

Isofluran hemmt die synaptische Plastizität im Hippocampus der Maus

Vanda Simon

Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

Isofluran hemmt die synaptische Plastizität im Hippocampus der Maus

Vanda Simon

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs
2. Univ.-Prof. Dr. B. Conrad

Die Dissertation wurde am 14.05.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2003 angenommen.

meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
2. Stand der Forschung	9
2.1. Neurophysiologische Grundlagen	9
2.1.1. Informations-Verarbeitung im zentralen Nervensystem	9
2.1.2. Die synaptische Übertragung	9
2.1.3. Erregende und hemmende Neurotransmittersysteme	10
2.1.4. Verschaltung erregender und hemmender Transmittersysteme im Hippocampus	11
2.1.5. Struktur und Funktion des Hippocampus	13
2.2. Die synaptische Plastizität	14
2.2.1. LTP im Hippocampus	17
2.2.2. LTD	19
2.2.3. Der Ca ²⁺ -Einstrom als Initialmechanismus bei LTP- und LTD	20
2.3. Das glutamaterge Neurotransmittersystem	21
2.4. Das GABAerge Neurotransmittersystem	22
2.5. Neuronale Grundlagen von Anästhesie	23
2.5.1. Volatile Anästhetika	23
2.5.2. Anästhetika-Wirkungen im Hippocampus	24
2.6. Isofluran (ISO)	26
2.7. Der MAC-Wert	26
3. Fragestellung	28
4. Material und Methodik	29
4.1. Hirnschnitt-Präparation	29
4.2. Elektrophysiologische Ableitungen	29
4.3. Applikation und Konzentrationsbestimmung von ISO	32
4.4. Statistische Auswertung	32
5. Ergebnisse	33
5.1. ISO reduziert die glutamaterge synaptische Transmission	33
5.2. ISO blockiert die Auslösung von LTP	34
5.3. Die Blockade von GABA _A -Rezeptoren hebt den ISO-Effekt auf	37
5.4. Der Effekt von ISO auf die LTP ist reversibel	39
5.5. ISO blockiert die Auslösung von LTD	40

6. Diskussion	42
6.1. ISO vermindert die glutamaterge synaptische Transmission im Hippocampus	42
6.2. Die Auslösung von LTP und LTD wird durch ISO blockiert	43
6.3. Die Rolle des GABA _A -Rezeptors bei der LTP-Hemmung	44
6.4. NMDA-Rezeptoren und LTD	45
6.5. Die Wirkung von ISO auf spannungsgesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle	45
7. Zusammenfassung	46
8. Literaturverzeichnis	48
9. Abbildungsverzeichnis	59
10. Anhang	60
10.1. Materialien und Geräte	60
10.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungen	60
10.1.2. Verbrauchsmittel	61
10.1.3. Geräte	61
10.2. Danksagung	62
10.3. Verzeichnis eigener Publikationen	63
10.4. Lebenslauf	64

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
CA1	cornu anterior (Region 1)
CGP-35348	3-Amino-Propyl(Diethoxymethyl)-Phosphorsäure
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (excitatory postsynaptic current)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
fEPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Feldpotenzial
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid)
GYKI-52466	1-(4-Amino-phenyl)-4-Methyl-7,8-Methyl-Endioxyl-5H-2,3-Benzodiazepin
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (inhibitory postsynaptic current)
ISO	Isofluran
LFS	niederfrequente Stimulation (low frequency stimulation)
LTD	Langzeitdepression (long-term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (long-term potentiation)
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
n	Anzahl der gewerteten Experimente
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Unter Allgemeinanästhesie versteht man einen medikamentös hervorgerufenen Zustand aus Bewusstseinsverlust (Hypnose), Relaxation und Analgesie bzw. Antinozizeption mit vegetativer Abschirmung. Mit den heutigen Anästhesieverfahren erreicht man diesen Zustand durch eine Kombination verschiedener Medikamente. Zu diesen gehören Muskelrelaxantien, die u.a. die kontrollierte Beatmung ermöglichen, Analgetika, wie z.B. Opioide, sowie die eigentlichen Anästhetika. Diese unterscheidet man in intravenöse und inhalative Anästhetika. Letztere können gasförmig, wie z.B. Lachgas, oder dampfförmig (flüchtig = volatil) sein. Der "Urahn" der volatilen Anästhetika ist Äther, der erstmals vor über 150 Jahren als Anästhetikum eingesetzt wurde. Die Narkose hat daraufhin der operativen Medizin völlig neue Möglichkeiten eröffnet. Bis zum heutigen Tage werden die volatilen Anästhetika hinsichtlich Verträglichkeit und besserer Steuerbarkeit klinisch-empirisch weiterentwickelt. Ihr eigentliches Wirkprinzip innerhalb des ZNS ist aber bis heute nicht vollständig verstanden, wenngleich seit etwa zwei Jahrzehnten intensiv danach geforscht wird.

Seit einigen Jahren werden die volatilen zunehmend durch intravenöse Anästhetika ergänzt oder sogar ersetzt. Allerdings sind sie sich sowohl in Wirkung als auch in den unerwünschten Wirkungen grundsätzlich ähnlich. Dies gilt auch für ihre neuronal-molekularen Wirkmechanismen, soweit sie bekannt sind. Derzeit geht man davon aus, dass Anästhetika ihre Wirkung im ZNS durch eine Modulation membranständiger Ionenkanäle entfalten (Franks, 1994). Typischerweise hemmen sie die exzitatorische glutamaterge und verstärken die inhibitorische GABAerge synaptische Übertragung (Little, 1996; MacIver, 1997). Die daraus resultierende Unterdrückung der Erregbarkeit zentraler Neuronen gilt als ein entscheidender Mechanismus, der insbesondere der hypnotischen Komponente einer Allgemeinanästhesie zugrundeliegt, er könnte aber auch für die Unterdrückung höherer integrativer Hirnleistungen verantwortlich sein. Eine vorübergehende Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung zeigt sich beispielsweise als perioperative Amnesie („loss of recall“). Neben diesem erwünschten Anästhesie-assoziierten Effekt könnten aber auch die unerwünschten Auswirkungen auf Kognition, Konzentrationsfähigkeit und Gedächtnis, wie sie nicht selten nach einer Allgemeinanästhesie auftreten (Pocock,

1993), letztlich auf längerdauernde Beeinträchtigungen der neuronalen Aktivität auf zellulärer oder synaptischer Ebene zurückgehen.

Gedächtnisleistungen sind das Ergebnis komplexer Reiz-induzierter Modulationen der synaptischen Übertragungsstärke innerhalb verschiedener neuronaler Verschaltungen und Netzwerke, insbesondere in der Hippocampus-Region (Bliss, 1993; Danysz, 1995; Linden, 1995). Die neurophysiologischen und molekularbiologischen Grundlagen dieser sog. synaptischen Plastizität werden seit langem intensiv beforscht. Das glutamaterge und das GABAerge Transmittersystem spielen hierbei eine wichtige Rolle (Bliss, 1993). Über eine mögliche Beeinflussung der synaptischen Plastizität durch Anästhetika ist jedoch bislang nichts beschrieben. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der *in vitro*-Wirkung des volatilen Anästhetikums Isofluran auf die synaptischen Plastizität im Hippocampus der Maus.

2. Stand der Forschung

2.1. Neurophysiologische Grundlagen

2.1.1. Informations-Verarbeitung im zentralen Nervensystem

Die verschiedenen Hirnfunktionen basieren auf Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen (Petrides, 1997). Die Informationen bestehen letztlich aus Aktionspotenzial-Salven, die innerhalb eines Neurons fortgeleitet und an den Synapsen auf ein anderes Neuron übergeleitet werden. Neuronale Schaltkreise bewerkstelligen die Informations-Verarbeitung. Die einzelnen Netzwerke stehen untereinander in Verbindung, bekommen Inputs und steuern über die Outputs andere Netzwerke an. Die Entwicklung dieser zellulär-elektrochemischen Netzwerke sowie ihre Verbindungen untereinander unterliegen einer ständigen morphologischen und funktionellen Dynamik, der sog. neuronalen Plastizität, ein fortwährender Reiz- und Aktivitäts-getriggelter Prozess. Dies geschieht bei der embryonalen Neuralentwicklung, bei sensorischer und motorischer Prägung sowie bei allen Lern- und Gedächtnisvorgängen.

Die funktionelle Dynamik, die sich innerhalb einzelner Neurone und Synapsen abspielt, bezeichnet man als synaptische Plastizität. Da sie Lern-, Gedächtnis- und Konditionierungs-Vorgängen zugrundeliegt, nennt man sie auch "zelluläres Korrelat von Lernen und Gedächtnis" (Bliss, 1993). Es gibt verschiedene Formen der synaptischen Plastizität. Dazu gehören u.a. eine Verstärkung sowie eine Verminderung der synaptischen Effizienz, also der synaptischen Übertragungsstärke. Diese Modulationen sind Reiz-abhängig, d.h. sie werden durch charakteristische Reizmuster der synaptischen Inputs ausgelöst. Man kann sie *in vitro* an Hirnschnittpräparaten erfassen und quantifizieren und somit auch als Modell für Pharmakawirkungen einsetzen.

2.1.2. Die synaptische Übertragung

Die der Informations-Ausbreitung innerhalb eines Neurons zugrundeliegenden Aktionspotenziale beruhen auf Potenzialveränderungen der Nervenzellmembran, die insbesondere durch spannungsgesteuerte Na⁺-Kanäle ausgelöst werden (Greger, 1996). Die Übertragung dieser Signale auf ein anderes Neuron geschieht durch elektrische oder (weitaus häufiger) chemische Synapsen. Letztere schütten zur Signalübertragung einen

Botenstoff, den Transmitter aus. Diese chemische Signalübertragung erfolgt somit indirekt und unidirektional: Die Transmitter werden in präsynaptischen Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert. Depolarisiert ein ankommendes Aktionspotenzial die Nervenendigung, strömen über die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle Ca^{2+} -Ionen in die Terminale ein. Diese sprunghafte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der präsynaptischen Terminale setzt einen komplexen Mechanismus in Gang, auf den hin die Vesikelmembran mit der Membran der Terminale verschmilzt. Dadurch wird der Transmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt. Die Bindung des Transmitters an spezifische Rezeptoren an der postsynaptischen Membran aktiviert die mit dem Rezeptor assoziierten Ionenkanäle. Dadurch ändert sich deren Permeabilität für bestimmte Ionen. Der daraus resultierende Ionenstrom führt zu einer Veränderung des postsynaptischen Membranpotenzials (Klinke, 1996). Dies führt, je nach Art des Transmittersystems, zu einer Erhöhung oder zu einer Verminderung der Erregbarkeit des postsynaptischen Neurons, d.h. ein Aktionspotenzial wird ausgelöst (bei überschwelliger Depolarisation) oder die Auslösung wird gehemmt (bei Hyperpolarisation).

2.1.3. Erregende und hemmende Neurotransmittersysteme

Man unterscheidet exzitatorische (erregende) und inhibitorische (hemmende) Neurotransmittersysteme. Die Bindung eines exzitatorischen Transmitters (z. B. Glutamat) an seinen spezifischen Rezeptor bewirkt an der postsynaptischen Membran einen Kationen-Einstrom und damit ein exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP), d.h. eine Depolarisierung der Zellmembran. Dies wirkt insofern erregend, dass bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes des Membranpotenzials in depolarisierender Richtung ein Aktionspotenzial ausgelöst wird.

Bindet ein inhibitorischer Transmitter (z.B. GABA) an seinen spezifischen Rezeptor (GABA_A -Rezeptor), so entsteht durch den ausgelösten Chlorid-Einstrom ein inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP), d.h. eine postsynaptische Hyperpolarisation, die der Entstehung eines Aktionspotenzials entgegenwirkt (Klinke, 1996).

Die verschiedenen Transmittersysteme einer synaptischen Verschaltung sind ein wichtiger Wirkort zahlreicher Pharmaka. Dadurch kann die synaptische Übertragung mehr oder weniger gezielt beeinflusst werden. Nach den Erkenntnissen der letzten zwei

Jahrzehnte trifft dies insbesondere für einige Anästhetika zu (siehe folgende Kapitel). Beispielsweise hemmt das iv-Anästhetikum Ketamin die (exzitatorische) glutamaterge Übertragung durch Blockade des NMDA-Rezeptors, während Propofol die Aktivität des inhibitorisch wirksamen GABA_A-Rezeptors verstärkt. Beide Substanzen vermindern somit die neuronale Erregbarkeit, worauf man die zentrale Hemmung bei einer Allgemeinanästhesie zurückführt.

2.1.4. Verschaltung erregender und hemmender Transmittersysteme im Hippocampus

Wegen seiner gut untersuchten, charakteristischen Neuroanatomie stellt der Hippocampus ein prädestiniertes Hirnareal zur Untersuchung von Organisation und Funktion neuronaler Verschaltungen dar (Ramon y Cajal, 1893; Maccaferri, 2000). Als mutmasslich wichtiger Zielort anästhetisch wirksamer Substanzen ist die Hippocampus-Region zudem ein geeignetes Modell zur Untersuchung der zellulären Wirkmechanismen von Anästhetika (Kendig, 1991).

Funktionell bildet der Hippocampus eine Art Zwischenspeicher. Er speichert und verarbeitet Informationen über einige Wochen und Monate und überführt sie dann zum dauerhaften Abspeichern in die entsprechenden Areale der Grosshirnrinde (Kandel, 1992). Als zelluläres Korrelat für die Lern- und Gedächtnis-Vorgänge gilt die besonders in der hippocampalen CA1-Region gut untersuchte synaptische Plastizität (Bliss, 1993). Man versteht darunter eine Modulierbarkeit der synaptischen Übertragung (synaptische Effizienz), die über glutamaterge, aber auch GABAerge Mechanismen vermittelt wird (Bliss, 1993).

Die Abb. 2.1. zeigt schematisch die Verschaltung des glutamatergen (erregenden) Transmittersystems mit dem GABAergen (hemmenden) Transmittersystem am Beispiel der CA1-Region des Hippocampus. Die hyperpolarisierende, inhibitorische Komponente des postsynaptischen Potenzials wird dabei über zwischengeschaltete GABAerge Interneurone vermittelt.

Exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission (CA1-Region des Hippocampus)

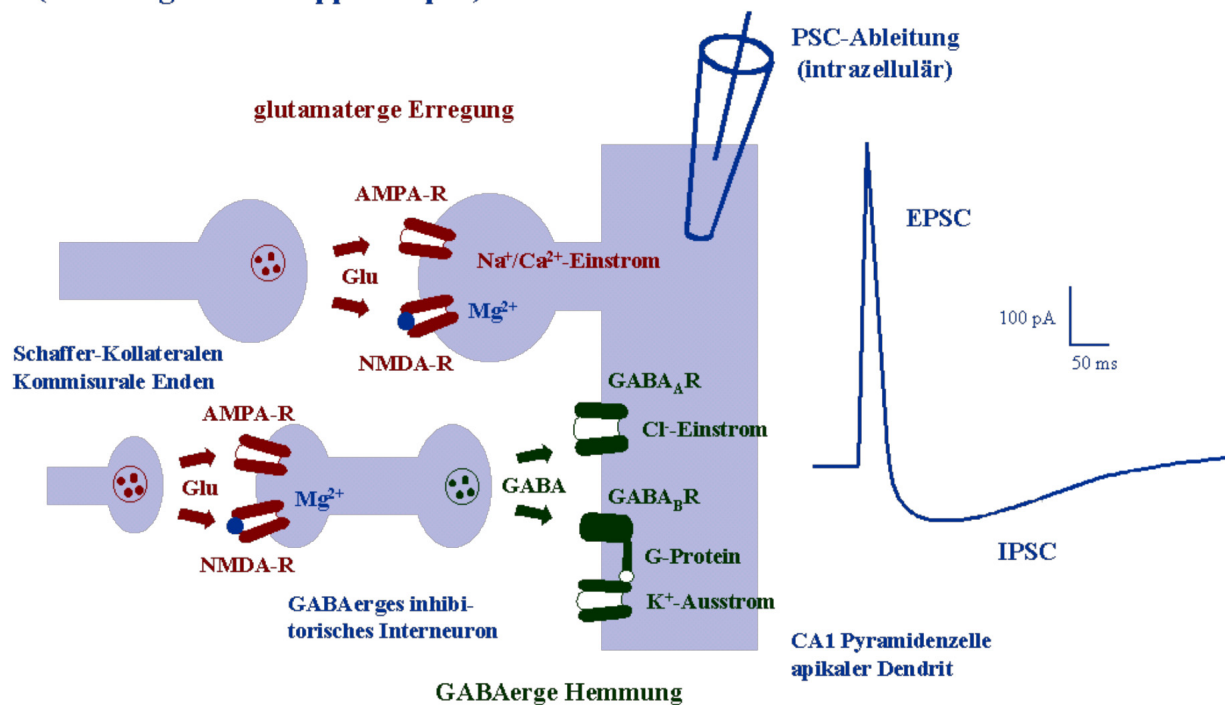


Abb. 2.1.: Eine in der CA1-Region des Hippocampus durchgeführte intrazelluläre Ableitung postsynaptischer Ströme zeigt unter Stimulation der Schaffer-Kollaterale Stromantworten, die aus einer exzitatorischen (EPSC) und einer inhibitorischen (IPSC) Komponente bestehen. Die exzitatorische Komponente kommt dabei vor allem durch Wirkung des Transmitters L-Glutamat auf ionotrope, glutamaterge Rezeptoren vom non-NMDA-Typ (sog. AMPA-Rezeptoren¹), die einen Na^+ -Einstrom vermitteln, zustande. Der nicht-kompetitive und spannungsabhängige Mg^{2+} -Block der NMDA-Rezeptoren löst sich bei überschwelliger Depolarisation der postsynaptischen Membran nach starker Aktivierung von AMPA-Rezeptoren. Wegen ihrer relativ langsamen Aktivierungskinetik tragen die NMDA-Rezeptoren jedoch wenig zur postsynaptischen Antwort bei. Der inhibitorische Anteil der Stromantwort wird von der Wirkung des Transmitters GABA bewirkt. Die schnelle Komponente besteht aus einem Cl^- -Einstrom, der durch ionotrope GABA_A -Rezeptoren vermittelt wird. Die langsamere Komponente ist ein durch G-Protein-gekoppelte GABA_B -Rezeptoren vermittelter K^+ -Ausstrom (Abb. modifiziert nach Bliss, 1993).

¹ Die Familie der ionotropen Glutamaterezeptoren umfasst zwei Untergruppen, die NMDA-Rezeptoren (selektiver Agonist: N-Methyl-D-Aspartat, NMDA) und die non-NMDA-Rezeptoren (Kullmann, 2000). Letztere untergliedern sich in AMPA-Rezeptoren (selektiver Agonist: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat, AMPA) und Kainatrezeptoren. Durch AMPA-Rezeptoren hervorgerufene Leitfähigkeitsänderungen der postsynaptischen Membran liegen im Bereich weniger Millisekunden, ihnen wird daher die schnelle Komponente des postsynaptischen Stromes zugeschrieben (Dingledine, 1999).

2.1.5. Struktur und Funktion des Hippocampus

Im Jahre 1953 hat man einem Patienten mit schwerer Epilepsie die Hippocampus-Region und die darüber liegenden Kortexareale beidseits entfernt. Daraufhin war der Patient zwar von seiner Epilepsie befreit, litt jedoch seitdem unter einer anterograden Amnesie. Tests haben gezeigt, dass insbesondere sein deklaratives Gedächtnis gestört war. Zudem war diese Amnesie irreversibel (Birbaumer, 1999).

Der Hippocampus ist Teil des Temporallappens und gehört zum limbischen System. Auf Grund seines dreischichtigen Aufbaus (Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum moleculare) wird der Hippocampus dem Archikortex zugerechnet. Man unterteilt ihn in die Regionen Subiculum, Fascia dentata und Cornu Ammonis (Ammonshorn). Das Cornu Ammonis wird wiederum in vier Subregionen (CA1 bis CA4) unterteilt. Insbesondere in der CA1-Region stehen die Pyramidenzellen über die glutamatergen Schaffer-Kollateralen (das sind spezielle Dendriten) miteinander in Verbindung (Abb. 2.2.). Diese stark vernetzte Verschaltung bildet die Grundlage für das deklarative Gedächtnis (Ramon y Cajal, 1968).

Der Hippocampus ist über die Fornix mit zahlreichen kortikalen und subkortikalen Gebieten verbunden. Der Tractus alveans und der Tractus perforans bilden hierbei zwei wichtige Afferenzen. Der Tractus alveans zieht vom Kortex über die Fornix direkt zu den Pyramidenzellen der CA1-Region. Der Tractus perforans enthält Fasern vom entorhinalen Kortex. Diese ziehen über den Gyrus dentatus und die Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region zum Subiculum (Amaral, 1990; Cerbone, 1993). Die Efferenzen verlaufen ebenfalls über die Fornix. Ein für die Konsolidierung deklarativer Gedächtnisinhalte wichtiger Schaltkreis ist der Papez-Neuronen-Kreis (Trepel, 1999). Er beginnt im Hippocampus, zieht über die Fornix zu den Corpora mamillaria und von dort über den Tractus mamillothalamicus zum Nucleus anterior Thalami. Über den Gyrus cinguli hat er schliesslich wieder Anschluss an den Hippocampus.

Bei der Gedächtnisbildung strömen Inputs aus verschiedenen kortikalen und subkortikalen Arealen in den Hippocampus ein. Die Rolle des Hippocampus besteht darin, Gedächtnisinhalte assoziativ zu verketteten und einen gemeinsamen Kontext herzustellen. So bilden sich Assoziationsmuster. Dadurch kann ein einzelner Reiz zusammenhängende Gedächtnisinhalte aufrufen (Birbaumer, 2000). Auf zellulär-

neuronaler Ebene bilden sich diese Assoziationsmuster in den synaptischen Verschaltungen afferenter und efferenter Bahnen innerhalb des Hippocampus. Über efferente Bahnen werden diese Muster dann in die jeweiligen kortikalen Assoziationsfelder projiziert und dort als Gedächtnisinhalte abgespeichert (Birbaumer, 2000).

Feldpotenzial-Ableitung an einem Hippocampus-Schnitt

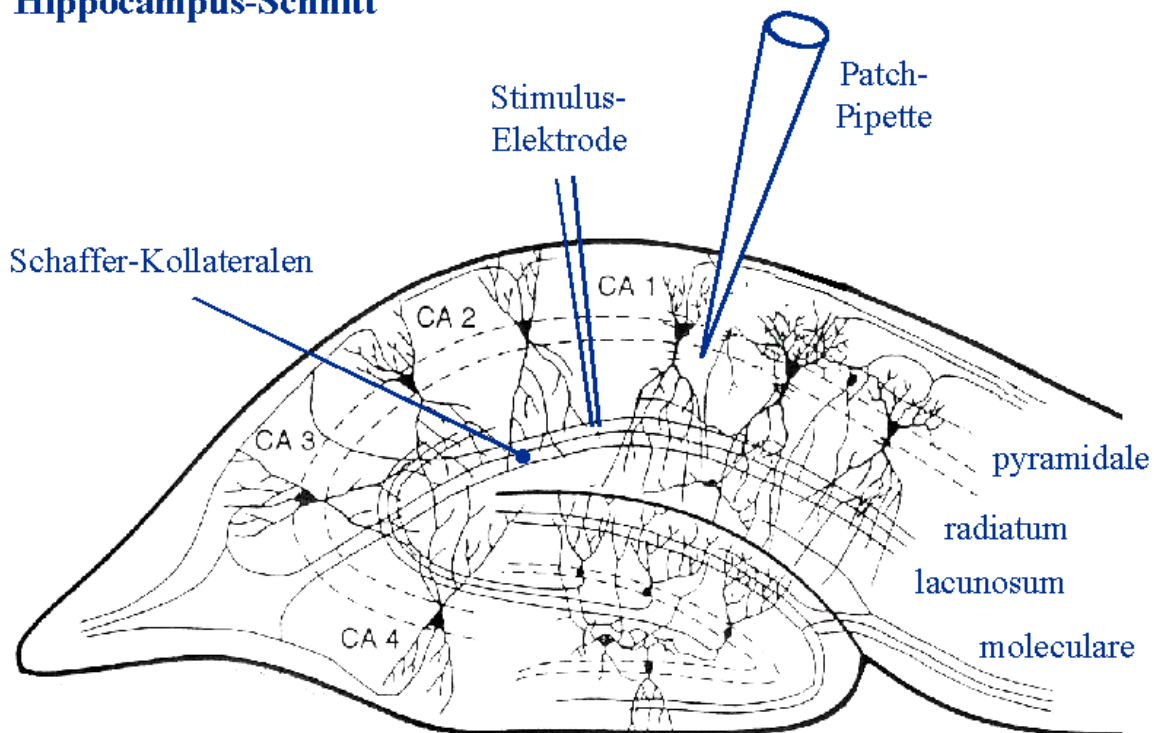


Abb. 2.2.: Die Struktur des Hippocampus (schematisch, Angabe der Schichten) mit experimenteller Anordnung zur Ableitung von Feldpotenzialen. Die Mess-Pipette ist extrazellulär platziert.

2.2. Die synaptische Plastizität

Die Verarbeitung und Speicherung von Informationen im ZNS geschieht durch Modulation der synaptischen Effizienz. Nach einer "synaptischen Potenzierung" löst ein synaptischer Input einen stärkeren Output aus als vorher. Den umgekehrten Fall nennt man "synaptische Depression". Beide Veränderungen werden durch typische Input-Reizmuster ausgelöst und können Minuten bis mehrere Wochen oder noch länger nachwirken. Der synaptische Input reguliert also den synaptischen Output. Diese

Modulierbarkeit der synaptischen Übertragung bezeichnet man als "synaptische Plastizität" oder "synaptisches Gedächtnis" (Bliss, 1993; Bear, 1994).

Bei der synaptischen Plastizität unterscheidet man neben Verstärkung (Potenzierung) und Verminderung (Depression) auch Kurzzeit- und Langzeit-Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke. Besonders die Langzeitveränderungen spielen bei neuronalen Anpassungsvorgängen, wie Konditionierung, Lernen/Gedächtnis, (selektive) Wahrnehmung, Habituation und Aversions-/Appetenz-Entwicklung, eine entscheidende Rolle (Bliss, 1993) und sind auch bei der Schmerz-Chronifizierung von Bedeutung (Hunt, 2001). Langzeit-Verstärkung (long-term potentiation, LTP) und Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) kommen im gesamten ZNS (Neokortex, Cerebellum, Amygdala, Hippocampus, Rückenmark) vor (Bliss, 1993; Linden, 1994; Malenka, 1995) und spielen auch eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Sensorik und Wahrnehmung, z.B. in der Sehbahn (Tao, 2001).

Man kann LTP/LTD *in vivo* oder *in vitro* experimentell erfassen. Im Tierversuch kann man beispielsweise durch stereotaktisch-fixierte Elektroden Konditionierungs-Reize applizieren und so in bestimmten Hirnregionen LTP auslösen und messen. *In vitro* kann man LTP/LTD an Hirnschnittpräparaten, üblicherweise von Ratten oder Mäusen, nachweisen. Solche Hirnschnitte müssen dünn genug sein ($< 0,5$ mm), damit die Nervenzellen *per diffusionem* durch eine Nährlösung mit Glukose und Sauerstoff versorgt werden und so funktional bleiben. Für die Messung plaziert man dann auf geeignete Weise die Reiz- und die Mess-Elektrode (am Beispiel des Hippocampus, Abb. 2.2.). Die Reiz-Elektrode provoziert, die Mess-Elektrode registriert die synaptischen Antworten. Plaziert man die Mess-Elektrode intrazellulär, kann man die Antworten einzelner Neurone messen. Die sog. Feldpotenziale misst man als Summen-Antwort vieler Neurone eines Areals, das von einer extrazellulär plazierten Elektrode erfasst wird (MacIver, 1989; MacIver, 1996).

Appliziert man über die Reiz-Elektrode einen kurzen (1-5 Sekunden) höherfrequenten (> 10 Hz) Stimulus, sind daraufhin die synaptischen Antworten typischerweise dauerhaft vergrößert (LTP). Längere (> 10 min) niederfrequente (< 5 Hz) Stimuli lösen hingegen eine LTD aus (Bliss, 1993) (Abb. 2.3.).

LTP/LTD *in vitro* in der CA1-Region des Hippocampus der Maus

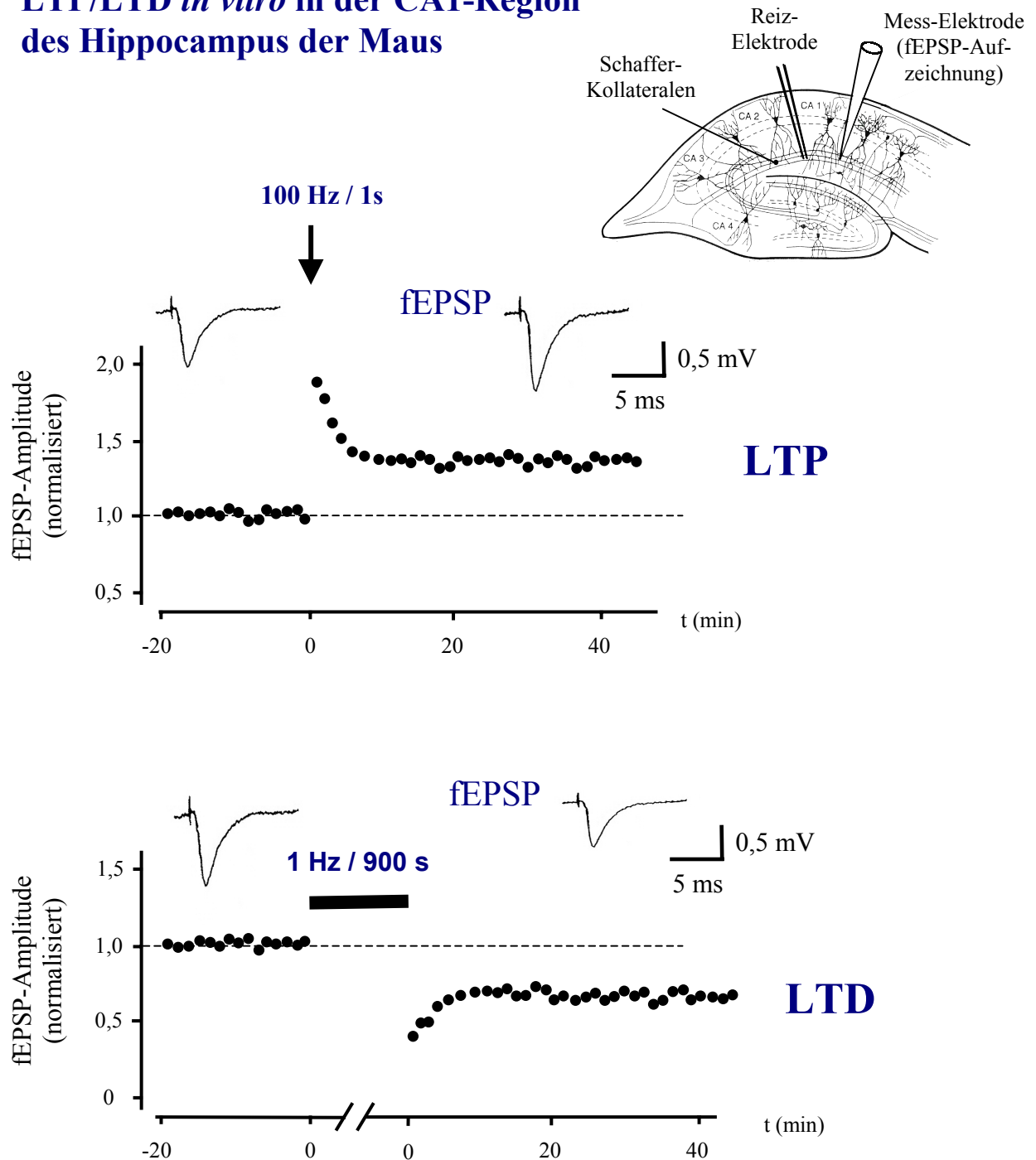


Abb. 2.3.: Induktion von LTP/LTD in einem Hippocampus-Schnitt (schematisch).

Die Beziehung zwischen Stimulus-Frequenz und der daraus resultierenden Veränderung kann allerdings erheblich variieren. Dies hängt u.a. vom jeweiligen Hirnareal und vom Alter des Tieres ab. Nach dem Stimulus stellt sich die Potenzierung/Depression der synaptischen Antworten meist unmittelbar ein. Man wertet sie im Experiment dann als Langzeitveränderung, also als LTP/LTD, sofern sie mindestens 45 Minuten erhalten bleibt. Wenn andernfalls die initiale

Potenzierung/Depression nur kurz erhalten bleibt, spricht man entsprechend von einer Kurzzeit-Veränderung, also einer short-term potentiation/depression (STP/STD) (Bliss, 1993).

Die funktionelle Unfähigkeit einer Synapse, auf den jeweiligen Stimulus hin LTP/LTD zu generieren, kann u.a. zellular-pathologisch oder pharmakologisch-toxisch bedingt sein. Eine solche Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität kann bestimmten Hirnleistungs- oder Funktionsstörungen zugrundeliegen. Beispiele hierfür sind (anterograde) Amnesie, Gedächtnisstörungen und Beeinträchtigung des motorischen Lernens nach der Verabreichung von Benzodiazepinen (Lister, 1985; Butefisch, 2000), von denen man weiss, dass sie *in vitro* die synaptische Plastizität im Hippocampus hemmen können (Trepel, 2000; Higashima, 1998; Seabrook, 1997). Die Unterdrückung der hippocampalen synaptischen Plastizität könnte also ein *in vitro*-Modell für Lern- und Gedächtnisstörungen darstellen.

2.2.1. LTP im Hippocampus

Nach der Theorie von Hebb (Hebb, 1949) ist für die Auslösung einer LTP das Zusammenspiel von prä- und postsynaptischer Aktivität notwendig. Das bedeutet, dass einerseits der Transmitter Glutamat aus präsynaptischen Endigungen infolge hochfrequenter Stimulation freigesetzt wird und andererseits gleichzeitig die postsynaptische Zelle durch diese Glutamatfreisetzung depolarisiert wird.

Induktion und Aufrechterhaltung einer LTP unterliegen komplexen Mechanismen, die grösstenteils noch kontrovers diskutiert werden. Sie unterscheiden sich zudem in den verschiedenen Hirnregionen. Insbesondere herrscht Uneinigkeit darüber, ob die entscheidenden Stimulus-induzierten Veränderungen (überwiegend) prä- oder postsynaptisch ablaufen.

In der CA1-Region des Hippocampus sind die Mechanismen der LTP bereits gut untersucht. Hier ist die LTP typischerweise NMDA-Rezeptor-abhängig (Schlüsselfunktion der NMDA-Rezeptoren). Neben den in der vorliegenden Arbeit erläuterten glutamatergen Mechanismen spielt auch die GABAerge Hemmung über Interneurone eine wichtige Rolle (Bliss, 1993).

Zunächst unterscheidet man Initialmechanismen (ersten Sekunden), mittelfristige Vorgänge (bis mehrere Stunden) und längerfristige Veränderungen

(Monate). Die initialen Auslösemechanismen unmittelbar nach einem hochfrequenten Stimulus gehen hauptsächlich darauf zurück, dass der Stimulus sowohl prä- als auch postsynaptisch eine Membran-Depolarisation bewirkt. Es kommt dadurch einerseits zu einer kurzzeitig erhöhten Transmitter- (Glutamat-) Ausschüttung in den synaptischen Spalt und andererseits zum Wegfall der spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockade der NMDA-Rezeptoren, welche daraufhin einen Ca^{2+} -Einstrom in die Postsynapse vermitteln (Tsumoto, 1992; Bear, 1994; Jodar, 1995). Damit beginnen die mittelfristigen Veränderungen, die sich – soweit bekannt – (überwiegend) in der Postsynapse abspielen. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration setzt eine Kaskade in Gang, die bestimmte Proteinkinasen aktiviert (Malenka, 1989) und in der Folge über intrazelluläre Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren deren Aktivität und damit die Glutamat-vermittelte synaptische Übertragung verstärkt. Die Abb. 2.4. dient einer schematischen Darstellung der hier stark vereinfacht beschriebenen Mechanismen.

NMDA-Rezeptor-abhängiger Mechanismus der LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus (vereinfacht)

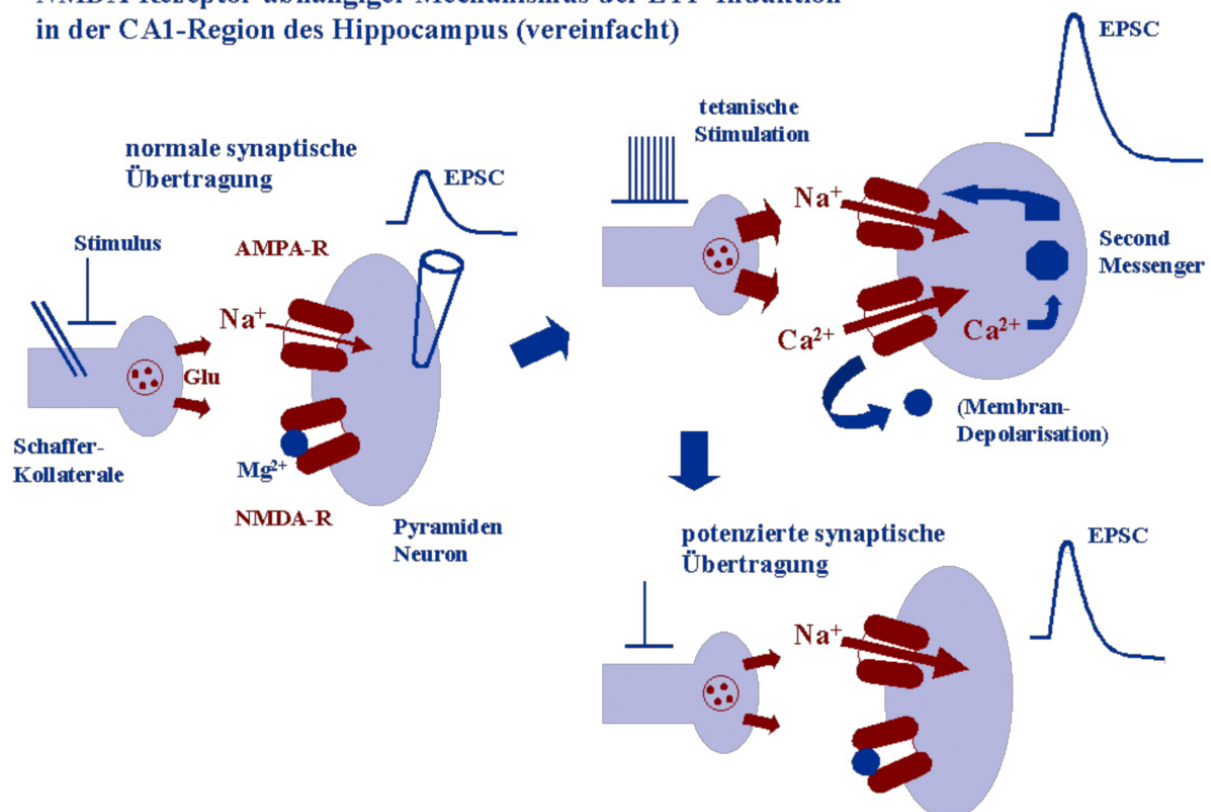


Abb. 2.4.: Die Auslösung der NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP im Hippocampus. Vereinfachte Darstellung ohne Berücksichtigung der GABAergen Interneurone.

Die dadurch erhöhte postsynaptische Aktivität (frühe LTP-Phase, 2-3 Stunden) bewirkt schliesslich die längerfristigen Veränderungen, die u.a. auf Protein-Expressions-Ebene stattfinden und der weiteren Aufrechterhaltung der LTP (späte Phase) zugrundeliegen (Bailey, 1996).

Eine NMDA-Rezeptor-abhängige LTP kann man an glutamatergen Synapsen verschiedener Hirnregionen beobachten. Man kann sie im Experiment typischerweise durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten (z.B. D-AP5) unterdrücken (Bliss, 1993).

2.2.2. LTD

LTD wurde erstmals an Purkinjezellen des Kleinhirns beobachtet. Im Experiment löst man LTD durch niederfrequente afferente Stimulation aus. In der CA1-Region des Hippocampus kann man, je nach Stimulations-Frequenz, an den selben Synapsen, an denen man LTP auslösen kann, auch LTD induzieren (Dudek, 1992; Dudek, 1993). Üblicherweise plziert man hierfür die Reizelektrode im Bereich der Schaffer-Kollateralen und appliziert einen niederfrequenten Stimulus (1 Hz für 15 min). Die Ableitelektrode erfasst die synaptischen Antworten der Pyramidenzellen. Wenn auf den Stimulus hin die synaptische Effizienz (Übertragungsstärke) für längere Zeit (Stunden) vermindert ist, spricht man von einer LTD.

Über die zellulären Mechanismen, die der LTD zugrundeliegen, ist noch vergleichsweise wenig bekannt. Besonders die Rolle der prä- bzw. postsynaptischen Komponente wird unterschiedlich beurteilt. Für den Hippocampus (CA1-Region) gilt, dass – ähnlich wie bei der LTP – ein postsynaptischer Ca^{2+} -Influx über NMDA-Rezeptoren der entscheidende Initialmechanismus ist (Tsumoto, 1992; Bear, 1994; Jodar, 1995). Deshalb spricht man hier, neben den anderen bekannten LTD-Formen, von der NMDA-Rezeptor-abhängigen Form. Die Erhöhung der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration durch einen niederfrequenten längerdauernden Stimulus unterscheidet sich in Ausmass und Kinetik von jener, die durch einen hochfrequenten kurzen Stimulus ausgelöst wird (bei der LTP). Die vergleichsweise geringe Ca^{2+} -Erhöhung nach niederfrequentem Reiz aktiviert bestimmte Protein-Phosphatasen, was in der Folge die LTD bewirkt (Mulkey, 1993).

Die Funktion einer LTD innerhalb neuronaler Verschaltungen bzw. innerhalb eines bestimmten Hirnareals ist umstritten. LTD könnte Phänomenen wie Habituation

oder Desensibilisierung zugrundeliegen. LTD könnte auch über die Verminderung der Erregbarkeit eines Neurons als Input-Filter fungieren (Bear, 1996).

2.2.3. Der Ca^{2+} -Einstrom als Initialmechanismus bei LTP- und LTD

Über die neuronale Membran hinweg herrscht ein starker Ca^{2+} -Konzentrationsgradient (intrazellulär 0,1 μM , extrazellulär 2 mM). Die Neurone reagieren auf einen Ca^{2+} -Einstrom sehr sensibel. Zur notwendigen Aufrechterhaltung dieses Ca^{2+} -Gradienten gibt es spezielle Mechanismen der intrazellulären Ca^{2+} -Sequestrierung (McCormick, 1999).

Alle Formen von LTP und LTD werden durch einen Anstieg der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet (Tsumoto, 1992; Bear, 1994; Jodar, 1995). Der Ca^{2+} -Einstrom erfolgt über aktivierte NMDA-Rezeptoren, spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle und metabotrope Glutamatrezeptoren (Malenka, 1995).

Die NMDA-Rezeptoren der Postsynapse sind unter "Normalbedingungen", d.h. beim "nicht erregten" Neuron, durch Mg^{2+} blockiert. NMDA-Rezeptoren sind also an der "normalen" glutamatergen synaptischen Übertragung kaum beteiligt. Der Kanalblock durch Mg^{2+} ist jedoch spannungsabhängig. Wird ein Neuron über eine bestimmte Schwelle hinweg depolarisiert, löst sich die Mg^{2+} -Blockade und Ca^{2+} -Ionen strömen durch die NMDA-Rezeptoren in die Postsynapse ein. Die dafür notwendige Depolarisation geschieht dadurch, dass durch einen hochfrequenten afferenten Reiz eine starke synaptische Glutamat-Ausschüttung erfolgt, die viele AMPA-Rezeptoren aktiviert. Der daraus resultierende Na^+ -Einstrom depolarisiert das Neuron (siehe auch Abb. 2.4.) (Bliss, 1993). Diese Depolarisation führt nicht nur zur Aktivierung der NMDA-Rezeptoren, sondern erhöht auch die Aktivität der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle und der metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Malenka, 1995).

Je nach Frequenz/Stärke der afferenten (präsynaptischen) Stimulation wird an vielen erregenden Synapsen innerhalb des ZNS eine LTP oder eine LTD ausgelöst. Dieser Bidirektionalität der synaptischen Plastizität liegen nach der „sliding threshold“-Theorie (Bienenstock, 1982; Bear, 1995) unterschiedliche Schwellenwerte der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration zugrunde. Steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stark an (bei hoher Stimulus-Frequenz), werden spezielle Proteinkinasen (z.B. Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) aktiviert. Durch Phosphorylierung bestimmter Substratproteine (z.B. AMPA-Rezeptor) kommt es in der Folge zur LTP.

Eine schwächere Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (bei niedriger Stimulus-Frequenz) aktiviert hingegen bestimmte Proteinphosphatasen (z.B. Calcineurin), was zu einer LTD führt (Bear, 1994; Tsumoto, 1996).

2.3. Das glutamaterge Neurotransmittersystem

Der Transmitter L-Glutamat (Abb. 2.5.) gilt als der wichtigste erregende Transmitter im ZNS. Er vermittelt Sensorik, Motorik und höhere Hirnfunktionen, wie Lernen und Gedächtnis. Die Biosynthese findet hauptsächlich in den neuronalen Terminalen statt und besteht in einer Katalyse aus Ammoniumionen und α -Ketoglutarat durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase. In den Terminalen liegt dann L-Glutamat in Speichervesikel vor und steht zur Freisetzung in den synaptischen Spalt bereit. Freigesetztes Glutamat wird einerseits durch spezifische Carrier in die Terminale wiederaufgenommen, andererseits in Gliazellen transportiert. Gliales Glutamat wird in Glutamin umgewandelt und kann so der Terminale zur Resynthese von L-Glutamat zugeführt werden (Starke, 1998).

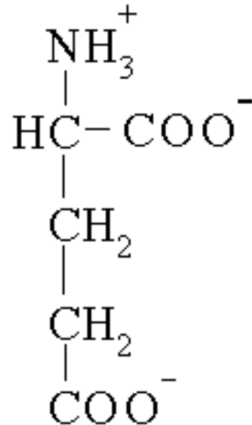


Abb. 2.5.: Strukturformel des Neurotransmitters Glutamat

Die an der glutamatergen Transmission beteiligten Rezeptoren teilt man in zwei Gruppen ein: Ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren. Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren unterscheidet man in AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren. Aktivierte AMPA- und Kainat-Rezeptoren vermitteln vor allem einen Na^+ -Einstrom, was die Zellmembran depolarisiert, das entsprechende Neuron also erregt. Insbesondere

die AMPA-Rezeptoren vermitteln die schnelle Komponente der erregenden postsynaptischen Potenziale (EPSPs). Der NMDA-Rezeptor, der bei einem Membranpotenzial unter -50 mV durch Mg^{2+} -Ionen blockiert ist, kann erst unter Membran-Depolarisation aktiviert werden und ist dann für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} permeabel. NMDA-Rezeptoren vermitteln die langsamere Komponente der EPSPs. Metabotrope Glutamat-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt. Sie aktivieren indirekt über intrazelluläre Messenger einen Ionenkanal. Diese Form der Signaltransduktion bewirkt an der neuronalen Membran eine verzögerte und langsame Depolarisation (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Hollmann, 1994).

2.4. Das GABAerge Neurotransmittersystem

In vielen neuronalen Verschaltungen, z.B. in der CA1-Region des Hippocampus, steht der exzitatorischen synaptischen Übertragung eine inhibitorische Komponente, die durch Interneurone vermittelt wird, gegenüber (siehe auch Abb. 2.1.). Der hierbei wichtigste Transmitter ist γ -Aminobuttersäure (GABA, Abb. 2.6.).

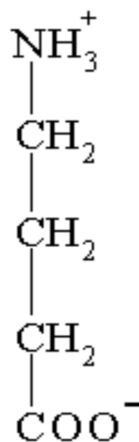


Abb. 2.6.: Strukturformel des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA)

GABA wurde bereits vor ca. 65 Jahren in der grauen Substanz des menschlichen Gehirns entdeckt. Etwa ein Drittel aller Synapsen des ZNS sind GABAerg (Bloom, 1971). GABAerge Projektionen gehen hauptsächlich von hemmenden Interneuronen aus. Die GABA-Biosynthese erfolgt aus Glutamat in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion unter Katalyse durch die Glutamat-Decarboxylase, die nur in den

GABAergen Interneuronen exprimiert wird (Starke, 1998). GABA wird in Vesikeln der neuronalen Terminalen gespeichert. (Petrides, 1997).

In den synaptischen Spalt freigesetztes GABA bindet an die ionotropen GABA_A- und an die metabotropen GABA_B-Rezeptoren. GABA_A-Rezeptoren sind postsynaptisch lokalisiert und vermitteln einen Cl⁻-Einstrom. Dieser hyperpolarisiert das postsynaptische Neuron und bildet die schnelle Komponente der inhibitorischen postsynaptischen Potenziale (IPSPs). GABA_B-Rezeptoren können prä- und postsynaptisch lokalisiert sein. Ihre Aktivierung hemmt Ca²⁺-Kanäle und aktiviert K⁺-Kanäle über G-Protein-gekoppelte Mechanismen. Dies bewirkt präsynaptisch eine Hemmung der GABA-Ausschüttung (negatives Feedback) und postsynaptisch die langsame Komponente der IPSPs. Die Inaktivierung von GABA erfolgt entweder durch Reabsorption in die Terminale oder durch enzymatischen Abbau im synaptischen Spalt (Möhler, 1996; Petrides, 1997).

Eine verstärkte Aktivierung des GABAergen Systems spielt u.a. bei der Induktion von Schlaf und Hypnose eine Rolle. Auch Anxiolyse und zentrale Relaxation (Therapie des status epilepticus), z.B. durch Benzodiazepine, wird u.a. durch diesen Mechanismus vermittelt. Eine (pharmakologische) Hemmung des GABAergen Systems kann für die Ausbildung von Angststörungen verantwortlich sein, kann sich aber auch positiv auf Gedächtnis und Lernfähigkeit auswirken (Goodchild, 1993).

2.5. Neuronale Grundlagen von Anästhesie

Die einer Allgemeinanästhesie zugrundeliegenden neuronalen und molekularen Mechanismen sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Derzeit geht man davon aus, dass Anästhetika ihre Wirkungen durch eine Modulation membranständiger Ionenkanäle hervorrufen (Franks, 1994). Vereinfachend lässt sich zusammenfassen, dass Anästhetika die exzitatorische glutamaterge synaptische Übertragung hemmen und die inhibitorische GABAerge Übertragung verstärken (Little, 1996; MacIver, 1997).

2.5.1. Volatile Anästhetika

Letztlich gehen alle volatilen Anästhetika auf den Äther zurück, der erstmals vor über 150 Jahren als Anästhetikum eingesetzt wurde. Die Meyer/Overton-Theorie von 1901 beschreibt eine Korrelation zwischen Wirkpotenz und Lipophilie der verschiedenen

volatilen Anästhetika. Deshalb nahm man lange Zeit an, dass sich die relativ lipophilen Anästhetika-Moleküle in die neuronale Zellmembran einlagern und dadurch die Funktion der Neurone beeinträchtigen.

Seit der Entwicklung der Patch-Clamp-Technik in den 70er Jahren kann man elektrische Signale auf Zellmembranebene erfassen und somit die Funktion membranständiger Ionenkanäle untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere diese Ionenkanäle der bevorzugte Wirkort volatiler Anästhetika sind. Beispielsweise verstärken volatile Anästhetika den hyperpolarisierenden Cl⁻-Einstrom durch GABA_A-Rezeptor-Kanäle (Jones, 1993; Harrison, 1993; Moody, 1998; Jenkins, 1999). Dieser Effekt wurde nicht nur an Hippocampus-Neuronen (Zimmerman, 1994), sondern auch an Ganglion-Neuronen der Rückenmarks-Hinterwurzel (Nakahiro, 1989) und an heterolog exprimierten GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen (Hapfelmeier, 2001a; Hapfelmeier, 2001b).

2.5.2. Anästhetika-Wirkungen im Hippocampus

Die Hippocampus-Region ist ein wichtiger Zielort von Anästhetika (Kendig, 1991). Die Anästhetika-Wirkungen am exzitatorischen glutamatergen System und am inhibitorischen GABAergen System unterscheiden sich grundsätzlich. In zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen bildet deshalb die exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission innerhalb der hippocampalen CA1-Region (meistens von Ratten) einen wichtigen Parameter zur Beurteilung von Anästhetika-Effekten. Zur Messung der synaptischen Transmission kann man Stimulus-induzierte postsynaptische Ströme (EPSCs/IPSCs), Feldpotenziale (fEPSPs) oder sog. Population Spikes (Summenantwort vieler "feuernder" Neurone) messen.

Manche intravenösen (iv) Anästhetika, wie z.B. Propofol oder Pentobarbital, wirken typischerweise überwiegend auf die inhibitorische synaptische Transmission. Sie verstärken diese Hemmung durch Erhöhung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Antworten (Wakasugi, 1999). Das iv-Anästhetikum Ketamin hingegen hemmt hauptsächlich die NMDA-Rezeptor-Aktivität, verstärkt aber auch GABA_A-Rezeptor-Antworten (Wakasugi, 1999).

Die volatilen Anästhetika Isofluran und Halothan verstärken die GABA_A-erge (Nicoll, 1972; Wakasugi, 1999) und vermindern gleichzeitig die glutamaterge

synaptische Transmission (Wakasugi, 1999). Die Hemmung der glutamatergen Transmission ist vorwiegend präsynaptisch bedingt, d.h. sie geht auf eine Reduktion der Glutamat-Freisetzung in den synaptischen Spalt zurück (MacIver, 1996).

Die Verminderung der glutamatergen Transmission

Volatile Anästhetika reduzieren die NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptor-vermittelte exzitatorische synaptische Transmission vorwiegend durch eine Hemmung der Glutamat-Ausschüttung (MacIver, 1996; Nishikawa, 2000). Über postsynaptische Angriffspunkte, wie z.B. die L-, N-, P- und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, reduziert ISO den postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom (Study, 1994). Dies verhindert eine ausreichende Membran-Depolarisation zur Lösung des spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blocks der NMDA-Rezeptoren. Diese können dann nicht durch Glutamat aktiviert werden.

Die Verstärkung der GABAergen Transmission

Die Verstärkung der GABA_A -Rezeptor-vermittelten inhibitorischen synaptischen Transmission durch volatile Anästhetika zeigt sich in Form von verlängerten GABA_A -IPSCs (Jones, 1993; Zimmerman, 1994; Nishikawa, 2001). Die Amplitude der IPSCs bleibt dabei unverändert oder wird sogar kleiner. Diesen – eigentlich paradoxen – Nebeneffekt kann man damit erklären, dass volatile Anästhetika zusätzlich einen sog. Offen-Kanal-Block am GABA_A -Rezeptor verursachen, was sich insbesondere bei höheren Konzentrationen bemerkbar macht (Neumahr, 2000; Hapfelmeier, 2001b). Die entscheidende Erhöhung des inhibitorisch wirksamen GABAergen Cl^- -Einstroms kommt durch die Verlängerung der GABA-getriggerten Rezeptor-Antworten zustande (Hapfelmeier, 2001a).

Der schnelle Cl^- -Einstrom durch die GABA_A -Rezeptor-Kanäle bildet zusammen mit dem langsameren GABA_B -Rezeptor-vermittelten K^+ -Ausstrom das IPSC (siehe auch Abb. 2.1.). Auch die GABA_B -Rezeptor-vermittelten Antworten werden durch volatile Anästhetika (Sevofluran) verstärkt (Hirota, 1997).

Beeinflussung der synaptischen Plastizität

Die bislang bekannten Anästhetika-Effekte auf die GABAerge und glutamaterge synaptische Übertragung lassen auch eine Beeinflussung der synaptischen Plastizität im

Hippocampus vermuten. Insbesondere die funktionelle Hemmung der NMDA-Rezeptoren (Kirson, 1998; Nishikawa, 2001) könnte sich inhibierend auf die NMDA-Rezeptor-abhängige LTP auswirken. Bisher gibt es dazu aber noch keine Befunde.

2.6. Isofluran (ISO)

Isofluran wurde erstmals 1965 synthetisiert, 1984 in Deutschland klinisch eingeführt und wird bis heute routinemässig eingesetzt (Larsen, 1999). ISO hat eine chirale Struktur (Strukturformel siehe Abb. 2.7.). Die klinisch verwendete Substanz liegt als Razemat vor und bildet eine klare und farblose Flüssigkeit. Das Molekulargewicht beträgt 185, der Dampfdruck ca. 238 mmHg (Larsen, 1999).

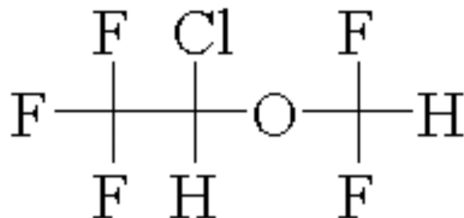


Abb. 2.7.: Strukturformel von Isofluran

Wegen einer geringen Löslichkeit im Blut flutet ISO sehr schnell an und wird in der Abklingphase auch wieder schnell über die Lunge abgeatmet (Büch, 1998). Wegen des günstigen Wirkungs-/Nebenwirkungsprofils gilt ISO zusammen mit Sevofluran derzeit als volatiles Anästhetikum mit dem besten Nutzen-Risiko-Verhältnis (Larsen, 1999).

Die Herstellung der ISO-Lösung für die *in vitro*-Experimente ist im Methodenteil beschrieben. Das *in vitro*-Äquivalent für eine klinisch relevante ISO-Konzentration beträgt etwa 0,2-0,5 mM (Firestone, 1986).

2.7. Der MAC-Wert

Der MAC-Wert (minimum alveolar concentration) ist die minimale alveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, die bei 50% der Probanden eine motorische Reaktion auf einen definierten Schmerzreiz (Hautinzision bestimmter Länge

an der Unterarm-Innenseite) unterdrückt (Eger, 1965). Bis heute ist der MAC-Wert eine wichtige Masszahl für die Wirksamkeit von Inhalationsanästhetika. Der MAC-Wert kann allerdings inter- und intraindividuell stark variieren (emotionaler Zustand, Prämedikation, Alter, Stoffwechselsituation, Gewöhnung an zentralwirksame Substanzen). Dagegen unterscheiden sich die MAC-Werte beim Menschen von denen anderer Spezies (z.B. Nagetiere, Affen) relativ wenig (Koblin, 1998). Der MAC-Wert von ISO beträgt etwa 0,7-0,8 Vol%, was bei einem Bunsen-Wasser/Gas-Koeffizienten von 1,08 (bei 25° C) ca. 0,2-0,5 mM in wässriger Lösung entspricht (Firestone, 1986).

3. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Wirkung des volatilen Anästhetikums ISO auf die Induzierbarkeit von LTP und LTD im Hippocampus der Maus. Hierbei wurden klinisch relevante ISO-Konzentrationen eingesetzt.

In einer ersten Versuchsserie soll der Effekt von ISO auf die synaptische Übertragungsstärke ermittelt werden. Dafür sollen mittels Patch-Clamp-Technik Stromantworten von Hippocampus-Neuronen aufgezeichnet werden.

In einer zweiten Versuchsserie sollen Feldpotenziale innerhalb der hippocampalen CA1-Region abgeleitet werden. LTP und LTD sollen anhand der Feldpotenziale gemessen werden.

Die folgenden Fragen sollen erörtert werden:

- Reduziert ISO die synaptische Übertragungsstärke?
- Wirkt hierbei ISO bei jungen und älteren Tieren unterschiedlich stark?

- Unterdrückt ISO die Auslösung von LTP?
- Wie wirkt ISO auf die Auslösung von LTP, wenn man die GABA_A-Rezeptoren durch Picrotoxin blockiert?
- Ist der Effekt von ISO reversibel?

- Unterdrückt ISO auch die Auslösung von LTD?

4. Material und Methoden

4.1. Hirnschnitt-Präparation

Von männlichen juvenilen (14 Tage) und erwachsenen JVBN-Mäusen (2 Monate) wurden transverse Hippocampus-Schnitte (300 μM dick) gewonnen. Vor der Dekapitation wurden die Mäuse mit ISO betäubt. Die Experimente wurden von der Ethikkommission der Bayerischen Staatsregierung genehmigt.

Alle Präparationsschritte erfolgten in einer eisgekühlten (2 - 4° C), Carbogen-gesättigten (95% O₂ / 5% CO₂) künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid (ACSF), Zusammensetzung: 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 2mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM D-Glukose und 1,25 mM NaH₂PO₄; pH 7,3). Mit einem sagittalen Schnitt durch die Kopfhaut wurde der Schädel freigelegt. Dann wurde der Schädel durch einen beidseitigen Transversalschnitt etwa in Höhe des Kleinhirns eröffnet. Anschliessend erfolgte vom Rückenmarkskanal her ein flach geführter Schnitt entlang der Sagittalnaht nach rostral. Die Kalottenhälften wurden mit einer Knochenzange nach beiden Seiten bis zum Bregma weggeklappt. Nach dem Durchtrennen der nervi optici und des verlängerten Rückenmarks wurde das Gehirn mit Hilfe eines gerundeten Spatels aus der Schädelgrube entnommen. Das Gehirn wurde mit der Basis nach unten auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier gelegt und kurz mit ACSF gespült. Das Kleinhirn wurde abgetrennt. Mit einer entfetteten Rasierklinge wurde das Grosshirn entlang der Hemisphärenlinie in zwei Hälften geteilt. Eine der beiden Hirnhälften wurde mit der Schnittfläche auf einen Plexiglasquader geklebt (Histoacrylkleber) und in ein mit ACSF gefülltes Schneidegefäss überführt. Mit dem Vibratom wurden schliesslich 300 μm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden mittels Pasteurpipette auf ein Teflon-Netz gelegt, das zuvor in einem mit Carbogen-gesättigter ACSF gefüllten Gefäss fixiert wurde. Dort ruhten die Schnitte bis zur Überführung in die Ableitkammer ca. eine Stunde bei Raumtemperatur (22 - 24° C).

4.2. Elektrophysiologische Ableitungen

Für die extrazellulären bzw. Ganzzell-Ableitungen wurden die Schnitte in eine Ableitkammer gelegt, in der ein Zu- und ein Abfluss für die ACSF installiert ist. Die Flussrate der Lösung durch die Kammer betrug 1,5 ml/min. Die ACSF wurde

kontinuierlich mit Carbogen begast. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Feldpotenziale bzw. EPSCs wurden in der dendritischen CA1-Region des Hippocampus abgeleitet, wie in Abb. 4.2. schematisch dargestellt.

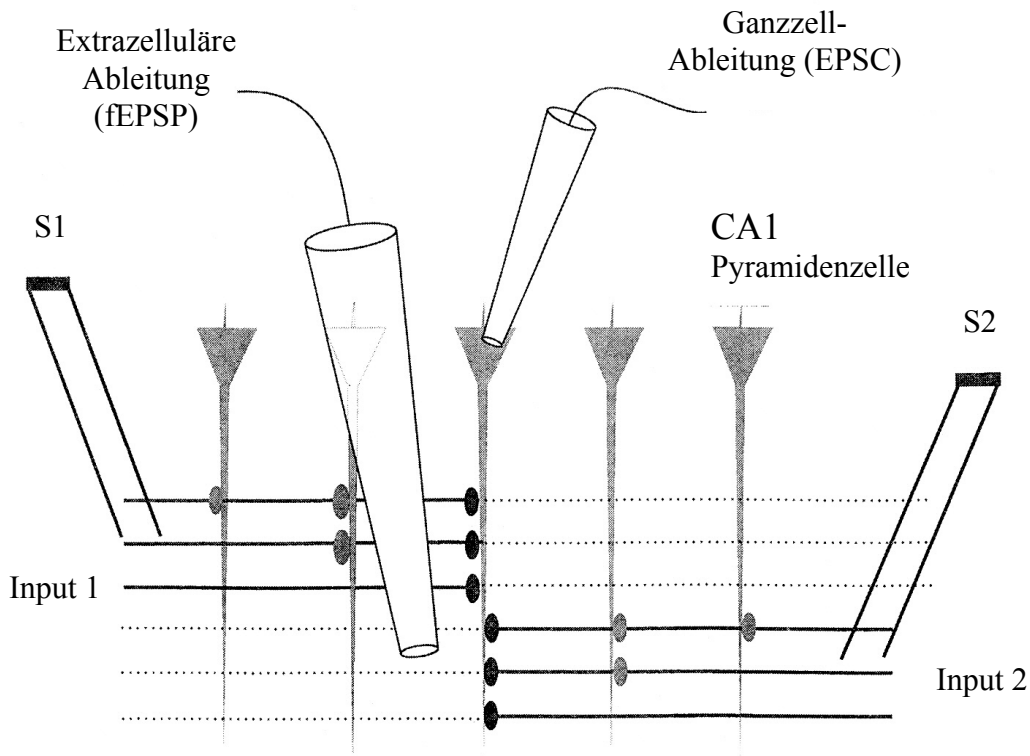


Abb. 4.2.: Aufzeichnung von fEPSPs bzw. EPSCs in der CA1-Region des Hippocampus (schematisch). Zwei Bündel afferenter Fasern laufen getrennt voneinander an den Dendriten einer Neuronen-Population zusammen und können deshalb separat stimuliert werden (Stimulationselektroden S1 und S2). Eine Stimulation über S1 bzw. S2 induziert synaptische Antworten, die auf den jeweiligen Input beschränkt sind (EPSC = exzitatorischer postsynaptischer Strom, fEPSP = exzitatorisches postsynaptisches Feldpotenzial).

Zur fEPSP-Aufzeichnung wurden mit ACSF gefüllte Glas-Mikroelektroden (1-2 M Ω Widerstand) verwendet. Um LTP auszulösen, wurden die Schaffer-Kollateral-Kommissuren tetanisch gereizt (100 Hz/1 s). Zur LTD-Induktion applizierten wir einen niederfrequenten Stimulus (1 Hz/900 s, low-frequency stimulation, LFS). Als Mass für die fEPSP-Grösse wurde die Steigung des fEPSP zwischen 20% und 80% der Antwort-

Amplitude gemessen. Die fEPSP-Steigungen (2 Aufnahmen pro Minute) wurden zur 30-minütigen Kontroll-Messung normalisiert (vor der tetanischen bzw. der niederfrequenten Reizung).

Die EPSCs wurden von mittels Infrarot-Mikroskop sichtbar gemachten Somata der Pyramiden-Neuronen in der CA1-Region im Ganzzell-Modus abgeleitet (Dodt, 1999). Die EPSCs bzw. EPSPs wurden durch Stimuli (4 x bzw. 2 x pro Minute, 4-5 V, 20 μ s) über zwei bipolare Wolfram-Elektroden evoziert. Die Wolfram-Drähte (Durchmesser 50 μ m) sind bis zu den Spitzen hin gegeneinander isoliert. Sie werden im Bereich der Schaffer-Kollateralen positioniert. Die Glas-Elektroden (4 - 5 M Ω) zur Ganzzell-Ableitung enthielten: 130 mM K-D-Glukonat, 5 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM D-Glukose, 20 mM Creatin-Phosphat, 5 mM QX-314. Um glutamaterge EPSCs zu isolieren, wurden GABA_A- bzw. GABA_B-Rezeptoren mit Picrotoxin (50 μ M) bzw. CGP-35348 (200 μ M) blockiert. Picrotoxin und CGP-35348 wurden hierbei über das Extrazellulärmedium appliziert. Spannungsgesteuerte Natrium- bzw. Kalium-Kanäle wurden mit QX-314 bzw. Cs⁺, intrazellulär über die Ableitelektrode appliziert, blockiert.

Die Ströme wurden mit einem „switched-voltage-clamp amplifier“ (SEC 1L, NPI electronic, Tamm) mit einer Wechsel-Frequenz von 40-43 kHz abgeleitet. Hierbei wird im sog. Bridge-Modus der Serienwiderstand kontinuierlich angezeigt und kompensiert (Misgeld, 1989). Bei dieser Art der Ableitung wird über die sog. Wheatstonesche Brücke gleichzeitig die Spannung gemessen (75% vom "duty cycle") und der Kompensationsstrom in das Neuron injiziert (25% vom "duty cycle").

Durch Injizieren von hyperpolarisierenden Strompulsen (300 ms, -10mV) wurde der neuronale Eingangswiderstand gemessen. Der mittlere Eingangswiderstand der Neurone betrug 223 ± 64 M Ω (n = 93).

Die aufgezeichneten Signale wurden gefiltert (3 kHz Low-Pass) und digitalisiert (9 kHz Digitalisierungs-Frequenz). Die digitalisierten Daten wurden mit Hilfe einer Daten-Aufzeichnungs-Software auf einem Power-MacIntosh-G3-Computer gespeichert. Alle Experimente wurden bei Zimmertemperatur und einem Haltepotenzial von -70 mV durchgeführt.

4.3. Die Applikation und Konzentrationsbestimmung von ISO

ISO ist ein volatiles Anästhetikum mit einem Molekulargewicht von 185 und einem Dampfdruck von ca. 240 mmHg. Zur Herstellung einer gesättigten ISO-Lösung wird das Anästhetikum der Extrazellulärlösung im Überschuss zugesetzt und für mindestens drei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt (das Becherglas ist hierbei mit Parafilm luftdicht verschlossen). Die ISO-Konzentration der gesättigten Lösung wurde gaschromatographisch bestimmt und betrug 15 mM (Scheller, 1997). Der MAC-Wert von ISO beträgt etwa 0,7 - 0,8 Vol%, was bei einem Bunsen-Wasser/Gas-Koeffizienten von 1,08 (bei 25° C) ca. 0,2-0,5 mM in wässriger Lösung entspricht (Firestone, 1986).

Bei jedem Experiment wurden drei verschiedene Verdünnungen der gesättigten ISO-Lösung (1:7,5, 1:15 bzw. 1:30 = 2 mM, 1 mM bzw. 0,5 mM) frisch vorbereitet und unter Begasung mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) dem Perfusionssystem zugeleitet. Um den Verlust der flüchtigen Substanz zu minimieren, wurden hoch-qualitative Polytetrafluorethylen-Schläuche als Leitungen verwendet. Zur Bestimmung der Endkonzentration von ISO in der Messkammer wurden Aliquots (1 ml) der jeweiligen ISO-Verdünnung aus der Perfusionskammer entnommen und in luftdichte Glasbehälter zur gaschromatographischen Messung abgefüllt. Dabei zeigte sich, dass alle ISO-Endkonzentrationen, die aus den verschiedenen Verdünnungen stammten, immer 0,2-0,3 mM betragen. Da diese ISO-Konzentration als klinisch relevant angesehen werden kann, wurde die 1:15-Verdünnung der gesättigten Lösung durchgehend verwendet.

4.4. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software IGOR Pro (WaveMetrics, N.Y., USA). Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanz-Abschätzung für LTP/LTD ab 30 Minuten nach der jeweiligen Stimulation erfolgte mittels Student's t-Test.

5. Ergebnisse

5.1. ISO reduziert die glutamaterge synaptische Transmission

In einer ersten Versuchsreihe wurden in der CA1-Region von Hippocampus-Schnitten junger Mäuse (14 Tage) sowohl Feldpotenziale (fEPSPs) als auch anhand von Ganzzell-Ableitungen postsynaptische Ströme (EPSCs) aufgezeichnet. Bei den erwachsenen Tieren (2 Monate) war eine stabile Ganzzell-Konfiguration zur Ableitung von EPSCs oft nicht möglich. Hier wurden deshalb fEPSPs aufgezeichnet.

Bei den jungen Tieren reduziert ISO (0,2 - 0,3 mM) die EPSC-Amplitude (gemessen an der Steigung der Antworten) im Mittel auf $37 \pm 6\%$, die fEPSP-Amplitude (ebenfalls gemessen an der Steigung) auf $37 \pm 5\%$ ($n = 6$). Bei den erwachsenen Tieren ist der ISO-Effekt auf die fEPSPs signifikant schwächer ($p < 0,05$, Student's t-Test) ausgeprägt (Reduktion auf $58 \pm 7\%$, $n = 9$, Abb. 5.1.).

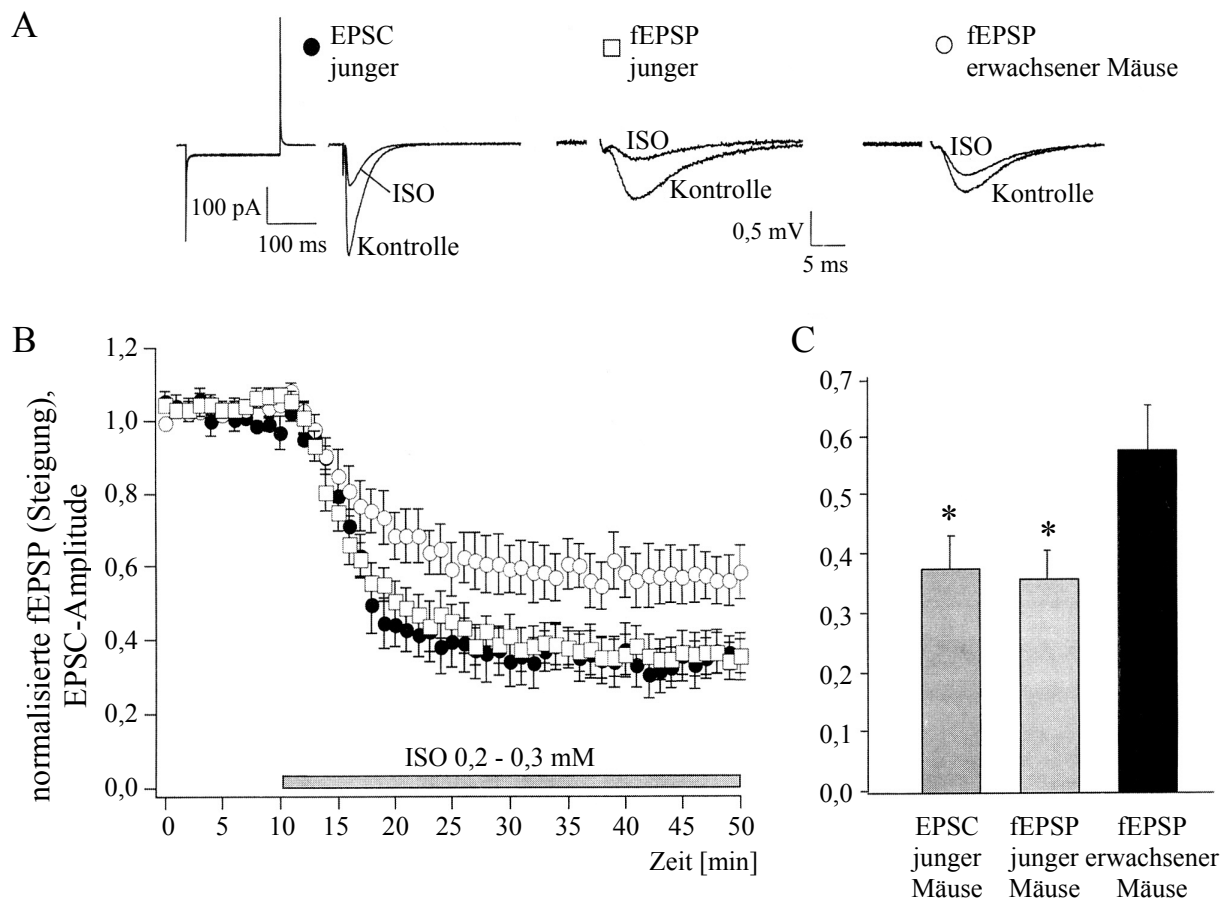


Abb. 5.1.: ISO reduziert die glutamaterge exzitatorische synaptische Transmission in der hippocampalen CA1-Region der Maus. Die Ausprägung des ISO-Effekts ist vom Alter der Tiere abhängig. **(A)** Exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) bzw. Feldpotenziale (fEPSPs) wurden vor dem ISO-Einwasch (Kontrolle) und anschliessend in Anwesenheit von ISO aufgezeichnet. **(B)** Zeitverlauf des ISO-Effekts ab Einwasch (grauer Balken) bei jungen und erwachsenen Mäusen. Die fEPSPs bzw. EPSCs wurden in Gruppen von je vier aufeinanderfolgenden Antworten gemittelt ($4 \times 15 \text{ s} = 1 \text{ min}$) und dann bezogen auf die 10-minütige Periode vor ISO-Einwasch normalisiert. Die sich hieraus ergebenden Verläufe sechs separater Experimente wurden anschliessend gemittelt. Die Strom-Antworten **(A, links)** auf hyperpolarisierende Pulse (-10 mV) zeigen, dass sich der Membranwiderstand über die Zeit hinweg nicht verändert hat. **(C)** Das Balkendiagramm zeigt die gemittelt-normalisierten Antworten aus den letzten 10 min der ISO-Applikation. Die Reduktion der Antworten durch ISO ist bei den jungen Mäusen signifikant stärker ausgeprägt (* $p < 0,05$).

5.2. ISO blockiert die Auslösung von LTP

In einer weiteren Versuchsreihe wurde jeweils in ein und dem selben Hippocampus-Schnitt über zwei getrennte und voneinander unabhängige Inputs (Stimulationselektroden S1 und S2, siehe Abb. 4.2.) ein tetatischer Stimulus (100

Hz/1s) appliziert. Diese Stimulation zur LTP-Auslösung erfolgte zunächst über Input 1 vor dem ISO-Einwasch und danach 90 min später über Input 2, etwa 30 min nach dem ISO-Einwasch.

Die der LTP-Quantifizierung zugrundeliegenden fEPSPs wurden alle 15 s durch einen singulären Rechteckspuls (4-5 V, 20 μ s) ausgelöst, und zwar jeweils abwechselnd über Input 1 und Input 2 (je 2 x pro Minute), und über die Messpipette aufgezeichnet. Die tetanische Stimulation erfolgte jeweils nach erfolgreicher Aufzeichnung einer ca. 20 min langen "stabilen Baseline" von in etwa konstant grossen fEPSPs (Abb. 5.2.1.).

Unmittelbar nach der tetanischen Stimulation kommt es typischerweise zu einem sprunghaften, starken Anstieg der Antworten, der sog. posttetanischen Potenzierung. Gleichzeitig bleiben die fEPSPs, die dem vom jeweils anderen Input stimulierten synaptischen Feld entspringen, unbeeinflusst (Abb. 5.2.1.). Die beiden Inputs, d.h. die zwei von ihnen stimulierten synaptischen Felder, sind also voneinander unabhängig.

Unter Input 1 (Kontrolle, vor ISO-Einwasch) zeigen sich nach der posttetanischen Potenzierung dauerhaft (ca. 60 min) erhöhte fEPSP-Antworten, d.h. eine (stabile) LTP. Die fEPSP-Antworten aus Input 2 bleiben dabei unverändert (Abb. 5.2.1.). Unter ISO-Einwasch verringern sich die fEPSPs beider synaptischer Felder, also unter Input 1 und Input 2. (Abb. 5.2.1.). Etwa 20 min nach dem ISO-Einwasch erfolgt die tetanische Stimulation über Input 2. In Anwesenheit von ISO zeigt sich zwar abermals eine posttetanische Potenzierung, eine LTP bleibt jedoch aus, wird also offensichtlich durch ISO unterdrückt. Die fEPSPs fallen etwa 30 min *post stimulationem* wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 5.2.1.).

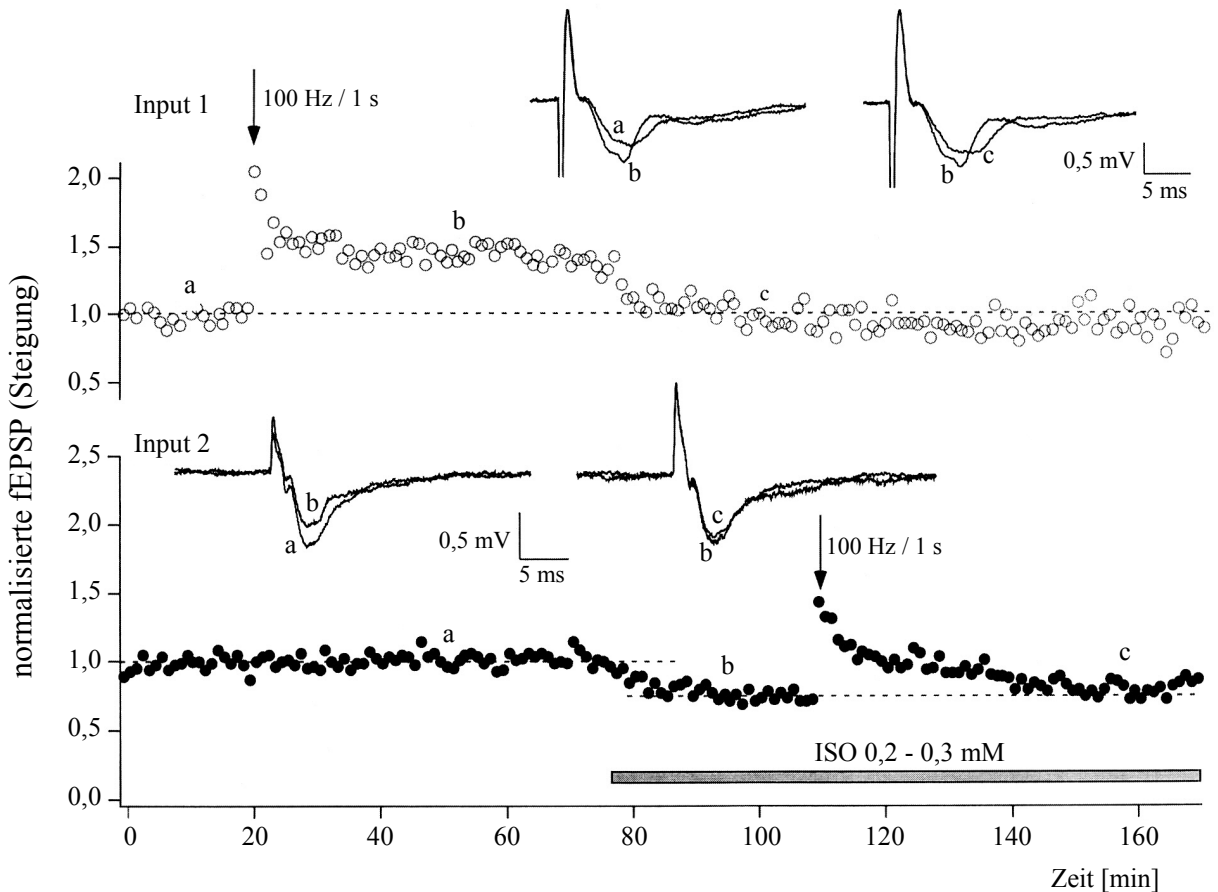


Abb. 5.2.1.: ISO hemmt die Auslösung von LTP. Über Input 1 und Input 2 wurden zwei unabhängige fEPSP-Antworten evoziert. Jeder Datenpunkt (Kreis) errechnet sich aus dem Mittel von zwei aufeinanderfolgenden fEPSP-Antworten (2 Antworten pro Minute aus Input 1 bzw. Input 2). Die gemittelten fEPSP-Amplituden (gemessen an der Steigung zwischen 20% - 80%) sind auf die Baseline normalisiert (Input 1: leere Kreise, Input 2: volle Kreise). Die tetanische Stimulation (100 Hz/1s, Pfeil) erfolgt zunächst über Input 1 vor dem ISO-Einwasch (Kontrolle) und danach über Input 2 unter Anwesenheit von ISO (0,2 – 0,3 mM, grauer Balken). Unter Input 1 (Kontrolle) zeigt sich nach der posttetanischen Potenzierung eine stabile LTP, unter Input 2 (ISO) bleibt jedoch nach der posttetanischen Potenzierung eine LTP aus. Zusätzlich reduziert ISO die fEPSPs beider Inputs (Verminderung der synaptischen Transmission, wie unter Punkt 5.1. bzw. Abb. 5.1.).

Die Abb. 5.2.2. zeigt gemittelt-normalisierte Werte aus 9 separaten Experimenten. Unter Kontrollbedingungen (ohne ISO) vergrößert die tetanische Stimulation die fEPSPs im Mittel auf $159 \pm 17\%$ (LTP 60 min *post stimulationem*, Abb. 5.2.2. links). In Anwesenheit von ISO kann die tetanische Stimulation keine LTP auslösen. Die fEPSP-Amplituden (gemessen an der fEPSP-Steigung) fallen ca. 30 min *post stimulationem* wieder auf das Ausgangsniveau zurück ($101 \pm 3\%$, $n = 9$, Abb. 5.2.2. rechts).

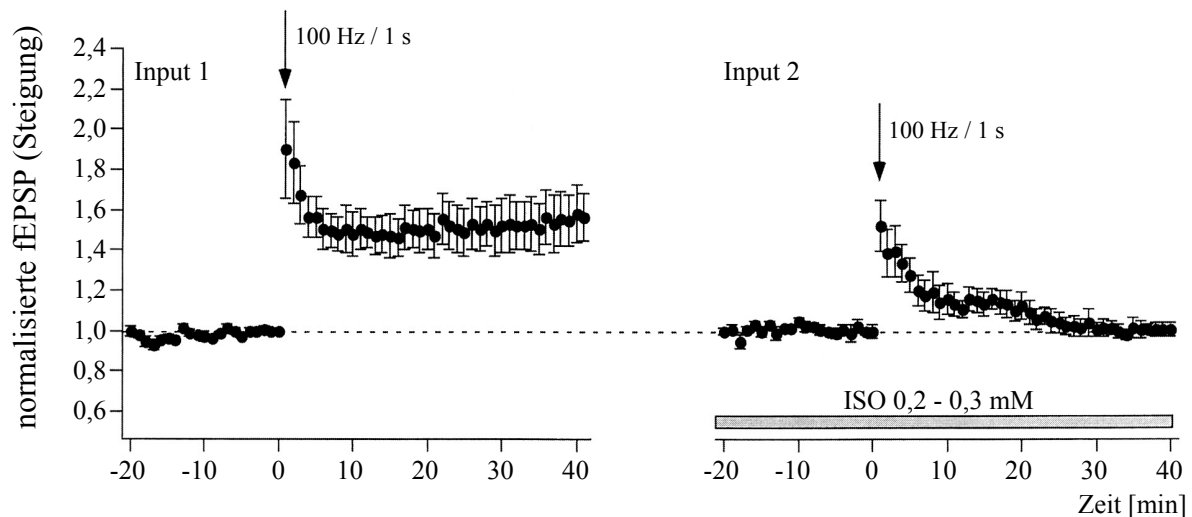


Abb. 5.2.2.: ISO hemmt die Auslösung von LTP (gemittelte Werte aus 9 separaten Experimenten). Die Feldpotenziale (fEPSPs) werden durch zwei unabhängige Inputs, die jeweils im selben Schnitt positioniert sind, ausgelöst und mittels Messelektrode aufgezeichnet. Unter Kontrollbedingungen (ohne ISO) vergrößert die tetanische Stimulation die fEPSPs im Mittel auf $159 \pm 17\%$ (gemessen an der fEPSP-Steigung, LTP 60 min *post stimulationem*) (**links**). In Anwesenheit von ISO kann die tetanische Stimulation keine LTP auslösen. Die fEPSP-Amplituden fallen ca. 30 min *post stimulationem* wieder auf das Ausgangsniveau zurück (**rechts**).

5.3. Die Blockade von GABA_A-Rezeptoren hebt den ISO-Effekt auf

Nach den bisherigen Erkenntnissen verstärkt ISO GABA_A-Rezeptor-vermittelte Stöme (Koltchine, 1999). Dadurch könnte ISO zusätzlich die glutamaterge synaptische Transmission während der tetanischen Stimulation reduzieren und somit die LTP-Auslösung hemmen. Um diesen möglichen Mechanismus zu überprüfen, wurde der Effekt von ISO auf die LTP unter Anwesenheit des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin (50 μ M) untersucht.

Auch unter Blockade der GABA_A-Rezeptoren (in Anwesenheit von Picrotoxin) löst die tetanische Stimulation eine stabile LTP aus ($131 \pm 13\%$, 60 min *post stimulationem*, $n = 8$, Abb. 5.3., links). Unter diesen Bedingungen (Picrotoxin) hemmt ISO (0,2 – 0,3 mM) die LTP-Auslösung durch die tetanische Stimulation nicht (fEPSP-Vergrößerung auf $133 \pm 8\%$, 60 min *post stimulationem*, $n = 8$, Abb. 5.3., rechts).

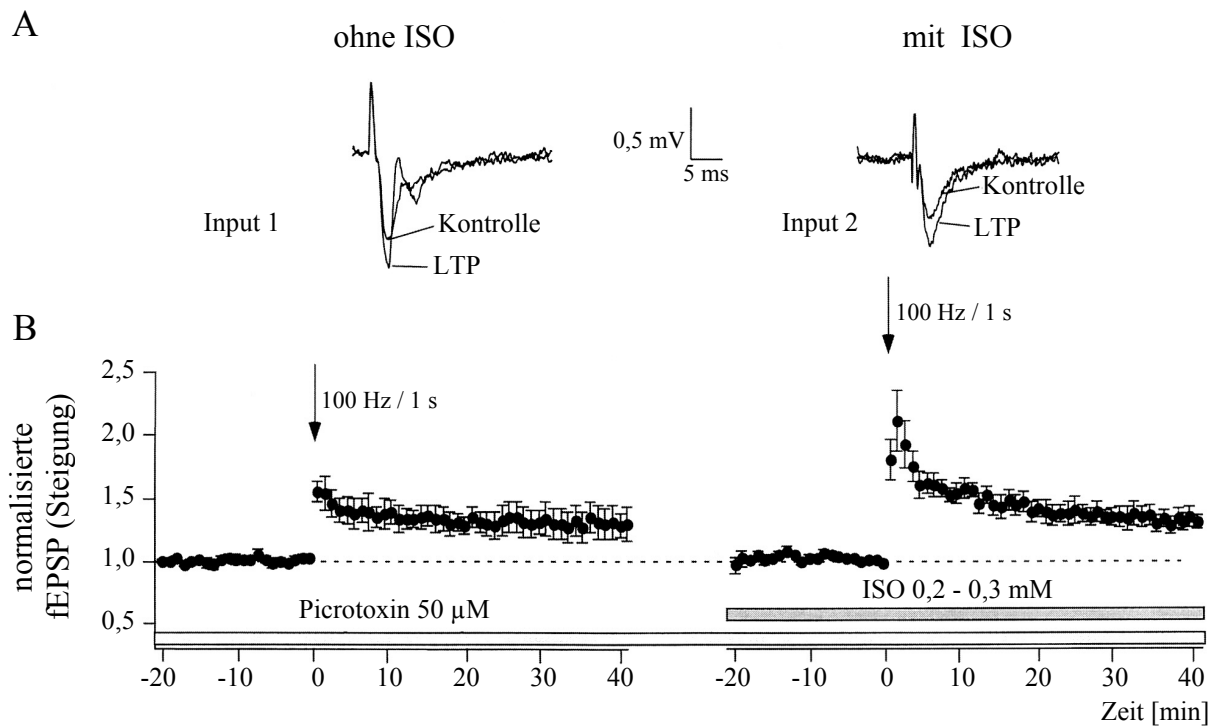


Abb. 5.3.: Die Blockade von GABA_A-Rezeptoren hebt den ISO-Effekt auf die LTP auf. In Anwesenheit von Picrotoxin (50 µM, weisser Balken) hemmt ISO (0,2 – 0,3 mM, grauer Balken) die LTP-Auslösung nicht (**A**: Einzelne fEPSPs jeweils vor und nach tetanischer Stimulation, zunächst ohne (links), anschliessend mit (rechts) ISO, **B**: Gemittelte Werte aus 8 separaten Experimenten). Experimentelles Design wie in Abb. 5.2.2. Der Pfeil zeigt jeweils den Zeitpunkt der tetanischen Stimulation.

Zudem schwächt Picrotoxin den ISO-Effekt auf die glutamaterge Transmission signifikant ab (Verminderung der fEPSPs auf $72 \pm 4\%$ mit Picrotoxin, auf $52 \pm 2\%$ ohne Picrotoxin, $p < 0,01$, Student's t-Test, ohne Abbildung).

Diese Befunde belegen, dass eine (verstärkte) Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zur Unterdrückung der LTP und zur Verminderung der glutamatergen Transmission durch ISO beitragen könnte.

Da in Anwesenheit von Picrotoxin (Hemmung der inhibitorisch wirksamen GABA_A-Rezeptoren) im Hippocampus-Schnitt ein höherer Exzitations-Tonus herrscht, der möglicherweise eine LTP-Auslösung erleichtert, wurde untersucht, ob Picrotoxin auch die LTP-Hemmung durch GYKI-52466 (10 µM) aufhebt. GYKI-52466 ist ein nicht-kompetitiver AMPA-Rezeptor-Antagonist (Rammes, 1994), der EPSPs ähnlich stark wie ISO reduziert (auf $46 \pm 5\%$, $n = 5$) und ebenfalls die LTP-Auslösung blockiert. Picrotoxin konnte allerdings die GYKI-52466-bedingte Hemmung der LTP-Auslösung nicht aufheben (ohne Abbildung). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass der hemmende Effekt von ISO auf die LTP durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird und

dass Picrotoxin nicht durch Hemmung der GABA-Aktivität die Schwelle für eine LTP-Auslösung herabsetzt.

5.4. Der Effekt von ISO auf die LTP ist reversibel

In dieser Versuchsreihe soll nun untersucht werden, inwieweit die Unterdrückung der LTP durch ISO reversibel ist. Dafür wird an einem der beiden Inputs in Anwesenheit von ISO (0,2 – 0,3 mM) der tetanische Stimulus appliziert. Unter diesen Bedingungen stellt sich, wie zu erwarten, keine LTP ein. Wieder reduziert ISO zusätzlich die fEPSPs (Abb. 5.4. A). Nach Auswasch von ISO vergrössern sich die fEPSPs wieder und ein tetanischer Stimulus am *selben* Input führt zu einer stabilen LTP (Abb. 5.4. A).

Die Abb. 5.4. B zeigt gemittelte Werte aus 6 separaten Experimenten. Die tetanische Stimulation erfolgte über ein und den selben Input innerhalb des jeweiligen Hippocampus-Schnitts, zunächst mit und anschliessend ohne ISO. Die fEPSPs wurden durchgehend anhand ihrer Steigung (zwischen 20% - 80%) gemessen und zur jeweiligen Baseline normalisiert.

Um sicherzugehen, dass der jeweils verwendete Hippocampus-Schnitt überhaupt eine LTP ausbilden kann, wurde zu Beginn jedes dieser Experimente am jeweils anderen Input eine Kontroll-LTP ausgelöst (ohne Abbildung).

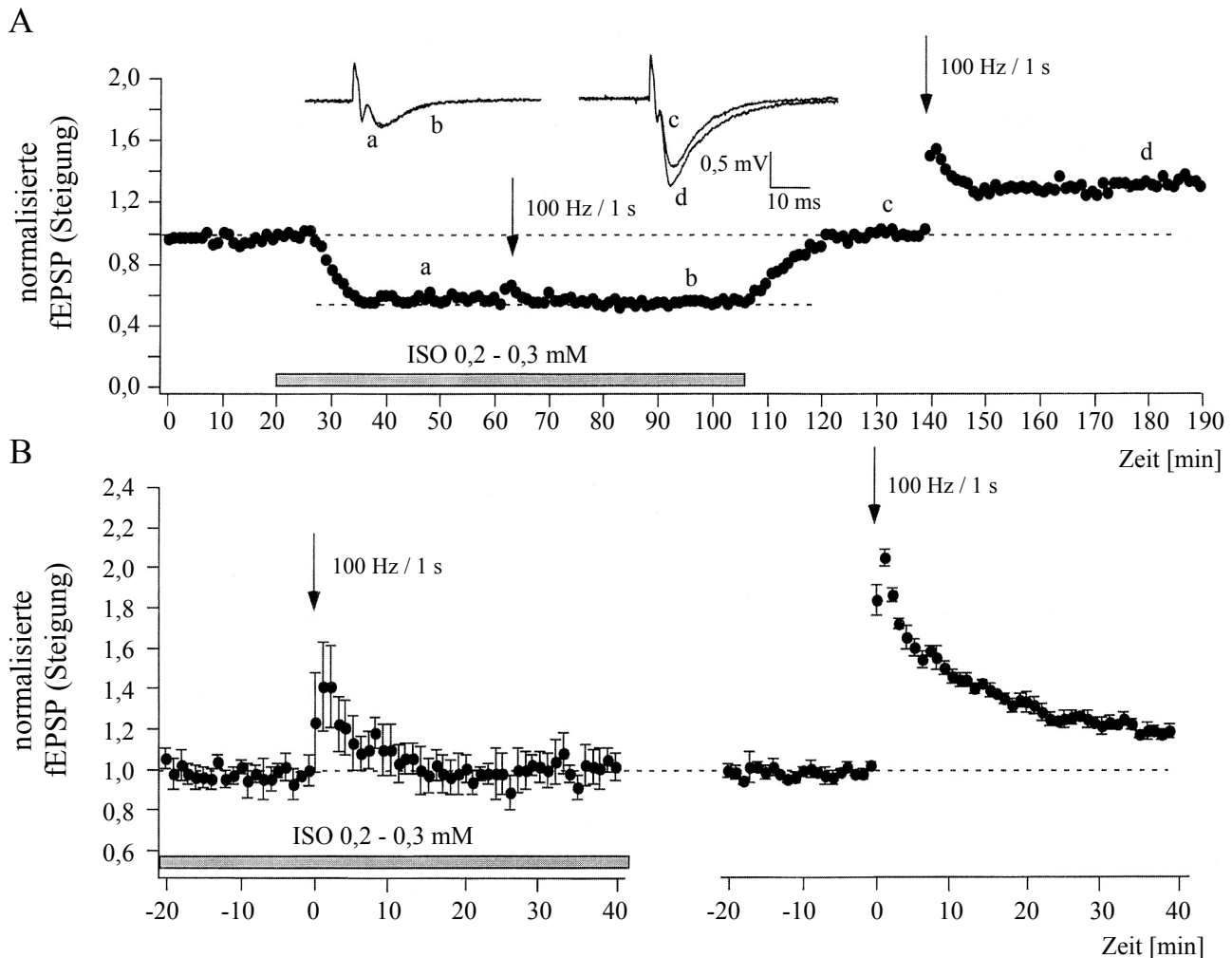


Abb. 5.4.: Der Effekt von ISO auf die LTP ist reversibel. **A:** Repräsentatives Experiment mit Darstellung einzelner fEPSPs (jeweils vor und nach tetanischer Stimulation am *selben* Input, zunächst mit (links), anschliessend ohne (rechts) ISO). Zunächst verkleinert ISO (0,2 – 0,3 mM, grauer Balken) die fEPSP-Antworten und unterdrückt die Auslösung einer LTP. Beide Effekte sind aufgehoben, nachdem ISO aus dem Schnitt ausgewaschen ist. **B:** Gemittelte Werte aus 6 separaten Experimenten. Der Pfeil zeigt jeweils den Zeitpunkt der tetanischen Stimulation (jeweils am *selben* Input). Jeder Datenpunkt ergibt sich aus der gemittelten Steigung von je vier aufeinanderfolgenden fEPSPs (4 evozierte Antworten pro Minute), normalisiert zur jeweiligen Baseline.

5.5. ISO blockiert die Auslösung von LTD

In einer abschliessenden Versuchsreihe soll untersucht werden, ob ISO im Hippocampus (CA1-Region) auch die Auslösung einer LTD (long-term depression) infolge einer niederfrequenten Stimulation (1 Hz/900 s, low-frequency stimulation, LFS) unterdrückt.

Hierfür wird nach Aufzeichnung einer möglichst stabilen Baseline (mindestens 20 min) am Input 1 die LFS appliziert. Diese bewirkt eine LTD (Verkleinerung der

fEPSPs im Mittel auf $83 \pm 6\%$, 40 min *post stimulationem*, $n = 6$, Abb. 5.5., links). Gleichzeitig bleiben die durch den Input 2 evozierten fEPSPs unbeeinflusst (die Inputs sind voneinander unabhängig, aus Abb. 5.5. nicht ersichtlich). Daraufhin wird ISO (0,2 – 0,3 mM) in den Hippocampus-Schnitt eingewaschen (Abb. 5.5., rechts, grauer Balken). Wieder verkleinert ISO die fEPSPs. Etwa 20 min nach dem ISO-Einwasch wird über den Input 2 die LFS appliziert. Unmittelbar nach der LFS sind die fEPSPs zwar vermindert, eine stabile LTD stellt sich unter ISO jedoch nicht ein (die Steigung der fEPSPs beträgt gegenüber der Baseline im Mittel $99 \pm 5\%$, 40 min *post stimulationem*, $n = 6$, Abb. 5.5., rechts).

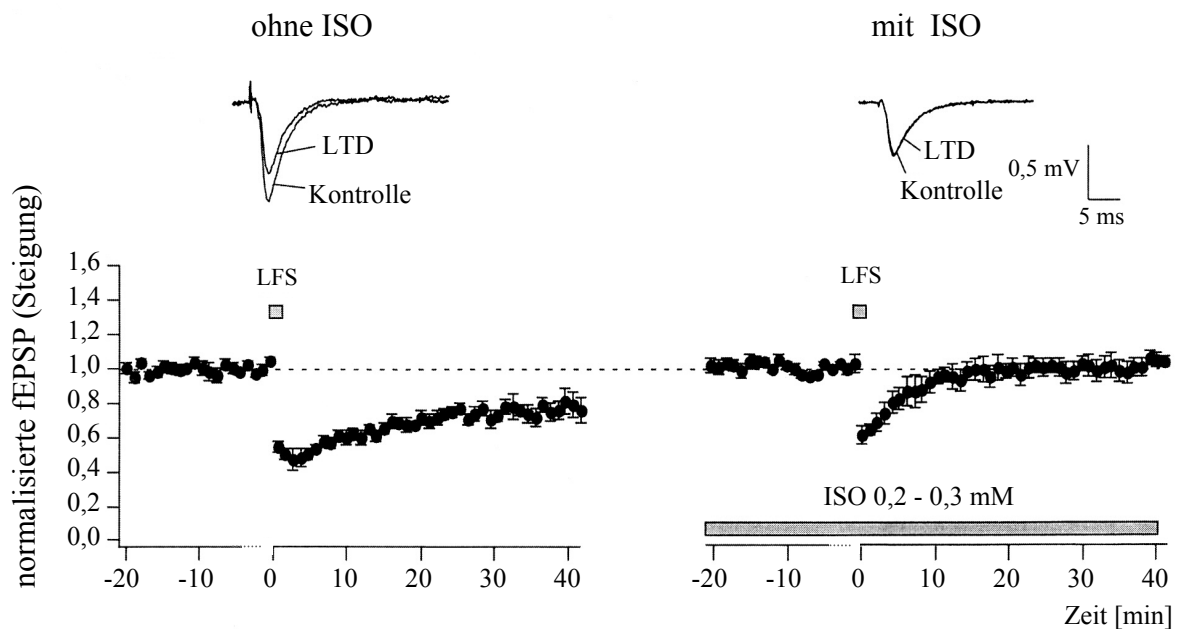


Abb. 5.5.: ISO blockiert die Auslösung von LTD. **A:** Einzelne fEPSPs jeweils vor und nach LFS, zunächst ohne (links), anschliessend mit (rechts) ISO, **B:** Gemittelte Werte aus 6 separaten Experimenten. Der Zeitpunkt der LFS ist jeweils angezeigt. Input 1 und Input 2 sind jeweils voneinander unabhängig. Jeder Datenpunkt ergibt sich aus der gemittelten Steigung von je zwei aufeinanderfolgenden fEPSPs (2 evozierte Antworten pro Minute und Input), normalisiert zur jeweiligen Baseline.

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt anhand eines Maus-Modells erstmalig, inwieweit eine klinisch relevante Konzentration des volatilen Anästhetikums Isofluran (ISO) die synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflusst. Hierbei zeigt sich, dass ISO nicht nur die glutamaterge synaptische Transmission vermindert, sondern auch die Auslösbarkeit von LTP und LTD als zwei Formen synaptischer Plastizität unterdrückt.

Der hemmende Effekt von ISO auf die hippocampale LTP ist reversibel und lässt sich durch Blockade der GABA_A-Rezeptoren aufheben. Dies belegt, dass ISO die LTP-Induktion durch Verstärkung GABA_A-Rezeptor-vermittelter Mechanismen unterdrückt. Derzeit ist noch unklar, ob auch intravenöse Anästhetika, wie Barbiturate, Etomidate oder Propofol, die ebenfalls GABAerge Mechanismen verstärken, ähnlich wie ISO die synaptische Plastizität beeinflussen. Für Benzodiazepine wurde bereits *in vivo* und *in vitro* gezeigt, dass sie die LTP-Induktion über eine Verstärkung der GABAergen Hemmung inhibieren (Trepel, 2000; Higashima, 1998; Seabrook, 1997). Beim Menschen kann die Verabreichung von Benzodiazepinen das motorische Lernen („*use-dependent*“-Plastizität) beeinträchtigen (Butefisch, 2000). Dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten, zu denen auch das Anästhetikum Ketamin zählt, *in vitro* die LTP-Induktion hemmen, ist bereits seit längerem bekannt (Bliss, 1993). Kein Anästhetikum ist jedoch bislang daraufhin untersucht worden.

Die hier erhobenen Befunde sind anästhesiologisch insofern relevant, als dass die Beeinträchtigung der hippocampalen synaptischen Plastizität durch ein Anästhetikum einer postoperativen (vorübergehenden) Beeinträchtigung von Gedächtnis und Kognition zugrundeliegen könnte.

6.1. ISO vermindert die glutamaterge synaptische Transmission im Hippocampus

Das volatile Anästhetikum ISO reduziert die glutamaterge synaptische Transmission in der CA1-Region des Hippocampus. In der hier beschriebenen Versuchsreihe war dieser *in vitro*-Effekt bei jungen Tieren stärker ausgeprägt als bei älteren Tieren. Dies könnte durch altersabhängige Expressions-Profile der verschiedenen Glutamat-Rezeptoren bedingt sein (Ben-Ari, 1997).

Es ist bereits bekannt, dass volatile Anästhetika in klinisch relevanten Konzentrationen Glutamat-Rezeptor-vermittelte Antworten hemmen. Man geht davon aus, dass dieser Effekt überwiegend durch einen präsynaptischen Wirkort vermittelt wird (MacIver, 1996; Nishikawa, 2000). Entsprechend werden sowohl NMDA- als auch non-NMDA-Rezeptor-vermittelte Antworten unterdrückt (Kirson, 1998). Allerdings hemmt ISO, anders als Halothan, bevorzugt die NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission (Nishikawa, 2000), was für eine zusätzliche (postsynaptische) Bindungsstelle für ISO am NMDA-Rezeptor spricht. Die Ausprägung dieser Bindungsstelle könnte mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Altersabhängigkeit der ISO-Wirkung in Zusammenhang stehen. Beispielsweise könnte bei jüngeren Individuen der NMDA-Rezeptor oder zumindest dessen relevante Bindungsstelle für ISO stärker exprimiert sein.

Es gibt auch Hinweise darauf, dass Hippocampus-Neurone junger Mäuse eine geringere initiale Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung, schwächere Reaktionen auf NMDA-Rezeptor-Agonisten und langsamere Kinetiken NMDA-Rezeptor-vermittelter EPSCs zeigen (Kirson, 1996). Es könnte sein, dass ISO deshalb NMDA-Rezeptor-vermittelte EPSCs bei jungen Tieren effektiver supprimiert.

Ob allerdings der altersabhängige ISO-Effekt im *in vitro*-Maus-Modell auch dem unterschiedlichen Anästhetika-Bedarf junger und älterer Patienten zugrunde liegt, soll an dieser Stelle nicht diskutiert werden. Dafür sind die neurophysiologischen Zusammenhänge zu wenig bekannt und das hier verwendete Tier-Modell zu eingeschränkt.

6.2. Die Auslösung von LTP und LTD wird durch ISO blockiert

In der hippocampalen CA1-Region erfordert sowohl die LTP-, als auch die sog. homosynaptische LTD-Induktion einen postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom (Lynch, 1990; Dudek, 1992) zusammen mit einer Aktivierung glutamaterger Rezeptoren. Im Hippocampus gibt es NMDA-Rezeptor-abhängige und NMDA-Rezeptor-unabhängige LTP-Formen (Bliss, 1993). Die vorliegende Arbeit beschränkt sich jedoch auf die NMDA-Rezeptor-abhängigen Plastizitäts-Formen, die ISO möglicherweise durch eine Reduktion der NMDA-Rezeptor-Aktivität unterdrückt.

Eine frühere Arbeit wies bereits darauf hin, dass Halothan, im Gegensatz zu Methoxyfluran, die Wahrscheinlichkeit einer LTP-Auslösung im Hippocampus von Ratten reduziert (MacIver, 1989). Dies zeigt einmal mehr, dass sich die verschiedenen volatilen Anästhetika in ihrer Wirkung auf synaptische Transmission und Plastizität durchaus unterscheiden können.

6.3. Die Rolle des GABA_A-Rezeptors bei der LTP-Hemmung

Die Blockade der GABA_A-Rezeptoren durch Picrotoxin hebt die ISO-bedingte Hemmung der LTP auf, nicht jedoch die LTP-Unterdrückung durch einen AMPA-Rezeptor-Antagonisten. Die GABA_A-Rezeptoren nehmen also offensichtlich eine Schlüsselrolle bei der LTP-Hemmung durch ISO ein.

Die Verstärkung GABA_A-Rezeptor-vermittelter, hyperpolarisierender Ströme hemmt indirekt die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und damit auch die Induktion von LTP und LTD im sog. "Zielneuron" (Wigstrom, 1983; Mott, 1991). Es gibt auch bereits Befunde darüber, dass eine erhöhte GABA_A-Rezeptor-Funktion, z.B. durch Benzodiazepine, Gedächtnisfunktionen und entsprechend die hippocampale synaptische Plastizität beeinträchtigt (Seabrook, 1997). Auf diesem Wege könnte auch ISO die Induktion von LTP und LTD unterdrücken. ISO agiert zwar nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle (Harris, 1993), verstärkt aber ebenfalls die inhibitorisch wirksame GABA_A-Rezeptor-Aktivität.

Die Verstärkung GABA-aktivierter Antworten durch ISO, wie sie u.a. in Hippocampus-Neuronen der Ratte beobachtet wurde (Jones, 1993), hängt zudem von der Untereinheiten-Zusammensetzung der jeweiligen GABA_A-Rezeptor-Population ab (Koltchine, 1999; Lees, 1998). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass ISO je nach Spezies, Hirnregion oder Alter eines Individuums auch die LTP oder allgemein die synaptische Plastizität unterschiedlich stark beeinträchtigt. Altersabhängige Expressions-Profile der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten sind bereits beschrieben worden (Ben-Ari, 1997).

6.4. NMDA-Rezeptoren und LTD

Auch die Induktion von LTD kann NMDA-Rezeptor-abhängig sein und durch GABA_A-Rezeptoren moduliert werden. Es wurde gezeigt, dass eine GABA-vermittelte Hemmung der Depolarisation und die damit verbundene verminderte NMDA-Rezeptor-Aktivität die Induktion einer LTD hemmt (Wagner, 1995). Es ist denkbar, dass ähnliche Mechanismen die ISO-bedingte Unterdrückung der LTD vermitteln.

6.5. Die Wirkung von ISO auf spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle

In hippocampalen Pyramiden-Neuronen hemmt ISO verschiedene Typen spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle (Study, 1994). Verschiebt sich darüberhinaus das Membranpotenzial in hyperpolarisierende Richtung, indem man die GABAergen inhibitorischen synaptischen Eingänge verstärkt, verringert sich der Ca²⁺-Einstrom durch diese Ca²⁺-Kanäle zusätzlich. Dies dürfte erheblich zur ISO-bedingten Hemmung der "use-dependent modulation of synaptic efficiency" (= synaptische Plastizität) beitragen.

Zudem weiss man, dass eine Blockade von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen die LTD-Induktion hemmen kann (Coussens, 1997). LTD wird beispielsweise in den Dendriten von Neokortex-Neuronen, ähnlich wie die hippocampale LTP, als Folge synaptischer Glutamat-Freisetzung mit dadurch bedingter NMDA-Rezeptor-Aktivierung erzeugt (Dodt, 1999).

Eine Hyperpolarisation der neuronalen Membran zusammen mit einer Abnahme des Membran-Eingangswiderstands vermindert die Amplitude der Aktionspotenziale, die sich vom Soma weg hin zu den Dendriten bewegen (sog. "back-propagating" Aktionspotenziale). Auch deren Form verändert sich dabei. Diese "back-propagating" Aktionspotenziale öffnen spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle (Hoffman, 1998). Sind sie verkleinert, erreichen sie mit geringerer Wahrscheinlichkeit die entlegeneren dendritischen Regionen. Man weiss aus früheren Arbeiten, dass ein dendritischer Ca²⁺-Einstrom in Verbindung mit "back-propagating" Aktionspotenzialen zur Ausbildung der synaptischen Plastizität entscheidend beiträgt (Spruston, 1995; Magee, 1997; Markram, 1997).

7. Zusammenfassung

Eine Zusammenschau der bisherigen Erkenntnisse und der hier vorgestellten Resultate ergibt, dass volatile Anästhetika in klinisch relevanten Konzentrationen auf die zentrale synaptische Transmission einwirken und inputgesteuerte Langzeitveränderungen der Erregbarkeit zentraler Neurone (synaptische Plastizität) unterdrücken.

Die (erwünschte) perioperative Amnesie ("loss of recall"), aber auch die gelegentlich auftretenden postoperativen kognitiven Störungen sind wichtige Aspekte der Allgemeinanästhesie. Diese Phänomene könnte man nun durch eine Hemmung der hippocampalen LTP und LTD erklären, da diese beiden Formen der synaptischen Plastizität verschiedenen Lern- und Gedächtnisprozessen zugrundeliegen.

Die Verminderung der glutamatergen Transmission wird wahrscheinlich überwiegend durch eine Verstärkung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Hemmung vermittelt. Dies reduziert die depolarisationsabhängige Aktivierung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren und die Aktivität spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle. Dadurch könnten die inputgesteuerten Langzeitveränderungen der synaptischen Effizienz, wie LTP und LTD, unterdrückt werden. Diese Wirkung könnte Teil der sog. "multisite agent-specific mechanisms" (MacIver, 1997) der zentral-neuronalen Wirkung von Allgemeinanästhetika sein.

Als ganz entscheidend ist zu bewerten, dass die hemmenden Effekte des volatilen Anästhetikums Isofluran auf LTP und LTD *in vitro* reversibel sind. Dies widerspricht der Befürchtung, dass Anästhetika dauerhafte Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit auslösen könnten.

Abschliessend soll die folgende Übersicht die mögliche Bedeutung der hier vorgestellten Arbeit für das Geschehen in der Hippocampus-Region während des Zustands der Anästhesie unterstreichen.

Was macht der Hippocampus?

- „Integrationsorgan des Endhirns“
- Verarbeitung optischer, akustischer, taktiler und viszeraler Inputs
- Gedächtnis-Konsolidierung
- Projektion von Gedächtnisinhalten in kortikale Assoziationsareale
- Beeinflussung des endokrinen, viszeralen und emotionalen Geschehens
- Beeinflussung von Bewusstseinslage und Muskeltonus

Was könnte die Hemmung der synaptischen Plastizität im Hippocampus klinisch bedeuten?

- perioperative Amnesie („loss of recall“)
- Vermeidung von Awareness (intraoperative Wachheit)
- verbesserte Antinozizeption
- Verhinderung von Schmerz-Bahnung („Schmerzgedächtnis“)
- vegetative Abschirmung
- Negative Auswirkungen auf das postoperative kognitive Outcome

8. Literaturverzeichnis

Amaral DG, Insausti R: Hippocampal formation. In: „The human nervous system“, Praxinos G (Hrsg.), Academic Press, San Diego, 1990, 711-755

Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER: Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:13445-13452

Bear MF: Mechanism for a sliding synaptic modification threshold. Neuron 1995; 15:1-4

Bear MF, Abraham WC: Long-term depression in hippocampus. Annu Rev Neurosci 1996; 19:437-462

Bear MF, Malenka RC: Synaptic plasticity: LTP and LTD. Curr Opin Neurobiol 1994; 4:389-399

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL: GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated "menage a trois". Trends Neurosci 1997; 20:523-529

Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW: Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. J Neurosci 1982; 2:32-48

Birbaumer N, Schmidt RF: Lernen und Gedächtnis. In: „Physiologie des Menschen“, Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrsg.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2000, 28. Auflage, 548-592

Birbaumer N, Schmidt RF: Biologische Psychologie, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, 4. Auflage

Bliss TVP, Collingridge GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-39

Bloom FE, Iversen LL: Localizing ³H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 1971; 229:628-630

Büch HP, Büch U: Narkotika. In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998, 7. Auflage, 242-244

Butefisch CM, Davis BC, Wise SP, Sawaki L, Kopylev L, Classen J, Cohen LG: Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3661-3665

Cerbone A, Patacchioli FR, Sadile AG: A neurogenetic and morphogenetic approach to hippocampal functions based on individual differences and neurobehavioral covariations. *Behav Brain Res* 1993; 55:1-16

Coussens CM, Kerr DS, Abraham WC: Glucocorticoid receptor activation lowers the threshold for NMDA-receptor-dependent homosynaptic long-term depression in the hippocampus through activation of voltage-dependent calcium channels. *J Neurophysiol* 1997; 78:1-9

Danysz W, Zajaczkowski W, Parsons CG: Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmacol* 1995; 6:455-474

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51:7-61

Dodt HU, Eder M, Frick A, Zieglgänsberger W: Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation. *Science* 1999; 286:110-113

Dudek SM, Bear MF: Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor block. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:4363-4367

Dudek SM, Bear MF: Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. J Neurosci 1993; 13:2910-2918

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

Firestone LL, Sauter JF, Braswell LM, Miller KW: Actions of general anesthetics on acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo californica*. Anesthesiology 1986; 64:694-702

Franks NP, Lieb WR: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. Nature 1994; 367:607-614

Goodchild CS: GABA receptors and benzodiazepines. Br J Anaesth 1993; 71:127-133

Greger R: Membranpotential. In: "Lehrbuch der Physiologie", Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996, 2. Auflage, 47-58

Hapfelmeier G, Haseneder R, Eder M, Adelsberger H, Kochs E, Rammes G, Zieglgänsberger W: Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block. Neurosci Lett 2001a; 307:97-100

Hapfelmeier G, Haseneder R, Kochs E, Beyerle M, Zieglgänsberger W: Co-administered nitrous oxide enhances the effect of isoflurane on GABAergic transmission by an increase in open-channel block. J Pharmacol Exp Ther 2001b; 298:201-208

Harris B, Wong G, Skolnick P: Neurochemical actions of inhalational anesthetics at the GABA_A receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265:1392-1398

Harrison NL, Kugler JL, Jones MV, Greenblatt EP, Pritchett DB: Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol Pharmacol* 1993; 44:628-632

Hebb DO: *The organization of behaviour*. John Wiley & Sons, New York, 1949

Higashima M, Kinoshita H, Koshino Y: Differences in the effects of zolpidem and diazepam on recurrent inhibition and long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1998; 245:77-80

Hirota K, Roth SH: Sevoflurane modulates both GABA_A and GABA_B receptors in area CA1 of rat hippocampus. *Br J Anaesth* 1997; 78:60-65

Hoffman DA, Johnston D: Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* 1998; 18:3521-3528

Hollmann M, Heinemann S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17:31-108

Hunt SP, Mantyh PW: The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:83-91

Jenkins A, Franks NP, Lieb WR: Effect of temperature and volatile anesthetics on GABA_A receptors. *Anesthesiology* 1999; 90:484-491

Jodar L, Kaneto H: Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jap J Pharmacol* 1995; 68:359-387

Jones MV and Harrison NL: Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophys* 1993; 70:1339-1349

Kandel ER, Hawkins RD: Molekulare Grundlagen des Lernens. Spektrum der Wissenschaft, 1992, 11. Auflage, 36-45

Kendig JJ, MacIver MB, Roth SH: Anesthetic actions in the hippocampal formation. *Annu NY Acad Sci* 1991; 625:37-53

Kirson ED, Yaari Y, Perouansky M: Presynaptic and postsynaptic actions of halothane at glutamatergic synapses in the mouse hippocampus. *Br J Pharmacol* 1998; 124:1607-1614

Kirson ED, Yaari Y: Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurones: Functional properties and sensitivity to ifenprodil. *J Physiol* 1996; 497:437-455

Klinke R: Erregungsübertragung in Zellverbänden. In: „Lehrbuch der Physiologie“, Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996, 2. Auflage, 59-78

Koblin DD, Fang Z, Eger EI, Laster MJ, Gong D, Ionescu P, Halsey MJ, Trudell JR: Minimum alveolar concentrations of noble gases, nitrogen, and sulfur hexafluoride in rats: helium and neon as nonimmobilizers (nonanesthetics). *Anesth Analg* 1998; 87:419-424

Koltchine VV, Finn SE, Jenkins A, Nikolaeva N, Lin A, Harrison NL: Agonist gating and isoflurane potentiation in the human gamma-aminobutyric acid type A receptor determined by the volume of a second transmembrane domain residue. *Mol Pharmacol* 1999; 56:1087-1093

Kullmann DM, Asztely F, Walker MC: The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD, and epilepsy. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:1551-1561

Larsen R: *Anästhesie*, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1999, 6. Auflage

Lees G, Edwards MD: Modulation of recombinant human gamma-aminobutyric acid A receptors by isoflurane: influence of the delta subunit. *Anesthesiology* 1998; 88:206-217

Linden DJ: Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 1994; 12:457-472

Linden DJ, Connor JA: Long-term synaptic depression. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18:319-357

Lister RG: The amnestic action of benzodiazepines in man. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9:87-94

Little HJ: How has molecular pharmacology contributed to our understanding of the mechanism(s) of general anesthesia? *Pharmacol Ther* 1996; 69:37-58

Lynch G, Kessler M, Arai A, Larson J: The nature and causes of hippocampal long-term potentiation. *Prog Brain Res* 1990; 83:233-250

Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P: Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 2000; 524:91-116

MacIver MB: General anesthetic actions on transmission at glutamate and GABA synapses. In: „Anesthesia: Biological Foundations“, Yaksh TL, Lynch C, Zapol WM,

Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ (Hrsg.), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, 277-286

MacIver MB, Mikulec AA, Amagasa SM, Monroe FA: Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology* 1996; 85:823-834

MacIver MB, Tauck DL, Kenig JJ: General anesthetic modification of synaptic facilitation and long-term potentiation in hippocampus. *Br J Anaesth* 1989; 62:301-310

Magee JC, Johnston D: A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurones. *Science* 1997; 275:209-212

Malenka RC: Synaptic plasticity in hippocampus and neocortex: a comparison. In: „The cortical neuron“, Gutnick MJ, Moody I (Hrsg.), Oxford University Press, New York, 1995, 98-108

Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN: An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 1989; 340:554-557

Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B: Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 1997; 275:213-215

McCormic DA: Membrane potential and action potential. In: „Fundamental Neuroscience“, Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Hrsg.), Academic Press, San Diego, 1999, 129-154

Misgeld U, Müller W, Polder HR: Potentiation and suppression by eserine of muscarinic synaptic transmission in the guinea-pig hippocampal slice. *J Physiol* 1989; 409:191-206

Möhler H, Fritschy JM, Luscher B, Rudolph U, Benson J, Benke D: The GABA_A receptors. From subunits to diverse functions. In: „Ion Channels“, 1996, 4. Auflage, 89-113

Moody EJ, Suzdak PD, Paul SM, Skolnick P: Modulation of the benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid receptor chloride channel complex by inhalation anesthetics. *J Neurochem* 1998; 51:1386-1393

Mott DD, Lewis DV: Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA_B receptors. *Science* 1991; 252:1718-1720

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC: An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 1993; 261:1051-1058

Nakahiro M, Yeh JZ, Brunner E, Narahashi T: General anesthetics modulate GABA receptor channel complex in rat dorsal root ganglion neurons. *FASEB* 1989; 3:1850-1854

Nakanishi S: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258:597-603

Neumahr S, Hapfelmeier G, Scheller M, Schneck H, Franke C, Kochs E: Dual action of isoflurane on the GABA-mediated currents through recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A receptor channels. *Anesth Analg* 2000; 90:1184-1190

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

Nishikawa K, MacIver MB: Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABA_A receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology* 2001; 94:340-347

Petrides PE: Nervengewebe. In: "Biochemie und Pathobiochemie", Löffler G, Petrides PE (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997, 5. Auflage, 971-993

Pocock G, Richards CD: Excitatory and inhibitory synaptic mechanisms in anaesthesia. Br J Anaesth 1993; 71:134-147

Rammes G, Parsons C, Muller W, Swandulla D: Modulation of fast excitatory synaptic transmission by cyclothiazide and GYKI 52466 in the rat hippocampus. Neurosci Lett 1994; 175:21-24

Ramon y Cajal S: Estructura del asta de ammon y fascia dentata. Anales de Sociedad espanola Historia natural 1893; 22:53-114

Ramon y Cajal S: The structure of Ammon's horn. Thomas, Springfield, 1968, 78

Scheller M, Buffler J, Schneck H, Kochs E, Franke C: Isoflurane and sevoflurane interact with the nicotinic acetylcholine receptor channels in micromolar concentrations. Anesthesiology 1997; 86:118-127

Seabrook GR, Easter A, Dawson GR, Bowery BJ: Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABA_A receptor benzodiazepine site ligands. Neuropharmacology 1997; 36:823-830

Seeburg PH: The molecular biology of mammalian glutamate receptors channels. Trends Neurosci 1993; 16:359-365

Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B: Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. Science 1995; 268:297-300

Starke K: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998, 7. Auflage, 121-124

Study RE: Isoflurane inhibits multiple voltage-gated calcium currents in hippocampal pyramidal neurons. *Anesthesiology* 1994; 81:104-116

Tao HW, Zhang LI, Engert F, Poo M: Emergence of input specificity of LTP during development of retinotectal connections in vivo. *Neuron* 2001; 31:569-580

Trepel C: Das limbische System. In: „Neuroanatomie“, Trepel C (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg, Oldenburg, 1999, 2. Auflage, 40-44

Trepel C, Racine RJ: GABAergic modulation of neocortical long-term potentiation in the freely moving rat. *Synapse* 2000; 35:120-128

Tsumoto T: Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Prog Neurobiol* 1992; 39:209-228

Tsumoto T, Yasuda H, Fukuda M & Akaneya Y: Postsynaptic calcium and calcium-dependent processes in synaptic plasticity in the developing visual cortex. *J Physiol* 1996; 90:151-156

Wagner JJ, Alger BE: GABAergic and developmental influences on homosynaptic LTD and depotentiation in rat hippocampus. *J Neurosci* 1995; 15:1577-1586

Wakasugi M, Hirota K, Roth SH, Ito Y: The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Anesth Analg* 1999; 88:676-680

Wigstrom H, Gustafsson B: Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature* 1983; 301:603-604

Zimmerman SA, Jones MV and Harrison NL: Potentiation of gamma-aminobutyric acidA receptor Cl⁻ current correlates with in vivo anesthetic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:987-991

9. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 2.1. Exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission (CA1-Region des Hippocampus)	12
Abb. 2.2. Feldpotenzial-Ableitung an einem Hippocampus-Schnitt	14
Abb. 2.3. Induktion von LTP/LTD in einem Hippocampus-Schnitt (schematisch)	16
Abb. 2.4. NMDA-Rezeptor-abhängiger Mechanismus der LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus	18
Abb. 2.5. Strukturformel von Glutamat	21
Abb. 2.6. Strukturformel von GABA	22
Abb. 2.7. Strukturformel von ISO	26
Abb. 4.2. Schematische Darstellung von Auslösung und Aufzeichnung von EPSCs und fEPSPs (Hippocampus, CA1-Region)	30
Abb. 5.1. Effekt von ISO auf die exzitatorische synaptische Transmission (mit Altersabhängigkeit)	34
Abb. 5.2.1. ISO hemmt die Auslösung von LTP (Einzelexperiment)	36
Abb. 5.2.2. ISO hemmt die Auslösung von LTP (Zusammenfassung von neun separaten Experimenten)	37
Abb. 5.3. Picrotoxin verhindert die ISO-bedingte Hemmung der LTP-Auslösung	38
Abb. 5.4. Nach Auswasch von ISO kann im selben synaptischen Feld wieder LTP ausgelöst werden	40
Abb. 5.5. ISO hemmt die Auslösung von LTD	41

10. Anhang

10.1. Materialien und Geräte

10.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungen

ACSF (artificial cerebrospinal fluid)

CaCl ₂	2 (mM)	Merck, Darmstadt
D-Glukose	10	Merck, Darmstadt
KCl	3	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	1	Merck, Darmstadt
NaCl	124	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	26	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	1,25	Merck, Darmstadt

Intrazellulärflüssigkeit

Creatin-Phosphat	20 (mM)	Merck, Darmstadt
D-Glukose	5	Merck, Darmstadt
EGTA	0,5	Sigma, Deisenhofen
HEPES	10	Sigma, Deisenhofen
KCl	5	Merck, Darmstadt
K-D-Glukonat	130	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	2	Merck, Darmstadt
QX-314	5	Merck, Darmstadt

Weitere Chemikalien

CGP-35348	Novartis, Basel, Schweiz
D-AP5	Sigma, Deisenhofen
GYKI-52466	Freundlicherweise überlassen von Dr. Tarnawa, Institute for Drug Research, Budapest, Ungarn
Isofluran (Forene®)	Deutsche Abbott GmbH, Wiesbaden
Picrotoxin	Sigma, Deisenhofen

Gase

O₂, Carbogen (O₂ / CO₂-Gemisch) Linde AG, Höllriegelskreuth

10.1.2. Verbrauchsmittel

Hirnschitt-Präparation

Glas-Petrischalen (20 x 100 mm) Sarstedt, Nümbrecht

Histoacryl[®]-Kleber B/Braun, Tuttlingen

Klingen MARTOR, Solingen

Elektrophysiologie

Silberdraht Heraeus Instruments, München

Mess-Pipetten, GC 150TF-10 Clark, Elektromedical Instruments, Pangbourne

Borosilikat-Kapillaren mit Reading, England

Filament, \varnothing_a 1,5 mm, \varnothing_i 1,17 mm

10.1.3. Geräte

Hirnschnitt-Präparation

Vibratom FTB, Villingen

Elektrophysiologie

Ziehgerät, DZM-Universalpuller Zeitz-Instruments, München

Verstärker SEC 1L/10L NPI electronic, Tamm

AD-Wandler ITC 16 Instrutech, corp., New York, USA

Infrarot-Kamera Hamatsu Photonics K.K., Japan

Mikroskop Zeiss, Jena

Schwarz-Weiss-Monitor Panasonic, Japan

Ableitkammer Luigs & Neumann GmbH, Ratingen

EDV

Aufzeichnungs-Software EPC9 HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht

Auswerte-Software IGOR Pro WaveMetrics, N.Y., USA

10.2. Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. E. Kochs für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Anaesthesiologie durchführen zu können, sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Zieglgänsberger danke ich für die Bereitstellung der Laborumgebung mit der technischen und personellen Ausstattung sowie für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. G. Hapfelmeier und Dr. G. Rammes für Betreuung, Anregungen und Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit.

Herrn Rainer Haseneder für die Unterstützung bei der graphischen Ausarbeitung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung 'Klinische Neuropharmakologie' danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre. Für die wissenschaftlichen aber auch die nicht-wissenschaftlichen Gespräche möchte ich mich insbesondere bei Shahnaz, Matthias, Anja, Ulli, Klaus und Krischan bedanken.

10.3. Verzeichnis eigener Publikationen

Die vorliegende Dissertation wurde teilweise in der folgenden Originalarbeit vorveröffentlicht:

Originalarbeit

Simon W, Hapfelmeier G, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G
Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus
Anesthesiology 2001; 94:1058-1065

Abstracts

Simon W, Hapfelmeier G, Rammes G, Zieglgänsberger W, Kochs E
Isofluran hemmt exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) an
Hippocampuschnitten
Anästhesiol Intensivmed 2000; 41:410, No 4-06.5

Simon W, Rammes G, Hapfelmeier G, Zieglgänsberger W, Kochs E
Isoflurane inhibits synaptic plasticity in mouse hippocampus
Eur J Anaesthesiology 2000; 17:754-85

Simon W, Rammes G, Hapfelmeier G, Kochs E, Zieglgänsberger W
Isoflurane reduces glutamatergic synaptic transmission and inhibits synaptic plasticity
in the hippocampus
J Neurosurgical Anesthesiology 2000; 12:396, No 29

Simon W, Hapfelmeier G, Zieglgänsberger W, Kochs E, Rammes G
Das zentral-wirksame Analgetikum Flupirtin verstärkt long-term depression (LTD)
im Hippocampus
Anästhesiol Intensivmed 2001; 42:510, No 3-A.1

Simon W, Hapfelmeier G, Rammes G, Zieglgänsberger W, Kochs E
The centrally acting nonopioid analgesic flupirtine increases long-term depression
(LTD) of hippocampal synapses
Eur J Anaesthesiology 2001; im Druck

10.4. Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Wanda Simon
Geburtsdatum	24.06.1970
Geburtsort	Myjava (Slowakei)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Ernest Simon, Chirurg Dr. Berta Simon, Kinderärztin

Schule

1977 – 1981	Grundschule Viechtach
1981 – 1991	Dominicus-von-Linprun-Gymnasium, Viechtach Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Medizinstudium

1991 – 1993	Vorklinischer Abschnitt an der Komensky Universität, Bratislava, Slowakei
1993 – 1999	Klinischer Abschnitt an der Ludwig-Maximilians- Universität, München
06/1999	Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

08/1999 – 01/2001	Ärztin im Praktikum an der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, Klinikum rechts der Isar
02/2001 – 12/2001	Assistenzärztin an der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, Klinikum rechts der Isar