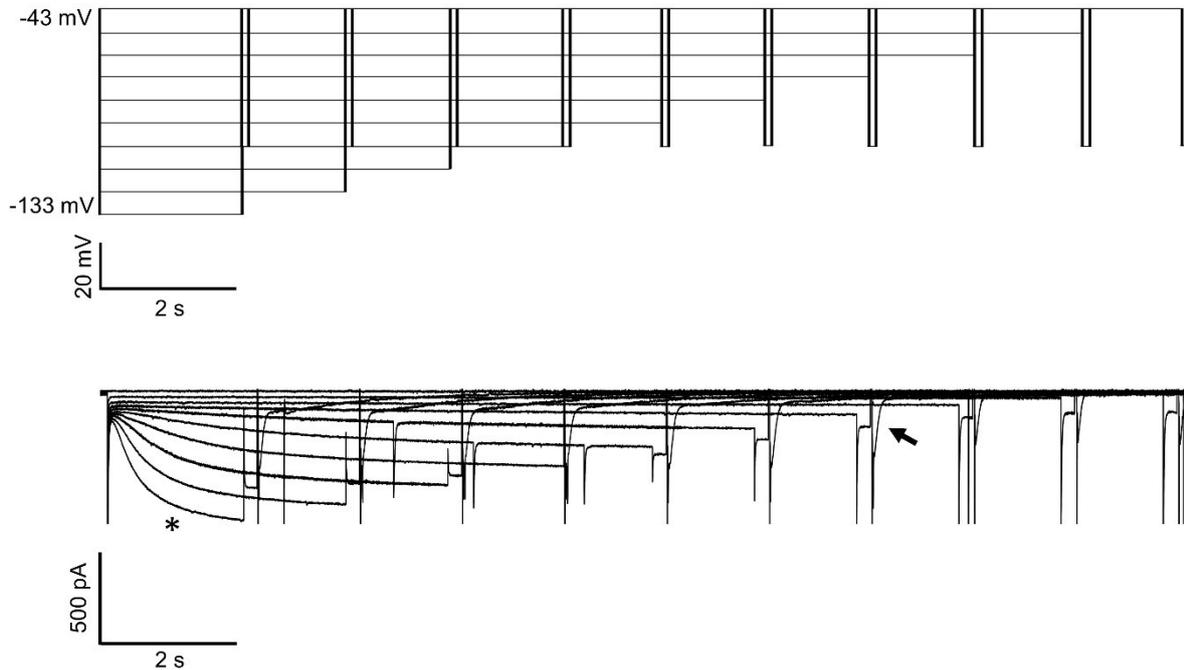


Abb. 7: Spannungsprotokoll: HCN-Kanal-vermittelter I_h

Im Rahmen des Messprotokolls wurde die Zellmembran des abgeleiteten TK-Schaltneurons schrittweise um 10 mV hyperpolarisiert. Ausgehend von -43 mV kam es hierdurch zu einer zunehmenden Aktivierung der HCN-Kanal-vermittelten Ströme, zu erkennen an dem langsamen, einwärtsgerichteten Kationstrom I_h (*, exemplarisch markiert für den Spannungspuls bei -133 mV). Am Ende jeder Spannungsstufe wurde die Kommandospannung kurzzeitig auf -103 mV eingestellt, um die deaktivierenden Ströme I_{Tail} zu messen (↑, exemplarisch markiert für den Spannungspuls bei -73 mV). Gleichzeitig wurde zur Gewährleistung stabiler Messbedingungen die Pulslänge bei jedem Spannungsschritt um 1,5 s verkürzt. Ableitung im Voltage-Clamp-Modus unter Zugabe von 150 μM Ba^{2+} .

Mit Hilfe dieser I_{Tail} -Ströme lassen sich sowohl die spannungsabhängige Aktivierung $p(V)$ als auch das sog. Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) bestimmen. Hierfür wurden die I_{Tail} -Ströme zunächst mittels folgender Funktion normalisiert:

$$p(V) = (I - I_{min}) / (I_{max} - I_{min})$$

Dabei stellt I_{max} die Amplitude des I_{Tail} für den Spannungssprung von -133 mV auf -103 mV und I_{min} die Amplitude des I_{Tail} für den Spannungssprung von -43 mV auf -103 mV dar (Mattusch et al. 2015). Im Anschluss erfolgte eine Kurvenanpassung an die normalisierten I_{Tail} -Ströme mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion:

$$\text{Normalisierte } I_{Tail} - \text{Ströme} = 1 / \{1 + \exp[(V_{1/2} - V) / S]\}$$

wobei S für die Steigung der Kurvenanpassung steht. Hiermit lässt sich die spannungsabhängige Aktivierung von HCN-Kanälen gut abbilden (Pape et al. 2005; Ying et al. 2006; Budde et al. 2008; Mattusch et al. 2015).

Die Aktivierungskinetik von HCN-Kanal vermittelten Strömen ist charakterisiert durch einen bi-exponentiellen Verlauf mit den spannungsabhängigen Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} , wobei τ_{fast} die Zeitkonstante darstellt, zur der die Stromamplitude 90 % der Gesamtamplitude beträgt. Die bi-exponentielle Kurvenanpassung zur Ermittlung von τ_{fast} und τ_{slow} erfolgte für das Membranpotenzial -133 mV mit folgender Funktion:

$$\gamma = \gamma_0 + A_1 \exp\left(\frac{-(x - x_0)}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-(x - x_0)}{\tau_2}\right)$$

Dabei wurde für jede Kurvenanpassung eine Verzögerung von ca. 50 ms, die zu Beginn der I_h -Stromspur auftrat, nicht berücksichtigt (Santoro et al. 2000; Ying et al. 2006).

2.4.6. Strom-Spannungsbeziehung und Membraneigenschaften

Unter den gleichen Messbedingungen wie zur Ermittlung von HCN-Kanal vermittelten Strömen wurden Messungen zur Strom-Spannungsbeziehung (IV) durchgeführt. Hierfür wurden im Current-Clamp-Modus 45 Strompulse mit einer Dauer von 500 ms im Abstand von 2 s eingespeist. Die Strominjektion wurde beginnend bei -90 pA schrittweise um je +10 pA bis max. +360 pA erhöht. Aus den aufgezeichneten Veränderungen des Membranpotenzials lassen sich aktive und passive Membraneigenschaften ableiten. Zu Letzteren zählen das RMP und der R_M . Siehe hierzu **Abbildung 8**.

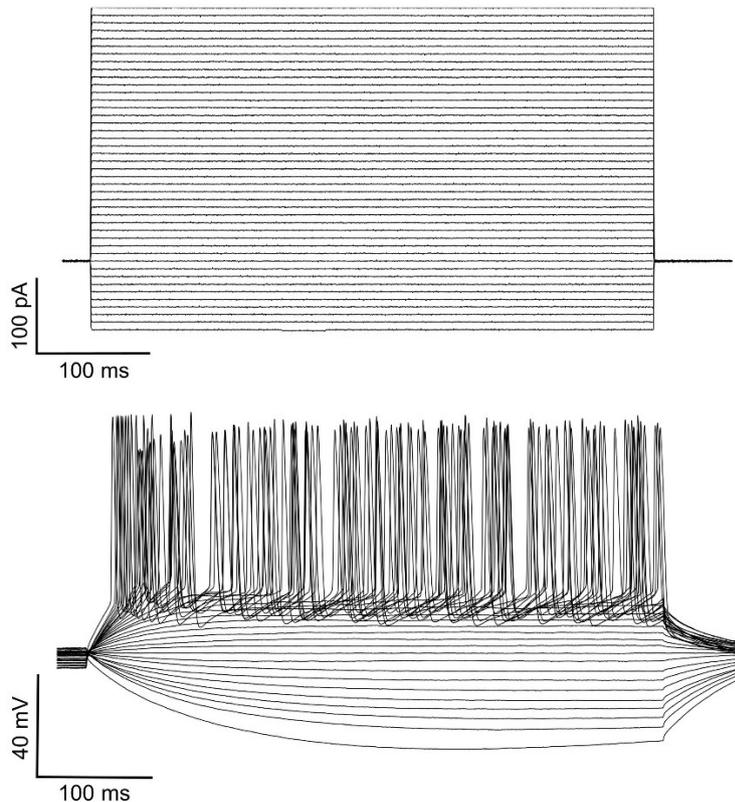


Abb. 8: Strom-Spannungsbeziehung (IV)

Injektion von 45 stufenförmigen Stromimpulsen mit einer Pulslänge von 500 ms. Ausgehend von -90 pA wurde die Zellmembran der abgeleiteten Zelle in Intervallen von 10 pA bis +360 pA zunehmend depolarisiert. Aus den hieraus resultierenden Spannungsantworten ließen sich aktive und passive Membraneigenschaften ermitteln. Das RMP entspricht dabei der gemessenen Spannung bei ausbleibender Strominjektion (0 pA) im Rahmen der IV-Kurve. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur 30 Spannungsantworten bis zu einer Strompulsstärke von +210 pA abgebildet. Ableitung im Current-Clamp-Modus unter Zugabe von 150 μM Ba $^{2+}$.

2.4.7. GABA_A-R: Miniatur inhibitorische postsynaptische Ströme und tonische Inhibition

Die Messung GABA_A-R-vermittelter Ströme erfolgte im Voltage-Clamp-Modus, wobei das Membranpotential der abgeleiteten Zellen konstant bei -70 mV gehalten wurde. Zudem wurde eine IZ mit angepasster Zusammensetzung verwendet (s. oben).

Zur Beurteilung der Wirkung von Sevofluran auf die phasische Komponente der GABA_A-R-vermittelten Inhibition wurden sog. *miniature inhibitory postsynaptic currents* (mIPSCs) gemessen. Es handelt sich bei mIPSCs um inhibitorische postsynaptische Ströme, die unabhängig von präsynaptischen Aktionspotenzialen durch spontane Exozytose einzelner GABAerger Vesikel zustande kommen (Ropert, Miles und Korn 1990; Pinheiro und Mülle 2008). Analog zu Aktionspotenzial-unabhängigen exzitatorischen postsynaptischen Strömen lassen sich mittels mIPSCs die an der inhibitorischen synaptischen Transmission beteiligten Prozesse genauer charakterisieren (Queenan, Lee und Pak 2012). So spricht eine Zunahme der Amplitude eher für eine Wirkung auf postsynaptischer Ebene, wie zum Beispiel eine

erhöhte Dichte oder Leitfähigkeit von postsynaptischen Rezeptoren (O'Brien et al. 1998). Demgegenüber weist eine Zunahme der Frequenz postsynaptischer Ströme auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Terminale (Murthy et al. 2001) oder auf strukturelle Veränderungen im Sinne einer Zunahme der funktionellen Synapsen (Malenka und Nicoll 1997) hin.

Einzelne mIPSCs wurden durch das automatische Detektionsprotokoll der Software Mini Analysis (Synaptosoft, Fort Lee, USA) erkannt und im Anschluss manuell kontrolliert. Erhoben wurden Daten über Frequenz, Amplitude, Ladungstransfer, Aktivierungszeit (*rise time*, Zeit, innerhalb welcher es zu einer Aktivierung des inhibitorischen postsynaptischen Stroms von 10 % auf 90 % kommt (Maniezzi et al. 2019)) sowie Deaktivierungszeitkonstante (τ_d : Zeit, innerhalb welcher es zu einer exponentiellen Abnahme des inhibitorischen postsynaptischen Stromflusses auf 37 % im Vergleich zu seinem Spitzenwert kommt (Maniezzi et al. 2019)). Zur Ermittlung von τ_d wurden die erhobenen mIPSCs graphisch gemittelt und entsprechend des Mittelpunkts ihrer Aktivierungszeit ausgerichtet. Anschließend wurde eine mono-exponentielle Kurvenanpassung vorgenommen.

GABA_A-R-vermittelte mIPSCs wurden unter Kontrollbedingungen sowie nach 20-minütiger Applikation von 690 μ M Sevofluran gemessen. Das unter Berücksichtigung der gegebenen Ionenkonzentrationen berechnete Nernst-Potenzial für Cl⁻ (E_{Cl})⁸ betrug +1 mV, so dass die gemessenen mIPSCs bei dem vorgegebenen Membranpotenzial von -70 mV als einwärts gerichtete Ströme erschienen. Durch Zugabe einer sättigenden Konzentration des GABA_A-R-Antagonisten Bicucullin (10 μ M) am Ende der Sevofluran-Applikation konnte das Auftreten von mIPSCs vollständig aufgehoben werden. Hierdurch ließ sich verifizieren, dass die gemessenen Ströme tatsächlich von GABA_A-Rs vermittelt wurden.

Der Einfluss von Sevofluran auf die tonische, GABA_A-R-vermittelte Inhibition ließ sich indirekt ermitteln. Hierfür wurde die Veränderung des injizierten Haltestroms analysiert, der notwendig war, um die abgeleitete Zelle auf dem vorgegebenen Membranpotenzial von -70 mV zu halten. Zudem wurde nach Applikation von Sevofluran der GABA_A-R-Antagonist Bicucullin (10 μ M) in die Extrazellulärlösung gegeben. Dies bewirkte eine Blockade sowohl der tonischen Inhibition als auch der phasischen, GABA_A-R-vermittelten Ströme, weshalb die Varianz des Haltestroms abnahm und das Messsignal deutlich weniger „verrauscht“ erschien (Farrant und Nusser 2005).

Für die quantitative Analyse der Veränderung des Haltestroms wurden aus 10-Sekunden langen Intervallen Histogramme generiert, in denen die Strom-Amplituden entsprechend ihrer Häufigkeitsverteilung graphisch dargestellt wurden (sog *all-point*-Histogramme). Im Anschluss

⁸Nernst-Potenzial: $\Delta E_N = -\frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{c_i}{c_o}\right)$ (Rettinger, Schwarz und Schwarz 2018)

wurde an die Histogramme eine Kurvenanpassung mittels Gauß-Funktion⁹ vorgenommen. Die Spitzen dieser Kurven entsprachen dabei den mittleren Werten des Haltestroms, die in die Auswertung eingingen (Bright und Smart 2013a; Maniezzi et al. 2019). Dabei konnte der Einfluss von Sevofluran auf die tonische Inhibition anhand der Differenz des mittleren Haltestroms quantifiziert werden ($\emptyset Haltestrom_{[Sevofluran]} - \emptyset Haltestrom_{[Kontrolle]}$).

Alle Messungen erfolgten unter der Zugabe von TTX (1 μ M) zur Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle, damit die Freisetzung von GABA durch spontane Aktionspotenziale ausgeschlossen werden konnte. Zudem enthielt die Extrazellulärlösung den spezifischen NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-AP5 (50 μ M), den spezifischen GABA_B-Rezeptor-Antagonisten CGP 55845 (5 μ M) sowie den spezifischen AMPA- und Kainat-Rezeptor-Antagonisten NBQX (5 μ M) bzw. DNQX (für $\alpha 4^{-/-}$: 20 μ M). Hierdurch konnten die GABA_A-R-vermittelten Ströme pharmakologisch isoliert werden.

2.5. Applikation und Konzentrationsbestimmung von Sevofluran

Für die Applikation des volatilen Anästhetikums Sevofluran (Sevorane, Abbott, Baar, Schweiz; für $\alpha 4^{-/-}$: Sevoflurane, USP, Baxter, Deerfield, USA) wurde ein Narkosemittelverdampfer (Dräger Vapor 19.3 für Sevofluran, Drägerwerk, Lübeck, Deutschland) in die Carbogengaszufuhr integriert. Das als Trägergas fungierende Carbogengas konnte aufgrund der variablen Bypassfunktion des Verdampfers bei Bedarf mit Sevofluran in unterschiedlichen Konzentrationen angereichert werden. Die Einstellung der Sevofluran-Konzentration erfolgte mittels Handrad am Vapor. Zudem wurde ein kontinuierliches Monitoring des applizierten Carbogengases und Sevoflurans mittels Narkosegasmonitors (Capnomac Ultima, Datex Ohmeda, Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Der Einfluss von Sevofluran auf HCN-Kanal-vermittelte Ströme sowie aktive und passive Membraneigenschaften wurde am Vapor mit den Volumenprozent-Werten 0,4 %, 1,3 %, 1,8 %, 3,2 % und 8 % untersucht. Für den Einfluss von Sevofluran auf die GABA_A-R-vermittelten Ströme wurde ein Wert von 3,2 % verwendet. Im Fall von Mäusen entsprechen dabei 3,2 % Sevofluran im Mittel einer MAC von 1,0 (Ichinose et al. 1998). In diesem Zusammenhang muss allerdings berücksichtigt werden, dass die *in vitro* Versuche bei Raumtemperatur (20–24 °C) durchgeführt wurden und die MAC von volatilen Anästhetika in der Gasphase eine deutliche Temperaturabhängigkeit aufweisen. So sinkt die MAC bei niedrigeren Umgebungstemperaturen (Franks und Lieb 1996; Jenkins, Franks und Lieb 1999). Deshalb wurde zusätzlich die Konzentration von Sevofluran in der flüssigen Phase bestimmt.

⁹Gauß-Funktion: $f(x) = \sum_{i=1}^n A_i \frac{e^{-(x-\mu_i)^2/2\sigma_i^2}}{\sigma_i\sqrt{2\pi}} + C$

Um aus den applizierten Volumenprozent-Werten die entsprechende Massenkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] bzw. Stoffmengenkonzentration [μM] des in der Extrazellulärlösung gelösten Sevoflurans ermitteln zu können, wurden nach 20-minütiger Sättigung der Extrazellulärlösung mit Sevofluran in einer Gaswaschflasche Proben aus der Messkammer des Patch-Clamp-Setups entnommen. In Kooperation mit der Firma *Intertek (Schweiz) AG* (Reinach, Schweiz) wurde aus diesen Proben die entsprechenden Massekonzentrationen mittels Headspace-Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (Headspace-GC/MS) bestimmt und anschließend die Stoffmengenkonzentrationen berechnet.

Als Extrazellulärlösung fungierte dabei mit Carbogengas gesättigte aCSF in folgender Zusammensetzung (Konzentrationen in mM): NaCl: 125; KCl: 2,5; NaH_2PO_4 -Monohydrat: 1,25; D(+)-Glucose-Monohydrat: 25; NaHCO_3 : 25; MgCl_2 -Hexahydrat: 1; CaCl_2 -Dihydrat: 2.

Für die Zirkulation der Extrazellulärlösung zwischen Gaswaschflasche und Messkammer des Patch-Clamp-Setups wurden peristaltische Schlauchpumpen (REGLO Analog MS-4/12, ISMATEC, Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland; für $\alpha 4^{-/-}$: MINIPULS 3, Gilson, Middleton, USA) verwendet. Um während der Zirkulation mögliche Verluste von gelöstem Sevofluran zu minimieren, kamen Schläuche aus Polytetrafluorethylen (PTFE-Chemieschlauch, RCT Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz.

2.6. Auswertung und Statistik

Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit HEKA Pulse (Heka Elektronik Dr Schulze, Lambrecht, Deutschland) sowie mit pClamp 10.3 (für $\alpha 4^{-/-}$: Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Für die anschließende Datenanalyse wurden Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA) und Clampfit Version 10.3.2.1 (Molecular Devices, San Jose, USA) verwendet, mIPSCs wurden mit Hilfe von Mini Analysis (Synaptosoft, Fort Lee, USA) ausgewertet.

Für die statistischen Analysen und die Erstellung der Grafiken wurde Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet.

Bei den erhobenen Daten handelt es sich um abhängige bzw. verbundene Stichproben. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde davon ausgegangen, dass die Voraussetzungen für parametrische Testverfahren grundsätzlich nicht erfüllt sind. Deshalb kam der nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zum Einsatz. Für die statistische Analyse von unabhängigen bzw. unverbundenen Stichproben wurde folglich der Mann-Whitney-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgesetzt. Ein Ergebnis wurde als statistisch signifikant bewertet, wenn ein p-Wert von $< 0,05$ vorlag. Dies wird in Grafiken entsprechend durch einen Asterisk gekennzeichnet (*: $p < 0,05$).

Für die Sevofluran-Konzentration von 8 % bzw. 1470 µM wurden insgesamt nur 5 Zellen gemessen und ausgewertet (n = 5), da es sich um eine hohe Konzentration mit limitierter klinischer Relevanz handelt. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs dieser Messreihe konnte mit dem zur Verwendung kommenden Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test grundsätzlich kein p-Wert < 0,05 erzielt werden. Vielmehr sind ermittelte Werte für eine Konzentration von 1470 µM deskriptiver Natur und wurden zur Interpolation herangezogen, wenn Veränderungen bereits in niedrigeren Konzentrationen signifikant waren.

Um zu testen, ob im Vergleich der verschiedenen Messreihen bezüglich der zentralen Tendenzen einer untersuchten Variable signifikante Unterschiede bestehen, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben mit Dunn-Tests als Post-hoc-Testverfahren verwendet (Motulsky 2017).

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve und zur Ermittlung der sogenannten halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀: *half maximal inhibitory concentration*) wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels variabler Steigung und der sog. Methode der kleinsten Quadrate. Hierfür wurden die entsprechenden X-Werte mittels dekadischem Logarithmus transformiert und ggf. Y-Werte normalisiert. Die nicht lineare Regressionsanalyse basierte dabei auf folgendem Modell (Motulsky 2016):

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(\log(IC_{50}-X) \times HillSlope)}}$$

Der sog. *HillSlope* beschreibt dabei als Steigungsparameter die Steigung der Kurve (Motulsky 2016).

Für Korrelationsanalysen zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson als Maß für den Zusammenhang berechnet (Motulsky 2017). Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten r erfolgte gemäß den Vorgaben nach Cohen (1988):

- |r| = 0,1: kleine Effektstärke der Korrelation
- |r| = 0,3: mittlere Effektstärke der Korrelation
- |r| = 0,5: große Effektstärke der Korrelation

Alle Daten werden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM: *standard error of the mean*) bzw. als Mittelwerte mit 95 % Konfidenzintervall (95%-KI) des Mittelwerts angegeben.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurde der Einfluss des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen untersucht.

3.1. Konzentrationsbestimmung von Sevofluran

Nach Etablierung von stabilen Kontrollmessungen erfolgte eine 20-minütige Begasung der Extrazellulärlösung mit Sevofluran in den Volumenprozent-Konzentrationen 0,4 %, 1,3 %, 1,8 %, 3,2 % sowie 8,0 % bei Raumtemperatur (20–24 °C). Die Sevofluran-Konzentrationen wurden dabei mittels Handrad am Vapor eingestellt. Um aus den verwendeten Volumenprozent-Werten die entsprechenden Masse- [$\mu\text{g}/\text{ml}$] bzw. Stoffmengenkonzentrationen [μM] des in der Extrazellulärlösung gelösten Sevoflurans (c_{aq} : *aqueous concentration*) zu bestimmen, wurden Proben aus der Messkammer entnommen und mittels Headspace-Gaschromatographie mit Massenspektromie-Kopplung (Headspace-GC/MS) ausgewertet. Die hierfür verwendeten Volumenprozent-Konzentrationen waren: 0 % ($n = 1$), 0,6 % ($n = 3$), 1,6 % ($n = 3$) und 3,2 % ($n = 3$) Sevofluran. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Masse- und Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq}) von Sevofluran (Headspace-GC/MS)

Massekonzentrationen des in der Extrazellulärlösung gelösten Sevoflurans für applizierte Volumenprozent-Werte wurden mittels Headspace-GC/MS in Kooperation mit der Firma *Intertek (Schweiz) AG* bestimmt. Hieraus wurden die entsprechenden Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq}) sowie Quotienten von Stoffmengenkonzentrationen und Volumenprozent-Werten berechnet ($n = 3$ für jede Konzentration).

Sevofluran [%]	Massekonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Stoffmengenkonzentration (c_{aq})		$c_{\text{aq}}/\%$ [$\mu\text{M}/\%$]
		SEM	[μM]	
0,6	26,8	$\pm 0,48$	134,1	$\pm 2,42$
1,6	89,3	$\pm 3,51$	446,4	$\pm 17,55$
3,2	137,9	$\pm 0,15$	689,5	$\pm 0,76$

In einer früheren Arbeit konnte mittels Gaschromatographie gezeigt werden, dass die c_{aq} der volatilen Anästhetika Sevofluran und Isofluran linear mit den Handradeinstellungen am Vapor korrelieren (Haseneder et al. 2009). Zudem wurde für die Interpolation der übrigen c_{aq} ein bereits publizierter Konzentrations-Wert für eine bei Raumtemperatur maximal mit Sevofluran gesättigte Extrazellulärlösung herangezogen (Haseneder et al. 2002), siehe **Abbildung 9** und **Tabelle 2**.

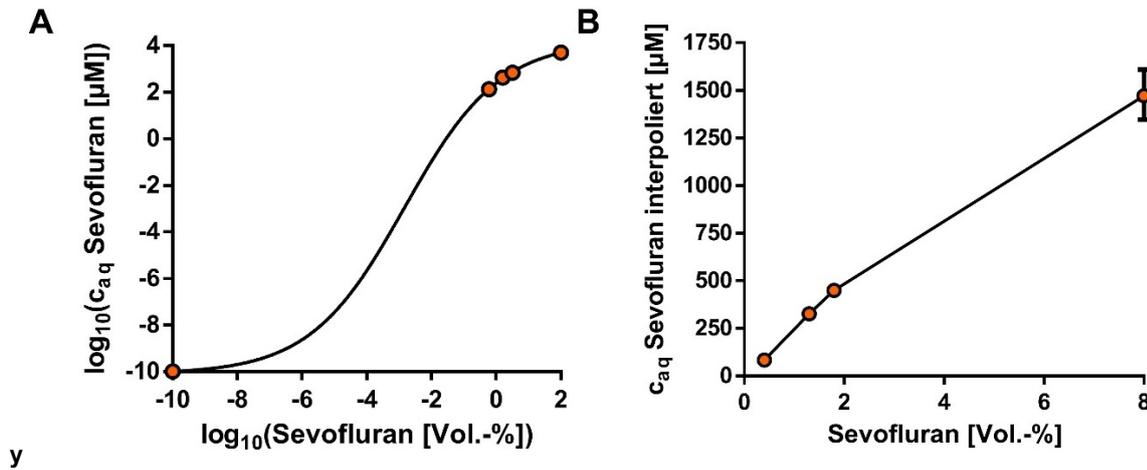


Abb. 9: Nicht-lineare Regressionsanalyse und Interpolation der Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq})

(A) Die mittels Headspace-GC/MS ermittelten c_{aq} des in Extrazellulärlösung gelösten Sevoflurans wurden mittels nicht-linearer Regression analysiert (Sigmoidale Kurvenanpassung, 4PL-Regressionsmodell, Methode der kleinsten Quadrate, Werte als dekadischer Logarithmus (\log_{10})). (B) Hiermit ließen sich die c_{aq} der übrigen Volumenprozent-Werte interpolieren (Sevofluran 0,4 %: 82,0 μM ; 95%-KI: 71,1–96,7 μM ; Sevofluran 1,3 %: 326,4 μM , 95%-KI: 306,0–347,5 μM ; Sevofluran 1,8 %: 449,4 μM , 95%-KI: 419,7–481,1 μM ; 8,0 %: 1471,5 μM , 95%-KI: 1344,9–1608,8 μM). Angabe Werte als Mittelwerte mit 95%-KI.

Tabelle 2: Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq}) Sevofluran

Angegeben sind die mittels Headspace-GC/MS ermittelten sowie mit Hilfe der nicht-linearen Regressionsanalyse interpolierten c_{aq} von Sevofluran mit den entsprechenden Volumenprozent-Werten. Werte gerundet auf 10er-Stelle.

Sevofluran [%]	Sevofluran c_{aq} [μM]
0,4	80
1,3	330
1,8	450
3,2	690
8,0	1470

3.2. Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit

Zunächst wurde ermittelt, inwieweit Sevofluran in verschiedenen Konzentrationen die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen beeinflusst. Hierfür wurden die Effekte auf aktive und passive elektrische Eigenschaften der neuronalen Zellmembran untersucht, die sich aus den Strom-Spannungsbeziehungs-Kurven ermitteln ließen.

Bezüglich des Ruhemembranpotenzials (RMP) wurde zunächst ausgeschlossen, dass sich die einzelnen Messreihen unter Kontrollbedingungen signifikant unterscheiden, siehe **Abbildung 10 A**. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden zudem die Messwerte unter Kontrollbedingungen auf 1,0 normalisiert und die Wirkung von Sevofluran als relative

Veränderung hiervon angegeben, siehe **Abbildung 10 B**. Dabei zeigte sich, dass es ab einer Konzentration von 690 μM Sevofluran zu einer signifikanten Hyperpolarisation des RMPs kam.

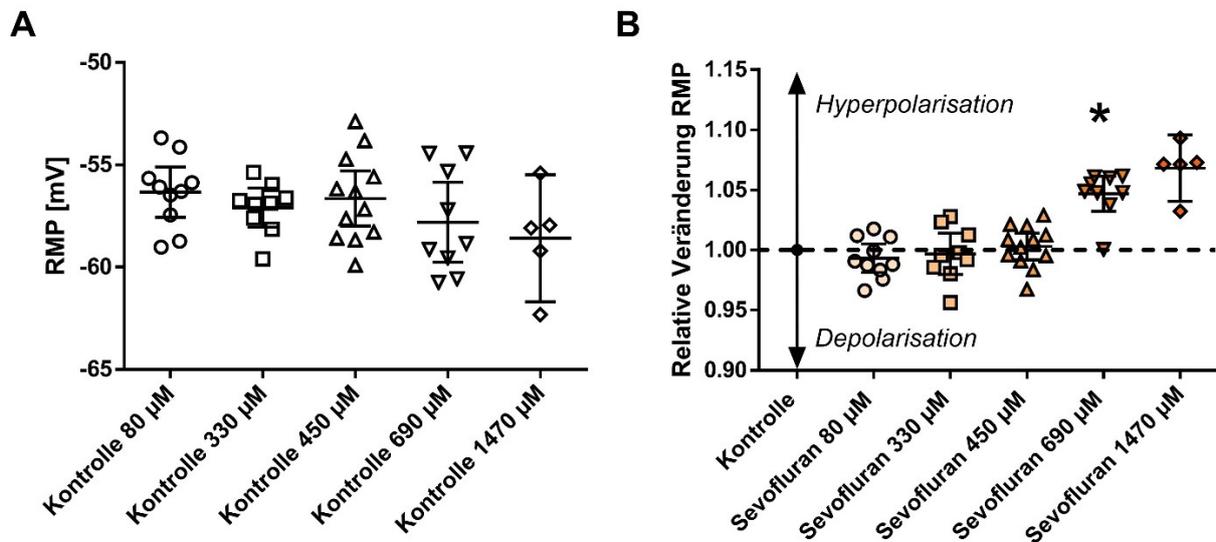


Abb. 10: Vergleich Kontrollgruppen und relative Veränderung RMP

(A) Im Vergleich zwischen den Messreihen zeigten sich bezüglich des RMPs unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede, weshalb von der Vergleichbarkeit der Messreihen ausgegangen werden kann ($p = 0,354$; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test als Post-hoc-Test). Mittelwerte mit 95%-KI. (B) Normalisiert auf die Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) zeigte sich, dass 80 μM (0,993, 95%-KI: 0,981–1,005, $n = 10$, $p = 0,275$), 330 μM (0,997, 95%-KI: 0,970–1,014, $n = 9$, $p = 0,734$) und 450 μM Sevofluran (1,003, 95%-KI: 0,992–1,014, $n = 12$, $p = 0,569$) keine signifikanten Veränderungen des RMPs bewirkten. Unter 690 μM Sevofluran kam es zu einer signifikanten Hyperpolarisation des RMPs (1,047, 95%-KI: 1,032–1,061, $n = 9$, $p = 0,004$). Auch 1470 μM Sevofluran führte zu einer Hyperpolarisation des RMPs (1,068, 95%-KI: 1,041–1,096, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI.

In **Tabelle 3** sind die Effekte von Sevofluran in den unterschiedlichen Konzentrationen auf das RMP in Absolutwerten dargestellt.

Tabelle 3: Die Wirkung von Sevofluran auf das RMP (Absolutwerte)

Die Wirkung von Sevofluran auf das RMP in verschiedenen Konzentrationen als Absolutwerte. Auch hier zeigte sich, dass es unter Sevofluran 690 μM zu einer signifikanten Verschiebung des RMPs in Richtung Hyperpolarisation kommt. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Mittelwerte mit 95%-KI.

Sevofluran [μM]	RMP (Kontrolle) [mV]	95%-KI	RMP (Sevofluran) [mV]	95%-KI	n	p
80	-56,34	-57,57 – -55,10	-55,95	-57,40 – -54,50	10	0,232
330	-57,09	-58,04 – -56,14	-56,91	-58,30 – -55,52	9	0,734
450	-56,64	-57,99 – -55,29	-56,81	-58,32 – -55,30	12	0,569
690	-57,80	-59,75 – -55,85	-60,49	-62,42 – -58,55	9	0,004
1470	-58,59	-61,70 – -55,48	-62,58	-66,28 – -58,88	5	-

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Sevofluran auf den Membranwiderstand (R_M) untersucht. Dabei wurde zunächst sichergestellt, dass sich die einzelnen Messreihen unter Kontrollbedingungen nicht signifikant voneinander unterscheiden, siehe **Abbildung 11 A**. Nach Normalisierung des Effekts von Sevofluran auf die jeweiligen Messungen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) zeigte sich, dass es ab einer Konzentration von 80 μM zu einer signifikanten Abnahme des R_M kam, siehe **Abbildung 11 B**. Zur weiteren Analyse wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit Hilfe einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit variabler Kurvenanpassung sowie der Methode der kleinsten Quadrate erstellt, siehe **Abbildung 11 C**. Hiermit ließ sich der sog. IC_{50} -Wert (*half maximal inhibitory concentration*) ermitteln. Dieser gibt die Konzentration eines Inhibitors an, unter welcher eine halbmaximale Hemmung zu beobachten ist (Sebaugh 2011). Dieser betrug bezogen auf den R_M 908,8 μM (95%-KI: 774,9–1068,0 μM) Sevofluran

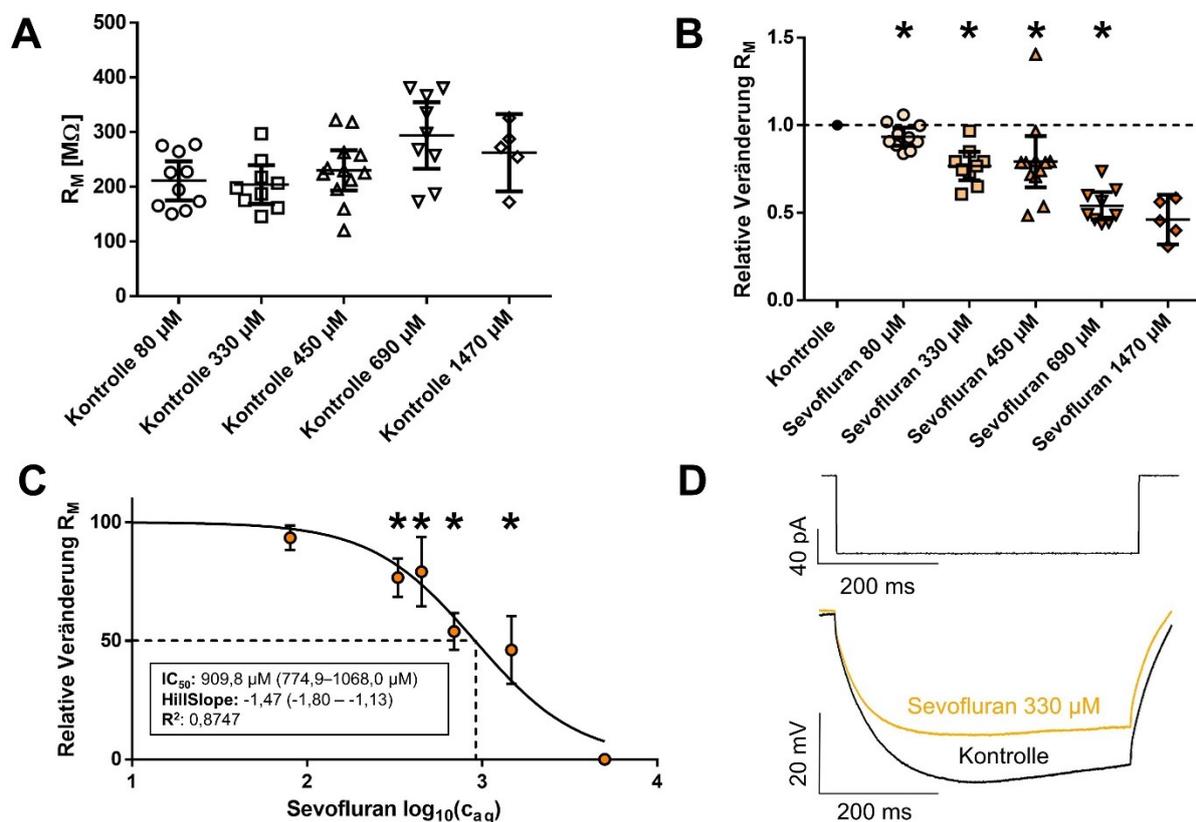


Abb. 11: Einfluss von Sevofluran auf den Membranwiderstand (R_M)

(A) Im Vergleich zwischen den Messreihen zeigten sich hinsichtlich des R_M unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede, weshalb von der Vergleichbarkeit der Messreihen ausgegangen werden kann ($p = 0,051$; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test als Post-hoc-Test). Mittelwerte mit 95%-KI. **(B)** Normalisiert auf die Messergebnisse unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) zeigte sich, dass es ab einer Konzentration von 80 μM Sevofluran zu einer signifikanten Abnahme des R_M kam (0,935, 95%-KI: 0,883–0,986, $n = 10$, $p = 0,027$). Auch 330 μM (0,767, 95%-KI: 0,686–0,848, $n = 9$, $p = 0,004$), 450 μM (0,792, 95%-KI: 0,646–0,938, $n = 12$, $p = 0,021$) und 690 μM Sevofluran (0,540, 95%-KI: 0,462–0,618, $n = 9$, $p = 0,004$) führten zu einer signifikanten Abnahme des R_M . Ebenso bewirkte 1470 μM Sevofluran eine Abnahme des R_M (0,462, 95%-KI: 0,320–0,604, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI. **(C)** Die relativen Veränderungen des R_M unter Sevofluran bezogen auf die Kontrollbedingungen (Kontrolle: 100,0) wurden zur Erstellung einer Dosis-

Wirkungskurve und zur Ermittlung des IC₅₀-Wertes herangezogen. Dabei ließ sich für die relative Veränderung des R_M eine IC₅₀ von 909,8 µM Sevofluran (95%-KI: 774,0–1068,0 µM) mit dem Steigungsparameter „HillSlope“ von -1,47 (-1,80 – -1,13) ermitteln, R²: 0,8747. Die c_{aq} von Sevofluran wurde mittels dekadischem Logarithmus (log₁₀) transformiert. * = p < 0,05, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Tests bezogen auf Messungen unter Kontrollbedingungen. Mittelwerte mit 95%-KI. **(D)** Stimulationsprotokoll und repräsentative Spannungsantworten unter Kontrollbedingungen sowie unter Applikation von 330 µM Sevofluran, die zur Bestimmung des R_M herangezogen wurden.

In **Tabelle 4** sind zusätzlich die Effekte von Sevofluran auf den R_M in Absolutwerten aufgeführt.

Tabelle 4: Die Wirkung von Sevofluran auf das R_M (Absolutwerte)

Die Wirkung von Sevofluran auf den R_M in den verschiedenen Konzentrationen als Absolutwerte. Im Gegensatz zur Analyse der relativen Veränderung ergibt sich erst ab einer Konzentration von 330 µM Sevofluran eine signifikante Abnahme des R_M. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Mittelwerte mit 95%-KI.

Sevofluran [µM]	R _M (Kontrolle) [MΩ]	95%-KI	R _M (Sevofluran) [MΩ]	95%-KI	n	p
80	211,3	175,5–247,0	199,1	158,0–240,2	10	0,065
330	204,3	168,8–239,8	156,2	124,6–187,7	9	0,004
450	230,4	193,7–267,1	178,3	146,7–209,9	12	0,012
690	294,0	233,2–354,8	153,6	130,4–176,8	9	0,004
1470	262,6	191,9–333,3	123,6	71,1–176,0	5	-

Weiterhin wurde der Einfluss von Sevofluran auf das Schwellenpotential untersucht. Wenn die neuronale Zellmembran durch zunehmende Depolarisation das Schwellenpotential erreicht, kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle (Aktionspotential). Das Schwellenpotential ist gekennzeichnet durch den Beginn des steilen Aufstrichs eines Aktionspotenzials (Klinke et al. 2014). Von der grundsätzlichen Vergleichbarkeit der Messreihen konnte dabei ausgegangen werden, siehe **Abbildung 12 A**. Unter Sevofluran-Applikation kam es zu einer signifikanten Verschiebung des Schwellenpotentials in Richtung Depolarisation, eine eindeutige Dosisabhängigkeit war allerdings nicht ersichtlich. Siehe hierzu **Abbildung 12 B**.

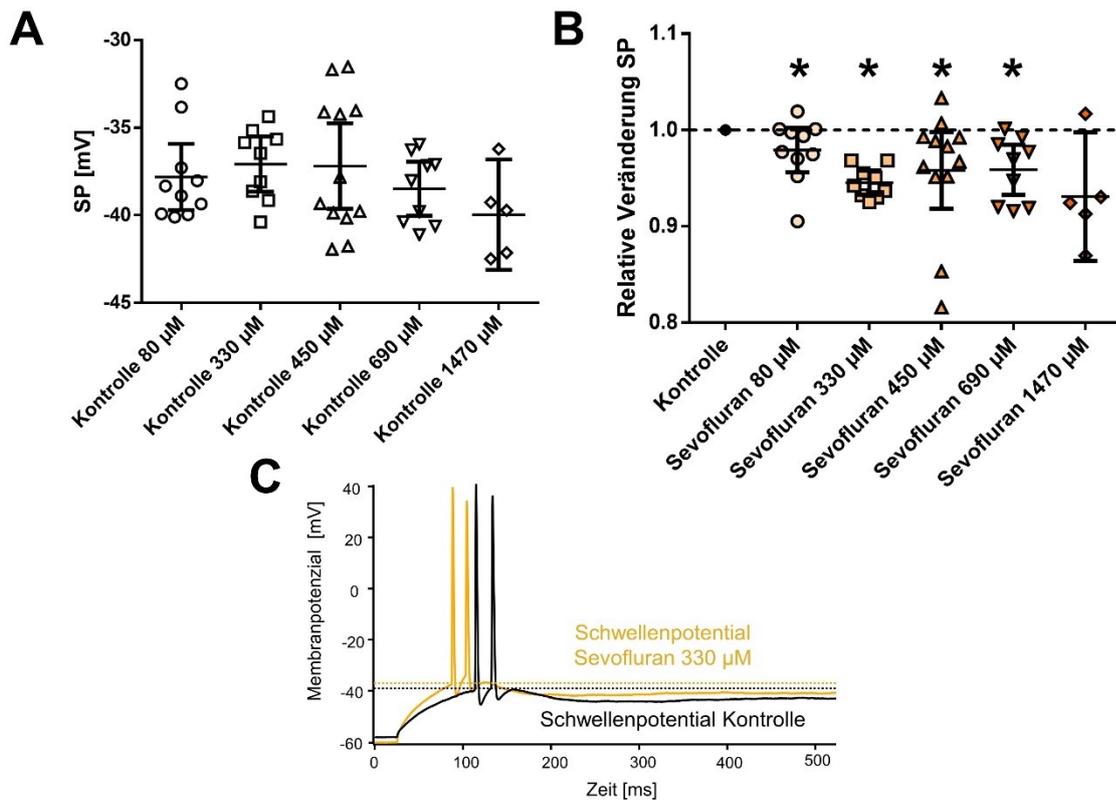


Abb. 12: Einfluss von Sevofluran auf das Schwellenpotential

(A) Der Vergleich des Schwellenpotentials (SP) unter Kontrollbedingungen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messreihen, weshalb die Vergleichbarkeit der Messreihen als gegeben angesehen wird ($p = 0,404$; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test als Post-hoc-Test). Mittelwerte mit 95%-KI. (B) Messwerte unter Sevofluran normalisiert auf Messwerte unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0). Bereits unter 80 μM Sevofluran kam es zu einer signifikanten Verschiebung des Schwellenpotentials in Richtung Depolarisation (0,979, 95%-KI: 0,956–1,002, $n = 10$, $p = 0,049$). Dieser Effekt konnte auch unter 330 μM (0,945, 95%-KI: 0,933–0,958, $n = 9$, $p = 0,004$), 450 μM (0,958, 95%-KI: 0,918–0,998, $n = 9$, $p = 0,012$) und 690 μM Sevofluran (0,959, 95%-KI: 0,933–0,985, $n = 9$, $p = 0,008$) beobachtet werden. Ebenso führten 1470 μM Sevofluran zu einer Verschiebung des Schwellenpotentials (0,931, 95%-KI: 0,864–0,997, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI. (C) Abgebildet sind repräsentative Spannungskurven nach depolarisierender Strom-Injektion (Kontrolle: +110 pA, 330 μM Sevofluran: +180 pA), unter welchen es erstmals zu einem Aktionspotential kam. Dabei wurde das Schwellenpotential unter 330 μM Sevofluran in Richtung Depolarisation verschoben.

Die Wirkung von Sevofluran auf das Schwellenpotential in Absolutwerten wird in **Tabelle 5** aufgelistet.

Tabelle 5: Wirkung von Sevofluran auf das Schwellenpotential (Absolutwerte)

Die Wirkung von Sevofluran auf das Schwellenpotential (SP) in den applizierten Konzentrationen als Absolutwerte. Auch hier zeigte sich, dass es bereits ab einer Konzentration von 80 μM Sevofluran zu einer signifikanten Verschiebung des Schwellenpotenzials in Richtung Depolarisation kam. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test. Mittelwerte mit 95%-KI.

Sevofluran [μM]	SP (Kontrolle) [mV]	95%-KI	SP (Sevofluran) [mV]	95%-KI	n	p
80	-37,8	-39,7 – -35,0	-37,0	-38,8 – -35,3	10	0,049
330	-37,1	-38,7 – -35,5	-35,1	-36,9 – -33,2	9	0,004
450	-37,2	-39,6 – -34,8	-35,7	-38,7 – -32,7	12	0,009
690	-40,2	-42,2 – -38,2	-38,5	-40,0 – -36,0	9	0,008
1470	-40,0	-43,1 – -36,8	-37,2	-40,6 – -33,7	5	-

Zudem wurde der Einfluss von Sevofluran auf die Frequenz der evozierten Aktionspotenziale (AP) untersucht. Dabei konnte von einer Vergleichbarkeit der Messreihen ausgegangen werden, siehe **Abbildung 13 A**. Bezogen auf die relative Veränderung kam es ab einer Konzentration von 330 μM Sevofluran zu einer signifikanten Reduzierung der AP-Frequenz gegenüber den Kontrollbedingungen, siehe **Abbildung 13 B**.

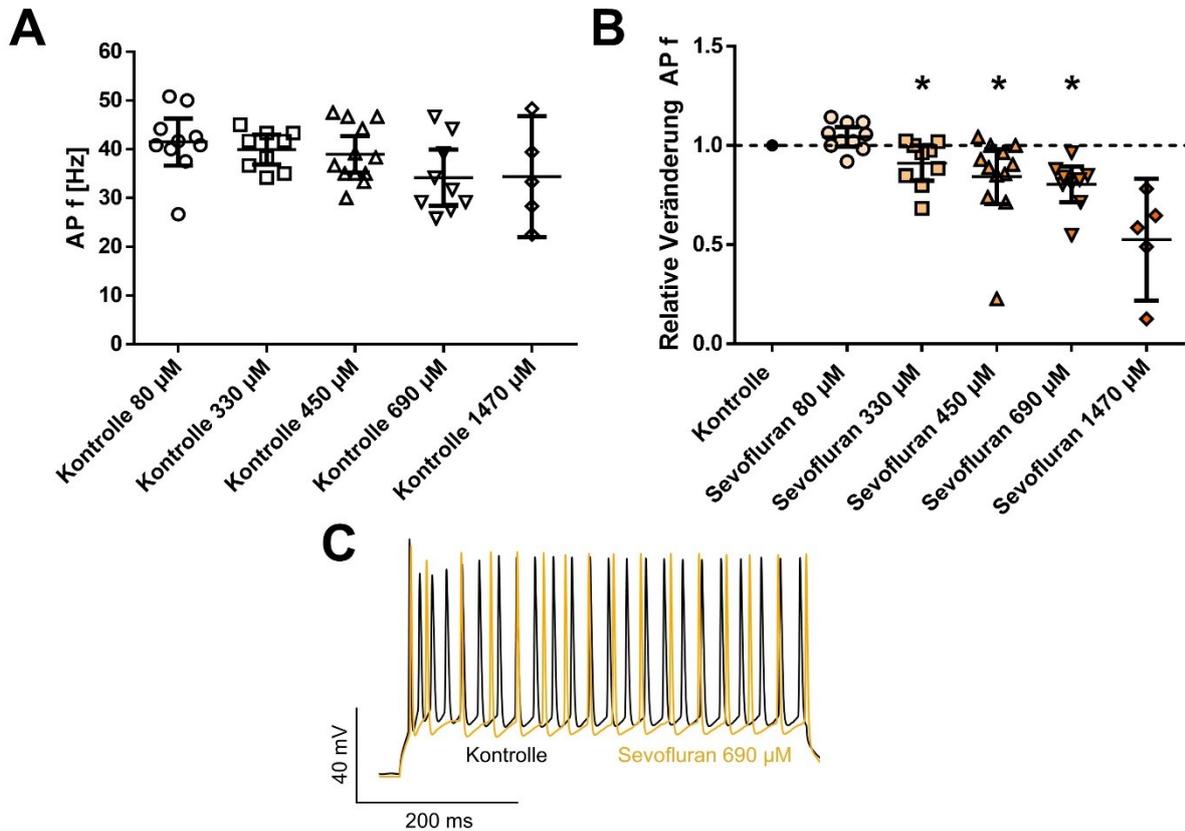


Abb. 13: Einfluss von Sevofluran auf die Aktionspotential-Frequenz

(A) Mit Hinblick auf die Aktionspotential-Frequenz (AP f) unterschieden sich die Messdaten unter Kontrollbedingungen in den verschiedenen Messreihen nicht signifikant voneinander ($p = 0,157$; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test als Post-hoc-Test). Mittelwerte mit 95%-KI. (B) Die Auswertung der auf die Messdaten unter Kontrollbedingungen normalisierten (Kontrolle 1,0), relativen Veränderungen der AP f unter Sevofluran-Applikation ergab, dass es unter 80 µM Sevofluran zu keiner signifikanten Veränderung kam (1,044, 95%-KI: 0,998–1,094, $n = 10$, $p = 0,074$). Ab einer Konzentration von 330 µM Sevofluran konnte eine Abnahme der AP f beobachtet werden (0,9108, 95%-KI: 0,8214–1,000, $n = 9$, $p = 0,039$), ebenso unter 450 µM (0,8431, 95%-KI: 0,7043–0,9819, $n = 12$, $p = 0,006$) und 690 µM Sevofluran (0,8043, 95%-KI: 0,7147–0,8940, $n = 9$, $p = 0,004$). Eine Abnahme der AP f konnte auch in allen Zellen unter 1470 µM Sevofluran beobachtet werden (0,5258, 95%-KI: 0,2179–0,8337, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe. * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI. (C) Repräsentative Spannungskurven nach depolarisierendem Strom-Impuls (+360 pA) im Current-Clamp-Modus. Verglichen wurde die maximale Frequenz von Aktionspotentialen unter Kontrollbedingungen sowie unter Sevofluran-Applikation (690 µM).

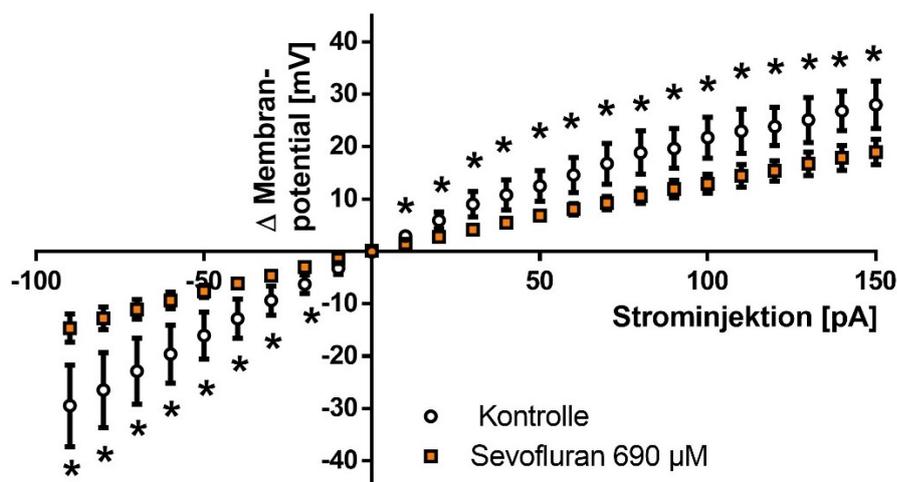
Die Wirkung von Sevofluran auf die AP-Frequenz in Absolutwerten ist in **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 6: Die Wirkung von Sevofluran auf die Aktionspotential-Frequenz (Absolutwerte)

Abgebildet ist der Effekt von Sevofluran auf die AP-Frequenz in verschiedenen Konzentrationen als Absolutwerte. Im Gegensatz zu den relativen Veränderungen (siehe Abbildung 13 B), kam es in Absolutwerten erst ab einer Konzentration von 450 μM Sevofluran zu einer signifikanten Reduzierung der AP-Frequenz. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test, Mittelwerte mit 95%-KI.

Sevofluran [μM]	AP f (Kontrolle) [Hz]	95%-KI	AP f (Sevofluran) [Hz]	95%-KI	n	p
80	41,5	36,7–46,3	43,3	37,9–48,8	10	0,078
330	39,9	36,9–43,0	36,5	31,5–41,5	9	0,065
450	39,0	35,2–42,7	32,8	26,1–39,5	12	0,004
690	34,2	28,4–40,0	28,0	20,1–35,0	9	0,004
1470	34,4	22,0–46,8	18,5	4,5–32,6	5	-

Abschließend wurde für eine Konzentration von 690 μM Sevofluran die Wirkung auf die Strom-Spannungsbeziehung (IV) in TK-Schaltneuronen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Strominjektionen im gesamten Messbereich von -90 pA bis +150 pA in Anwesenheit von 690 μM Sevofluran zu einer signifikanten Depolarisation des Membranpotentials im Vergleich zu Messungen unter Kontrollbedingungen führten, siehe **Abbildung 14**. Dies spricht dafür, dass es trotz Zugabe von 150 μM Ba^{2+} in die aCSF durch Sevofluran zu einer Zunahme sog. Leck-Ströme (*leak currents*) kommt.

**Abb. 14: IV-Kurve Sevofluran 690 μM**

Zur Erstellung einer Strom-Spannungsbeziehung (IV) wurden im Current-Clamp-Modus beginnend von -90 pA bis +150 pA in 10 pA-Schritten Ströme in TK-Schaltneurone ($n = 9$) injiziert und die entsprechende Veränderung (Δ) des Membranpotentials gemessen. Es zeigte sich, dass es bei einer Konzentration von 690 μM Sevofluran zu einer signifikanten Abnahme des Δ Membranpotentials über den gesamten Messbereichs kam. Messungen unter Zugabe von 150 μM Ba^{2+} . Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI.

Zusammenfassend beeinflusste Sevofluran sowohl aktive als auch passive elektrische Membraneigenschaften. Unterschiede zeigten sich bezüglich der jeweiligen Konzentration, ab welcher Sevofluran zu signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollbedingungen führte.

3.3. Die Wirkung von Sevofluran auf HCN-Kanäle

Zur Ermittlung des Einflusses von Sevofluran auf HCN-Kanäle in TK-Schaltneuronen wurden Ganzzellableitungen sowohl im Current-Clamp- als auch im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt.

3.3.1. Die Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag

Im Current-Clamp-Modus demonstrieren TK-Schaltneurone unter Injektion eines hyperpolarisierenden Strompulses (-350 pA) eine transiente Depolarisation des Membranpotentials, den sog. *Voltage Sag* (siehe **Abbildung 15 D**). Dieser wird durch den einwärts gerichteten Kationenstrom I_h vermittelt, wobei im Gegensatz zu anderen Neuronen-Populationen maßgeblich HCN-Kanäle der Isoform 2 beteiligt sind (Moosmang et al. 1999; Ludwig et al. 2003).

Dabei zeigte sich, dass es bereits ab einer Konzentration von 80 μM Sevofluran zu einer signifikanten Reduzierung des relativen *Voltage Sags* kam (**Abbildung 15 B**). Aus den relativen Veränderungen des *Voltage Sags* wurde zudem mittels nicht-linearer Regressionsanalyse eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, um die entsprechende IC_{50} zu ermitteln. Bezüglich des *Voltage Sags* ergaben die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten einen IC_{50} -Wert für Sevofluran von 735,3 μM (95%-KI: 618,3–874,6 μM). Siehe **Abbildung 15 B**.

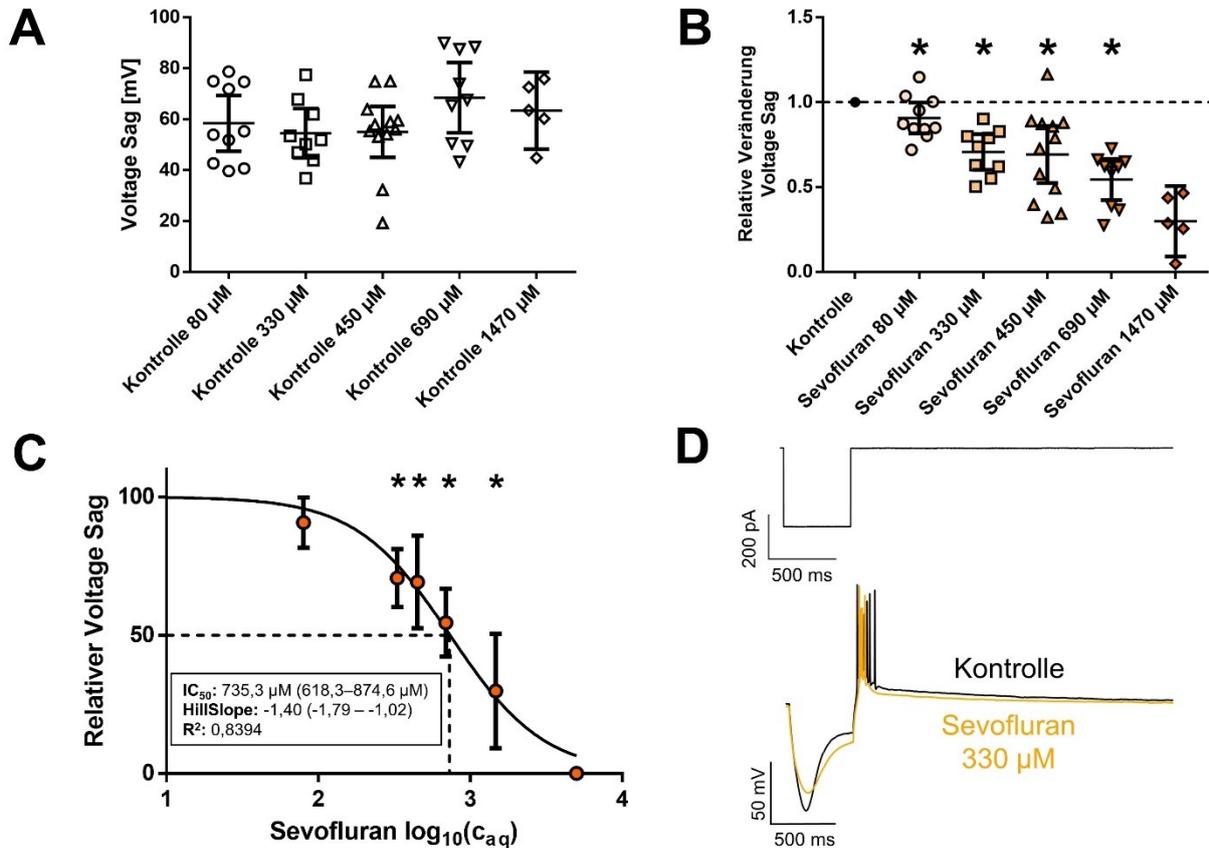


Abb. 15: Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag

(A) Der Voltage Sag unter Kontrollbedingungen unterschied sich in den verschiedenen Messreihen nicht signifikant voneinander ($p = 0,447$). Die Vergleichbarkeit der Messreihen war somit gegeben. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test als Post-hoc-Test. Mittelwerte mit 95%-KI. (B) Bezogen auf die relativen Veränderungen des Voltage Sags zeigte sich, dass es im Vergleich zu den Messungen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) ab einer Konzentration von 80 µM Sevofluran zu einer signifikanten Abnahme kam (0,907, 95%-KI: 0,816–0,998, $n = 10$, $p = 0,049$). Ebenso konnte eine signifikante Abnahme des relativen Voltage Sags mit 330 µM (0,707, 95%-KI: 0,602–0,811, $n = 9$, $p = 0,004$), 450 µM (0,692, 95%-KI: 0,525–0,860, $n = 12$, $p = 0,005$) sowie 690 µM Sevofluran (0,545, 95%-KI: 0,423–0,667, $n = 9$, $p = 0,004$) beobachtet werden. Eine starke Abnahme des Voltage Sags zeigte sich auch unter 1470 µM Sevofluran (0,298, 95%-KI: 0,091–0,506, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI. (C) Die relativen Veränderungen des Voltage Sags unter Sevofluran bezogen auf die Kontrollbedingungen (Kontrolle: 100,0) wurden zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve und zur Ermittlung des IC₅₀-Wertes herangezogen. Dabei ließ sich für die relative Veränderung des Voltage Sags eine IC₅₀ von 735,3 µM Sevofluran (95%-KI: 618,3–874,6 µM) mit dem Steigungsparameter „HillSlope“ von -1,40 (-1,79 – -1,02) ermitteln, R²: 0,8304. * = $p < 0,05$. Die c_{aq} von Sevofluran wurde mittels dekadischem Logarithmus (\log_{10}) transformiert. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Tests bezogen auf Messungen unter Kontrollbedingungen. Mittelwerte mit 95%-KI. (D) Repräsentative Spannungsantworten eines TK-Schaltneurons unter Kontrollbedingungen sowie unter 330 µM Sevofluran. Zu erkennen ist die Abnahme des Voltage Sags unter Sevofluran.

Die Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag in Absolutwerten ist in **Tabelle 7** aufgeführt.

Tabelle 7: Wirkung von Sevofluran auf den Voltage Sag (Absolutwerte)

Die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal vermittelten *Voltage Sag* in verschiedenen Konzentrationen als Absolutwerte. Im Gegensatz zu den relativen Veränderungen (siehe **Abbildung 14 B**) konnte erst ab einer Konzentration von 330 μM Sevofluran eine signifikante Reduzierung des *Voltage Sags* beobachtet werden. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test. Mittelwerte mit 95%-KI.

Sevofluran [μM]	<i>Voltage Sag</i> (Kontrolle) [mV]	95%-KI	<i>Voltage Sag</i> (Sevofluran) [mV]	95%-KI	n	p
80	58,5	47,5–69,4	53,4	41,6–65,2	10	0,065
330	54,5	44,8–64,2	39,1	28,4–49,8	9	0,004
450	55,0	45,1–65,0	40,3	26,9–53,6	12	0,005
690	68,5	54,7–82,3	39,1	25,2–53,0	9	0,004
1470	63,4	48,3–78,6	20,5	4,1–36,9	5	-

3.3.2. Die Wirkung von Sevofluran auf den Rebound Delay

Am Ende des im Current-Clamp-Modus applizierten hyperpolarisierenden Strompulses, durch welchen der depolarisierende *Voltage Sag* induziert wird, kommt es konsekutiv zu einer Salve von Aktionspotenzialen mit niedrigem Schwellenpotential, dem sog. *Rebound Burst* (Ying und Goldstein 2005). Dieser *Rebound Burst* tritt mit einer zeitlichen Verzögerung auf, was als *Rebound Delay* bezeichnet wird.

Definiert wird der *Rebound Delay* als die Zeit zwischen dem Ende der hyperpolarisierenden Strominjektion sowie der Spitze des ersten Aktionspotenzials (Neuhoff et al. 2002), siehe **Abbildung 16 D**. So zeigte sich, dass es ab einer Konzentration von 330 μM Sevofluran dosisabhängig zu einer signifikanten Verlängerung des relativen *Rebound Delays* kam (**Abbildung 16 B**).

Um die Beziehung zwischen Amplitude des *Voltage Sags* und Dauer des *Rebound Delays* zu untersuchen, wurden zudem beide Werte unter Kontrollbedingungen sowie beispielhaft unter 330 μM und 450 μM Sevofluran in einem Graph gegeneinander aufgetragen. Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse zur Ermittlung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson als Maß für den Zusammenhang zwischen *Voltage Sag* und *Rebound Delay* durchgeführt, siehe **Abbildung 16 C**. Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten r erfolgte gemäß Cohen (1988). Für die Beziehung zwischen Amplitude des *Voltage Sags* und Dauer des *Rebound Delays* lag demnach im Fall der Messungen unter Kontrollbedingungen eine moderate inverse Korrelation vor. Für die Messungen unter Applikation von 330 μM und 450 μM Sevofluran zeigte sich eine starke inverse Korrelation.

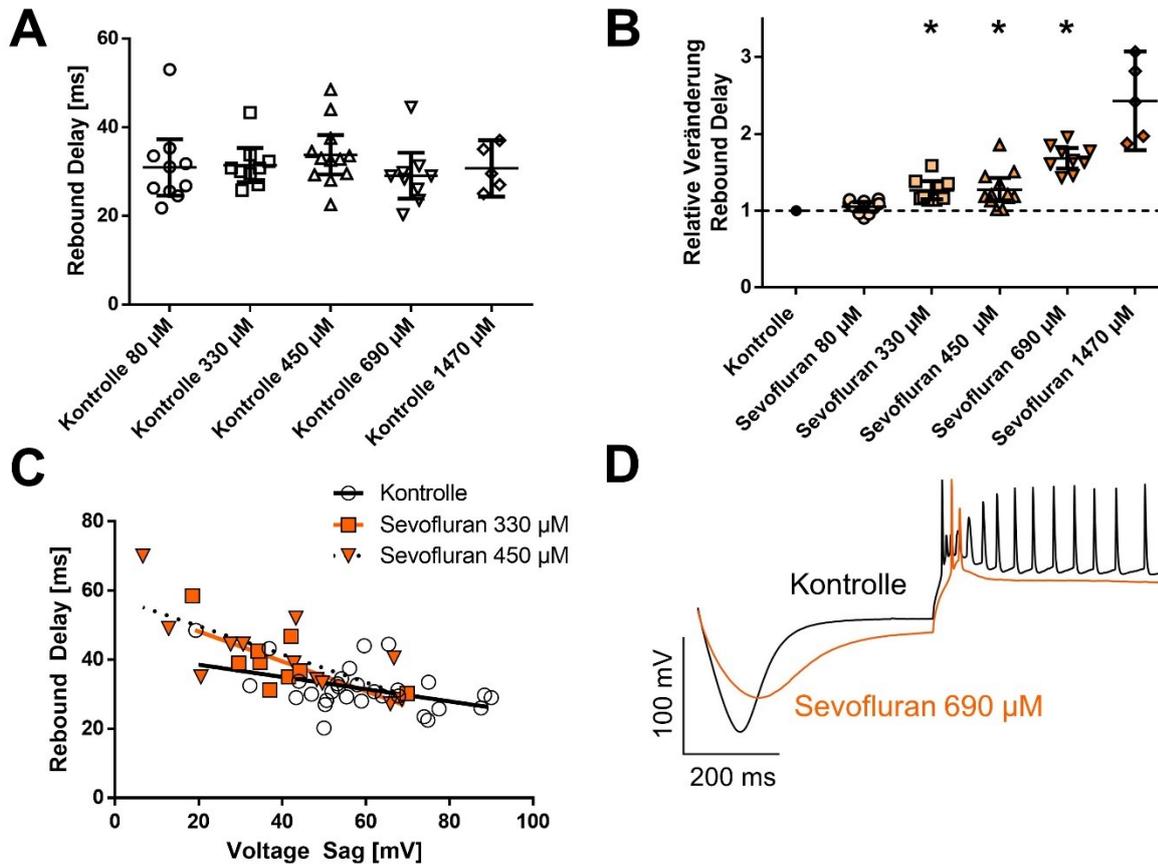


Abb. 16: Wirkung von Sevofluran auf den *Rebound Delay* und Korrelation mit *Voltage Sag*

(A) Von der Vergleichbarkeit der verschiedenen Messreihen mit Hinblick auf den *Rebound Delay* konnte ausgegangen werden, da sich die Messdaten unter Kontrollbedingungen im Vergleich nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,351$; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test als Post-hoc-Testverfahren). Mittelwerte mit 95%-KI.

(B) Unter $80 \mu\text{M}$ Sevofluran war keine signifikante Veränderung des relativen *Rebound Delays* zu beobachten ($1,05$, 95%-KI: $0,99-1,11$, $n = 10$, $p = 0,106$). Ab einer Konzentration von $330 \mu\text{M}$ Sevofluran kam es zu einer signifikanten Verlängerung des relativen *Rebound Delays* ($1,27$, 95%-KI: $1,20-1,38$, $n = 9$, $p = 0,004$), genauso unter $450 \mu\text{M}$ ($1,27$, 95%-KI: $1,12-1,43$, $n = 12$, $p < 0,001$) sowie $690 \mu\text{M}$ Sevofluran ($1,68$, 95%-KI: $1,55-1,82$, $n = 9$, $p = 0,004$). Der Effekt zeigte sich auch unter $1470 \mu\text{M}$ Sevofluran ($2,43$, 95%-KI: $1,79-3,07$, $n = 5$).

(C) Streudiagramm, in dem die Amplituden der *Voltage Sags* unter Kontrollbedingungen ($n = 30$) sowie unter Applikation von $330 \mu\text{M}$ ($n = 9$) und $450 \mu\text{M}$ Sevofluran ($n = 12$) als Funktion der Dauer der entsprechenden *Rebound Delays* abgebildet wurden. Die Korrelationsanalyse ergab die folgenden Korrelationskoeffizienten r nach Pearson:

- Kontrolle: $r = -0,445$ (95%-KI: $-0,694 - -0,100$, $p = 0,013$)
- Sevofluran $330 \mu\text{M}$: $r = -0,694$ (95%-KI: $-0,930 - -0,055$, $p = 0,038$)
- Sevofluran $450 \mu\text{M}$: $r = -0,722$ (95%-KI: $-0,916 - -0,253$, $p = 0,008$)

In das Streudiagramm sind die entsprechenden Regressionsgeraden eingezeichnet, die mittels linearer Regression berechnet wurden. Für die Steigung der Regressionsgeraden konnten dabei folgende Werte ermittelt werden:

- Kontrolle: $-0,177$ (95%-KI: $-0,315 - -0,039$; $R^2 = 0,1975$; $p = 0,014$)
- $330 \mu\text{M}$ Sevofluran: $-0,433$ (95%-KI: $-0,835 - -0,031$; $R^2 = 0,4811$; $p = 0,038$)
- $450 \mu\text{M}$ Sevofluran: $-0,407$ (95%-KI: $-0,682 - -0,132$; $R^2 = 0,5216$; $p < 0,001$)

Die Unterschiede in den ermittelten Steigungsparametern waren allerdings nicht signifikant ($p = 0,125$)

(D) Repräsentative Spannungskurven im Current-Clamp-Modus als Folge eines hyperpolarisierenden Strompulses (-350 pA) unter Kontrollbedingungen sowie unter $690 \mu\text{M}$ Sevofluran. Zu erkennen ist, dass es unter Sevofluran zu einer Verlängerung des *Rebound Delays* kommt. Der *Rebound Delay* beschreibt die zeitliche Verzögerung zwischen Ende des hyperpolarisierenden Strompulses und der Spitze des ersten Aktionspotenzials.

Die Wirkung von Sevofluran auf den *Rebound Delay* in Absolutwerten ist in **Tabelle 8** dargestellt.

Tabelle 8: Wirkung von Sevofluran auf den *Rebound Delay* (Absolutwerte)

Die Wirkung von Sevofluran auf den *Rebound Delay* in verschiedenen Konzentrationen als Absolutwert. Ebenso wie bei Betrachtung der relativen Veränderung kam es ab einer Konzentration von 330 μM Sevofluran dosisabhängig zu einer signifikanten Verlängerung des *Rebound Delays*. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test. Mittelwerte mit 95%-KI.

Sevofluran [μM]	<i>Rebound Delay</i> (Kontrolle) [ms]	95%-KI	<i>Rebound Delay</i> (Sevofluran) [ms]	95%-KI	n	p
80	30,9	24,6–37,27	32,8	25,0–40,6	10	0,080
330	31,4	27,6–35,3	39,9	33,2–46,6	9	0,004
450	33,8	29,4–38,2	41,5	34,0–49,0	12	< 0,001
690	29,1	23,9–34,2	48,9	38,8–59,1	9	0,004
1470	30,7	24,3–37,1	75,1	45,7–104,6	5	-

3.3.3. Die Wirkung von Sevofluran auf den Kationenstrom I_h

Zur Beurteilung des Kationenstroms I_h wurden die Zellen im Voltage-Clamp-Modus beginnend bei -43 mV stufenweise in Schritten von 10 mV bis maximal -133 mV hyperpolarisiert (**Abbildung 17 A**). Die maximale I_h -Amplitude konnte bestimmt werden, indem das Membranpotenzial der Zellen auf -133 mV ($I_{h(-133\text{mV})}$) eingestellt wurde (Pape 1996). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Messdaten auf die maximale I_h -Amplitude unter Kontrollbedingungen mit 1,0 normalisiert. Dabei zeigte sich, dass es unter Sevofluran-Applikation zu einer signifikanten Abnahme der relativen Amplitude von I_h kam (**Abbildung 17 B**). Bei einem Membranpotenzial von -133 mV konnte dosisabhängig eine signifikante Veränderung ab einer Konzentration von 330 μM Sevofluran (**Abbildung 17 Ci**) beobachtet werden, wohingegen die Messungen von I_h bei einem Membranpotenzial von -73 mV ($I_{h(-73\text{mV})}$) erst ab einer Sevofluran-Konzentration von 450 μM signifikante Veränderungen der relativen Amplitude ergaben (**Abbildung 17 Cii**). Aus entsprechenden Dosis-Wirkungskurven ließen sich zudem IC_{50} -Werte ermitteln. Für $I_{h(-133\text{mV})}$ betrug die IC_{50} 1175 μM Sevofluran (95%-KI: 1028–1343 μM), für $I_{h(-73\text{mV})}$ 950 μM Sevofluran (95%-KI: 821–1099 μM) (**Abbildung 17 Di, Dii**).

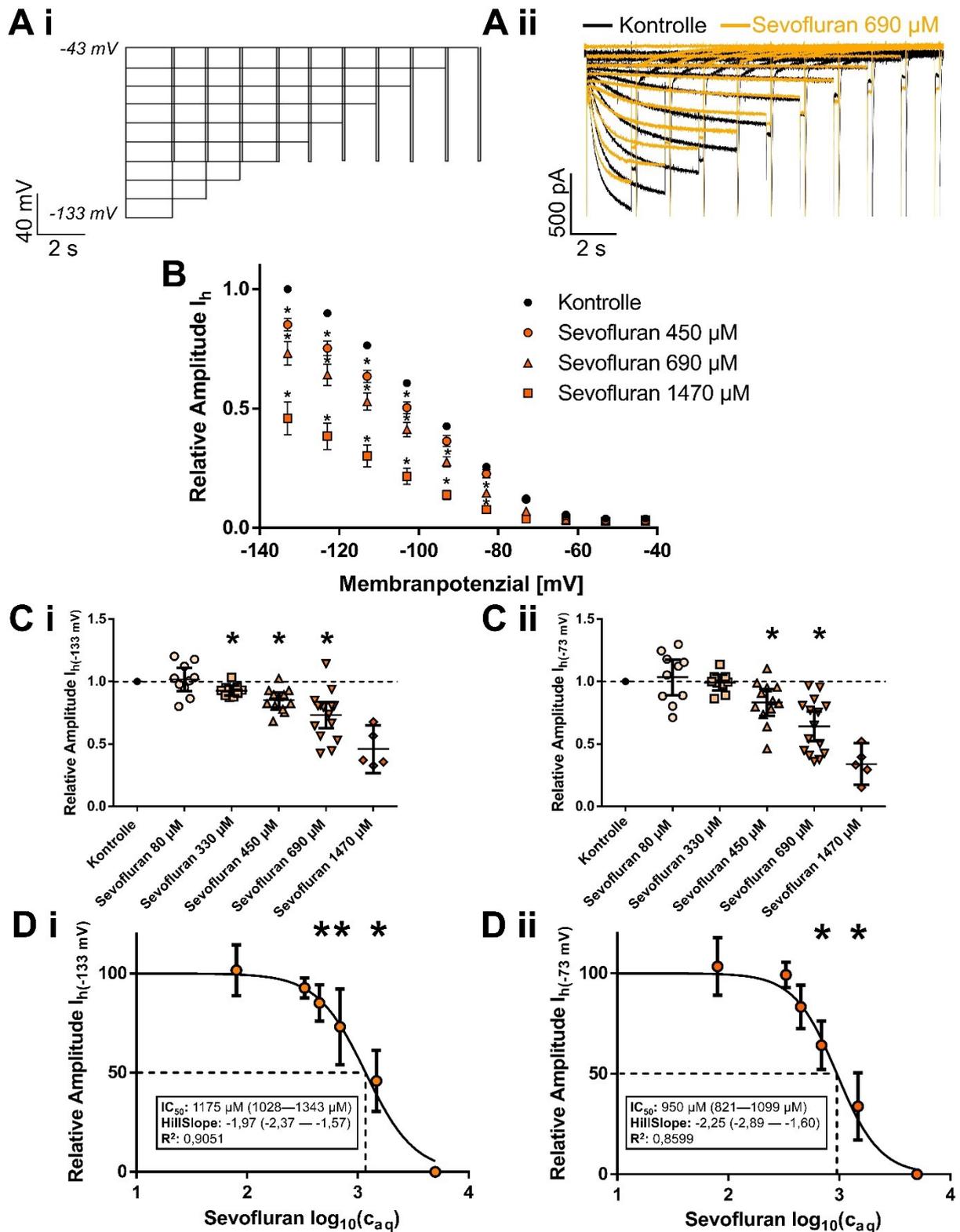


Abb. 17: Die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal-vermittelten Kationenstrom I_h

(Ai) Stimulationsprotokoll zur Messung des HCN-Kanal-vermittelten Kationenstroms I_h mit einer stufenweise Hyperpolarisation des TK-Schaltneurons beginnend von -43 mV bis maximal -133 mV. (Aii) Repräsentative Stromkurven im Voltage-Clamp-Modus unter Kontrollbedingungen sowie nach Applikation von 690 μM Sevofluran.

(B) Ab einer Konzentration von 450 μM Sevofluran kam es zu einer signifikanten Reduktion des Kationenstroms I_h . Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Messdaten auf die maximale I_h -Amplitude bei -133 mV unter

Kontrollbedingungen normalisiert. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Tests für jeden Spannungsschritt bezogen auf Werte unter Kontrollbedingungen, $n = 5-12$ für jede Konzentration, $* = p < 0,05$.

(Ci) Bezogen auf die relative I_h -Amplitude bei -133 mV ($I_{h(-133\text{mV})}$) kam es im Vergleich zu den Messungen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) mit 80 μM Sevofluran (1,02, 95%-KI: 0,93–1,11, $n = 10$, $p = 0,695$) zu keiner signifikanten Veränderung. Demgegenüber konnte unter 330 μM (0,93, 95%-KI: 0,89–0,97, $n = 9$, $p = 0,008$), 450 μM (0,85, 95%-KI: 0,79–0,91, $n = 12$, $p = 0,001$) sowie 690 μM Sevofluran (0,73, 95%-KI: 0,63–0,84, $n = 15$, $p < 0,001$) dosisabhängig eine signifikante Reduktion der relativen $I_{h(-133\text{mV})}$ -Amplitude beobachtet werden. Die Abnahme betrug unter 1470 μM Sevofluran 0,46 (95%-KI: 0,27–0,65, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, $* = p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI. **(Cii)** Zudem wurde der Einfluss von Sevofluran auf die relative I_h -Amplitude bei einem Membranpotenzial von -73 mV ($I_{h(-73\text{mV})}$) ermittelt. Im Vergleich zu den Messungen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) konnte dabei in den Konzentrationen von 80 μM (1,03, 95%-KI: 0,89–1,12, $n = 10$, $p = 0,557$) und 330 μM Sevofluran (0,99, 95%-KI: 0,93–1,06, $n = 9$, $p = 0,844$) keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Die Konzentrationen von 450 μM (0,83, 95%-KI: 0,72–0,94, $n = 12$, $p = 0,005$) und 690 μM Sevofluran (0,64, 95%-KI: 0,52–0,76, $n = 15$, $p < 0,001$) führten dagegen zu einer signifikanten Reduktion von $I_{h(-73\text{mV})}$. Die Abnahme unter 1470 μM Sevofluran betrug 0,33 (95%-KI: 0,17–0,51, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, $* = p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI.

(Di) Die relativen Veränderungen $I_{h(-133\text{mV})}$ unter Sevofluran-Applikation in verschiedenen Konzentrationen wurden zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve und zur Berechnung des entsprechenden IC_{50} -Wertes herangezogen. So ließ sich für die Reduktion von $I_{h(-133\text{mV})}$ eine IC_{50} von 1175 μM Sevofluran (95%-KI: 1028–1343 μM) mit dem Steigungsparameter „HillSlope“ von $-1,97$ (95%-KI: $-2,37 - -1,57$) ermitteln. $R^2: 0,9051$. **(Dii)** Im Vergleich hierzu fiel die IC_{50} für die Reduktion von $I_{h(-73\text{mV})}$ mit 950 μM Sevofluran (95%-KI: 821–1099 μM) niedriger aus (HillSlope: $-2,25$, 95%-KI: $-2,89 - -1,60$; $R^2: 0,8599$). Die c_{aq} von Sevofluran wurden mittels dekadischem Logarithmus (\log_{10}) transformiert. $* = p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Tests bezogen auf Messungen unter Kontrollbedingungen. Mittelwerte mit 95%-KI.

3.3.4. Die Wirkung von Sevofluran auf die Aktivierungszeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow}

Während sich bezüglich der spannungsabhängigen Aktivierungszeitkonstanten der HCN-Kanäle im Fall von τ_{slow} keine signifikanten Unterschiede unter Sevofluran zeigten, kam es ab einer Konzentration von 450 μM Sevofluran zu einer signifikanten Verlängerung von τ_{fast} (Abbildung 18).

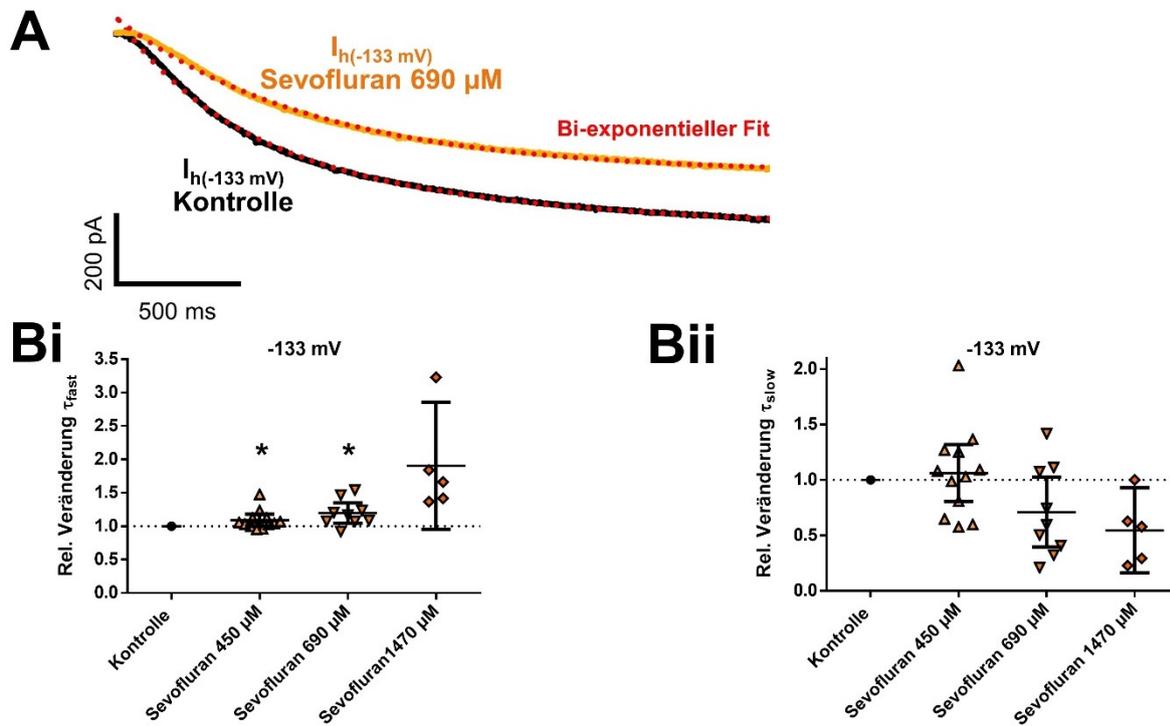


Abb. 18: Die Wirkung von Sevofluran auf τ_{fast} und τ_{slow}

(A) Repräsentative I_h -Stromkurven bei einem Membranpotenzial von -133 mV unter Kontrollbedingungen sowie unter 690 μM Sevofluran. Die bi-exponentielle Kurvenanpassungen zur Ermittlung von τ_{fast} und τ_{slow} sind als gestrichelte Linien in Rot eingetragen. **(Bi)** Im Vergleich zu den Messungen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) kam es unter Sevofluran ab einer Konzentration von 450 μM zu einer signifikanten Verlängerung von τ_{fast} (1,09, 95%-KI: 1,00–1,81, $n = 12$, $p = 0,034$). Unter 690 μM Sevofluran fiel die Verlängerung stärker aus (1,20, 95%-KI: 1,04–1,35, $n = 9$, $p = 0,02$), dieser Trend setzte sich weiterhin in allen abgeleiteten Zellen unter 1470 μM Sevofluran fort (1,90, 95%-KI: 0,95–2,85, $n = 5$). **(Bii)** Demgegenüber zeigten sich nach Sevofluran-Applikation keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Veränderung von τ_{slow} . Für 450 μM betrug die relative Veränderung 1,06 (95%-KI: 0,80–1,32, $n = 12$, $p = 0,791$), für 690 μM 0,71 (0,40–1,03, $n = 9$, $p = 0,098$) und für 1470 μM Sevofluran 0,55 (0,16–0,93, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI.

3.3.5. Die Wirkung von Sevofluran auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$

Aus der spannungsabhängigen Aktivierung $p(V)$ der normalisierten I_{Tail} -Ströme ließ sich zudem das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass es erst ab einer Konzentration von 690 μM Sevofluran zu einer signifikanten Hyperpolarisation des $V_{1/2}$ kam (**Abbildung 19 B**).

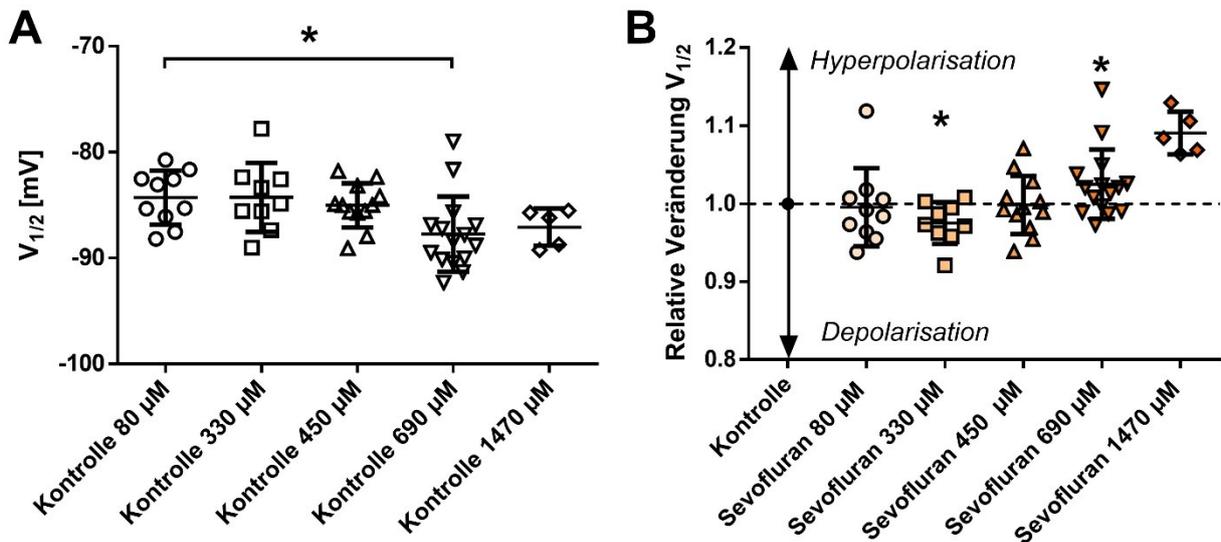


Abb. 19: Die Wirkung von Sevofluran auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$)

(A) Die Vergleichbarkeit der verschiedenen Messreihen unter Kontrollbedingungen wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests überprüft, der einen signifikanten Unterschied der Mediane ergab ($p = 0,008$). Die als Post-hoc-Testverfahren durchgeführten Dunn-Tests ergaben dabei zwar einen signifikanten Unterschied der $V_{1/2}$ -Werte zwischen der 80 μM und der 690 μM Sevofluran Gruppe. Im Vergleich der Absolutwerte ($V_{1/2}$ Kontrolle 80 μM : $-84,3$ mV, 95%-KI: $-81,6 - -87,5$ mV vs. $V_{1/2}$ Kontrolle 690 μM : $-87,7$ mV, 95%-KI: $-86,9 - -90,1$ mV) fällt die Differenz mit 3,4 mV gering aus, weshalb weiterhin von der grundsätzlichen Vergleichbarkeit der Messreihen ausgegangen wurde. (B) Keine relative Veränderung (Kontrolle: 1,0) bezüglich des $V_{1/2}$ ergab sich für die Applikation von 80 μM (1,000, 95%-KI: 0,950–1,031, $n = 10$, $p = 0,375$) sowie 450 μM Sevofluran (0,998, 95%-KI: 0,975–1,022, $n = 12$, $p = 0,677$), unter 330 μM Sevofluran zeigte sich sogar eine leichte Verschiebung von $V_{1/2}$ in Richtung Depolarisation ($=0,975$, 95%-KI: 0,955–0,996, $n = 9$, $p = 0,0273$). Eine signifikante Verschiebung des $V_{1/2}$ in Richtung Hyperpolarisation konnte bei einer Konzentration von 690 μM Sevofluran beobachtet werden (1,025, 95%-KI: 1,000–1,050, $n = 15$, $p = 0,041$), dieser Effekt ließ sich auch in allen abgeleiteten Zellen unter 1470 μM Sevofluran replizieren (1,090, 95%-KI: 1,057–1,124, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, Mittelwerte mit 95%-KI.

Wie bereits gezeigt, kommt es unter Sevofluran trotz Zugabe von 150 μM Ba^{2+} zu einer Zunahme sog. Leck-Ströme (*leak currents*), siehe **Abbildung 14**. Dies könnte erklären, dass es erst ab einer vergleichsweise hohen Konzentration von 690 μM Sevofluran zu einer moderaten Verschiebung von $V_{1/2}$ in Richtung Hyperpolarisation kam. Zudem war es aufgrund des Auftretens der Leckströme unter höheren Sevofluran-Konzentrationen notwendig, die Normalisierung der I_{Tail} -Ströme entsprechend anzupassen (**Abbildung 20 Ei**), siehe hierzu auch Budde et al. (2008). Für spannungsabhängige Aktivierungskurven $p(V)$ sowie für eine Übersicht der Wirkung von Sevofluran auf das $V_{1/2}$ in Absolutwerten siehe **Abbildung 20**.

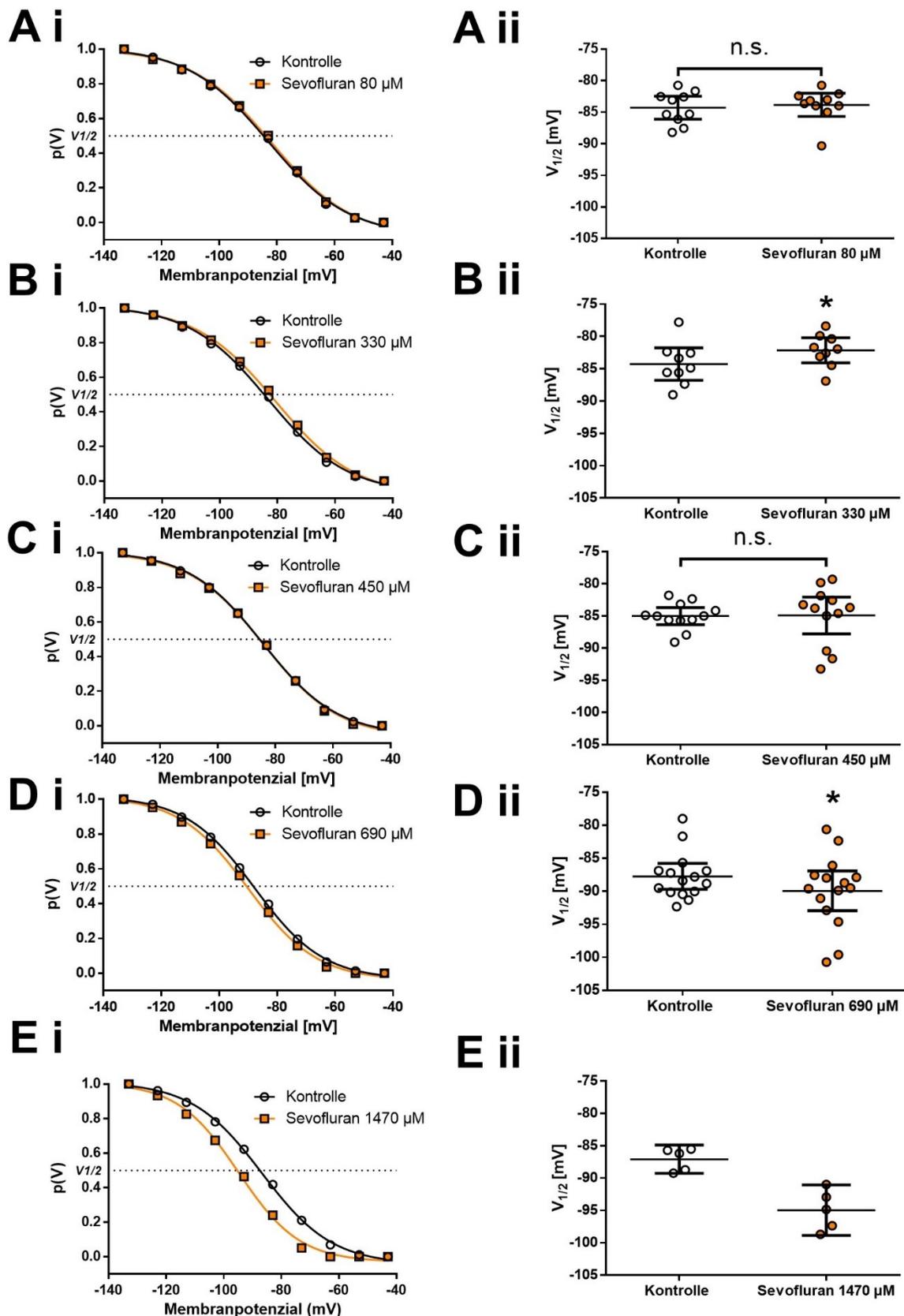


Abb. 20: Einfluss von Sevofluran auf die spannungsabhängige Aktivierung p(V) und das Potential der halbmaximalen Aktivierung (V_{1/2})

(Ai–Ei) Abgebildet ist der Einfluss von Sevofluran in den untersuchten Konzentrationen auf die spannungsabhängige Aktivierung p(V) der normalisierten I_{Tail}-Ströme im Vergleich zu Messungen unter Kontrollbedingungen. Zur Ermittlung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung (V_{1/2}, gestrichelte Linie) erfolgte eine Kurvenanpassung mittels Boltzmann-Funktion. (Ei) Aufgrund des Auftretens von ausgeprägten Leck-Strömen

in Anwesenheit von Sevofluran in höheren Konzentrationen wurde für die Messungen unter 1470 μM Sevofluran eine entsprechende Anpassung der Normalisierung der I_{Tail} -Ströme vorgenommen. I_{min} wurde als die tatsächlich niedrigste I_{Tail} -Amplitude definiert. Dabei trat I_{min} in den gemessenen Zellen unter 1470 μM Sevofluran bei einem Membranpotential von -73 mV auf. I_{Tail} -Ströme im Bereich von -43 mV bis -63 mV flossen entsprechend nicht in die Berechnung von $p(V)$ ein ($I_{\text{Tail}} = 0$). **(Aii)** In einer Konzentration von 80 μM hatte Sevofluran keinen signifikanten Einfluss auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) (Kontrolle: -84,3 mV, 95%-KI: -82,5 – -86,1 mV; vs. Sevofluran 80 μM : -83,3 mV, 95%-KI: -82,0 – -85,7 mV, $n = 10$, $p = 0,375$), **(Bii)** Für 330 μM Sevofluran wurde sogar eine Verschiebung von $V_{1/2}$ in Richtung Depolarisation beobachtet (Kontrolle: -84,3 mV, 95%-KI: -81,8 – -86,8 mV; vs. Sevofluran 330 μM : -82,1 mV, 95%-KI: -80,2 – -84,1 mV, $n = 9$, $p = 0,027$). **(Cii)** Demgegenüber konnte in einer Konzentration von 450 μM Sevofluran keine signifikante Veränderung beobachtet werden (Kontrolle: -85,0 mV, 95%-KI: -83,7 – -86,4 mV; vs. Sevofluran 450 μM : -84,9 mV, 95%-KI: -82,1 – -87,8 mV, $n = 12$, $p = 0,677$). **(Dii)** Ab einer Konzentration von 690 μM Sevofluran kam es zu einer signifikanten Verschiebung von $V_{1/2}$ in Richtung Hyperpolarisation (Kontrolle: -87,7 mV, 95%-KI: -85,8 – -89,7 mV; vs. Sevofluran 690 μM : -89,9 mV, 95%-KI: -86,9 – -93,0 mV, $n = 15$, $p = 0,041$). **(Eii)** Ein gleichgerichteter Effekt auf $V_{1/2}$ zeigte sich auch bei 1470 μM Sevofluran (Kontrolle: -87,1 mV, 95%-KI: 85,0 – -89,3 mV; vs. Sevofluran 1470 μM : -95,0 mV, 95%-KI: -91,1 – -98,4 mV, $n = 5$). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, * = $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$), Mittelwerte mit 95%-KI.

3.4. Die Wirkung von Sevofluran auf GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme

Zur Ermittlung der Wirkung von Sevofluran auf GABA_A-R-vermittelte Ströme wurden Messungen im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Das Membranpotential der abgeleiteten TK-Schaltneuronen wurde konstant auf -70 mV gehalten. Die Etablierung von Messungen unter Kontrollbedingungen erfolgte unter Zugabe von 1 μM TTX, 50 μM D-AP5, 5 μM CGP 55845 und 5 μM NBQX (für $\alpha 4^{-/-}$: 20 μM DNQX).

3.4.1. Die Wirkung von Sevofluran auf mIPSCs in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen

Die *miniature inhibitory postsynaptic currents* (mIPSCs) als Korrelate phasischer, GABA_A-Rezeptor vermittelten Inhibition wurden bezüglich ihrer Frequenz, Amplitude, Aktivierungszeit, Deaktivierungszeitkonstante τ_d sowie ihres Ladungstransfers analysiert. Die Messungen erfolgten unter Kontrollbedingungen sowie nach 20-minütiger Applikation von 690 μM Sevofluran. Nach Zugabe einer sättigenden Konzentration des GABA_A-R-Antagonisten Bicucullin (10 μM) am Ende der Sevofluran-Applikation kam es zu einem vollständigen Sistieren von mIPSCs (**Abbildung 21 A**).

Dabei zeigte sich, dass es im WT zu einer signifikanten Abnahme der mIPSC-Frequenz kam (**Abbildung 21 B**), wohingegen mIPSC-Aktivierungszeit (**Abbildung 21 D**), τ_d (**Abbildung 21 E**) und Ladungstransfer (**Abbildung 21 F**) signifikant zunahm. Keine signifikante Veränderung war im WT bezüglich der mIPSC-Amplitude zu verzeichnen (**Abbildung 21 C**).

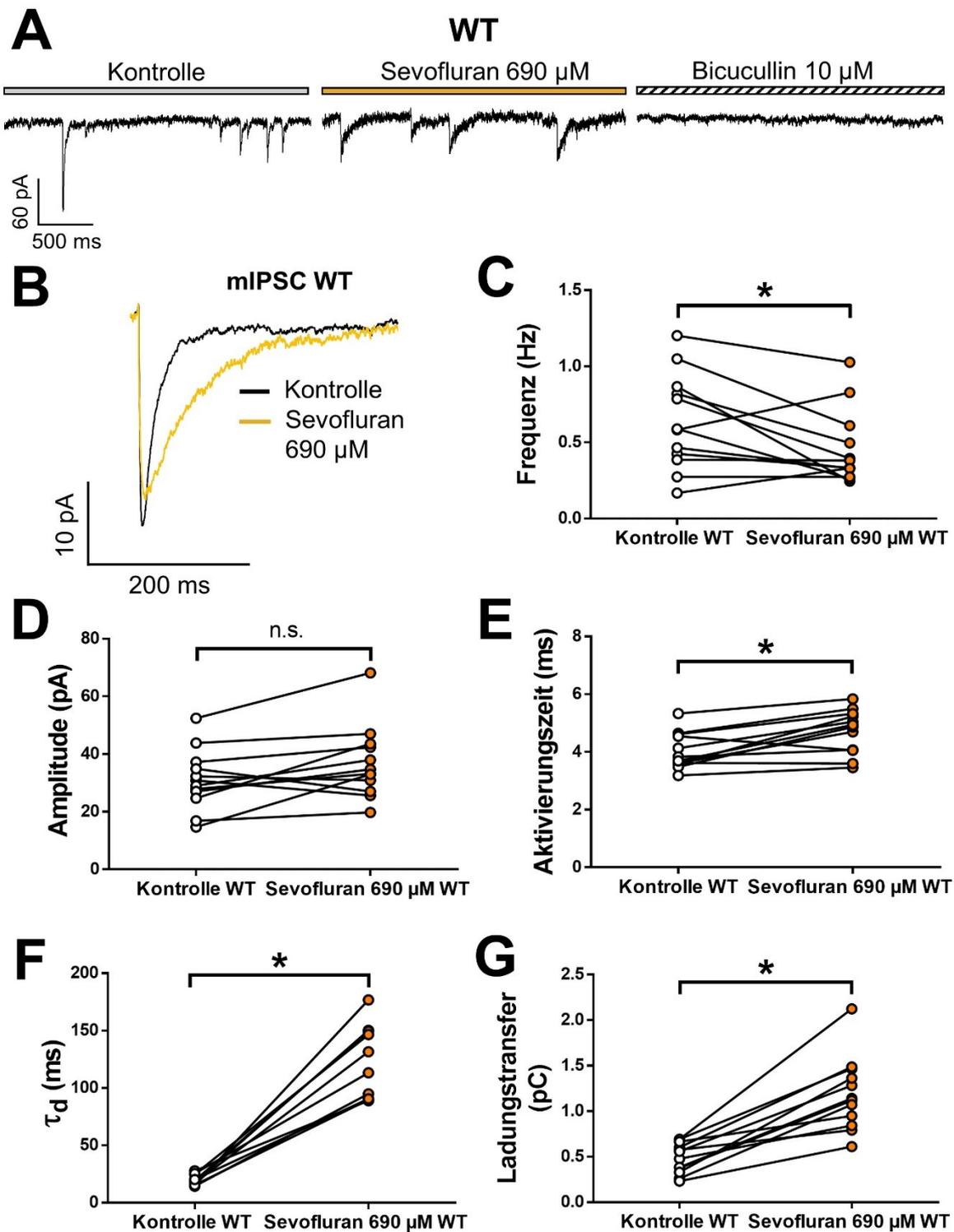


Abb. 21: Die Wirkung von Sevofluran auf mIPSCs in WT-TK-Schaltneuronen

(A) Repräsentative Stromspuren von mIPSCs bei einem vorgegebenen Membranpotenzial von -70 mV im Voltage-Clamp-Modus und in Anwesenheit von 1 μ M TTX, 50 μ M D-AP5, 5 μ M CGP 55845 und 5 μ M NBQX (Kontrolle), nach Applikation von 690 μ M Sevofluran (20 Minuten) sowie nach Applikation des spezifischen GABA_A-R-Antagonisten Bicucullin (10 μ M) in WT-TK-Schaltneuronen. (B) Automatisch selektierte und graphisch gemittelte Stromspuren von mIPSCs, die entsprechend des Mittelpunktes ihrer Aktivierungszeit ausgerichtet wurden, unter Kontrollbedingungen ($n = 50$) und nach Applikation von 690 μ M Sevofluran ($n = 50$). (C) Unter 690 μ M Sevofluran kam es in WT-TK-Schaltneuronen zu einer signifikanten Abnahme des mIPSC-Frequenz (Kontrolle: $0,64$ Hz, 95%-KI: $0,44$ – $0,84$ Hz; vs. Sevofluran: $0,46$ Hz, 95%-KI: $0,30$ – $0,62$ Hz, $n = 12$, $p = 0,042$). (D) Keine signifikanten Unterschiede waren bezüglich der mIPSC-Amplitude festzustellen (Kontrolle: $31,0$ pA, 95%-KI: $24,3$ – $37,7$ pA; vs. Sevofluran: $36,9$ pA, 95%-KI: $28,9$ – $44,9$ pA, $n = 12$, $p = 0,052$). (E) In Anwesenheit von 690 μ M Sevofluran kam es

zudem zu einer signifikanten Zunahme der mIPSC-Aktivierungszeit (Kontrolle: 4,02 ms, 95%-KI: 3,62–4,42 ms; vs. Sevofluran: 4,72 ms, 95%-KI: 4,23–5,20 ms, $n = 12$, $p = 0,005$), (**F**) der Deaktivierungszeitkonstanten (τ_d) (Kontrolle: 19,7 ms, 95%-KI: 16,3–23,1 ms; vs. Sevofluran: 123,2 ms, 95%-KI: 100,4–146,0 ms, $n = 10$, $p = 0,002$), (**G**) sowie des Ladungstransfers (Kontrolle: 0,488 pC, 95%-KI: 0,381–0,594 pC; vs. Sevofluran: 1,188 pC, 95%-KI: 0,933–1,442 pC, $n = 12$, $p < 0,001$. pC: Picocoulomb). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, * = $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

Zudem wurde untersucht, wie sich die Zugabe von 690 μM Sevofluran auf mIPSCs in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen auswirkt. Die Ergebnisse hiervon sind in **Abbildung 22** zusammengefasst. Im Gegensatz zu den Messungen in WT-TK-Schaltneuronen zeigte sich hier keine signifikante Veränderung der mIPSC-Frequenz (**Abbildung 22 C**).

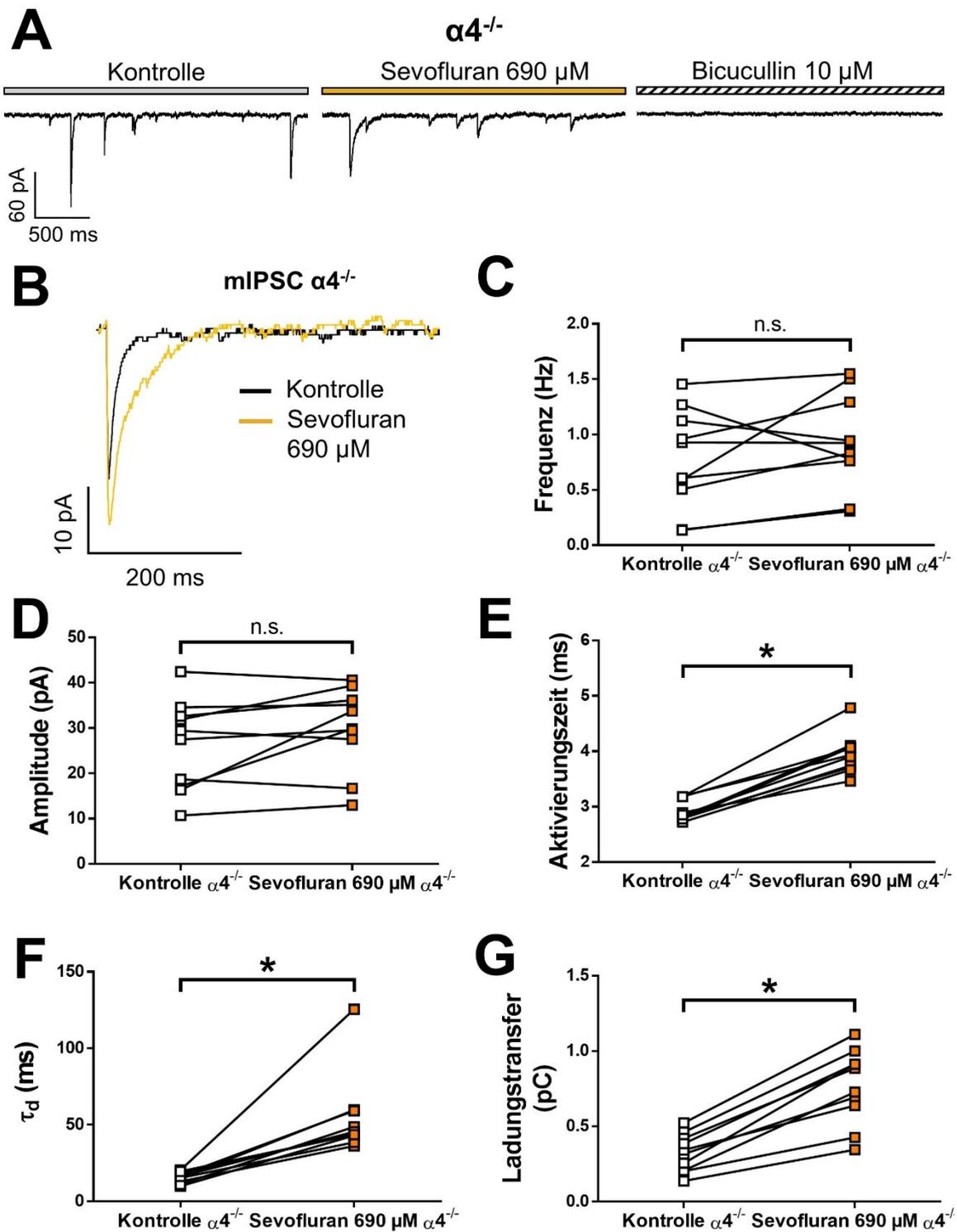


Abb. 22: Wirkung von Sevofluran auf mIPSCs in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen

(A) Abgebildet sind repräsentative Stromspuren von mIPSCs bei einem Membranpotenzial von -70 mV im Voltage-Clamp-Modus und unter Zugabe von 1 μM TTX, 50 μM D-AP5, 5 μM CGP 55845 und 20 μM DNQX (Kontrolle), nach Applikation von 690 μM Sevofluran (20 Minuten) sowie nach Applikation des spezifischen GABA_A-R-Antagonisten Bicucullin (10 μM) in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen. (B) Automatisch selektierte und graphisch gemittelte Stromspuren von mIPSCs, die entsprechend des Mittelpunktes ihrer Aktivierungszeit ausgerichtet wurden, unter Kontrollbedingungen (n = 50) und nach Applikation von 690 μM Sevofluran (n = 50). (C) Im Gegensatz zu den WT-TK-Schaltneuronen kam es unter 690 μM Sevofluran in den $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen zu keiner signifikanten Veränderung der mIPSC-Frequenz (Kontrolle: 0,77 Hz, 95%-KI: 0,45–1,10 Hz; vs. Sevofluran: 0,92 Hz, 95%-KI: 0,62–1,23 Hz, n = 10, p = 0,232). (D) Keine signifikanten Unterschiede nach Sevofluran-Applikation waren zudem hinsichtlich der mIPSC-Amplitude festzustellen (Kontrolle: 26,1 pA, 95%-KI: 19,0–33,3 pA; vs. Sevofluran: 30,1 pA,

95%-KI: 23,6–36,7 pA, $n = 10$, $p = 0,065$). **(E)** Die Zugabe von 690 μM Sevofluran bewirkte eine signifikante Zunahme der mIPSC-Aktivierungszeit (Kontrolle: 2,92 ms, 95%-KI: 2,79–3,06 ms; vs. Sevofluran: 3,94 ms, 95%-KI: 3,68–4,20 ms, $n = 10$, $p = 0,002$), **(F)** der Deaktivierungszeitkonstanten (τ_d) (Kontrolle: 15,6 ms, 95%-KI: 13,1–18,0 ms; vs. Sevofluran: 54,4 ms, 95%-KI: 35,7–73,1 ms, $n = 10$, $p = 0,002$), **(G)** sowie des Ladungstransfers (Kontrolle: 0,325 pC, 95%-KI: 0,236–0,414 pC; vs. Sevofluran: 0,765 pC, 95%-KI: 0,589–0,942 pC, $n = 10$, $p = 0,002$. pC: Picocoulomb). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, * = $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

Abschließend wurden die erhobenen mIPSC-Parameter in WT-TK-Schaltneuronen mit den mIPSC-Parametern in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen unter Kontrollbedingungen miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass mIPSCs in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen unter Kontrollbedingungen eine signifikant kürzere Aktivierungszeit und einen signifikant geringeren Ladungstransfer aufwiesen, siehe **Tabelle 9**.

Tabelle 9: Vergleich der mIPSC-Parameter in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen unter Kontrollbedingungen

Übersicht der erhobenen mIPSC-Parameter in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen unter Kontrollbedingungen. Im Vergleich der Stichproben untereinander zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Aktivierungszeit und des Ladungstransfers. WT: $n = 10$ –12; $\alpha 4^{-/-}$: $n = 10$. Mann-Whitney-Test für jeden Parameter. Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall.

mIPSC-Parameter	WT (Kontrolle)	95%-KI	$\alpha 4^{-/-}$ (Kontrolle)	95%-KI	p
Frequenz (Hz)	0,64	0,44–0,84	0,77	0,45–1,10	0,377
Amplitude (pA)	31,0	24,3–37,7	26,1	19,0–33,3	0,447
Aktivierungszeit (ms)	4,02	3,62–4,42	2,92	2,79–3,06	<0,001
τ_d (ms)	19,7	16,3–23,1	15,6	13,1–18,0	0,090
Ladungstransfer (pC)	0,488	0,382–0,594	0,325	0,236–0,414	0,030

3.4.2. Die Wirkung von Sevofluran auf die tonische Inhibition in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen

Der Einfluss von Sevofluran auf die tonische, durch extrasynaptische GABA_A-R-vermittelte Inhibition wurde anhand der Veränderungen des Haltestroms bestimmt (Bright und Smart 2013a; Maniezzi et al. 2019). Im Fall von WT-TK-Schaltneuronen ergab die quantitative Analyse der Stromspuren mittels *all-point*-Histogrammen und anschließender Kurvenanpassung, dass es unter der Applikation von 690 μM Sevofluran zu einer signifikanten, einwärts gerichteten Verschiebung des mittleren Stroms kam (**Abbildung 23 C**). Dabei

entspricht diese einwärts gerichtete Verschiebung des Haltestroms einer positiven Modulation der tonischen Inhibition, welche durch extrasynaptische GABA_A-R- vermittelt wird (Bright und Smart 2013a; Maniezzi et al. 2019).

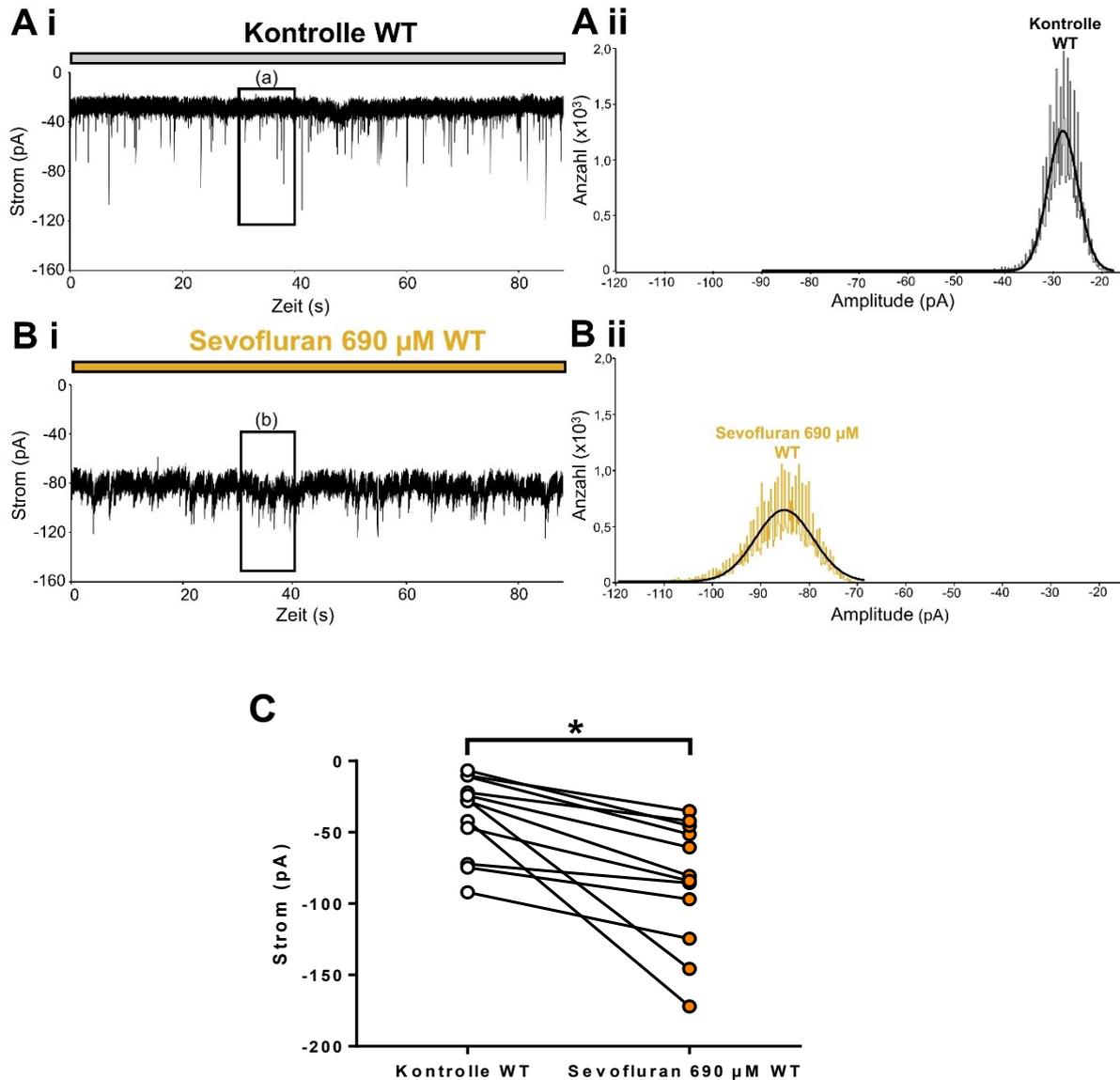


Abb. 23: Die Wirkung von Sevofluran auf die tonische Inhibition in WT-TK-Schaltneuronen

(Ai) Repräsentative Stromspur eines WT-TK-Schaltneurons bei einem vorgegebenen Membranpotenzial von -70 mV im Voltage-Clamp-Modus und unter Zugabe von 1 μ M TTX, 50 μ M D-AP5, 5 μ M CGP 55845 und 5 μ M NBQX (Kontrolle). Die mit **(a)** bezeichnete Box kennzeichnet das 10-Sekunden lange Intervall, welches zur Erstellung des *all-point*-Histogramms in **(Aii)** verwendet wurde. **(Aii)** Repräsentatives *all-point*-Histogramm des 10-Sekunden-Intervalls aus **(Ai)**. Die eingezeichnete Kurve wurde mittels Gauß-Funktion an die Datenpunkte des Histogramms angepasst. Dabei stellt die Spitze der Kurve den mittleren Haltestromwert unter Kontrollbedingungen dar. **(Bi)** Repräsentative Stromspur mit pharmakologisch isolierten mIPSCs desselben WT-TK-Schaltneurons nach 20-minütiger Applikation von 690 μ M Sevofluran. Das 10-Sekunden lange Intervall, welches zur Erstellung des entsprechenden *all-point*-Histogramms nach Sevofluran-Applikation **(Bii)** herangezogen wurde, ist mit **(b)** gekennzeichnet. **(Bii)** Mittels Anpassung einer Gauß-Funktion an die Datenpunkte des *all-point*-Histogramms wurde der mittlere Haltestrom unter Sevofluran-Applikation ermittelt. Dabei zeigte sich, dass es unter Sevofluran zu einer einwärts gerichteten Verschiebung des Haltestroms kam. **(C)** Insgesamt kam es in WT-TK-Schaltneuronen zu einer signifikanten Zunahme des applizierten Haltestroms unter 690 μ M Sevofluran und somit der von

extrasynaptischen GABA_A-R-vermittelten, tonischen Inhibition (Kontrolle: -38,1 pA, 95%-KI: -56,0 – -20,3 pA vs. Sevofluran: -85,4 pA, 95%-KI: -112,9 – -57,8 pA, n = 12, p < 0,001). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, * = p < 0,05.

Interessanterweise zeigte sich demgegenüber in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen unter Sevofluran-Applikation in einer Konzentration von 690 μ M keine einwärts gerichtete Verschiebung des Haltestroms, sondern vielmehr eine leichte, aber signifikante auswärts gerichtete Verschiebung des Haltestroms, siehe **Abbildung 24 C**.

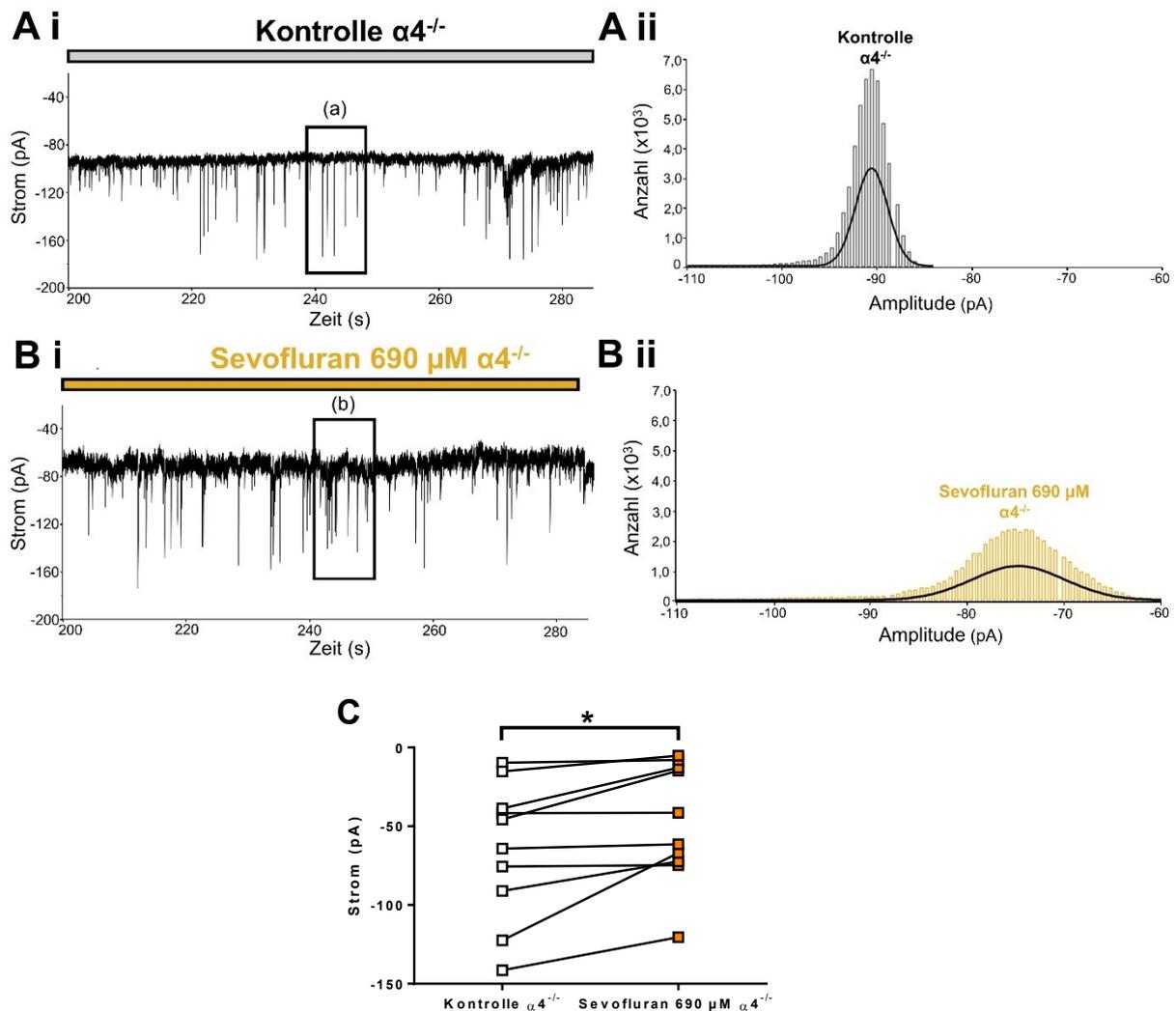


Abb. 24: Die Wirkung von Sevofluran auf die tonische Inhibition in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen

(Ai) Repräsentative Stromspur eines $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneurons bei einem vorgegebenen Membranpotenzial von -70 mV im Voltage-Clamp-Modus und unter Zugabe von 1 μ M TTX, 50 μ M D-AP5, 5 μ M CGP 55845 und 20 μ M DNQX (Kontrolle). Die mit **(a)** bezeichnete Box kennzeichnet das 10-Sekunden lange Intervall, welches zur Erstellung des *all-point*-Histogramms in **(Aii)** verwendet wurde. **(Aii)** Repräsentatives *all-point*-Histogramm des 10-Sekunden-Intervalls aus **(Ai)**. Die eingezeichnete Kurve wurde mittels Gauß-Funktion an die Datenpunkte des Histogramms angepasst. Dabei stellt die Spitze der Kurve den mittleren Haltestromwert unter Kontrollbedingungen dar. **(Bi)** Repräsentative Stromspur mit pharmakologisch isolierten mIPSCs desselben $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneurons nach 20-minütiger Applikation von 690 μ M Sevofluran. Das 10-Sekunden lange Intervall, welches zur Erstellung des entsprechenden *all-point*-Histogramms nach Sevofluran-Applikation **(Bii)** herangezogen wurde, ist mit **(b)** gekennzeichnet. **(Bii)** Mittels Anpassung einer Gauß-Funktion an die Datenpunkte des *all-point*-Histogramms wurde der mittlere Haltestrom unter Sevofluran-Applikation ermittelt. Dabei zeigte sich, dass es unter Sevofluran zu einer leichten auswärts gerichteten Verschiebung des Haltestroms kam. **(C)** Im Gegensatz zu den WT-TK-

Schaltneuronen kam es in den $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen zu einer signifikanten Abnahme des applizierten Haltestroms unter Sevofluran und somit der von extrasynaptischen GABA_A-Rs vermittelten, tonischen Inhibition (Kontrolle: -64,6 pA, 95%-KI: -95,7 – -33,4 pA vs. Sevofluran: -47,8 pA, 95%-KI: -74,9 – -20,7 pA, n = 10, p = 0,002). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, * = p < 0,05.

Dabei unterschieden sich die mittleren Halteströme unter Kontrollbedingungen in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen nicht signifikant voneinander, siehe **Abbildung 25 A**. Auch im Vergleich der relativen Veränderungen des Haltestroms nach Sevofluran-Applikation zeigte sich, dass es in TK-Schaltneuronen von WT-Tieren zu einer signifikanten Zunahme des Haltestroms kam, wohingegen der Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit eine Abnahme des Haltestroms unter Sevofluran bewirkte (siehe **Abbildung 25 B**). Wie aus der Abbildung hervorgeht, war dieser Effekt in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen zwar signifikant, aber quantitativ gering ausgeprägt.

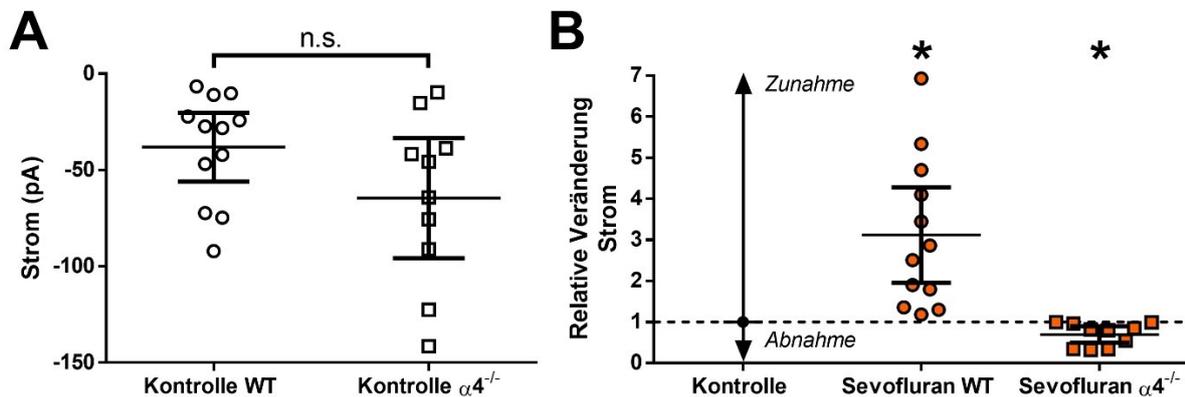


Abb. 25: Vergleich der tonischen Inhibition unter Kontrollbedingungen sowie nach Sevofluran-Applikation (690 μ M) in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen

(A) Der Vergleich des Haltestroms in WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen unter Kontrollbedingungen ergab keinen signifikanten Unterschied (Kontrolle WT: -38,1 pA, 95%-KI: -56,0 – -20,3 pA, n = 12; vs. Kontrolle $\alpha 4^{-/-}$: -64,6 pA, 95%-KI: -95,7 – -33,4 pA, n = 10; p = 0,177). Mann-Whitney-Test, n.s. = nicht signifikant (p > 0,05). (B) Bezüglich der relativen Veränderungen des Haltestroms nach Sevofluran-Applikation (690 μ M) zeigte sich, dass es in WT-Neuronen gegenüber den Messungen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: 1,0) zu einer signifikanten Zunahme des Haltestroms kam (3,12, 95%-KI: 1,95–4,28, n = 12, p < 0,001), wohingegen der Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit zu einer geringfügigen, aber signifikanten Abnahme führte (0,69, 95%-KI: 0,49–0,90, n = 10, p = 0,002). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe. * = p < 0,05, Mittelwerte mit 95%-KI.

Zudem erfolgte nach Abschluss der Sevofluran-Applikation die Zugabe des GABA_A-R-Antagonisten Bicucullin (10 μ M). Neben der vollständigen Aufhebung von mIPSCs kam es zu einer Veränderung des Haltestroms durch Blockade extrasynaptischer GABA_A-Rs. Hierdurch ließ sich im Vergleich zu dem mittleren Haltestrom unter Kontrollbedingungen die Präsenz einer basalen tonischen Inhibition ermitteln. Diese ergab für WT-TK-Schaltneurone eine einwärtsgerichtete Verschiebung des mittleren Haltestroms um +18,2 pA (\pm 4,0 pA, n = 5) und im Fall von $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen von +14,0 (\pm 4,7 pA, n = 9). Die Unterschiede im Vergleich zu den Messdaten unter Kontrollbedingungen waren allerdings in beiden Fällen nicht signifikant.

4. Diskussion

Gegenstand des vorliegenden Promotionsvorhabens war es, die Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen im VB-Kernkomplex des Thalamus mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik zu untersuchen. Hierfür wurden Strom- und Spannungsantworten durch Stimulationsprotokolle im Current- sowie im Voltage-Clamp-Modus generiert.

Der Thalamus wurde wiederholt als wichtige anatomische Zielstruktur für volatile Anästhetika identifiziert (Alkire et al. 1999; Fiset et al. 1999; Kaisti et al. 2002; Alkire, Hudetz und Tononi 2008) und spezifische elektrische Aktivitätsmuster, die im TK-Netzwerk generiert werden, sind mit dem Zustand der Bewusstlosigkeit assoziiert (Pape et al. 2005). Dabei wird die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen maßgeblich durch den HCN-Kanal vermittelten Kationenstrom I_h beeinflusst (Pape 1996; Robinson und Siegelbaum 2003). Zudem nehmen GABA_A-Rs mit ihren unterschiedlichen Modalitäten der Inhibition eine bedeutsame Rolle in der Regulierung von Neuronen ein (Franks 2008; Garcia, Kolesky und Jenkins 2010). Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens konnte gezeigt werden, dass Sevofluran in klinisch relevanten Dosierungen *in vitro* inhibitorisch auf die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen im VB-Kernkomplex des Thalamus wirkt. Dabei führte Sevofluran dosisabhängig über ein breites Membranpotenzial-Spektrum zu einer signifikanten Reduktion der I_h -Stromamplitude und in höheren Konzentrationen zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von HCN-Kanälen in Richtung Hyperpolarisation. Darüber hinaus bewirkt Sevofluran eine Verstärkung der phasischen Inhibition via synaptischer GABA_A-Rs und der tonischen Inhibition via extrasynaptischer GABA_A-Rs, wobei die Vermittlung der tonischen Inhibition in Abhängigkeit von der $\alpha 4$ -Untereinheit-Expression extrasynaptischer GABA_A-Rs zu erfolgen scheint. Diese Daten unterstützen dabei die Ergebnisse vorausgehender Arbeiten, welche funktionell der Inhibition des Thalamus eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Bewusstlosigkeit-induzierenden Wirkung von Sevofluran zuschreiben.

4.1. Klinische Relevanz der Sevofluran-Konzentration

Ein kritischer Punkt in der Identifizierung der molekularen Zielstrukturen von Anästhetika stellt die Verwendung von Konzentrationen dar, die eine klinische Relevanz aufweisen (Eger et al. 2001). In diesem Zusammenhang gilt es zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Arbeit die Applikation von Sevofluran nicht mittels Verdünnung und Zugabe von maximal gesättigter Sevofluran-Lösung erfolgte (wie etwa bei Haseneder et al. (2002)), sondern mit Hilfe eines Sevofluran-Vapors (wie etwa bei Sugawara et al. (2018)). Hiermit konnte das Carbogengas mit den Sevofluran-Volumenprozentkonzentrationen von 0,4 %, 1,3 %, 1,8 %, 3,2 % sowie 8,0 % angereichert werden. Die Referenz für die verwendeten Konzentrationen stellt dabei der

MAC-Wert von Sevofluran dar (Franks und Lieb 1994). Im Fall von männlichen CD1-Mäusen entsprechen 3,22 % Sevofluran bei physiologischen Temperaturen einer MAC von 1,0 (Ichinose et al. 1998), wobei gezeigt wurde, dass sich MAC-Werte für die Anästhetika Desfluran, Halothan und Isofluran in genetisch unterschiedlichen Mausstämmen zum Teil deutlich unterscheiden können (Sonner et al. 1999; Sonner, Gong und Eger 2000). Zudem muss berücksichtigt werden, dass die korrespondierenden gelösten Stoffmengenkonzentrationen (c_{aq}) von volatilen Anästhetika eine Temperaturabhängigkeit aufweisen (Franks und Lieb 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, mit den eingestellten Volumenprozentkonzentrationen korrespondierenden c_{aq} -Werte (0,4 %: 80 μM , 1,3 %: 330 μM , 1,8 %: 450 μM , 3,2 %: 690 μM und 8,0 %: 1470 μM) zeigen eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur publizierten c_{aq} -Werten von Sevofluran in wässriger Lösung. So rangieren mittels Gaschromatographie ermittelte Werte im Bereich von 80 $\mu\text{M}/\%$ (2,8 %: 230 μM , 5,0 %: 410 μM , Nishikawa et al. (2011)), 150 $\mu\text{M}/\%$ (2,7 %: 400 μM , Nishikawa et al. (2005)), 190 $\mu\text{M}/\%$ (0,5 %: 94 μM , 1,0 %: 184 μM , Lim et al. (2014)) bis 210 $\mu\text{M}/\%$ (2,0 %: 420 μM , Haseneder et al. (2009)). Dabei konnte in einer früheren Arbeit unseres Labors mittels Gaschromatographie gezeigt werden, dass die c_{aq} der volatilen Anästhetika Sevofluran und Isofluran linear mit den Handradeinstellungen am Vapor korrelieren (Haseneder et al. 2009). Dies deckt sich ebenfalls mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Messungen, siehe **Tabelle 1**.

Als Vergleichswert wurde die Empfehlung ausgesprochen, für *in vitro* Versuche bei Raumtemperatur mit Sevofluran eine mittlere effektive Konzentration (sog. EC_{50} -Wert: *half maximal effective concentration*) von 330 μM anzunehmen (Garcia, Kolesky und Jenkins 2010). Rechnerisch ergibt sich unter Verwendung geeigneter Verteilungskoeffizienten und nach notwendigen Temperaturkorrekturen (Franks und Lieb 1993, 1996) bei Raumtemperatur eine MAC-äquivalente c_{aq} von 380 μM (Haseneder et al. 2009). Somit sind die im Rahmen der vorliegenden Experimente applizierten Sevofluran-Konzentrationen im Bereich von 80 μM bis 690 μM Sevofluran sicher klinisch relevant. Die hohe Konzentration von 1470 μM Sevofluran war in diesem Zusammenhang bewusst ausgewählt und wurde primär zur Berechnung von IC_{50} -Werten herangezogen. Allerdings kamen in vorausgehenden elektrophysiologischen Arbeiten, welche die Wirkung von Sevofluran in unterschiedlichen molekularen Kontexten evaluierten, auch zum Teil deutlich höhere Konzentrationen zum Einsatz, etwa 2000 μM (Barber et al. 2014) oder 2000 μM bis 8000 μM (Lecker et al. 2013).

4.2. Die Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit

Die Ergebnisse funktioneller Bildgebungsstudien führten zu der Hypothese, dass Anästhetika durch Hyperpolarisation und einer konsekutiv verminderten Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen zur Entstehung und Aufrechterhaltung des Bewusstseinsverlusts beitragen könnten (Alkire, Haier und Fallon 2000). Dabei scheint dem Wechsel von einem tonischen Aktivitätsmuster der Signaltransmission zum Kortex während des Zustands von Wachheit (Steriade, McCormick und Sejnowski 1993; McCormick und Bal 1997) zu dem sog. „Burst-Modus“ während der unterschiedlichen Schlafphasen eine wichtige Rolle zuzukommen (Pape et al. 2005; Franks 2008). Der Burst-Modus von TK-Schaltneuronen ist durch langsame, rhythmische Aktionspotenzialfolgen und eine Verschiebung des Membranpotenzials in Richtung Hyperpolarisation mit konsekutiver Disruption von afferentem Informationstransfer zum Kortex gekennzeichnet (Huguenard und McCormick 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es ab einer Konzentration von 690 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 1,8–2,1-fache MAC) zu einer signifikanten Hyperpolarisation des Ruhemembranpotenzials (RMP) kam (**Abbildung 10**). Bereits ab 80 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 0,21–0,24-fache MAC) konnte eine signifikante Reduktion des R_M (**Abbildung 11**) sowie eine Verschiebung des Schwellenpotentials in Richtung Depolarisation beobachtet werden (**Abbildung 12**), ab 330 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 0,9–1,0-fache MAC) war die AP-Frequenz signifikant vermindert (**Abbildung 13**). Diese Ergebnisse lassen sich gut mit Daten aus Arbeiten in Übereinstimmung bringen, die den Einfluss von Isofluran auf passive und aktive Membraneigenschaften von TK-Schaltneuronen in Ratten untersuchten. Auch hier führte Isofluran dosisabhängig zu einer Hyperpolarisation des RMPs (Ries und Puil 1999a, 1999b), einer Verminderung des R_M , einer Reduktion der tonischen AP-Frequenz und sowie einer Verschiebung des AP-Schwellenpotentials in Richtung Depolarisation (Ries und Puil 1999b). Hiervon abweichend existiert eine Arbeit, die zwar von gleichgerichteten Effekten auf aktive Membraneigenschaften von TK-Schaltneuronen berichtet, allerdings keine signifikanten Veränderungen des RMPs und des R_M unter Isofluran-Applikation feststellen konnte (Eckle et al. 2012). Mit einer mechanistisch überzeugenden Erklärung bezüglich dieser divergierenden Ergebnisse vermögen die Autoren der Studie indes nicht aufzuwarten, vielmehr wird auf allgemeine Limitationen in der Vergleichbarkeit der Daten hingewiesen, wie etwa eine mögliche interne biologische Variabilität der verwendeten Versuchstiere, Unterschiede hinsichtlich Umwelt, Ernährung oder Behausung sowie unterschiedlicher Versuchsbedingungen (Eckle et al. 2012).

Mit Blick auf weitere Anästhetika-Klassen offenbaren sich neben Ähnlichkeiten auch substanzspezifische Unterschiede. So bewirkte das intravenöse Anästhetikum Propofol in TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplex in klinisch relevanter Dosierung eine mit der Wirkung von Sevofluran vergleichbare Hyperpolarisation des RMPs um -2 bis -4 mV, zudem kam es zu

einer signifikanten Reduktion des R_M auf 72 % des Ausgangswertes (was einer im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Wirkung von Sevofluran im Bereich von 450 μM bis 690 μM entspricht).¹⁰ In diesem Zusammenhang schien die Wirkung von Propofol auf den R_M insbesondere auf eine Wirkung an GABA_A -Rs zurückzuführen zu sein (Ying et al. 2006). Allgemein bedeutet eine Abnahme des zellulären R_M eine verringerte Erregbarkeit von Neuronen, da entsprechend des Ohm'schen Gesetzes ein unveränderter Membranstrom konsekutiv eine geringere Depolarisation des Membranpotenzials bewirkt und somit die Auftretenswahrscheinlichkeit von Aktionspotenzialen reduziert wird (Mongiati et al. 2009; Rettinger, Schwarz und Schwarz 2018). Selbst in Hirnschnitten, die drei Stunden nach intraperitonealer Propofol-Injektion angefertigt wurden, war das AP-Schwellenpotential von TK-Schaltneuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe noch signifikant in Richtung Depolarisation verschoben (Ying et al. 2006). Ähnliche Effekte auf den R_M konnten zudem für das Barbiturat Pentobarbital in Neuronen des Corpus geniculatum mediale des auditorischen Thalamus festgestellt werden. Zudem führte Pentobarbital bezüglich der aktiven Membraneigenschaften in Abhängigkeit vom Membranpotenzial zu einer Aufhebung des tonischen Entladungsmusters sowie des Burst-Modus von APs, welche sich erst durch stärkere Strominjektionen wiederherstellen ließen (Wan und Puil 2002). Die gleiche Beobachtung wurde auch im Rahmen dieser Arbeit unter Sevofluran-Applikation gemacht (Daten nicht im Ergebnisteil gezeigt), was auf eine Blockade durch Shunting-Effekte hinweisen könnte (Wan und Puil 2002). Im Gegensatz hierzu hatte das Edelgas Xenon, dessen Einsatz als Anästhetikum in einer funktionellen Bildgebungsstudie ebenfalls zu einer Reduktion des regionalen Metabolismus im Thalamus führte (Rex et al. 2006), keinen signifikanten Effekt auf das RMP, das Schwellenpotential von APs oder die AP-Frequenz von TK-Schaltneuronen und bewirkte sogar eine Zunahme des R_M (Mattusch et al. 2015). Bezüglich des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts kann dies als weiterer Hinweis für bedeutende substanzspezifische Unterschiede verstanden werden (Rudolph und Antkowiak 2004; Antkowiak und Grasshoff 2015).

Um die molekularen Mechanismen, mittels derer Sevofluran zu einer verminderten intrinsischen Erregbarkeit mit Veränderungen der passiven und aktiven Membraneigenschaften von TK-Schaltneuronen führt, genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden die Wirkung von Sevofluran auf HCN-Kanäle sowie die tonische und phasische GABA_A -R-vermittelte Inhibition genauer untersucht.

¹⁰ Interessanterweise konnte ein mit Propofol vergleichbarer Effekt auf das RMP und den R_M durch Applikation des spezifischen HCN-Kanal-Blocker erzielt werden (Ying et al. 2006), wobei als Einschränkung die Spezifität von ZD7288 für die Blockade von HCN-Kanal vermittelten Strömen durch experimentelle Daten zum Teil in Frage gestellt (Wu et al. 2012).

4.3. Die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal-vermittelten *Voltage Sag* und *Rebound Delay*

TK-Schaltneurone im VB-Komplex des Thalamus demonstrieren in Folge eines hyperpolarisierenden Stromimpulses einen sog. depolarisierenden *Voltage Sag* mit einer anschließenden, niedrighschwelliger AP-Salve (sog. *Rebound Burst*), welche mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung auftritt (dem sog. *Rebound Delay*), sowie einer Nachdepolarisation (*afterdepolarization*, ADP) (Ying und Goldstein 2005; Ying et al. 2006). Der den charakteristischen *Voltage Sag* vermittelnde Kationenstrom I_h beruht in TK-Schaltneuronen maßgeblich auf der HCN-Kanal Isoform Typ 2 (Ludwig et al. 2003). Dabei besteht eine inverse Korrelation zwischen Amplitude des *Voltage Sags* und dem *Rebound Delay*, was zuerst an dopaminergen Neuronen des Hirnstamms demonstriert wurde (Neuhoff et al. 2002) und sich auch im Fall von TK-Schaltneuronen bestätigte (Ying et al. 2006; Mattusch et al. 2015).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sevofluran dosisabhängig mit einer IC_{50} von $735,3 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 1,9–2,2-fache MAC) zu einer signifikanten Abnahme des *Voltage Sags* führt sowie dosisabhängig ab einer Konzentration von $330 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 0,9–1,0-fache MAC) eine signifikante Verlängerung des *Rebound Delays* induziert (siehe **Abbildung 15** und **16**). Dabei zeigte sich eine moderate inverse Korrelation zwischen *Voltage Sag* und *Rebound Delay* unter Kontrollbedingungen. Unter Sevofluran-Applikation wurde der die Beziehung beschreibenden Korrelationskoeffizient deutlich negativer mit einer zunehmenden Steigung der entsprechenden Regressionsgeraden, ähnlich wie im Fall von Propofol (Ying et al. 2006) und Xenon (Mattusch et al. 2015). Da der *Voltage Sag* maßgeblich von dem Kationenstrom I_h abhängt (Ludwig et al. 2003), ist diese Veränderung der Korrelation als konsistent mit der supprimierenden Wirkung von Sevofluran auf I_h -abhängige Spannungsantworten von TK-Schaltneuronen zu betrachten.

Die niedrighschwelliger *Rebound Bursts* von TK-Schaltneuronen im VB-Kernkomplex des Thalamus in Folge einer Membran-Hyperpolarisation führen zu einer Erregung kortikaler Pyramidenzellen (Wahl-Schott und Biel 2009), vor allem via nicht-NMDA-glutamaterger Projektionen (Hill und Greenfield 2013). Durch die funktionelle Beeinträchtigung von TK-Schaltneuronen in der Generierung von *Rebound Bursts* könnte Sevofluran zu einer verminderten kortikalen Exzitation führen. Dies wird durch eine andere Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt, in welcher mit Hilfe der *Voltage-sensitive dye imaging* (VSDI)-Technik unter Sevofluran dosisabhängig eine globale Abnahme sowie eine zeitliche Verzögerung der kortikalen Depolarisation infolge einer elektrischen Stimulation des VB-Kernkomplexes des Thalamus beobachtet werden konnte (Kratzer et al. 2017). Einen ähnlichen Effekt auf die TK-Netzwerkaktivität hatte auch das Edelgas Xenon (Mattusch et al. 2015). Ob eine Beeinträchtigung der präsynaptischen HCN-Kanal-Funktion zu einer Inhibition oder

Verstärkung von synaptischer Transmission führt, ist umstritten (Beaumont et al. 2002; Boyes et al. 2007). Eine experimentelle Arbeit konnte jedoch zeigen, dass im Hippocampus die glutamaterge synaptische Transmission durch einen Stickstoffmonoxid-Cyclisches Guanosinmonophosphat-abhängigen Signalweg via präsynaptischer HCN-Kanäle aktiviert wird (Neitz et al. 2011). Somit könnte die verringerte kortikale Depolarisation unter Sevofluran auch darauf zurückzuführen sein, dass Sevofluran durch seine dosisabhängige Beeinträchtigung von HCN-Kanälen in TK-Schaltneuronen zu einer verminderten Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat in kortikalen Synapsen führt.

Interessanterweise führte das intravenöse Anästhetikum Propofol zu einer deutlich differenzierteren Modulation der thalamokortikalen Signaltransmission: hier zeigte sich mit Hilfe der VSDI-Technik eine Beeinträchtigung tiefer kortikaler Strukturen infolge von thalamischer Stimulation (Kratzer et al. 2017). Dies kann als weiterer Hinweis verstanden werden, dass der anästhetikavermittelte Bewusstseinsverlust auf einer substanzspezifischen Modulation unterschiedlicher neuronaler Signalwege beruht. Und so finden sich bei genauer Betrachtung neben den substanzspezifischen Unterschieden auf Netzwerk-Ebene auch differenzierte Effekte auf zellulärer Ebene. Denn selbst unter der hohen Konzentration von 1470 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 3,9–4,5-fache MAC) kam es zu keiner vollständigen Aufhebung des *Voltage Sags*. Demgegenüber führte die Applikation von Propofol in einer klinisch relevanten Dosierung von 5 μM zu einer beinahe vollständigen Abnahme des *Voltage Sags*, wobei durch die anschließende Zugabe des spezifischen HCN-Kanal-Blockers ZD7288 kein additiver Effekt erzielt werden konnte. Dies wurde als okklusiver Effekt gewertet (Ying et al. 2006), der sich für Sevofluran in klinisch relevanten Dosierungen nicht replizieren ließ. Dies bestätigte sich auch in einer anderen, kürzlich publizierten Arbeit, die den Effekt von Sevofluran auf sich entwickelnde cholinerge Interneuronen des Striatums von Mäusen untersuchte (Sugasawa et al. 2018). Dabei handelt es sich um eine Neuronenpopulation, die ebenfalls eine hohe HCN2-Expression aufweist (Santoro et al. 2000). Hier zeigte sich, dass die Applikation von 4,0 % Sevofluran via Vapor bei Raumtemperatur zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude des *Voltage Sags* führte (die Amplitude des *Voltage Sags* betrug unter Kontrollbedingungen $-12,48 \pm 1,38$ mV und unter Sevofluran 4,0 % $-10,89 \pm 1,57$ mV)¹¹, aber keine vollständigen Aufhebung bewirkte.

Ergänzend könnte in weiterführenden Experimenten eine Ko-Applikation von Sevofluran und des spezifischen GABA_A-R-Blockers Bicucullin sinnvoll sein, um einen möglichen GABA_A-R-vermittelten Effekt auf *Voltage Sag* und *Rebound Delay* zu evaluieren (Ying et al. 2006). Hierdurch könnte präzisiert werden, ob die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal

¹¹ Die erheblichen Unterschiede in den Absolutwerten des *Voltage Sags* sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in der Arbeit von Sugasawa et al. (2018) eine Extrazellulärlösung ohne Ba²⁺ verwendet wurde. Ba²⁺ bewirkt eine Demaskierung des *Voltage Sags* (Dahunashvili et al. 2018).

vermittelten Kationenstrom I_h tatsächlich direkter Natur ist. Auch wurde keine spezielle IZ zur Isolierung von I_h verwendet, um potenziell kontaminierende Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ströme zu minimieren (Ying et al. 2006).

4.4. Die Wirkung von Sevofluran auf die HCN-Kanal vermittelten I_h , $V_{1/2}$ und τ_{fast}

Der HCN-Kanal vermittelte Kationenstrom I_h spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Membranpotentials und -widerstandes von TK-Schaltneuronen. Aufgrund ihrer intrinsischen Schrittmacheraktivität tragen HCN-Kanäle auf molekularer Ebene zudem maßgeblich zur Generierung von rhythmischen Oszillationen im TK-Netzwerk bei. Dieser Umstand wiederum impliziert eine funktionelle Beteiligung von HCN-Kanälen in der Regulierung unterschiedlicher Bewusstseinszustände (Pape 1996; Pape et al. 2005; Meuth et al. 2006; Ying et al. 2006; Biel et al. 2009; He et al. 2014; Calabro et al. 2015). Im Wesentlichen konnten zwei Effekte von Sevofluran auf native HCN-Kanäle in TK-Schaltneuronen nachgewiesen werden. Zum einen kam es erst ab einer vergleichsweise hohen Konzentration von 690 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 1,8-2,1-fache MAC) zu einer signifikanten, aber geringen Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) in Richtung Hyperpolarisation (siehe **Abbildung 19, 20**). Zum anderen konnte ab einer Konzentration von 330 μM Sevofluran eine signifikante Reduktion der maximalen I_h -Amplitude (bei einem Membranpotential von -133 mV) mit einer IC_{50} von 1175 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 3,1–3,6-fache MAC) festgestellt werden. Aber auch im Bereich von physiologischeren Membranpotentialen war eine signifikante Abnahme der I_h -Amplitude zu verzeichnen: so ließ sich beispielsweise für ein Membranpotential von -73 mV eine IC_{50} von 950 μM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 2,5–2,9-fache MAC) ermitteln (siehe **Abbildung 17**).

Dabei zeigten die Werte von $V_{1/2}$ unter Kontrollbedingungen (-84,3 mV bis -87,7 mV für unterschiedliche Versuchsreihen, siehe **Abbildung 20**) eine gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Werten von $V_{1/2}$ für TK-Schaltneurone. So betrug $V_{1/2}$ bei Budde et al. (2008) -86 ± 1 mV, bei Datunashvili et al. (2018) $-86,4 \pm 0,9$ mV, bei Meuth et al. (2006) -87 ± 2 mV oder bei Ludwig et al. (2003) -88 ± 1 mV. Dennoch weisen die Werte in der Literatur auch in diesem Zusammenhang eine gewisse Streubreite auf und reichen von $-79,2 \pm 0,4$ mV (Ying et al. 2006) bis $-98,8 \pm 1,6$ mV (Mattusch et al. 2015). $V_{1/2}$ -Werte unterscheiden sich dabei in Abhängigkeit von der jeweiligen HCN Isoform und sind etwa im Fall von HCN1 und HCN3 deutlich in Richtung Depolarisation verschoben (Stieber et al. 2005). In TK-Schaltneuronen finden sich vor allem HCN2- und HCN4-Kanäle (Moosmang et al. 1999; Notomi und Shigemoto 2004), wobei HCN2 die prädominante Isoform zu sein scheint (Ludwig et al. 2003). Auch entsprachen zuvor gemessene Aktivierungskinetiken von nativen I_h -Strömen in TK-Schaltneuronen Werten, die mittels heterolog exprimierter HCN2-Kanälen, nicht aber HCN4-Kanälen, ermittelt wurden (Ludwig et al. 1999; Biel et al. 2009; Mattusch et al. 2015).

Schließlich kommt es in TK-Schaltneuronen von HCN2^{-/-}-Mäusen zu einem Verlust von I_h (Ludwig et al. 2003). Dies spricht zusammenfassend dafür, dass die beobachteten Effekte auf native I_h-Ströme vor allem durch HCN2 vermittelt werden.

Wie erwähnt, fiel der Hyperpolarisations-Shift unter Xenon (Mattusch et al. 2015), Propofol (Ying et al. 2006) und Halothan (Sirois, Lynch und Bayliss 2002; Budde et al. 2008) in klinisch relevanter Dosierung deutlich stärker aus als unter Sevofluran (in welchem Fall ein vergleichbarer Effekt erst ab einer Konzentration von 1470 µM Sevofluran festgestellt werden konnte). Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen zu sein, dass volatile Anästhetika in ihrer modulierenden Wirkung auf HCN-Kanäle eine deutliche Isoform-Spezifität aufweisen und die Untereinheiten-Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Neuronen-Typ stark variiert (Moosmang et al. 1999). So wurde gezeigt, dass die volatilen Anästhetika Isofluran und Halothan im Fall von HCN1- und HCN2-Kanälen dosisabhängig eine Verschiebung von V_{1/2} in Richtung Hyperpolarisation und eine Abnahme der maximalen I_h-Amplitude verursachen (Sirois, Lynch und Bayliss 2002; Chen et al. 2005). Interessanterweise ergaben sich dabei deutliche Unterschiede im Vergleich zwischen HCN1- und HCN2-Kanälen. So fiel der hyperpolarisierende Shift von V_{1/2} im Fall von HCN1 Kanälen prominent aus (Halothan 300 µM¹²: -9,0 ± 0,7 mV; Isofluran 900 µM¹³: -10,1 ± 0,9 mV, siehe Chen et al. (2005)), wohingegen der Effekt auf HCN2-Kanäle deutlich geringer war (Halothan 300 µM: -3,6 ± 0,6 mV; Isofluran 900 µM: -3,7 ± 1,5 mV, siehe Chen et al. (2005)). Da bei TK-Schaltneuronen der Kationenstrom I_h maßgeblich von HCN2-Kanälen vermittelt wird (Ludwig et al. 2003), könnten hierdurch Unterschiede im Ausmaß des Hyperpolarisations-Shifts erklärt werden. Dies wurde auch durch kürzlich publizierte Daten über die Wirkung von Sevofluran auf den HCN-Kanal-vermittelten Kationenstrom I_h und dessen Aktivierungskinetik in sich entwickelnden cholinergen Interneuronen des Striatums von Mäusen bestätigt. Hier zeigte sich eine geringe Verschiebung von V_{1/2} um ca. -3,1 mV unter Sevofluran (Sugasawa et al. 2018). In dieser Neuronenpopulation stellt HCN2 – neben HCN4 in geringerem Umfang – ebenfalls den maßgeblichen Isoform-Typ in Mäusen dar (Santoro et al. 2000). Zum anderen könnte der vergleichsweise geringe Hyperpolarisations-Shift, der erst ab einer Konzentration von 690 µM Sevofluran auftrat, darauf zurückzuführen sein, dass es trotz Zugabe von 150 µM Ba²⁺ in die Extrazellulärlösung zu einem Anstieg von sog. K⁺-Leck-Strömen kam (*leak currents*), siehe **Abbildung 14**. Diesen Leck-Strömen wird u. a. die hyperpolarisierende Wirkung von volatilen Anästhetika auf das RMP von Neuronen zugeschrieben (Patel et al. 1999; Ries und Puil 1999a, 1999b). Hierdurch könnte der Effekt von Sevofluran auf V_{1/2} maskiert werden. Eine ähnliche Beobachtung ist auch bei Budde et al. (2008) beschrieben. Hier führten Isofluran und

¹² 300 µM Halothan: c_{aq} äquivalent zu 1-fache MAC bei Raumtemperatur (Chen et al. 2005)

¹³ 900 µM Isofluran: c_{aq} äquivalent zu 3,2-fache MAC bei Raumtemperatur (Garcia, Kolesky und Jenkins 2010)

Sevofluran in TK-Schaltneuronen selbst in Anwesenheit von 2 mM Ba²⁺ zu einem so starken Anstieg von Leck-Strömen, dass die Analyse der I_{Tail}-Ströme nur eingeschränkt möglich war.

Bezüglich der Reduktion der maximalen I_h-Amplitude erscheinen die substanzspezifischen Unterschiede weniger stark ausgeprägt, obwohl auch diesbezüglich der HCN-Isoform und damit der spezifischen Neuronenpopulation eine wichtige Rolle zukommt. Während volatile Anästhetika zu keiner signifikanten Abnahme der maximalen I_h-Amplitude von HCN1-Kanälen führten, kam es im Zusammenhang mit HCN2-Kanälen unter 500 µM¹⁴ Halothan zu einer Abnahme der maximalen I_h-Amplitude um ca. 27 % und unter 900 µM Isofluran um ca. 20 % (Chen et al. 2005). Ein gleichgerichteter und quantitativ vergleichbarer Effekt auf die maximale I_h-Amplitude wie im Fall von Sevofluran wurde auch für Xenon (Mattusch et al. 2015) und Propofol (Ying et al. 2006) beobachtet.

HCN-Kanal-vermittelte Ströme (I_h) weisen in Folge von Hyperpolarisation im Voltage-Clamp-Modus eine charakteristische Aktivierungskinetik auf. Diese Kinetik kann mittels bi-exponentieller Kurvenanpassung beschrieben werden, wobei sich im Vergleich verschiedener Isoformen des HCN-Kanals Unterschiede zeigen (Santoro et al. 2000). Im Fall von HCN2 überwiegt dabei die langsame Komponente der Aktivierung (τ_{slow}) bis etwa zum Potential der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$. Durch weitere Spannungssprünge in Richtung Hyperpolarisation nimmt hingegen der Anteil von τ_{fast} an der Strom-Amplitude schnell zu und die Bedeutung von τ_{slow} nimmt ab (Santoro et al. 2000). Es zeigte sich, dass es ab einer Konzentration von 450 µM Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 1,2–1,4-fache MAC) zu einer signifikanten Verlängerung der Aktivierungszeitkonstanten τ_{fast} bei einem Membranpotential von -133 mV kam, siehe **Abbildung 18**. Sevofluran bewirkt somit eine Verlangsamung der I_h-Aktivierung. Ein vergleichbarer Effekt von Sevofluran konnte auch im Fall von cholinergen Interneuronen des Striatums nachgewiesen werden (Sugasawa et al. 2018).

In der Zusammenschau sprechen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten dafür, dass Sevofluran einen inhibitorisch-modulierenden Effekt auf HCN-Kanäle in TK-Schaltneuronen entfaltet. Dabei wird auf Grundlage von Mutagenesis-Experimenten und Simulationen angenommen, dass sowohl volatile Anästhetika als auch Propofol HCN-Kanäle in ihrem geschlossenen Zustand stabilisieren, aber mechanistische Unterschiede in der Bedeutung von cAMP bestehen (Chen et al. 2005; Lyashchenko et al. 2007; Riegelhaupt, Tibbs und Goldstein 2018).

Die Funktion von HCN-Kanälen wird durch intrazelluläres cAMP moduliert (Luthi und McCormick 1999; Frere und Luthi 2004; Biel et al. 2009), wobei cAMP durch Bindung an die C-terminale Domäne die intrinsische allosterische Inhibition von HCN Kanälen aufhebt und

¹⁴ 500 µM Halothan: c_{aq} äquivalent zu 1,7-fache MAC bei Raumtemperatur (Chen et al. 2005)

somit aktivierend wirkt (Ishii et al. 1999; Ludwig et al. 1999; Chen et al. 2005). Die Sensitivität gegenüber cAMP scheint sich in Abhängigkeit von der jeweiligen HCN-Isoform zu unterscheiden, wobei im Fall von HCN2 saturierende Konzentrationen von cAMP eine deutliche Verschiebung des $V_{1/2}$ in Richtung Depolarisation induzieren (Stieber et al. 2005; Mattusch et al. 2015). Zudem führt cAMP zu einer Beschleunigung der Aktivierungskinetik und verstärkt I_h -Ströme (Pape 1996). Inwieweit die Suppression von I_h in TK-Schaltneuronen dabei von Interaktionen zwischen Anästhetika und cAMP beeinflusst wird, scheint substanzspezifischen Unterschieden zu unterliegen (Riegelhaupt, Tibbs und Goldstein 2018). Zwar führen sowohl Propofol als auch volatile Anästhetika und Xenon zu einer Verschiebung von $V_{1/2}$ in Richtung Hyperpolarisation, die Wirkung von Propofol auf $V_{1/2}$ scheint aber unabhängig von cAMP zu sein (Ying et al. 2006), wohingegen im Fall von Xenon durch Zugabe von cAMP in die IZ sowohl die Wirkung auf $V_{1/2}$ als auch auf die I_h -Amplitude aufgehoben wurde. Dies könnte dafür sprechen, dass Xenon durch die Reduktion von intrazellulärem cAMP oder durch einen Antagonismus an der cAMP-Bindungsstelle die Funktion des HCN-Kanals beeinflusst (Mattusch et al. 2015). Auch eine Interaktion von Sevofluran mit cAMP wäre denkbar, da im Fall von Isofluran und Halothan die Effekte auf HCN1- und HCN2-Kanäle cAMP-abhängig waren (Chen et al. 2005; Chen et al. 2009). So existieren beispielsweise Daten, die verminderte intrazelluläre cAMP-Level im dorsalen Hippocampus von Ratten nach prolongierter Sevofluran-Exposition demonstrieren (Xiong et al. 2013). Dieser Effekt könnte durch eine inhibitorische Wirkung von volatilen Anästhetika auf das Enzym Adenylylcyclase (AC) vermittelt werden, wie etwa im Fall von Halothan in braunen Adipozyten (Ohlson et al. 2004) sowie im Fall von Sevofluran und Isofluran in humanen Neuroblastom-Zellen (Kuroda et al. 2004) gezeigt werden konnte. Außerdem wurde in einer weiteren Arbeit nachgewiesen, dass eine Gain-of-Function-Mutation eines AC-kodierenden Gens in *C. elegans* mit konsekutiv erhöhten cAMP-Konzentrationen in Nervenzellen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Isofluran führte (Saifee et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von cAMP nicht evaluiert. Ergänzende Versuche, in denen eine Aufrechterhaltung des intrazellulären cAMP-Levels angestrebt wird, könnten in diesem Zusammenhang sinnvoll sein, um mögliche Verdünnungseffekte auszuschließen (Riegelhaupt, Tibbs und Goldstein 2018).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der Einsatz von Sevofluran in TK-Schaltneuronen dosisabhängig die Wahrscheinlichkeit erhöht, die nativen HCN-Kanäle in einem geschlossenen Zustand zu halten. Es liegt nahe, dass dies wie im Fall von anderen volatilen Anästhetika (Chen et al. 2005; Chen et al. 2009) durch einen cAMP-abhängigen Mechanismus vermittelt wird, der experimentelle Nachweis hierfür steht jedoch noch aus. Funktionell könnte die inhibitorische Wirkung von Sevofluran auf HCN-Kanäle von TK-Schaltneuronen eine wichtige Komponente bezüglich des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts darstellen, da diesen Kanälen eine entscheidende Rolle bei der Generierung von synchronisierten

Oszillationen im TK-Netzwerk zukommt, wie sie typischerweise in Phasen des Schlafs oder auch unter Narkose auftreten (Voss und Sleight 2007; Franks 2008; Wahl-Schott und Biel 2009; He et al. 2014).

Allerdings ist die verminderte intrinsischen Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen nach Sevofluran-Applikation wahrscheinlich nicht nur durch seine Wirkung auf HCN-Kanäle zu erklären, sondern muss in einem komplexen Zusammenspiel mit der Modulation weiterer membranständiger Kanäle verstanden werden. Insbesondere K_{2P} -Kanälen wird eine zentrale Rolle in der Regulierung des Membranpotentials von Neuronen zugeschrieben, indem sie die basale Membranpermeabilität für K^+ -Ionen regulieren (Goldstein et al. 2001; Yao et al. 2017). Bezüglich dieser diversen Superfamilie von Kanälen konnte im Fall von TK-Schaltneuronen mittels *In-situ*-Hybridisierung eine hohe Expressionsrate von TASK-3 sowie eine moderate Expression von TASK-1, TRAAK und TWIK-1 nachgewiesen werden (Talley et al. 2001). Dabei scheint das Membranpotential von TK-Schaltneuronen maßgeblich durch die Interaktion von HCN2- mit TASK-3-Kanälen reguliert zu werden (Meuth et al. 2003; Meuth et al. 2006). Seit Längerem ist bekannt, dass volatile Anästhetika K_{2P} -Kanäle modulieren und hierdurch eine Hyperpolarisation von TK-Schaltneuronen mit konsekutiv reduzierter neuronaler Erregbarkeit induzieren (Patel et al. 1999; Patel und Honore 2001; Franks und Honore 2004; Franks 2008). So führt Isofluran zu einer Aktivierung von TASK-Kanälen *in vivo* und *in vitro* (Berg et al. 2004), in Übereinstimmung mit Arbeiten, die eine dosisabhängige Aktivierung von sog. K^+ -Leck-Strömen (*leak currents*) in TK-Schaltneuronen berichteten (Ries und Puil 1999a). Auch Halothan demonstrierte sowohl in Hirnstamm-Motoneuronen (Sirois, Lynch und Bayliss 2002) als auch in TK-Schaltneuronen des dorsalen Corpus geniculatum laterale (Budde et al. 2008) nicht nur eine Inhibition des Kationenstroms I_h , sondern aktivierte auch einen TASK-ähnlichen K^+ -Strom. Die unter Sevofluran beobachtete Hyperpolarisation des Membranpotentials könnte damit z. T. auch auf die Modulation von K_{2P} -Kanälen zurückzuführen sein (Zhao et al. 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Sevofluran als positiver allosterischer Modulator an spannungsaktivierten K^+ -Kanälen wirkt (K_v) (Liang et al. 2015), die ebenfalls im Thalamus exprimiert werden (Vacher, Mohapatra und Trimmer 2008) und denen eine fundamentale Bedeutung in der Regulierung des Schwellenpotentials, der Repolarisation, der Fortleitung sowie des Entladungsmusters von Aktionspotenzialen zugeschrieben wird (Robbins und Tempel 2012). Aber auch eine hemmende Wirkung von Sevofluran auf spannungsaktivierten Natrium (Na_v)-Kanäle wäre denkbar, um die Wirkung auf die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen zu erklären. Diese werden ebenfalls im Thalamus exprimiert (Trimmer und Rhodes 2004; Vacher, Mohapatra und Trimmer 2008). Die aktuelle Datenlage ist diesbezüglich jedoch nicht eindeutig. So konnte erst ab der vergleichsweise hohen Konzentration von 1000 μ M Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 2,6–3,0-fache MAC) ein hemmender Effekt auf eine Gruppe von Na_v -Kanäle nachgewiesen werden,

möglicherweise via Proteinkinase-C-vermittelter Signaltransduktion. Allerdings ließ sich der Effekt mit einer Konzentration von 500 μM Sevofluran nicht replizieren, was die klinische Relevanz in Frage stellt (Yokoyama et al. 2011). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigte sich kein Effekt von Sevofluran auf die Kinetik oder Amplitude von APs (Daten im Ergebnisteil nicht angegeben). Andere experimentelle Daten sprechen dagegen für eine Wirkung der volatilen Anästhetika Isofluran und Sevofluran auf Na_v -Kanäle in klinisch relevanten Dosierungen (Rehberg, Xiao und Duch 1996; Zhao et al. 2019). Darüber hinaus konnte für das volatile Anästhetikum Halothan in klinisch relevanter Dosierung eine inhibitorische Wirkung auf präsynaptische Natriumkanäle demonstriert werden, mit konsekutiv verminderter Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat (Ratnakumari und Hemmings 1998). Diese Wirkung volatiler Anästhetika auf präsynaptische Na_v -Kanäle wurde in weiteren Studien bestätigt (Baumgart et al. 2015; Pal et al. 2015). Im Kontext von thalamokortikaler Signaltransduktion erscheinen diesbezüglich weitere Untersuchungen vielversprechend.

4.5. Die Wirkung von Sevofluran auf die GABA_A -R-vermittelte Inhibition

Das TK-Netzwerk ist eine zentrale neuronale Zielstruktur im Rahmen des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts (Angel 1993; Alkire, Haier und Fallon 2000; Alkire und Miller 2005). Neben Einflüssen des extrathalamischen inhibitorischen Systems¹⁵ weisen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TK-Schaltneurone des VB-Kernkomplexes – wie alle übrigen Kerngebiete des dorsalen Thalamus auch – starke inhibitorische Projektionen von GABAergen Interneuronen des NRT auf, welcher durch seine besondere anatomische Lage sowie seine bidirektionalen Konnektivität mit Thalamus und Kortex in der Vermittlung von *Bottom-Up*- sowie *Top-Down*-Prozessen eine besondere Rolle einnimmt (Buzsáki 2006; Ferrarelli und Tononi 2011). Lokale GABAerge Interneurone sind dahingegen im VB-Kernkomplex des Thalamus so gut wie nicht existent (Harris und Hendrickson 1987; Munsch et al. 2005). Während Tiefschlafphasen demonstrieren Interneurone des NRT ein durch rhythmische AP-Salven gekennzeichnetes Entladungsmuster¹⁶, wodurch via GABAerger synaptischer Transmission stärkere postsynaptische inhibitorische Antworten in TK-Schaltneuronen hervorgerufen werden (Steriade 2001). Dies begünstigt in Folge einer zunehmenden Hyperpolarisation der TK-Schaltneuronen die Generierung von *Rebound Bursts* in einer Frequenz von 1 bis 3 Hz (δ -Wellen), die im TK-Netzwerk synchronisieren und konsekutiv zu einem verminderten Informationstransfer zum Kortex führen (Steriade et al. 1993; Steriade 1997, 2003). Hiermit vergleichbar demonstrieren Patienten in Vollnarkose

¹⁵ Zum extrathalamischen inhibitorischen Systems zählen die Basalganglien, die sog. Zona incerta, die Area pretektalis und die Formatio reticularis pontis (Halassa und Acsady 2016)

¹⁶ Dies stellt den grundlegenden Mechanismus in der Generierung von sog. Schlafspindeln dar (Steriade 2003)

ebenfalls langsam-wellige EEG-Aktivität (Chander et al. 2014). Im Fall des volatilen Anästhetikums Isofluran konnte gezeigt werden, dass es *in vivo* zu einer starken Verminderung der AP-Feuerrate von TK-Schaltneuronen bei gleichzeitig weitestgehend erhaltenem sensorischen Input zum Thalamus kommt (Detsch et al. 1999), wobei diese inhibitorischen Effekte durch die lokale Applikation des spezifischen GABA_A-R-Antagonisten Bicucullin in den VPM des Thalamus aufgehoben werden konnten (Vahle-Hinz et al. 2001). Es lag daher nahe, dass auch Sevofluran seine Wirkung auf die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen u. a. mittels Modulation GABAerger Inhibition vermittelt.

Ohnehin wird die Verstärkung – insbesondere synaptischer – GABAerger Inhibition als ein zentraler molekularer Mechanismus gewertet, welcher zu dem Komplexen Phänomen des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts *in vivo* beiträgt (Hemmings et al. 2005; Grasshoff et al. 2006; Franks 2008). GABA_A-Rs stellen den am weitest verbreiteten und wichtigsten inhibitorischen Rezeptor-Typ im ZNS von adulten Säugetieren dar, wobei es durch die Bindung von GABA zu einem Einstrom von Chloridionen mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zelle kommt (Olsen und Sieghart 2008, 2009). Bekannterweise bewirken die volatilen Anästhetika Desfluran, Isofluran und Sevofluran in klinisch relevanten Dosierungen eine Verstärkung der Funktion von synaptischen GABA_A-Rs, ebenso wie vier weitere Vertreter aus der Gruppe der zehn am häufigsten verwendeten Anästhetika (Mihic et al. 1994; Nishikawa und Harrison 2003; Garcia, Kolesky und Jenkins 2010; Dai, Perouansky und Pearce 2012; Kotani und Akaike 2013). Diese intrasynaptischen GABA_A-Rs zeichnen sich durch eine niedrige Affinität gegenüber GABA aus und generieren inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) kurzer Dauer und mit einer schnellen Deaktivierungszeitkonstanten (Mody und Pearce 2004). Im Fall von TK-Schaltneuronen setzen sie sich v. a. aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 2$ zusammen (Jia et al. 2008; Jia et al. 2005). Dabei rückt neben der synaptischen, phasischen Form GABAerger Inhibition zunehmend eine persistierende, tonische Inhibition in den Fokus (Olsen 2015; Spiegel, Bichler und Garcia 2017). Neben der extrasynaptischen Membranlokalisation unterscheiden sich die an der tonischen Inhibition beteiligten GABA_A-Rs auch in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung und ihren pharmakologischen Eigenschaften, wie etwa einer weitaus höheren Affinität gegenüber GABA sowie einer fehlenden Desensibilisierung (Yeung et al. 2003; Belelli et al. 2005; Franks 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Sevofluran in einer Konzentration von 690 μM (ca. 1,8–2,1-fache MAC) auf die phasische und tonische GABA_A-R-vermittelte Inhibition in TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Bedeutung der $\alpha 4$ -Untereinheit des GABA_A-Rs gelegt, welche in der Form von $\alpha 4\beta 2/3\delta$ -GABA_A-Rs in dieser Neuronenpopulation stark exprimiert wird und vor allem in extra- und perisynaptischer Lokalisation vorzufinden ist (Belelli et al. 2005; Cope, Hughes und Crunelli

2005; Jia et al. 2005). Hierfür wurden $\alpha 4^{-/-}$ -Mäuse mit einem konventionellen Knockout verwendet.

4.5.1. Phasische Inhibition

Es zeigte sich, dass es unter Sevofluran in TK-Schaltneuronen von WT-Mäusen ($\alpha 4^{+/+}$) zu einer Verstärkung der phasischen GABA_A-R-vermittelten Inhibition kam. So führte Sevofluran zu einer Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstanten τ_d mit konsekutiv erhöhtem Ladungstransfer. Ein vergleichbarer Effekt war im Fall von $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen zu verzeichnen, mit dem Unterschied, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der mIPSC-Frequenz kam. Im Vergleich der mIPSC-Parameter von $\alpha 4^{-/-}$ - und WT-Mäusen fiel dabei auf, dass mIPSCs in TK-Schaltneuronen von $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen eine kürzere Aktivierungszeit und einen niedrigeren Ladungstransfer aufwiesen bei im Übrigen guter Übereinstimmung.

Dabei deuten Daten aus *in vitro* Ableitungen von TK-Schaltneuronen sowie von hippocampalen CA1-Neuronen mit genetisch modifizierten GABA_A-Rs darauf hin, dass der prolongierende Effekt von Isofluran (jedoch nicht von Halothan) auf die Deaktivierungskinetik maßgeblich durch die $\alpha 1$ -Untereinheit vermittelt wird (Sonner et al. 2007; Ying et al. 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich dabei gut mit Daten, die den Einfluss von Isofluran in Konzentrationen unterhalb der MAC-Grenze auf IPSCs in TK-Schaltneuronen von $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen untersuchten (Jia et al. 2008). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Deaktivierungszeitkonstanten unter Kontrollbedingungen im Vergleich mit WT-Mäusen und Isofluran führte dosisabhängig in beiden Gruppen zu einer Verlängerung von τ_d (Jia et al. 2008). Leider wurden bezüglich weiterer IPSC-Parameter keine Angaben gemacht, zudem handelte es sich um sog. spontane IPSCs (sIPSCs) ohne TTX in der Extrazellulärlösung. Allerdings ergaben Messungen von hippocampalen Körnerzellen des Gyrus Dentatus (GD), dass der Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit auch in dieser Neuronenpopulation zu einer Veränderung der mIPSC-Kinetik führt (Chandra et al. 2006; Liang et al. 2008). Interessanterweise kam es aber in beiden Arbeiten zu einer Verlangsamung der mIPSC-Kinetik durch den Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit mit einer signifikant verlängerten Aktivierungszeit und Deaktivierungszeitkonstanten im Vergleich zu WT-Tieren, wohingegen der Einfluss auf den Ladungstransfer und die mIPSC-Amplitude jeweils unterschiedlich bewertet wurde. In der Zusammenschau erscheinen die Ergebnisse dieses Dissertationsvorhabens bezüglich der veränderten mIPSC-Kinetik mit einer verkürzten Aktivierungskinetik sowie einem reduzierten Ladungstransfer durch den Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit plausibel. Zwar wurden in hippocampalen Neuronen des GD wiederholt ein entgegengesetzter Effekt auf die Aktivierungszeit beobachtet, allerdings handelt es sich um eine andere Neuronenpopulation und Vergleichswerte für TK-Schaltneurone fehlen bisher in

der Literatur. In Messungen von TK-Schaltneuronen mit gekoppelten Neuronen des NRT von Tieren mit globalen Knockout der $\alpha 4$ -Untereinheit ergab allerdings die Messung von Burst-vermittelten IPSCs sowohl eine signifikante Abnahme des Ladungstransfers als auch der Deaktivierungszeitkonstanten ohne signifikante Veränderung der IPSC-Amplitude (Herd et al. 2013)

Bezüglich der synaptischen GABAergen Inhibition wurden von Jia et al. (2008) der Einfluss von Isofluran auf sog. spontane IPSCs (sIPSCs) in WT-Tieren untersucht, die sich von mIPSCs durch die fehlende Zugabe von TTX in die Extrazellulärlösung unterscheiden. Übereinstimmend mit Sevofluran wurde keine signifikante Veränderung auf die sIPSC-Amplitude beobachtet, allerdings auch nicht auf die Frequenz, wohingegen Isofluran in höheren Konzentrationen ebenfalls zu einer starken Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstanten τ_d führte. Dies deckt sich zudem mit der berichteten Wirkung von Isofluran auf sIPSCs in Pyramidenzellen des auditorischen Kortex (Verbny, Merriam und Banks 2005) sowie in Pyramidenzellen des Hippocampus (Dai, Perouansky und Pearce 2012). Mit Hinblick auf die Rolle der $\alpha 4$ -Untereinheit scheint Isofluran in den Konzentrationen 25 bis 250 μM eine vergleichbare Wirkung auf die Deaktivierungszeitkonstante von sIPSCs sowohl in WT- als auch $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen zu haben, diesbezüglich konnten die Autoren keine signifikanten Unterschiede bei gleichgerichteten Effekten feststellen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen somit eine Verlängerung der phasischen, durch synaptische GABA_A-R-vermittelten Ströme, wobei dieser Effekt unabhängig von der $\alpha 4$ -Untereinheit zu sein scheint. Dies erfolgte anhand der Auswertung von spontan auftretenden, sog. *miniature inhibitory postsynaptic currents* (mIPSCs).

4.5.2. Tonische Inhibition

Bezüglich der tonischen Inhibition führte Sevofluran in TK-Schaltneuronen von WT-Tieren zu einer starken Zunahme. Interessanterweise bewirkte der Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit keine Zunahme, sondern sogar eine leichte Abnahme im Sinne einer auswärts gerichteten Verschiebung des Haltestroms. Wie aus **Abbildung 25** hervorgeht, war dieser Effekt in $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen zwar signifikant, aber quantitativ gering ausgeprägt, was die biologische Relevanz der beobachteten Abnahme relativiert. Dabei waren unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des applizierten Haltestroms zwischen der WT- und $\alpha 4^{-/-}$ -Gruppe festzustellen.

Frühere Arbeiten ergaben übereinstimmend, dass TK-Schaltneuronen eine tonische, GABA_A-R-vermittelte Inhibition demonstrieren (Belelli et al. 2005; Cope, Hughes und Crunelli 2005; Jia et al. 2005; Chandra et al. 2006). Auch wurde bereits von Chandra et al. (2006) die Bedeutung

der $\alpha 4$ -Untereinheit des GABA_A-Rs in der Vermittlung tonischer Inhibition in hippocampalen Körnerzellen des GD sowie in TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes untersucht, wobei es sich in beiden Fällen um Neuronenpopulationen mit hoher Expressionsrate der $\alpha 4$ -Untereinheit handelt (Wisden et al. 1992; Pirker et al. 2000). Dabei zeigte sich, dass in $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen hippocampale Neurone des GD eine deutlich reduzierte tonische Inhibition und TK-Schaltneurone überhaupt keine messbare tonische Inhibition demonstrierten (Chandra et al. 2006). In einer weiteren Arbeit konnte festgestellt werden, dass es in hippocampalen Neuronen des GD von $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen ebenfalls zu einer signifikant reduzierten, geringen tonischen Inhibition mit einem Verlust der Ethanol-vermittelten Potenzierung der tonischen Inhibition kam (Liang et al. 2008). Eine deutlich reduzierte, aber vorhandene tonische Inhibition in TK-Schaltneuronen von Tieren mit globalen Knockout der $\alpha 4$ -Untereinheit wurde wiederum in der Arbeit von Herd et al. (2013) beschrieben. Damit scheint der Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit zu einer bedeutsamen Reduktion der tonischen, GABA_A-R-vermittelten Inhibition in TK-Schaltneuronen zu führen.

In diesem Zusammenhang ist der Vergleich der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens erhobenen Daten mit einer Arbeit von Jia et al. (2008) von besonderem Interesse, in welcher der Einfluss von Isofluran auf phasische sowie tonische, GABA_A-R-vermittelte Inhibition in TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes von WT- sowie $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen untersucht wurde. Es zeigte sich, dass Isofluran (verwendete Konzentrationen: 25–250 μM , c_{aq} äquivalent zu 0,09–0,90-fache MAC)¹⁷ in TK-Schaltneuronen von WT-Tieren dosisabhängig zu einer einwärts gerichteten Verschiebung des Haltestroms führte. Die Veränderung der mittleren Amplitude dieses Stroms betrug für 250 μM Isofluran 51 ± 4 pA, im Vergleich hierzu bewirkte Sevofluran in einer Konzentration von 690 μM eine Veränderung von 47 ± 11 pA. Vergleichbare Veränderungen unter Isofluran wurden auch im Fall von hippocampalen Neuronen beobachtet (Caraiscos et al. 2004). Zum einen scheint Isofluran dabei eine weitaus stärkere Wirkung auf die extrasynaptischen GABA_A-Rs vom Typ $\alpha 4\beta 2\delta$ zu haben als auf die v. a. intrasynaptisch lokalisierten GABA_A-Rs vom Typ $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Zum anderen zeigte sich in einem heterologen Expressionssystem, dass Isofluran sowohl GABA-vermittelte Ströme verstärkte als auch GABA-unabhängig zu einer direkten Aktivierung von $\alpha 4\beta 2\delta$ -GABA_A-Rs führte. Die Autoren der Studie folgern hieraus, dass Isofluran durch direkte Aktivierung von extrasynaptischen GABA_A-Rs als auch durch eine Verstärkung der Wirkung von sog. *ambient* GABA im Sinne einer positiven allosterischen Modulation zu einer Zunahme der tonischen Inhibition führt (Jia et al. 2008). Bezüglich der tonischen Inhibition von $\alpha 4^{-/-}$ -Mäusen zeigten sich unter Isofluran in den Konzentrationen 25 μM bis 250 μM keine signifikante Veränderung der tonischen Inhibition.

¹⁷ Empfohlene EC₅₀ für *in vitro* Versuche bei Raumtemperatur: 280 μM (Garcia, Kolesky und Jenkins 2010) bzw. Konzentration, welcher der einfachen MAC entspricht: 270 μM (Haseneder et al. 2009).

In der Arbeit von Jia et al. (2008) wurde der Einfluss des volatilen Anästhetikums Isofluran auf die phasische und tonische, GABA_A-R-vermittelte Inhibition in TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes mit einem Fokus auf die Rolle der $\alpha 4$ -Untereinheit untersucht. Damit handelt es sich mit Ausnahme der verwendeten Konzentrationen um vergleichbare Fragestellungen, wie sie auch in diesem Dissertationsprojekt adressiert wurden. Zwar sind Sevofluran und Isofluran physiochemisch ähnliche Substanzen (siehe **Abbildung 1**), in der Literatur finden sich allerdings auch Hinweise auf bedeutsame Unterschiede bezüglich ihrer pharmakologischen Wirkung auf GABA_A-Rs. In einer neueren Arbeit von Woll et al. (2018) wurden mittels sog. *Photolabeling*-Technik und photoaktivierbarer Isofluran- und Sevofluran-Analoga die Bindungsstellen von Isofluran und Sevofluran an $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ - und $\alpha 1\beta 3$ -GABA_A-Rs untersucht, wobei Letzteren als extrasynaptischen Rezeptoren eine Bedeutung in der Vermittlung tonischer Inhibition zugeschrieben wird (Mortensen und Smart 2006). Dabei deuten die Ergebnisse dieser Untersuchung zum einen darauf hin, dass die identifizierten Bindungsstellen überwiegend spezifisch sind und sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Rezeptor-Untereinheit unterscheiden. Zum anderen zeigten sich bezüglich der Bindungsstellen von Sevofluran und Isofluran neben Gemeinsamkeiten auch mehrere Unterschiede. Interessanterweise scheinen beide Substanzen somit bezüglich ihrer Bindung an synaptische und extrasynaptische GABA_A-Rs ein hohes Maß an Selektivität zu demonstrieren. Ein ähnlich selektives Verhalten in Bezug auf die Bindung an GABA_A-Rs war bereits für Vertreter aus der Gruppe der intravenösen Anästhetika bekannt, wie etwa Propofol, Etomidat und verschiedene Barbiturate (Forman und Miller 2016). Das unterschiedliche Bindungsverhalten könnte dabei frühere Beobachtungen erklären, die funktionelle Unterschiede zwischen Isofluran und Sevofluran in ihrer Wirkung auf GABA_A-Rs beobachten konnten. In der Arbeit von Ogawa et al. (2011) wurde der Einfluss der volatilen Anästhetika Isofluran, Enfluran und Sevofluran auf phasische und tonische GABA_A-R-vermittelte Inhibition in mechanisch isolierten CA1-Neuronen des Hippocampus von Ratten mit intakten präsynaptischen Endigungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle drei Substanzen dosisabhängig zu einer Verstärkung der tonischen Inhibition führten, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Außerdem konnten die Autoren bezüglich der synaptischen Inhibition Unterschiede zwischen der Wirkung von Isofluran und Enfluran, zweier Strukturisomere, auf der einen Seite und Sevofluran auf der anderen Seite ermitteln. Während Enfluran und Isofluran zu einer Erhöhung der mIPSC-Frequenz führten, hatte Sevofluran keinen Effekt auf die Frequenz. Keine der drei Substanzen führte zu einer signifikanten Veränderung der mIPSC-Amplitude in klinisch relevanter Dosierung, wohingegen nur Sevofluran zu einer Zunahme der Deaktivierungszeitkonstanten führte (in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit). In der Zusammenschau mit weiteren Differenzen wurde eine differenzierte Modulation synaptischer und extrasynaptischer GABA_A-

Rs durch diese drei Substanzen postuliert (Ogawa et al. 2011). Dies unterstreicht die Notwendigkeit substanzspezifischer Betrachtungen.

Ein weiterer diskussionswürdiger Aspekt ist die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Bestimmung der basalen tonischen Inhibition. Dies geschah nach 20-minütiger Applikation von Sevofluran durch Zugabe von Bicucullin in die Extrazellulärlösung. Zwar deuten die Daten auf das Vorhandensein einer tonischen Inhibition sowohl in TK-Schaltneuronen von WT- als auch von $\alpha 4^{-/-}$ -Tieren hin, allerdings waren die Unterschiede im Vergleich zu den Messungen unter Kontrollbedingungen jeweils nicht signifikant. In der Applikation von Sevofluran vor Bestimmung der basalen tonischen Inhibition könnte eine Limitation der Aussagekraft dieser Daten liegen, da volatile Anästhetika als sog. „dirty drugs“ mit einer Vielzahl von Proteinen der Zellmembranen Interaktionen aufweisen, inklusive zahlreicher Bestandteile der vesikulären Neurotransmitterfreisetzung sowie spannungs- und ligandengesteuerter Ionenkanäle (Pittson, Himmel und MacIver 2004; Al-Hasan et al. 2011). Auch wurde etwa im Vergleich zu der Arbeit von Jia et al. (2008) eine relativ höhere Konzentration von Sevofluran verwendet, was die Bestimmung der basalen tonischen Inhibition beeinträchtigt haben könnte. Dies lässt ggf. die Durchführung ergänzender Messungen ohne Sevofluran-Applikation empfehlenswert erscheinen. Außerdem könnte in der Verwendung unterschiedlicher GABA_A-R Antagonisten zur Bestimmung der basalen tonischen Inhibition (Bicucullin in der vorliegenden Arbeit sowie in Herd et al. (2013), Picrotoxin u. a. in Liang et al. (2008) sowie Gabazin etwa bei Chandra et al. (2006)) eine Beeinträchtigung in der Vergleichbarkeit der Daten liegen (Johnston 2013). So interagieren Gabazin und Bicucullin mit unterschiedlichen Aminosäure-Resten des GABA_A-Rezeptors (Zhang, Xue und Chang 2008), wohingegen Picrotoxin im Gegensatz zum kompetitiven Antagonisten Bicucullin die Wirkweise eines gemischten/nicht-kompetitiven GABA_A-R-Antagonist zeigt (Krishek, Moss und Smart 1996). Auch sei auf weitere Unterschiede bezüglich der publizierten Methodiken hingewiesen, die Differenzen in Absolutwerten erklären könnten, wie etwa die Verwendung von unterschiedlichen Intrazellulärlösungen mit variierender Zusammensetzung (basierend entweder auf Kaliumchlorid- oder Caesiumchlorid). Dies beeinflusst in der Folge auch das Membranpotenzial, welches im Voltage-Clamp-Modus zur Ableitung GABA_A-R-vermittelter Ströme eingestellt werden muss.

Ein weiterer Faktor, welcher die Aussagekraft der erhobenen Daten über GABA_A-R-vermittelte Ströme beeinträchtigen könnte, ist die Durchführung der Versuche bei Raumtemperatur (20–24 °C). Dies entspricht einer weit verbreiteten Praxis (Jia et al. 2005; Belelli et al. 2005; Jia et al. 2008; Ying et al. 2009; Ogawa et al. 2011), u. a. weil die Etablierung stabiler Messbedingungen bei höheren Temperaturen deutlich beeinträchtigt ist (Bright und Smart 2013). Während auf Grundlage der bisherigen Datenlage keine Anhaltspunkte existieren, dass die Funktion von HCN2-Kanälen unter normalen Bedingungen eine Temperaturabhängigkeit

aufweist (Nakamura et al. 2013; DiFrancesco und DiFrancesco 2015),¹⁸ scheint die Funktion von GABA_A-Rs durch die vorherrschende Temperatur beeinflusst zu werden (Bright und Smart 2013a), insbesondere in Hinblick auf ihre Interaktionen mit volatilen Anästhetika (Jenkins, Franks und Lieb 1999). Dabei zeigte sich, dass es mit steigenden Temperaturen zu einer Abnahme der Affinität für GABA mit Verschiebung der entsprechenden EC₅₀-Werte sowie einer erhöhten Leitfähigkeit einzelner GABA_A-Rs kommt (Jenkins, Franks und Lieb 1999; Millingen et al. 2008). Bezüglich synaptischer Inhibition führt ein Anstieg der Temperatur zu einer erhöhten Frequenz (korrelierend mit einer erhöhten Feuerrate von inhibitorischen Interneuronen, Kim und Connors (2012)) sowie einer erhöhten Amplitude und einer schnelleren Kinetik der Deaktivierung von sIPSCs (Otis und Mody 1992), was sich auch im Fall von Neuronen des NRT sowie TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes bestätigte (Huntsman und Huguenard 2000). Auch die tonische Inhibition wird mannigfaltig durch Temperatur-abhängige Effekte moduliert (Bright und Smart 2013a), in einzelnen Neuronen führte eine Anhebung der Temperatur auf ein physiologisches Niveau zu einer Verdoppelung der tonischen Inhibition (Bright und Smart 2013b). Während verschiedene volatile Anästhetika in einer MAC-äquivalenten Konzentration bei niedrigeren Temperaturen zu einer substanzspezifischen Potenzierung von GABA-vermittelten Strömen führten, nahm dieser Effekt in einem Bereich von 10 bis 37 °C ab, wobei bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C die zuvor beobachteten Unterschiede bezüglich der Wirkung von verschiedenen volatilen Anästhetika weitestgehend ausgeglichen waren (Jenkins, Franks und Lieb 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit kamen Tiere zum Einsatz, die einen konventionellen, globalen Knockout der $\alpha 4$ -Untereinheit des GABA_A-Rs aufwiesen. Diese Tiere sind voll lebensfähig, zeigen ein normales Fortpflanzungsverhalten und unterscheiden sich bei oberflächlicher Betrachtung phänotypisch nicht von WT-Tieren, was sich mit der Charakterisierung von genetisch identischen Tieren in vorausgehenden Publikationen deckt (Chandra et al. 2006). Allerdings neigen Techniken mit einem vollständigen Knockout im Vergleich zu gezielten Interventionen eher dazu, kompensatorische Veränderungen zu induzieren, beispielsweise hinsichtlich der genauen Lokalisation und den Eigenschaften der verbleibenden Rezeptoren (Rovo et al. 2014). So scheint es im Fall von konventionellen $\alpha 4^{-/-}$ -Tieren zu einer kompensatorisch erhöhten Expression der $\gamma 2$ -Untereinheit in GABA_A-Rs zu kommen (Liang et al. 2008). Hierin könnte eine Limitation in der exakten Beurteilung der $\alpha 4$ -Untereinheit und seiner Funktion liegen.

¹⁸ Allerdings führt eine bestimmte Missense-Mutation (S126L) in HCN2-Kanälen zu einer erhöhten Temperaturempfindlichkeit dieser Kanäle, mit schnellerer Kinetik und konsekutiv erhöhtem I_h bei febrilen Temperaturen. Diese Mutation wurde in Patienten mit prolongierten Fieberkrämpfen entdeckt und könnte im Zusammenhang mit bestimmten Epilepsieformen stehen (Nakamura et al. 2013; DiFrancesco und DiFrancesco 2015).

Final sei als Limitation darauf verwiesen, dass die Messungen von $\alpha 4^{-/-}$ -TK-Schaltneuronen in einem anderen Labor erfolgten. Damit einhergehend kamen unterschiedliche Messinstrumente, Aufnahme- und Auswertprogramme zum Einsatz, auch gab es geringe Unterschiede bezüglich der verwendeten Substanzen und damit einhergehend der Osmolarität. Aus diesem Grund war zudem die Auswahl von Alters- und Zucht-korrelierten WT-Tieren nicht möglich.

Die Daten dieser Arbeit legen in Zusammenschau mit der existierenden Literatur nahe, dass die durch Sevofluran hervorgerufene Verstärkung der tonischen Inhibition in TK-Schaltneuronen des VB-Kernkomplexes spezifisch durch GABA_A-Rs mit der $\alpha 4$ -Untereinheit vermittelt wird und unabhängig von synaptischen GABA_A-Rs ist.

Die Bedeutung dieser Erkenntnis wird auch mit Hinblick auf die Arbeit von Rovo et al. (2014) über die Bedeutung von GABA_A-Rs in der Interaktion zwischen NRT und Thalamus deutlich. Trotz fokaler Deletion synaptischer GABA_A-Rs mit der Untereinheit $\gamma 2$ mittels viraler Intervention im Thalamus von Mäusen konnten weiterhin *in vivo* weitestgehend intakte, thalamokortikal-generierte Oszillationen beobachtet werden (wie etwa Schlafspindeln oder langsam-wellige kortikale Oszillationen, siehe Andrillon et al. (2011)). Extrasynaptische GABA_A-Rs des Thalamus schienen daher interessanterweise für die Aufrechterhaltung einer intakten Netzwerkfunktion ausreichend zu sein. In der weiteren Ergründung dieses überraschenden Phänomens zeigte sich erwartungsgemäß, dass *in vitro* TK-Schaltneurone mit Deletion der synaptischen GABA_A-Rs keine GABAergen synaptischen IPSCs mehr aufwiesen, wenn auf sie projizierende Neurone des NRT im tonischen Modus feuerten. Allerdings zeigten sich im Burst-Feuermodus von NRT-Neuronen phasische, GABA_A-R-vermittelte Events mit langsamer Kinetik, die als Burst-abhängige, phasische Rekrutierung extrasynaptischer GABA_A-Rs interpretiert wurden.¹⁹ Die Bedeutung extrasynaptischer GABA_A-Rs von TK-Schaltneuronen in Abhängigkeit vom Feuermuster des NRT wurde auch in konventionellen $\alpha 4^{-/-}$ -Tieren mittels Dual Patch-Clamp-Technik untersucht (Herd et al. 2013). Dabei zeigte sich, dass sowohl die phasische als auch die tonische GABA_A-R-vermittelte Inhibition von TK-Schaltneuronen in erstaunlich hohem Umfang dynamisch durch die Aktivität von projizierenden Neuronen des NRT reguliert wird. Zudem wird die Kinetik synaptischer Inhibition stark durch die Rekrutierung extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren beeinflusst. Hierdurch wird die für längere Zeit in der Literatur vertretene Ansicht, es existiere eine gewisse Dualität zwischen extrasynaptischen und synaptischen GABA_A-Rs zunehmend in Frage gestellt. Den extrasynaptischen GABA_A-Rs wurde klassischerweise eine eher statische Funktion zugewiesen, indem sie durch aus Synapsen „überlaufendes“ GABA persistierend

¹⁹ IPSCs durch AP-vermittelte Aktivierung von extrasynaptischen GABA_A-Rs mit außergewöhnlich langsamer Kinetik werden als „GABA-A-slow“ Events bezeichnet und konnten auch in anderen Hirnregionen nachgewiesen werden (Szabadics, Tamas und Soltesz 2007; Manko et al. 2012)

aktiviert werden und mittels tonischer Inhibition die Erregbarkeit von Neuronen und somit Netzwerken regulieren (Mody und Pearce 2004; Semyanov et al. 2004; Farrant und Nusser 2005). Dies deckt sich auch mit Erkenntnissen aus Arbeiten, welche eine veränderte $\alpha 4$ -Untereinheit-Lokalisation und Funktionalität im Zusammenspiel mit der häufig kolokalisierten δ -Untereinheit (Jia et al. 2005) in einem Epilepsie-Model (Peng et al. 2004) sowie einem Modell zum Alkoholentzugssyndrom (Liang et al. 2006) nachweisen konnten, was ebenfalls zu Veränderungen sowohl der tonischen als auch phasischen Inhibition führte. Mit Hinblick auf diese Erkenntnisse wird deutlich, dass die Erforschung der *in vivo* Wirkung von Anästhetika auf GABA_A-R-vermittelte Inhibition im Kontext des TK-Netzwerks sehr spezifisch mit Hinblick auf Untereinheiten-Zusammensetzung zu erfolgen hat.

Die Ergebnisse dieses Promotionsprojekts verdeutlichen die Komplexität, die aus der differenzierten Wirkung von Anästhetika auf GABA_A-Rs in Abhängigkeit von ihrer spezifischen Untereinheiten-Zusammensetzung erwächst. Neben dem anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlust zeichnet sich ein ähnliches Bild für die pharmakologische Modulation zahlreicher weiterer neuronaler Netzwerke ab, die u. a. an der Regulation von Angst, Lernen, Gedächtnis, Sucht- sowie Stress-bezogenen Verhalten beteiligt sind und in denen den jeweiligen GABA_A-R-Untereinheiten eine zentrale Rolle zukommt (Engin, Benham und Rudolph 2018). Dies unterstreicht die Bedeutung, die pharmakologische Wirkung von Substanzen auf Ebene der Rezeptor-Untereinheiten, der Neuronenpopulation sowie des neuronalen Netzwerks jeweils spezifisch zu betrachten.

5. Zusammenfassung

Das volatile Anästhetikum Sevofluran kommt weltweit und mit hoher Sicherheit im klinischen Alltag zum Einsatz. Trotz langjähriger Forschungsbemühungen sind die exakten neuronalen Mechanismen, über die Sevofluran den Bewusstseinsverlust induziert und aufrechterhält, noch nicht ausreichend verstanden. Wiederholt wurde in diesem Zusammenhang der pharmakologischen Modulation des TK-Netzwerks eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens wurde die Wirkung von Sevofluran auf die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen im VB-Kernkomplex des Thalamus untersucht. Hierzu wurden in vitalen Hirnschnitten von Mäusen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik Strom- und Spannungsantworten durch Stimulationsprotokolle im Current- und im Voltage-Clamp-Modus erzeugt. Dabei zeigte sich, dass Sevofluran zu einer Reduktion der intrinsischen Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen führte. Dosisabhängig kam es zu einer signifikanten Hyperpolarisation des RMPs, einer Reduktion des R_M , einer Verschiebung des Schwellenpotenzials in Richtung Depolarisation sowie einer Verminderung der AP-Frequenz. Bezüglich der Wirkung von Sevofluran auf HCN-Kanäle, die sich in TK-Schaltneuronen überwiegend aus der Isoform Typ 2 zusammensetzen, kam es dosisabhängig mit einer IC_{50} von $735,3 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 1,9–2,2-fache MAC) zu einer signifikanten Abnahme des *Voltage Sags* sowie ab einer Konzentration von $330 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 0,9–1,0-fache MAC) zu einer signifikanten Verlängerung des *Rebound Delays*. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es ab einer Konzentration von $690 \mu\text{M}$ Sevofluran (c_{aq} äquivalent zu 1,8–2,1-fache MAC) zu einer signifikanten Verschiebung des $V_{1/2}$ in Richtung Hyperpolarisation kam. Zudem bewirkte Sevofluran ab einer Konzentration von $330 \mu\text{M}$ eine signifikante und dosisabhängige Abnahme der maximalen I_h -Amplitude mit einer IC_{50} von $1175 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 3,1–3,6-fache MAC) sowie ab einer Konzentration von $450 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 1,2–1,4-fache MAC) eine signifikante Verlängerung der schnellen Aktivierungszeitkonstanten τ_{fast} von I_h .

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Sevofluran in einer Konzentration von $690 \mu\text{M}$ (c_{aq} äquivalent zu 1,8–2,1-fache MAC) auf die phasische und tonische, GABA_A -R-vermittelte Inhibition in TK-Schaltneuronen untersucht. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die hauptsächlich extra- und perisynaptisch lokalisierte $\alpha 4$ -Untereinheit des GABA_A -Rs gelegt. Sowohl in $\alpha 4^{+/+}$ - als auch in $\alpha 4^{-/-}$ -Tieren führte Sevofluran zu einer signifikanten Verstärkung der phasischen Inhibition von TK-Schaltneuronen mit einer Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstanten und konsekutiv erhöhtem Ladungstransfer. Demgegenüber konnte ausschließlich in TK-Schaltneuronen von WT-Tieren eine Verstärkung der tonischen Inhibition durch Sevofluran verzeichnet werden. Vielmehr führte der Verlust der $\alpha 4$ -Untereinheit des GABA_A -Rs zu einer leichten Abnahme des applizierten Haltestroms, was zum einen die bedeutsame Rolle dieser Untereinheit in der Vermittlung von tonischer Inhibition in

TK-Schaltneuronen unterstreicht. Zum anderen tragen diese Ergebnisse zu der Hypothese bei, dass Sevofluran eine differenzierte Modulation von GABA_A-Rs in Abhängigkeit von ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung bewirkt. Damit leisten die vorliegenden Ergebnisse einen Beitrag zum Verständnis über die molekularen Mechanismen auf thalamischer Ebene, mittels welcher Sevofluran zur Entstehung des anästhetikavermittelten Bewusstseinsverlusts beitragen könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, S. Y., S. W. Ying und P. A. Goldstein. 2006. „Compartmental distribution of hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channel 2 and hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channel 4 in thalamic reticular and thalamocortical relay neurons.“, *Neuroscience*, 141: 1811-25.
- Agmon, A. und B. W. Connors. 1991. „Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro.“, *Neuroscience*, 41: 365-79.
- Al-Hasan, Y. M., H. R. Krishnan, A. Ghezzi, F. J. Prado, 3rd, R. B. Robles und N. S. Atkinson. 2011. „Tolerance to anesthesia depends on synaptic proteins.“, *Behav Genet*, 41: 734-45.
- Alkire, M. T., C. D. Asher, A. M. Franciscus und E. L. Hahn. 2009. „Thalamic microinfusion of antibody to a voltage-gated potassium channel restores consciousness during anesthesia.“, *Anesthesiology*, 110: 766-73.
- Alkire, M. T., R. J. Haier und J. H. Fallon. 2000. „Toward a unified theory of narcosis: brain imaging evidence for a thalamocortical switch as the neurophysiologic basis of anesthetic-induced unconsciousness.“, *Conscious Cogn*, 9: 370-86.
- Alkire, M. T., A. G. Hudetz und G. Tononi. 2008. „Consciousness and anesthesia.“, *Science*, 322: 876-80.
- Alkire, M. T., J. R. McReynolds, E. L. Hahn und A. N. Trivedi. 2007. „Thalamic microinjection of nicotine reverses sevoflurane-induced loss of righting reflex in the rat.“, *Anesthesiology*, 107: 264-72.
- Alkire, M. T. und J. Miller. 2005. „General anesthesia and the neural correlates of consciousness.“, *Prog Brain Res*, 150: 229-44.
- Alkire, M. T., C. J. Pomfrett, R. J. Haier, M. V. Gianzero, C. M. Chan, B. P. Jacobsen und J. H. Fallon. 1999. „Functional brain imaging during anesthesia in humans: effects of halothane on global and regional cerebral glucose metabolism.“, *Anesthesiology*, 90: 701-9.
- Ando, N., Y. Sugawara, R. Inoue, T. Aosaki, M. Miura und K. Nishimura. 2014. „Effects of the volatile anesthetic sevoflurane on tonic GABA currents in the mouse striatum during postnatal development.“, *Eur J Neurosci*, 40: 3147-57.
- Andrillon, T., Y. Nir, R. J. Staba, F. Ferrarelli, C. Cirelli, G. Tononi und I. Fried. 2011. „Sleep spindles in humans: insights from intracranial EEG and unit recordings.“, *J Neurosci*, 31: 17821-34.
- Angel, A. 1993. „Central neuronal pathways and the process of anaesthesia.“, *Br J Anaesth*, 71: 148-63.
- Angell, M. 2000. „Looking back on the millennium in medicine.“, *N Engl J Med*, 342: 42-9.
- Antkowiak, B. und C. Grasshoff. 2015. *Allgemeinanästhetika. Vom molekularen Mechanismus zum klinischen Wirkprofil.* . (Eigenverlag Abbie Wiesbaden).
- Bacci, A., U. Rudolph, J. R. Huguenard und D. A. Prince. 2003. „Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneuron subclasses.“, *J Neurosci*, 23: 9664-74.
- Baker, R., T. C. Gent, Q. Yang, S. Parker, A. L. Vyssotski, W. Wisden, S. G. Brickley und N. P. Franks. 2014. „Altered activity in the central medial thalamus precedes changes in the neocortex during transitions into both sleep and propofol anesthesia.“, *J Neurosci*, 34: 13326-35.
- Bal, T. und D. A. McCormick. 1996. „What stops synchronized thalamocortical oscillations?“, *Neuron*, 17: 297-308.

- Barber, A. F., V. Carnevale, M. L. Klein, R. G. Eckenhoff und M. Covarrubias. 2014. „Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 6726-31.
- Bartho, P., T. F. Freund und L. Acsady. 2002. „Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta.“, *Eur J Neurosci*, 16: 999-1014.
- Baumgart, J. P., Z. Y. Zhou, M. Hara, D. C. Cook, M. B. Hoppa, T. A. Ryan und H. C. Hemmings, Jr. 2015. „Isoflurane inhibits synaptic vesicle exocytosis through reduced Ca²⁺ influx, not Ca²⁺-exocytosis coupling.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 11959-64.
- Beaumont, V., N. Zhong, R. C. Froemke, R. W. Ball und R. S. Zucker. 2002. „Temporal synaptic tagging by I(h) activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement.“, *Neuron*, 33: 601-13.
- Belelli, D., D. R. Peden, T. W. Rosahl, K. A. Wafford und J. J. Lambert. 2005. „Extrasynaptic GABAA receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics.“, *J Neurosci*, 25: 11513-20.
- Ben-Ari, Y. 2015. „Commentary: GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo.“, *Front Cell Neurosci*, 9: 478.
- Benninghoff, Alfred; Drenckhahn, Detlef 2014 *Taschenbuch Anatomie*. (Elsevier, Urban & Fischer München).
- Berg, A. P., E. M. Talley, J. P. Manger und D. A. Bayliss. 2004. „Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits.“, *J Neurosci*, 24: 6693-702.
- Biel, M., C. Wahl-Schott, S. Michalakis und X. Zong. 2009. „Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function.“, *Physiol Rev*, 89: 847-85.
- Blain-Moraes, S., V. Tarnal, G. Vanini, A. Alexander, D. Rosen, B. Shortal, E. Janke und G. A. Mashour. 2015. „Neurophysiological correlates of sevoflurane-induced unconsciousness.“, *Anesthesiology*, 122: 307-16.
- Blanton, M. G., J. J. Lo Turco und A. R. Kriegstein. 1989. „Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex.“, *J Neurosci Methods*, 30: 203-10.
- Bokor, H., S. G. Frere, M. D. Eyre, A. Slezia, I. Ulbert, A. Luthi und L. Acsady. 2005. „Selective GABAergic control of higher-order thalamic relays.“, *Neuron*, 45: 929-40.
- Bonin, R. P. und B. A. Orser. 2008. „GABA(A) receptor subtypes underlying general anesthesia.“, *Pharmacol Biochem Behav*, 90: 105-12.
- Booth, HS; Bixby EM 1932. „Fluorine derivatives of chloroform.“, *Industrial and Engineering Chemistry* 24: 637 - 41.
- Boyes, J., J. P. Bolam, R. Shigemoto und I. M. Stanford. 2007. „Functional presynaptic HCN channels in the rat globus pallidus.“, *Eur J Neurosci*, 25: 2081-92.
- Bright, D. P. und T. G. Smart. 2013a. „Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition.“, *Front Neural Circuits*, 7: 193.
- Bright, D. P. und T. G. Smart. 2013b. „Protein kinase C regulates tonic GABA(A) receptor-mediated inhibition in the hippocampus and thalamus.“, *Eur J Neurosci*, 38: 3408-23.
- Brioni, J. D., S. Varughese, R. Ahmed und B. Bein. 2017. „A clinical review of inhalation anesthesia with sevoflurane: from early research to emerging topics.“, *J Anesth*, 31: 764-78.
- Brooks-Kayal, A. R., M. D. Shumate, H. Jin, T. Y. Rikhter und D. A. Coulter. 1998. „Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy.“, *Nat Med*, 4: 1166-72.

- Brown, B. R., Jr. und E. J. Frink, Jr. 1992. „Whatever happened to sevoflurane?“, *Can J Anaesth*, 39: 207-9.
- Brown, D. A., P. R. Adams, A. J. Higgins und S. Marsh. 1979. „Distribution of gaba-receptors and gaba-carriers in the mammalian nervous system.“, *J Physiol (Paris)*, 75: 667-71.
- Budde, T., P. Coulon, M. Pawlowski, P. Meuth, T. Kanyshkova, A. Japes, S. G. Meuth und H. C. Pape. 2008. „Reciprocal modulation of I (h) and I (TASK) in thalamocortical relay neurons by halothane.“, *Pflugers Arch*, 456: 1061-73.
- Burkat, P. M., J. Yang und K. J. Gingrich. 2001. „Dominant gating governing transient GABA(A) receptor activity: a first latency and Po/o analysis.“, *J Neurosci*, 21: 7026-36.
- Buzsáki, G. 2006. *Rhythms of the brain*. (Oxford University Press: Oxford; New York).
- Cagetti, E., J. Liang, I. Spigelman und R. W. Olsen. 2003. „Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors.“, *Mol Pharmacol*, 63: 53-64.
- Calabro, R. S., A. Cacciola, P. Bramanti und D. Milardi. 2015. „Neural correlates of consciousness: what we know and what we have to learn!“, *Neurol Sci*, 36: 505-13.
- Campbell, C., M. Andreen, M. F. Battito, E. M. Camporesi, M. E. Goldberg, R. M. Grounds, J. Hobbhahn, P. Lumb, J. M. Murray, D. R. Solanki, S. O. Heard und P. Coriat. 1996. „A phase III, multicenter, open-label, randomized, comparative study evaluating the effect of sevoflurane versus isoflurane on the maintenance of anesthesia in adult ASA class I, II, and III inpatients.“, *J Clin Anesth*, 8: 557-63.
- Caraiscos, V. B., J. G. Newell, K. E. You-Ten, E. M. Elliott, T. W. Rosahl, K. A. Wafford, J. F. MacDonald und B. A. Orser. 2004. „Selective enhancement of tonic GABAergic inhibition in murine hippocampal neurons by low concentrations of the volatile anesthetic isoflurane.“, *J Neurosci*, 24: 8454-8.
- Cavelier, P., M. Hamann, D. Rossi, P. Mobbs und D. Attwell. 2005. „Tonic excitation and inhibition of neurons: ambient transmitter sources and computational consequences.“, *Prog Biophys Mol Biol*, 87: 3-16.
- Chander, D., P. S. Garcia, J. N. MacColl, S. Illing und J. W. Sleight. 2014. „Electroencephalographic variation during end maintenance and emergence from surgical anesthesia.“, *PLoS One*, 9: e106291.
- Chandra, D., F. Jia, J. Liang, Z. Peng, A. Suryanarayanan, D. F. Werner, I. Spigelman, C. R. Houser, R. W. Olsen, N. L. Harrison und G. E. Homanics. 2006. „GABAA receptor alpha 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 15230-5.
- Chen, X., S. Shu, D. P. Kennedy, S. C. Willcox und D. A. Bayliss. 2009. „Subunit-specific effects of isoflurane on neuronal Ih in HCN1 knockout mice.“, *J Neurophysiol*, 101: 129-40.
- Chen, X., J. E. Sirois, Q. Lei, E. M. Talley, C. Lynch, 3rd und D. A. Bayliss. 2005. „HCN subunit-specific and cAMP-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents.“, *J Neurosci*, 25: 5803-14.
- Cohen, J. . 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. (Lawrence Erlbaum Associates: Hillsdale).
- Conti, A., D. G. Iacopino, V. Fodale, S. Micalizzi, O. Penna und L. B. Santamaria. 2006. „Cerebral haemodynamic changes during propofol-remifentanyl or sevoflurane anaesthesia: transcranial Doppler study under bispectral index monitoring.“, *Br J Anaesth*, 97: 333-9.
- Cope, D. W., S. W. Hughes und V. Crunelli. 2005. „GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons.“, *J Neurosci*, 25: 11553-63.

- Dai, S., M. Perouansky und R. A. Pearce. 2012. „Isoflurane enhances both fast and slow synaptic inhibition in the hippocampus at amnestic concentrations.“, *Anesthesiology*, 116: 816-23.
- Datunashvili, M., R. Chaudhary, M. Zobeiri, A. Luttjohann, E. Mergia, A. Baumann, S. Balfanz, B. Budde, G. van Luijelaar, H. C. Pape, D. Koesling und T. Budde. 2018. „Modulation of Hyperpolarization-Activated Inward Current and Thalamic Activity Modes by Different Cyclic Nucleotides.“, *Front Cell Neurosci*, 12: 369.
- Davis, P. J., J. A. Greenberg, M. Gendelman und K. Fertal. 1999. „Recovery characteristics of sevoflurane and halothane in preschool-aged children undergoing bilateral myringotomy and pressure equalization tube insertion.“, *Anesth Analg*, 88: 34-8.
- de Groote, L. und A. C. Linthorst. 2007. „Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus.“, *Neuroscience*, 148: 794-805.
- De Hert, S. und A. Moerman. 2015. „Sevoflurane.“, *F1000Res*, 4: 626.
- Detsch, O., C. Vahle-Hinz, E. Kochs, M. Siemers und B. Bromm. 1999. „Isoflurane induces dose-dependent changes of thalamic somatosensory information transfer.“, *Brain Res*, 829: 77-89.
- DiFrancesco, J. C. und D. DiFrancesco. 2015. „Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases.“, *Front Cell Neurosci*, 6: 174.
- Dodt, H. U., K. Becker und W. Zieglgansberger. 2013. „Infrared video microscopy for visualizing neurons and neuronal excitation in brain slices.“, *Cold Spring Harb Protoc*, 2013: 1149-52.
- Dodt, H. U., M. Eder, A. Schierloh und W. Zieglgansberger. 2002. „Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices.“, *Sci STKE*, 2002: pl2.
- Dodt, H. U. und W. Zieglgansberger. 1990. „Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy.“, *Brain Res*, 537: 333-6.
- Dodt, H. U. und W. Zieglgansberger. 1994. „Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function.“, *Trends Neurosci*, 17: 453-8.
- Eckle, V. S., M. R. Digruccio, V. N. Uebele, J. J. Renger und S. M. Todorovic. 2012. „Inhibition of T-type calcium current in rat thalamocortical neurons by isoflurane.“, *Neuropharmacology*, 63: 266-73.
- Eger, E. I., 2nd, D. M. Fisher, J. P. Dilger, J. M. Sonner, A. Evers, N. P. Franks, R. A. Harris, J. J. Kendig, W. R. Lieb und T. Yamakura. 2001. „Relevant concentrations of inhaled anesthetics for in vitro studies of anesthetic mechanisms.“, *Anesthesiology*, 94: 915-21.
- Engin, E., R. S. Benham und U. Rudolph. 2018. „An Emerging Circuit Pharmacology of GABA_A Receptors.“, *Trends Pharmacol Sci*, 39: 710-32.
- Farrant, M. und Z. Nusser. 2005. „Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors.“, *Nat Rev Neurosci*, 6: 215-29.
- Ferrarelli, F. und G. Tononi. 2011. „The thalamic reticular nucleus and schizophrenia.“, *Schizophr Bull*, 37: 306-15.
- Fiset, P., T. Paus, T. Daloz, G. Plourde, P. Meuret, V. Bonhomme, N. Hajj-Ali, S. B. Backman und A. C. Evans. 1999. „Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study.“, *J Neurosci*, 19: 5506-13.
- Flohr, H., U. Glade und D. Motzko. 1998. „The role of the NMDA synapse in general anesthesia.“, *Toxicol Lett*, 100-101: 23-9.
- Fogerson, P. M. und J. R. Huguenard. 2016. „Tapping the Brakes: Cellular and Synaptic Mechanisms that Regulate Thalamic Oscillations.“, *Neuron*, 92: 687-704.

- Fogle, K. J., A. K. Lyashchenko, H. K. Turbendian und G. R. Tibbs. 2007. „HCN pacemaker channel activation is controlled by acidic lipids downstream of diacylglycerol kinase and phospholipase A2.“, *J Neurosci*, 27: 2802-14.
- Forman, S. A. und K. W. Miller. 2016. „Mapping General Anesthetic Sites in Heteromeric gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors Reveals a Potential For Targeting Receptor Subtypes.“, *Anesth Analg*, 123: 1263-73.
- Franks, N. P. 2008. „General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal.“, *Nat Rev Neurosci*, 9: 370-86.
- Franks, N. P. und E. Honore. 2004. „The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection.“, *Trends Pharmacol Sci*, 25: 601-8.
- Franks, N. P. und W. R. Lieb. 1982. „Molecular mechanisms of general anaesthesia.“, *Nature*, 300: 487-93.
- Franks, N. P. und W. R. Lieb. 1993. „Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels.“, *Br J Anaesth*, 71: 65-76.
- Franks, N. P. und W. R. Lieb. 1994. „Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia.“, *Nature*, 367: 607-14.
- Franks, N. P. und W. R. Lieb. 1996. „Temperature dependence of the potency of volatile general anaesthetics: implications for in vitro experiments.“, *Anesthesiology*, 84: 716-20.
- Frere, S. G. und A. Luthi. 2004. „Pacemaker channels in mouse thalamocortical neurones are regulated by distinct pathways of cAMP synthesis.“, *J Physiol*, 554: 111-25.
- Fuller, P. M., D. Sherman, N. P. Pedersen, C. B. Saper und J. Lu. 2011. „Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system.“, *J Comp Neurol*, 519: 933-56.
- Garcia, P. S., S. E. Kolesky und A. Jenkins. 2010. „General anesthetic actions on GABA(A) receptors.“, *Curr Neuropharmacol*, 8: 2-9.
- Geng, Y. J., Q. H. Wu und R. Q. Zhang. 2017. „Effect of propofol, sevoflurane, and isoflurane on postoperative cognitive dysfunction following laparoscopic cholecystectomy in elderly patients: A randomized controlled trial.“, *J Clin Anesth*, 38: 165-71.
- Gentz, B. A. und T. P. Malan, Jr. 2001. „Renal toxicity with sevoflurane: a storm in a teacup?“, *Drugs*, 61: 2155-62.
- Giacino, J., J. J. Fins, A. Machado und N. D. Schiff. 2012. „Central thalamic deep brain stimulation to promote recovery from chronic posttraumatic minimally conscious state: challenges and opportunities.“, *Neuromodulation*, 15: 339-49.
- Goldstein, P. A. 2015. „HCN1 Channels as Targets for Volatile Anesthetics: Coming to the Fore.“, *Anesth Analg*, 121: 594-6.
- Goldstein, S. A., D. Bockenhauer, I. O'Kelly und N. Zilberberg. 2001. „Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits.“, *Nat Rev Neurosci*, 2: 175-84.
- Gonsowski, C. T., M. J. Laster, E. I. Eger, 2nd, L. D. Ferrell und R. L. Kerschmann. 1994. „Toxicity of compound A in rats. Effect of a 3-hour administration.“, *Anesthesiology*, 80: 556-65.
- Grant, E., A. Hoerder-Suabedissen und Z. Molnar. 2012. „Development of the corticothalamic projections.“, *Front Neurosci*, 6: 53.
- Grasshoff, C., B. Drexler, U. Rudolph und B. Antkowiak. 2006. „Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects.“, *Curr Pharm Des*, 12: 3665-79.
- Guay, J. 2011. „General anaesthesia does not contribute to long-term post-operative cognitive dysfunction in adults: A meta-analysis.“, *Indian J Anaesth*, 55: 358-63.

- Gugino, L. D., R. J. Chabot, L. S. Pritchep, E. R. John, V. Formanek und L. S. Aglio. 2001. „Quantitative EEG changes associated with loss and return of consciousness in healthy adult volunteers anaesthetized with propofol or sevoflurane.“, *Br J Anaesth*, 87: 421-8.
- Halassa, M. M. und L. Acsady. 2016. „Thalamic Inhibition: Diverse Sources, Diverse Scales.“, *Trends Neurosci*, 39: 680-93.
- Halassa, M. M., Z. Chen, R. D. Wimmer, P. M. Brunetti, S. Zhao, B. Zikopoulos, F. Wang, E. N. Brown und M. A. Wilson. 2014. „State-dependent architecture of thalamic reticular subnetworks.“, *Cell*, 158: 808-21.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F. J. Sigworth. 1981. „Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.“, *Pflugers Arch*, 391: 85-100.
- Harris, R. M. und A. E. Hendrickson. 1987. „Local circuit neurons in the rat ventrobasal thalamus--a GABA immunocytochemical study.“, *Neuroscience*, 21: 229-36.
- Haseneder, R., S. Kratzer, L. von Meyer, M. Eder, E. Kochs und G. Rammes. 2009. „Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation.“, *Eur J Pharmacol*, 623: 47-51.
- Haseneder, R., G. Rammes, W. Zieglgansberger, E. Kochs und G. Hapfelmeier. 2002. „GABA(A) receptor activation and open-channel block by volatile anaesthetics: a new principle of receptor modulation?“, *Eur J Pharmacol*, 451: 43-50.
- He, C., F. Chen, B. Li und Z. Hu. 2014. „Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations.“, *Prog Neurobiol*, 112: 1-23.
- Hemmings, H. C., Jr., M. H. Akabas, P. A. Goldstein, J. R. Trudell, B. A. Orser und N. L. Harrison. 2005. „Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action.“, *Trends Pharmacol Sci*, 26: 503-10.
- Hemmings, H. C., Jr., P. M. Riegelhaupt, M. B. Kelz, K. Solt, R. G. Eckenhoff, B. A. Orser und P. A. Goldstein. 2019. „Towards a Comprehensive Understanding of Anesthetic Mechanisms of Action: A Decade of Discovery.“, *Trends Pharmacol Sci*, 40: 464-81.
- Herd, M. B., A. R. Brown, J. J. Lambert und D. Belelli. 2013. „Extrasynaptic GABA(A) receptors couple presynaptic activity to postsynaptic inhibition in the somatosensory thalamus.“, *J Neurosci*, 33: 14850-68.
- Herrero, M. T., C. Barcia und J. M. Navarro. 2002. „Functional anatomy of thalamus and basal ganglia.“, *Childs Nerv Syst*, 18: 386-404.
- Hill, M. R. und S. A. Greenfield. 2013. „Characterization of early cortical population response to thalamocortical input in vitro.“, *Front Neurosci*, 7: 273.
- Hillis, L. D., P. K. Smith, J. L. Anderson, J. A. Bittl, C. R. Bridges, J. G. Byrne, J. E. Cigarroa, V. J. DiSesa, L. F. Hiratzka, A. M. Hutter, Jr., M. E. Jessen, E. C. Keeley, S. J. Lahey, R. A. Lange, M. J. London, M. J. Mack, M. R. Patel, J. D. Puskas, J. F. Sabik, O. Selnes, D. M. Shahian, J. C. Trost, M. D. Winniford, A. K. Jacobs, J. L. Anderson, N. Albert, M. A. Creager, S. M. Ettinger, R. A. Guyton, J. L. Halperin, J. S. Hochman, F. G. Kushner, E. M. Ohman, W. Stevenson, C. W. Yancy und Guidelines American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice. 2012. „2011 ACCF/AHA guideline for coronary artery bypass graft surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.“, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 143: 4-34.
- Holiday, D. A. und F. R. Smith. 1981. „Clinical characteristics and biotransformation of sevoflurane in healthy human volunteers.“, *Anesthesiology*, 54: 100-6.
- Hudetz, A. G. 2012. „General anesthesia and human brain connectivity.“, *Brain Connect*, 2: 291-302.

- Huguenard, J. R. und D. A. McCormick. 2007. „Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations.“, *Trends Neurosci*, 30: 350-6.
- Huntsman, M. M. und J. R. Huguenard. 2000. „Nucleus-specific differences in GABA(A)-receptor-mediated inhibition are enhanced during thalamic development.“, *J Neurophysiol*, 83: 350-8.
- Huntsman, M. M., D. M. Porcello, G. E. Homanics, T. M. DeLorey und J. R. Huguenard. 1999. „Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus.“, *Science*, 283: 541-3.
- Ichinose, F., W. D. Mi, M. Miyazaki, T. Onouchi, T. Goto und S. Morita. 1998. „Lack of correlation between the reduction of sevoflurane MAC and the cerebellar cyclic GMP concentrations in mice treated with 7-nitroindazole.“, *Anesthesiology*, 89: 143-8.
- Ishii, T. M., M. Takano, L. H. Xie, A. Noma und H. Ohmori. 1999. „Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node.“, *J Biol Chem*, 274: 12835-9.
- Jenkins, A., N. P. Franks und W. R. Lieb. 1999. „Effects of temperature and volatile anesthetics on GABA(A) receptors.“, *Anesthesiology*, 90: 484-91.
- Jia, F., L. Pignataro, C. M. Schofield, M. Yue, N. L. Harrison und P. A. Goldstein. 2005. „An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons.“, *J Neurophysiol*, 94: 4491-501.
- Jia, F., M. Yue, D. Chandra, G. E. Homanics, P. A. Goldstein und N. L. Harrison. 2008. „Isoflurane is a potent modulator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus.“, *J Pharmacol Exp Ther*, 324: 1127-35.
- Johnston, G. A. 2013. „Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists.“, *Br J Pharmacol*, 169: 328-36.
- Johr, M. 2016. „[Inhalation and intravenous anesthesia in pediatric patients].“, *Anaesthesist*, 65: 415-22.
- Jones, E. G. 1998. „A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections.“, *Adv Neurol*, 77: 49-71; discussion 72-3.
- Jones, E. G. 2009. „Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex.“, *Ann N Y Acad Sci*, 1157: 10-23.
- Joo, H. S. und W. J. Perks. 2000. „Sevoflurane versus propofol for anesthetic induction: a meta-analysis.“, *Anesth Analg*, 91: 213-9.
- Jordan, D., R. Ilg, V. Riedl, A. Schorer, S. Grimberg, S. Neufang, A. Omerovic, S. Berger, G. Untergehrer, C. Preibisch, E. Schulz, T. Schuster, M. Schroter, V. Spoormaker, C. Zimmer, B. Hemmer, A. Wohlschlager, E. F. Kochs und G. Schneider. 2013. „Simultaneous electroencephalographic and functional magnetic resonance imaging indicate impaired cortical top-down processing in association with anesthetic-induced unconsciousness.“, *Anesthesiology*, 119: 1031-42.
- Kaisti, K. K., L. Metsahonkala, M. Teras, V. Oikonen, S. Aalto, S. Jaaskelainen, S. Hinkka und H. Scheinin. 2002. „Effects of surgical levels of propofol and sevoflurane anesthesia on cerebral blood flow in healthy subjects studied with positron emission tomography.“, *Anesthesiology*, 96: 1358-70.
- Kaneda, M., M. Farrant und S. G. Cull-Candy. 1995. „Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum.“, *J Physiol*, 485 (Pt 2): 419-35.
- Kharasch, E. D. 1995. „Biotransformation of sevoflurane.“, *Anesth Analg*, 81: S27-38.

- Kim, J. A. und B. W. Connors. 2012. „High temperatures alter physiological properties of pyramidal cells and inhibitory interneurons in hippocampus.“, *Front Cell Neurosci*, 6: 27.
- Kitano, H., J. R. Kirsch, P. D. Hurn und S. J. Murphy. 2007. „Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain.“, *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 1108-28.
- Klinke, R., H. C. Pape, A. Kurtz und S. Silbernagl. 2014. *Physiologie*. (Georg Thieme Verlag: Stuttgart; New York).
- Kopp Lugli, A., C. S. Yost und C. H. Kindler. 2009. „Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia.“, *Eur J Anaesthesiol*, 26: 807-20.
- Kotani, N. und N. Akaike. 2013. „The effects of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission.“, *Brain Res Bull*, 93: 69-79.
- Kozlov, A. S., M. C. Angulo, E. Audinat und S. Charpak. 2006. „Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 10058-63.
- Krasowski, M. D. 2003. „Contradicting a unitary theory of general anesthetic action: a history of three compounds from 1901 to 2001.“, *Bull Anesth Hist*, 21: 1, 4-8, 21 passim.
- Kratzer, S., C. Mattusch, P. S. Garcia, S. Schmid, E. Kochs, G. Rammes, G. Schneider, M. Kreuzer und R. Haseneder. 2017. „Propofol and Sevoflurane Differentially Modulate Cortical Depolarization following Electric Stimulation of the Ventrobasal Thalamus.“, *Front Comput Neurosci*, 11: 109.
- Krishek, B. J., S. J. Moss und T. G. Smart. 1996. „A functional comparison of the antagonists bicuculline and picrotoxin at recombinant GABAA receptors.“, *Neuropharmacology*, 35: 1289-98.
- Kullmann, D. M., A. Ruiz, D. M. Rusakov, R. Scott, A. Semyanov und M. C. Walker. 2005. „Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why?“, *Prog Biophys Mol Biol*, 87: 33-46.
- Kuroda, M., D. Yoshikawa, K. Nishikawa, S. Saito und F. Goto. 2004. „Volatile anesthetics inhibit calcitonin gene-related peptide receptor-mediated responses in pithed rats and human neuroblastoma cells.“, *J Pharmacol Exp Ther*, 311: 1016-22.
- Langsjo, J. W., A. Maksimow, E. Salmi, K. Kaisti, S. Aalto, V. Oikonen, S. Hinkka, R. Aantaa, H. Sipila, T. Viljanen, R. Parkkola und H. Scheinin. 2005. „S-ketamine anesthesia increases cerebral blood flow in excess of the metabolic needs in humans.“, *Anesthesiology*, 103: 258-68.
- Le Masson, G., S. Renaud-Le Masson, D. Debay und T. Bal. 2002. „Feedback inhibition controls spike transfer in hybrid thalamic circuits.“, *Nature*, 417: 854-8.
- Lecker, I., Y. Yin, D. S. Wang und B. A. Orser. 2013. „Potentiation of GABAA receptor activity by volatile anaesthetics is reduced by alpha5GABAA receptor-preferring inverse agonists.“, *Br J Anaesth*, 110 Suppl 1: i73-81.
- Lee, V. und J. Maguire. 2014. „The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type.“, *Front Neural Circuits*, 8: 3.
- Liang, J., A. Suryanarayanan, D. Chandra, G. E. Homanics, R. W. Olsen und I. Spigelman. 2008. „Functional consequences of GABAA receptor alpha 4 subunit deletion on synaptic and extrasynaptic currents in mouse dentate granule cells.“, *Alcohol Clin Exp Res*, 32: 19-26.
- Liang, J., N. Zhang, E. Cagetti, C. R. Houser, R. W. Olsen und I. Spigelman. 2006. „Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors.“, *J Neurosci*, 26: 1749-58.

- Liang, Q., W. D. Anderson, S. T. Jones, C. S. Souza, J. M. Hosoume, W. Treptow und M. Covarrubias. 2015. „Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action.“, *PLoS One*, 10: e0143363.
- Lim, B. G., F. Y. Shen, Y. B. Kim, W. B. Kim, Y. S. Kim, H. C. Han, M. K. Lee, M. H. Kong und Y. I. Kim. 2014. „Possible role of GABAergic depolarization in neocortical neurons in generating hyperexcitatory behaviors during emergence from sevoflurane anesthesia in the rat.“, *ASN Neuro*, 6.
- Liu, X., K. K. Lauer, B. D. Ward, S. J. Li und A. G. Hudetz. 2013. „Differential effects of deep sedation with propofol on the specific and nonspecific thalamocortical systems: a functional magnetic resonance imaging study.“, *Anesthesiology*, 118: 59-69.
- Ludwig, A., T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wotjak, T. Munsch, X. Zong, S. Feil, R. Feil, M. Lancel, K. R. Chien, A. Konnerth, H. C. Pape, M. Biel und F. Hofmann. 2003. „Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2.“, *EMBO J*, 22: 216-24.
- Ludwig, A., X. Zong, J. Stieber, R. Hullin, F. Hofmann und M. Biel. 1999. „Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics.“, *EMBO J*, 18: 2323-9.
- Luthi, A. und D. A. McCormick. 1998. „Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca²⁺-mediated upregulation of Ih.“, *Neuron*, 20: 553-63.
- Luthi, A. und D. A. McCormick. 1999. „Modulation of a pacemaker current through Ca(2+)-induced stimulation of cAMP production.“, *Nat Neurosci*, 2: 634-41.
- Lyashchenko, A. K., K. J. Redd, J. Yang und G. R. Tibbs. 2007. „Propofol inhibits HCN1 pacemaker channels by selective association with the closed states of the membrane embedded channel core.“, *J Physiol*, 583: 37-56.
- Magrassi, L., G. Maggioni, C. Pistarini, C. Di Perri, S. Bastianello, A. G. Zippo, G. A. Iotti, G. E. Biella und R. Imberti. 2016. „Results of a prospective study (CATS) on the effects of thalamic stimulation in minimally conscious and vegetative state patients.“, *J Neurosurg*, 125: 972-81.
- Mahmoudi, M., M. H. Kang, N. Tillakaratne, A. J. Tobin und R. W. Olsen. 1997. „Chronic intermittent ethanol treatment in rats increases GABA(A) receptor alpha4-subunit expression: possible relevance to alcohol dependence.“, *J Neurochem*, 68: 2485-92.
- Mai, J. K. und M. Majtanik. 2018. „Toward a Common Terminology for the Thalamus.“, *Front Neuroanat*, 12: 114.
- Malenka, R. C. und R. A. Nicoll. 1997. „Silent synapses speak up.“, *Neuron*, 19: 473-6.
- Maniezzi, C., F. Talpo, P. Spaiardi, M. Toselli und G. Biella. 2019. „Oxytocin Increases Phasic and Tonic GABAergic Transmission in CA1 Region of Mouse Hippocampus.“, *Front Cell Neurosci*, 13: 178.
- Manko, M., T. C. Bienvenu, Y. Dalezios und M. Capogna. 2012. „Neurogliaform cells of amygdala: a source of slow phasic inhibition in the basolateral complex.“, *J Physiol*, 590: 5611-27.
- Mann, E. O. und I. Mody. 2010. „Control of hippocampal gamma oscillation frequency by tonic inhibition and excitation of interneurons.“, *Nat Neurosci*, 13: 205-12.
- Marini, F., I. Bellugi, D. Gambi, M. Pacenti, S. Dugheri, L. Focardi und G. Tulli. 2007. „Compound A, formaldehyde and methanol concentrations during low-flow sevoflurane anaesthesia: comparison of three carbon dioxide absorbers.“, *Acta Anaesthesiol Scand*, 51: 625-32.

- Martuzzi, R., R. Ramani, M. Qiu, N. Rajeevan und R. T. Constable. 2010. „Functional connectivity and alterations in baseline brain state in humans.“, *Neuroimage*, 49: 823-34.
- Mashour, G. A. und M. T. Alkire. 2013. „Consciousness, anesthesia, and the thalamocortical system.“, *Anesthesiology*, 118: 13-5.
- Mashour, G. A., D. T. Woodrum und M. S. Avidan. 2015. „Neurological complications of surgery and anaesthesia.“, *Br J Anaesth*, 114: 194-203.
- Mattusch, C., S. Kratzer, M. Buerge, M. Kreuzer, T. Engel, C. Kopp, M. Biel, V. Hammelmann, S. W. Ying, P. A. Goldstein, E. Kochs, R. Haseneder und G. Rammes. 2015. „Impact of Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated Cation Channel Type 2 for the Xenon-mediated Anesthetic Effect: Evidence from In Vitro and In Vivo Experiments.“, *Anesthesiology*, 122: 1047-59.
- McCann, M. E., J. C. de Graaff, L. Dorris, N. Disma, D. Withington, G. Bell, A. Grobler, R. Stargatt, R. W. Hunt, S. J. Sheppard, J. Marmor, G. Giribaldi, D. C. Bellinger, P. L. Hartmann, P. Hardy, G. Frawley, F. Izzo, B. S. von Ungern Sternberg, A. Lynn, N. Wilton, M. Mueller, D. M. Polaner, A. R. Absalom, P. Szmuk, N. Morton, C. Berde, S. Soriano, A. J. Davidson und G. A. S. Consortium. 2019. „Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international, multicentre, randomised, controlled equivalence trial.“, *Lancet*, 393: 664-77.
- McCormick, D. A. und T. Bal. 1997. „Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms.“, *Annu Rev Neurosci*, 20: 185-215.
- Meera, P., R. W. Olsen, T. S. Otis und M. Wallner. 2009. „Etomidate, propofol and the neurosteroid THDOC increase the GABA efficacy of recombinant alpha4beta3delta and alpha4beta3 GABA A receptors expressed in HEK cells.“, *Neuropharmacology*, 56: 155-60.
- Meuth, S. G., T. Budde, T. Kanyshkova, T. Broicher, T. Munsch und H. C. Pape. 2003. „Contribution of TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons.“, *J Neurosci*, 23: 6460-9.
- Meuth, S. G., T. Kanyshkova, P. Meuth, P. Landgraf, T. Munsch, A. Ludwig, F. Hofmann, H. C. Pape und T. Budde. 2006. „Membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels.“, *J Neurophysiol*, 96: 1517-29.
- Mihic, S. J., S. J. McQuilkin, E. I. Eger, 2nd, P. Ionescu und R. A. Harris. 1994. „Potentiation of gamma-aminobutyric acid type A receptor-mediated chloride currents by novel halogenated compounds correlates with their abilities to induce general anesthesia.“, *Mol Pharmacol*, 46: 851-7.
- Miller, D., S. R. Lewis, M. W. Pritchard, O. J. Schofield-Robinson, C. L. Shelton, P. Alderson und A. F. Smith. 2018. „Intravenous versus inhalational maintenance of anaesthesia for postoperative cognitive outcomes in elderly people undergoing non-cardiac surgery.“, *Cochrane Database Syst Rev*, 8: CD012317.
- Miller, J. W. und J. A. Ferrendelli. 1990. „Characterization of GABAergic seizure regulation in the midline thalamus.“, *Neuropharmacology*, 29: 649-55.
- Millingen, M., H. Bridle, A. Jesorka, P. Lincoln und O. Orwar. 2008. „Ligand-specific temperature-dependent shifts in EC50 values for the GABAA receptor.“, *Anal Chem*, 80: 340-3.
- Mitrofanis, J. und R. W. Guillery. 1993. „New views of the thalamic reticular nucleus in the adult and the developing brain.“, *Trends Neurosci*, 16: 240-5.

- Mody, I. 2001. „Distinguishing between GABA(A) receptors responsible for tonic and phasic conductances.“, *Neurochem Res*, 26: 907-13.
- Mody, I. und R. A. Pearce. 2004. „Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors.“, *Trends Neurosci*, 27: 569-75.
- Mongiat, L. A., M. S. Esposito, G. Lombardi und A. F. Schinder. 2009. „Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus.“, *PLoS One*, 4: e5320.
- Moosmang, S., M. Biel, F. Hofmann und A. Ludwig. 1999. „Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain.“, *Biol Chem*, 380: 975-80.
- Mortensen, M. und T. G. Smart. 2006. „Extrasynaptic alphabeta subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons.“, *J Physiol*, 577: 841-56.
- Motulsky, H. J. 2017. „GraphPad Statistics Guide“, aufgerufen am 28 August 2019. <http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>.
- Motulsky, H. J. . 2016. „GraphPad Curve Fitting Guide“, aufgerufen am 07 August 2019. <http://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm>.
- Munsch, T., Y. Yanagawa, K. Obata und H. C. Pape. 2005. „Dopaminergic control of local interneuron activity in the thalamus.“, *Eur J Neurosci*, 21: 290-4.
- Murthy, V. N., T. Schikorski, C. F. Stevens und Y. Zhu. 2001. „Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size.“, *Neuron*, 32: 673-82.
- Nakamura, Y., X. Shi, T. Numata, Y. Mori, R. Inoue, C. Lossin, T. Z. Baram und S. Hirose. 2013. „Novel HCN2 mutation contributes to febrile seizures by shifting the channel's kinetics in a temperature-dependent manner.“, *PLoS One*, 8: e80376.
- Neher, E., B. Sakmann und J. H. Steinbach. 1978. „The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes.“, *Pflugers Arch*, 375: 219-28.
- Neitz, A., E. Mergia, U. T. Eysel, D. Koesling und T. Mittmann. 2011. „Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus.“, *Eur J Neurosci*, 33: 1611-21.
- Neuhoff, H., A. Neu, B. Liss und J. Roeper. 2002. „I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain.“, *J Neurosci*, 22: 1290-302.
- Nishikawa, K. und N. L. Harrison. 2003. „The actions of sevoflurane and desflurane on the gamma-aminobutyric acid receptor type A: effects of TM2 mutations in the alpha and beta subunits.“, *Anesthesiology*, 99: 678-84.
- Nishikawa, K., K. Kubo, J. Ishizeki, T. Takazawa, S. Saito und F. Goto. 2005. „The interaction of noradrenaline with sevoflurane on GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in the rat hippocampus.“, *Brain Res*, 1039: 153-61.
- Nishikawa, K., K. Kubo, H. Obata, Y. Yanagawa und S. Saito. 2011. „The influence of manipulations to alter ambient GABA concentrations on the hypnotic and immobilizing actions produced by sevoflurane, propofol, and midazolam.“, *Neuropharmacology*, 61: 172-80.
- Nishiyama, T. 2005. „Hemodynamic and catecholamine response to a rapid increase in isoflurane or sevoflurane concentration during a maintenance phase of anesthesia in humans.“, *J Anesth*, 19: 213-7.
- Notomi, T. und R. Shigemoto. 2004. „Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain.“, *J Comp Neurol*, 471: 241-76.
- O'Brien, R. J., S. Kamboj, M. D. Ehlers, K. R. Rosen, G. D. Fischbach und R. L. Huganir. 1998. „Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation.“, *Neuron*, 21: 1067-78.

- O'Neill, N. und S. Sylantyev. 2019. „The Functional Role of Spontaneously Opening GABAA Receptors in Neural Transmission.“, *Front Mol Neurosci*, 12: 72.
- Ogawa, S. K., E. Tanaka, M. C. Shin, N. Kotani und N. Akaike. 2011. „Volatile anesthetic effects on isolated GABA synapses and extrasynaptic receptors.“, *Neuropharmacology*, 60: 701-10.
- Ohlson, K. B., I. G. Shabalina, K. Lennstrom, E. C. Backlund, N. Mohell, G. E. Bronnikov, S. G. Lindahl, B. Cannon und J. Nedergaard. 2004. „Inhibitory effects of halothane on the thermogenic pathway in brown adipocytes: localization to adenylyl cyclase and mitochondrial fatty acid oxidation.“, *Biochem Pharmacol*, 68: 463-77.
- Olsen, R. W. 2015. „Allosteric ligands and their binding sites define gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes.“, *Adv Pharmacol*, 73: 167-202.
- Olsen, R. W. und W. Sieghart. 2008. „International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update.“, *Pharmacol Rev*, 60: 243-60.
- Olsen, R. W. und W. Sieghart. 2009. „GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology.“, *Neuropharmacology*, 56: 141-8.
- Otis, T. S. und I. Mody. 1992. „Modulation of decay kinetics and frequency of GABAA receptor-mediated spontaneous inhibitory postsynaptic currents in hippocampal neurons.“, *Neuroscience*, 49: 13-32.
- Pal, D., J. M. Jones, S. Wisidagamage, M. H. Meisler und G. A. Mashour. 2015. „Reduced Nav1.6 Sodium Channel Activity in Mice Increases In Vivo Sensitivity to Volatile Anesthetics.“, *PLoS One*, 10: e0134960.
- Palanca, B. J. A., M. S. Avidan und G. A. Mashour. 2017. „Human neural correlates of sevoflurane-induced unconsciousness.“, *Br J Anaesth*, 119: 573-82.
- Pape, H. C. 1996. „Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons.“, *Annu Rev Physiol*, 58: 299-327.
- Pape, H. C. , S. G. Meuth, T. Seidenbecher, T. Munsch und T. Budde. 2005. „Der Thalamus: Tor zum Bewusstsein und Rhythmusgenerator im Gehirn.“, *Neuroforum* 2: 44-55.
- Papouin, T. und P. G. Haydon. 2018. „Obtaining Acute Brain Slices.“, *Bio Protoc*, 8.
- Patel, A. J. und E. Honore. 2001. „Anesthetic-sensitive 2P domain K⁺ channels.“, *Anesthesiology*, 95: 1013-21.
- Patel, A. J., E. Honore, F. Lesage, M. Fink, G. Romey und M. Lazdunski. 1999. „Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels.“, *Nat Neurosci*, 2: 422-6.
- Patel, S. S. und K. L. Goa. 1996. „Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia.“, *Drugs*, 51: 658-700.
- Peden, D. R., C. M. Petitjean, M. B. Herd, M. S. Durakoglugil, T. W. Rosahl, K. Wafford, G. E. Homanics, D. Belelli, J. M. Fritschy und J. J. Lambert. 2008. „Developmental maturation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors in mouse thalamic ventrobasal neurones.“, *J Physiol*, 586: 965-87.
- Peng, Z., B. Hauer, R. M. Mihalek, G. E. Homanics, W. Sieghart, R. W. Olsen und C. R. Houser. 2002. „GABA(A) receptor changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain.“, *J Comp Neurol*, 446: 179-97.
- Peng, Z., C. S. Huang, B. M. Stell, I. Mody und C. R. Houser. 2004. „Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy.“, *J Neurosci*, 24: 8629-39.

- Peng, Z., N. Zhang, D. Chandra, G. E. Homanics, R. W. Olsen und C. R. Houser. 2014. „Altered localization of the delta subunit of the GABAA receptor in the thalamus of alpha4 subunit knockout mice.“, *Neurochem Res*, 39: 1104-17.
- Pian, P., A. Bucchi, A. Decostanzo, R. B. Robinson und S. A. Siegelbaum. 2007. „Modulation of cyclic nucleotide-regulated HCN channels by PIP(2) and receptors coupled to phospholipase C.“, *Pflugers Arch*, 455: 125-45.
- Picard, V., L. Dumont und M. Pellegrini. 2000. „Quality of recovery in children: sevoflurane versus propofol.“, *Acta Anaesthesiol Scand*, 44: 307-10.
- Pinheiro, P. S. und C. Mülle. 2008. „Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action.“, *Nat Rev Neurosci*, 9: 423-36.
- Pirker, S., C. Schwarzer, A. Wieselthaler, W. Sieghart und G. Sperk. 2000. „GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain.“, *Neuroscience*, 101: 815-50.
- Pittson, S., A. M. Himmel und M. B. MacIver. 2004. „Multiple synaptic and membrane sites of anesthetic action in the CA1 region of rat hippocampal slices.“, *BMC Neurosci*, 5: 52.
- Queenan, B. N., K. J. Lee und D. T. Pak. 2012. „Wherefore art thou, homeo(stasis)? Functional diversity in homeostatic synaptic plasticity.“, *Neural Plast*, 2012: 718203.
- Rajasekaran, K., S. Joshi, C. Sun, Z. Mtchedlishvilli und J. Kapur. 2010. „Receptors with low affinity for neurosteroids and GABA contribute to tonic inhibition of granule cells in epileptic animals.“, *Neurobiol Dis*, 40: 490-501.
- Ranft, A., D. Golkowski, T. Kiel, V. Riedl, P. Kohl, G. Rohrer, J. Pientka, S. Berger, A. Thul, M. Maurer, C. Preibisch, C. Zimmer, G. A. Mashour, E. F. Kochs, D. Jordan und R. Ilg. 2016. „Neural Correlates of Sevoflurane-induced Unconsciousness Identified by Simultaneous Functional Magnetic Resonance Imaging and Electroencephalography.“, *Anesthesiology*, 125: 861-72.
- Ratnakumari, L. und H. C. Hemmings, Jr. 1998. „Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane.“, *Anesthesiology*, 88: 1043-54.
- Rau, V., S. V. Iyer, I. Oh, D. Chandra, N. Harrison, E. I. Eger, 2nd, M. S. Fanselow, G. E. Homanics und J. M. Sonner. 2009. „Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 4 subunit knockout mice are resistant to the amnestic effect of isoflurane.“, *Anesth Analg*, 109: 1816-22.
- Raz, A., S. M. Grady, B. M. Krause, D. J. Uhrich, K. A. Manning und M. I. Banks. 2014. „Preferential effect of isoflurane on top-down vs. bottom-up pathways in sensory cortex.“, *Front Syst Neurosci*, 8: 191.
- Rehberg, B., Y. H. Xiao und D. S. Duch. 1996. „Central nervous system sodium channels are significantly suppressed at clinical concentrations of volatile anesthetics.“, *Anesthesiology*, 84: 1223-33; discussion 27A.
- Rettinger, Jürgen, Silvia Schwarz und Wolfgang Schwarz. 2018. *Elektrophysiologie*. (Springer Spektrum: Berlin).
- Rex, S., W. Schaefer, P. H. Meyer, R. Rossaint, C. Boy, K. Setani, U. Bull und J. H. Baumert. 2006. „Positron emission tomography study of regional cerebral metabolism during general anesthesia with xenon in humans.“, *Anesthesiology*, 105: 936-43.
- Riegelhaupt, P. M., G. R. Tibbs und P. A. Goldstein. 2018. „HCN and K2P Channels in Anesthetic Mechanisms Research.“, *Methods Enzymol*, 602: 391-416.
- Ries, C. R. und E. Puil. 1999a. „Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons.“, *J Neurophysiol*, 81: 1802-9.
- Ries, C. R. und E. Puil. 1999b. „Mechanism of anesthesia revealed by shunting actions of isoflurane on thalamocortical neurons.“, *J Neurophysiol*, 81: 1795-801.

- Rivera, C., J. Voipio und K. Kaila. 2005. „Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CA VII.“, *J Physiol*, 562: 27-36.
- Robbins, C. A. und B. L. Tempel. 2012. „Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models.“, *Epilepsia*, 53 Suppl 1: 134-41.
- Robinson, R. B. und S. A. Siegelbaum. 2003. „Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function.“, *Annu Rev Physiol*, 65: 453-80.
- Ropert, N., R. Miles und H. Korn. 1990. „Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus.“, *J Physiol*, 428: 707-22.
- Rossaint, Rolf, Christian Werner und Bernhard Zwißler. 2019. *Die Anästhesiologie*. (Springer: Berlin ; Heidelberg).
- Rovo, Z., F. Matyas, P. Bartho, A. Slezia, S. Lecci, C. Pellegrini, S. Astori, C. David, B. Hangya, A. Luthi und L. Acsady. 2014. „Phasic, nonsynaptic GABA-A receptor-mediated inhibition entrains thalamocortical oscillations.“, *J Neurosci*, 34: 7137-47.
- Rubaiy, H. N. 2017. „A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels.“, *J Pharm Pharm Sci*, 20: 48-67.
- Rudolph, U. und B. Antkowiak. 2004. „Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics.“, *Nat Rev Neurosci*, 5: 709-20.
- Saifee, O., L. B. Metz, M. L. Nonet und C. M. Crowder. 2011. „A gain-of-function mutation in adenylate cyclase confers isoflurane resistance in *Caenorhabditis elegans*.“, *Anesthesiology*, 115: 1162-71.
- Sakmann, B. und E. Neher. 1984. „Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes.“, *Annu Rev Physiol*, 46: 455-72.
- Santoro, B., S. Chen, A. Luthi, P. Pavlidis, G. P. Shumyatsky, G. R. Tibbs und S. A. Siegelbaum. 2000. „Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS.“, *J Neurosci*, 20: 5264-75.
- Saros, G. B., A. Doolke, R. E. Anderson und J. G. Jakobsson. 2006. „Desflurane vs. sevoflurane as the main inhaled anaesthetic for spontaneous breathing via a laryngeal mask for varicose vein day surgery: a prospective randomized study.“, *Acta Anaesthesiol Scand*, 50: 549-52.
- Scheller, M. S., L. J. Saidman und B. L. Partridge. 1988. „MAC of sevoflurane in humans and the New Zealand white rabbit.“, *Can J Anaesth*, 35: 153-6.
- Schutte, D., A. M. Zwitserloot, R. Houmes, M. de Hoog, J. M. Draaisma und J. Lemson. 2013. „Sevoflurane therapy for life-threatening asthma in children.“, *Br J Anaesth*, 111: 967-70.
- Sebaugh, J. L. 2011. „Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation.“, *Pharm Stat*, 10: 128-34.
- Sebel, L. E., J. E. Richardson, S. P. Singh, S. V. Bell und A. Jenkins. 2006. „Additive effects of sevoflurane and propofol on gamma-aminobutyric acid receptor function.“, *Anesthesiology*, 104: 1176-83.
- Semyanov, A., M. C. Walker, D. M. Kullmann und R. A. Silver. 2004. „Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone.“, *Trends Neurosci*, 27: 262-9.
- Shen, Q. Y., L. Fang, H. M. Wu, F. He, P. S. Ding und R. Y. Liu. 2015. „Repeated inhalation of sevoflurane inhibits airway inflammation in an OVA-induced mouse model of allergic airway inflammation.“, *Respirology*, 20: 258-63.
- Sherman, S. M. und R. W. Guillery. 1996. „Functional organization of thalamocortical relays.“, *J Neurophysiol*, 76: 1367-95.

- Sherman, S. M. und R. W. Guillery. 2002. „The role of the thalamus in the flow of information to the cortex.“, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357: 1695-708.
- Sieghart, W. und G. Sperk. 2002. „Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes.“, *Curr Top Med Chem*, 2: 795-816.
- Sirois, J. E., C. Lynch, 3rd und D. A. Bayliss. 2002. „Convergent and reciprocal modulation of a leak K⁺ current and I(h) by an inhalational anaesthetic and neurotransmitters in rat brainstem motoneurons.“, *J Physiol*, 541: 717-29.
- Smith, I., M. Nathanson und P. F. White. 1996. „Sevoflurane--a long-awaited volatile anaesthetic.“, *Br J Anaesth*, 76: 435-45.
- Snow, S. J. 2007. „Anaesthesia: symbol of humanitarianism.“, *BMJ*, 334 Suppl 1: s5.
- Sonner, J. M., D. Gong und E. I. Eger, 2nd. 2000. „Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains.“, *Anesth Analg*, 91: 720-6.
- Sonner, J. M., D. Gong, J. Li, E. I. Eger, 2nd und M. J. Laster. 1999. „Mouse strain modestly influences minimum alveolar anesthetic concentration and convulsivity of inhaled compounds.“, *Anesth Analg*, 89: 1030-4.
- Sonner, J. M., D. F. Werner, F. P. Elsen, Y. Xing, M. Liao, R. A. Harris, N. L. Harrison, M. S. Fanselow, E. I. Eger, 2nd und G. E. Homanics. 2007. „Effect of isoflurane and other potent inhaled anesthetics on minimum alveolar concentration, learning, and the righting reflex in mice engineered to express alpha1 gamma-aminobutyric acid type A receptors unresponsive to isoflurane.“, *Anesthesiology*, 106: 107-13.
- Speigel, I., E. K. Bichler und P. S. Garcia. 2017. „The Influence of Regional Distribution and Pharmacologic Specificity of GABAAR Subtype Expression on Anesthesia and Emergence.“, *Front Syst Neurosci*, 11: 58.
- Stein, V. und R. A. Nicoll. 2003. „GABA generates excitement.“, *Neuron*, 37: 375-8.
- Steriade, M. 1997. „Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance.“, *Cereb Cortex*, 7: 583-604.
- Steriade, M. 2001. „The GABAergic reticular nucleus: a preferential target of corticothalamic projections.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3625-7.
- Steriade, M. 2003. „The corticothalamic system in sleep.“, *Front Biosci*, 8: d878-99.
- Steriade, M., D. Contreras, R. Curro Dossi und A. Nunez. 1993. „The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks.“, *J Neurosci*, 13: 3284-99.
- Steriade, M., D. A. McCormick und T. J. Sejnowski. 1993. „Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain.“, *Science*, 262: 679-85.
- Stevens, D. R., R. Seifert, B. Bufe, F. Muller, E. Kremmer, R. Gauss, W. Meyerhof, U. B. Kaupp und B. Lindemann. 2001. „Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli.“, *Nature*, 413: 631-5.
- Stieber, J., S. Herrmann, S. Feil, J. Loster, R. Feil, M. Biel, F. Hofmann und A. Ludwig. 2003. „The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15235-40.
- Stieber, J., G. Stockl, S. Herrmann, B. Hassfurth und F. Hofmann. 2005. „Functional expression of the human HCN3 channel.“, *J Biol Chem*, 280: 34635-43.
- Strum, D. P. und E. I. Eger, 2nd. 1987. „Partition coefficients for sevoflurane in human blood, saline, and olive oil.“, *Anesth Analg*, 66: 654-6.
- Sugasawa, Y., M. Fukuda, N. Ando, R. Inoue, S. Nakauchi, M. Miura und K. Nishimura. 2018. „Modulation of hyperpolarization-activated cation current I_h by volatile anesthetic

- sevoflurane in the mouse striatum during postnatal development.“, *Neurosci Res*, 132: 8-16.
- Sun, C., W. Sieghart und J. Kapur. 2004. „Distribution of alpha1, alpha4, gamma2, and delta subunits of GABAA receptors in hippocampal granule cells.“, *Brain Res*, 1029: 207-16.
- Sun, L. S., G. Li, T. L. Miller, C. Salorio, M. W. Byrne, D. C. Bellinger, C. Ing, R. Park, J. Radcliffe, S. R. Hays, C. J. DiMaggio, T. J. Cooper, V. Rauh, L. G. Maxwell, A. Youn und F. X. McGowan. 2016. „Association Between a Single General Anesthesia Exposure Before Age 36 Months and Neurocognitive Outcomes in Later Childhood.“, *JAMA*, 315: 2312-20.
- Sur, C., S. J. Farrar, J. Kerby, P. J. Whiting, J. R. Atack und R. M. McKernan. 1999. „Preferential coassembly of alpha4 and delta subunits of the gamma-aminobutyric acidA receptor in rat thalamus.“, *Mol Pharmacol*, 56: 110-5.
- Szabadics, J., G. Tamas und I. Soltesz. 2007. „Different transmitter transients underlie presynaptic cell type specificity of GABAA,slow and GABAA,fast.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 14831-6.
- Talley, E. M., G. Solorzano, Q. Lei, D. Kim und D. A. Bayliss. 2001. „Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family.“, *J Neurosci*, 21: 7491-505.
- Tang, N., C. Ou, Y. Liu, Y. Zuo und Y. Bai. 2014. „Effect of inhalational anaesthetic on postoperative cognitive dysfunction following radical rectal resection in elderly patients with mild cognitive impairment.“, *J Int Med Res*, 42: 1252-61.
- Trimmer, J. S. und K. J. Rhodes. 2004. „Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain.“, *Annu Rev Physiol*, 66: 477-519.
- Vacher, H., D. P. Mohapatra und J. S. Trimmer. 2008. „Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons.“, *Physiol Rev*, 88: 1407-47.
- Vahle-Hinz, C., O. Detsch, M. Siemers, E. Kochs und B. Bromm. 2001. „Local GABA(A) receptor blockade reverses isoflurane's suppressive effects on thalamic neurons in vivo.“, *Anesth Analg*, 92: 1578-84.
- Velly, L. J., M. F. Rey, N. J. Bruder, F. A. Gouvitsos, T. Witjas, J. M. Regis, J. C. Peragut und F. M. Gouin. 2007. „Differential dynamic of action on cortical and subcortical structures of anesthetic agents during induction of anesthesia.“, *Anesthesiology*, 107: 202-12.
- Verbny, Y. I., E. B. Merriam und M. I. Banks. 2005. „Modulation of gamma-aminobutyric acid type A receptor-mediated spontaneous inhibitory postsynaptic currents in auditory cortex by midazolam and isoflurane.“, *Anesthesiology*, 102: 962-9.
- Villablanca, J. R. 2004. „Counterpointing the functional role of the forebrain and of the brainstem in the control of the sleep-waking system.“, *J Sleep Res*, 13: 179-208.
- Voss, L. und J. Sleigh. 2007. „Monitoring consciousness: the current status of EEG-based depth of anaesthesia monitors.“, *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 21: 313-25.
- Wahl-Schott, C. und M. Biel. 2009. „HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function.“, *Cell Mol Life Sci*, 66: 470-94.
- Wainger, B. J., M. DeGennaro, B. Santoro, S. A. Siegelbaum und G. R. Tibbs. 2001. „Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels.“, *Nature*, 411: 805-10.
- Wallin, R. F., B. M. Regan, M. D. Napoli und I. J. Stern. 1975. „Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent.“, *Anesth Analg*, 54: 758-66.
- Wallner, M., H. J. Hanchar und R. W. Olsen. 2003. „Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans.“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15218-23.

- Wan, X. und E. Puil. 2002. „Pentobarbital depressant effects are independent of GABA receptors in auditory thalamic neurons.“, *J Neurophysiol*, 88: 3067-77.
- Wang, J., S. Chen und S. A. Siegelbaum. 2001. „Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions.“, *J Gen Physiol*, 118: 237-50.
- White, P. F., J. Tang, R. H. Wender, R. Yumul, O. J. Stokes, A. Sloninsky, R. Naruse, R. Kariger, E. Norel, S. Mandel, T. Webb und A. Zaentz. 2009. „Desflurane versus sevoflurane for maintenance of outpatient anesthesia: the effect on early versus late recovery and perioperative coughing.“, *Anesth Analg*, 109: 387-93.
- Wilhelm, Wolfram. 2018. *Praxis der Anästhesiologie*. (Springer: Berlin).
- Wisden, W., D. J. Laurie, H. Monyer und P. H. Seeburg. 1992. „The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon.“, *J Neurosci*, 12: 1040-62.
- Woll, K. A., X. Zhou, N. V. Bhanu, B. A. Garcia, M. Covarrubias, K. W. Miller und R. G. Eckenhoff. 2018. „Identification of binding sites contributing to volatile anesthetic effects on GABA type A receptors.“, *FASEB J*, 32: 4172-89.
- Wu, J., N. Harata und N. Akaike. 1996. „Potentiation by sevoflurane of the gamma-aminobutyric acid-induced chloride current in acutely dissociated CA1 pyramidal neurones from rat hippocampus.“, *Br J Pharmacol*, 119: 1013-21.
- Wu, X., L. Liao, X. Liu, F. Luo, T. Yang und C. Li. 2012. „Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents?“, *Channels (Austin)*, 6: 438-42.
- Xiong, W. X., G. X. Zhou, B. Wang, Z. G. Xue, L. Wang, H. C. Sun und S. J. Ge. 2013. „Impaired spatial learning and memory after sevoflurane-nitrous oxide anesthesia in aged rats is associated with down-regulated cAMP/CREB signaling.“, *PLoS One*, 8: e79408.
- Yao, C., Y. Li, S. Shu, S. Yao, C. Lynch, D. A. Bayliss und X. Chen. 2017. „TASK channels contribute to neuroprotective action of inhalational anesthetics.“, *Sci Rep*, 7: 44203.
- Yasuda, N., S. H. Lockhart, E. I. Eger, 2nd, R. B. Weiskopf, J. Liu, M. Laster, S. Taheri und N. A. Peterson. 1991. „Comparison of kinetics of sevoflurane and isoflurane in humans.“, *Anesth Analg*, 72: 316-24.
- Yeung, J. Y., K. J. Canning, G. Zhu, P. Pennefather, J. F. MacDonald und B. A. Orser. 2003. „Tonically activated GABAA receptors in hippocampal neurons are high-affinity, low-conductance sensors for extracellular GABA.“, *Mol Pharmacol*, 63: 2-8.
- Ying, S. W., S. Y. Abbas, N. L. Harrison und P. A. Goldstein. 2006. „Propofol block of I(h) contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons.“, *Eur J Neurosci*, 23: 465-80.
- Ying, S. W. und P. A. Goldstein. 2005. „Propofol-block of SK channels in reticular thalamic neurons enhances GABAergic inhibition in relay neurons.“, *J Neurophysiol*, 93: 1935-48.
- Ying, S. W., D. F. Werner, G. E. Homanics, N. L. Harrison und P. A. Goldstein. 2009. „Isoflurane modulates excitability in the mouse thalamus via GABA-dependent and GABA-independent mechanisms.“, *Neuropharmacology*, 56: 438-47.
- Yokoyama, T., K. Minami, Y. Sudo, T. Horishita, J. Ogata, T. Yanagita und Y. Uezono. 2011. „Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Na(v)1.8, Na(v)1.7, and Na(v)1.4 expressed in *Xenopus* oocytes.“, *J Anesth*, 25: 609-13.
- Yuan, R., X. Di, P. A. Taylor, S. Gohel, Y. H. Tsai und B. B. Biswal. 2016. „Functional topography of the thalamocortical system in human.“, *Brain Struct Funct*, 221: 1971-84.

- Zeldenrust, F., P. Chameau und W. J. Wadman. 2018. „Spike and burst coding in thalamocortical relay cells.“, *PLoS Comput Biol*, 14: e1005960.
- Zhang, J., F. Xue und Y. Chang. 2008. „Structural determinants for antagonist pharmacology that distinguish the rho1 GABAC receptor from GABAA receptors.“, *Mol Pharmacol*, 74: 941-51.
- Zhao, W., M. Zhang, J. Liu, P. Liang, R. Wang, H. C. Hemmings und C. Zhou. 2019. „Isoflurane Modulates Hippocampal Cornu Ammonis Pyramidal Neuron Excitability by Inhibition of Both Transient and Persistent Sodium Currents in Mice.“, *Anesthesiology*, 131: 94-104.
- Zhou, C., P. Liang, J. Liu, B. Ke, X. Wang, F. Li, T. Li, D. A. Bayliss und X. Chen. 2015. „HCN1 Channels Contribute to the Effects of Amnesia and Hypnosis but not Immobility of Volatile Anesthetics.“, *Anesth Analg*, 121: 661-66.
- Zimmerman, S. A., M. V. Jones und N. L. Harrison. 1994. „Potentiation of gamma-aminobutyric acidA receptor Cl- current correlates with in vivo anesthetic potency.“, *J Pharmacol Exp Ther*, 270: 987-91.

Danksagung

Es ist mir ein besonderes Anliegen, all denen Personen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben, meinen Dank auszusprechen, insbesondere

Herrn Professor E. Kochs und Herrn Professor Dr. G. Schneider für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin durchzuführen.

Meinem Doktorvater und Arbeitsgruppenleiter, Herrn Professor Dr. R. Haseneder, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die exzellente fachliche Betreuung, die unkomplizierte Ansprechbarkeit in allen Belangen sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung meiner Arbeit.

Meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter, Herrn PD Dr. S. Kratzer, für die ausgezeichnete Betreuung und die hervorragende Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die Korrektur der Arbeit sowie das intensive persönliche Engagement zu jeder Zeit.

Herrn Professor Paul García, MD, für die Gelegenheit zu einem lehrreichen und produktiven Forschungsaufenthalt sowie die großzügige Beherbergung in Atlanta. Zudem danke ich allen Mitgliedern des ehemaligen Neuroanesthesia Laboratory, allen voran Herrn Dr. Matthias Kreuzer für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Allen Mitgliedern der AG Experimentelle Pharmakologie des Bewusstseinsverlusts für die überaus angenehme Zusammenarbeit. Dabei danke ich vor allem Frau Elisabeth Pircher für die Einführung in das experimentelle Arbeiten sowie Claudia und Konrad für unermüdliche und freundschaftliche Unterstützung.

Allen weiteren Mitgliedern des Labors, vor allem Tatjana und Sebastian. Auch Andreas Blaschke und Nina Bayer möchte ich für ihre geduldige und zuverlässige Unterstützung in allen Laborangelegenheiten danken.

Meiner Familie und meiner Freundin Anahita gelten mein besonderer Dank.