

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinikum rechts der Isar / Klinik für Anaesthesiologie  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

## Der Einfluss des Inhalationsanästhetikums Xenon auf die synaptische Transmission.

Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik in vitalen ZNS-Schnittpräparaten.

Stephan Alexander Kratzer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. G. K. Rammes, Ph.D.  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth  
3. Univ.-Prof. Dr. St. Engelhardt

Diese Dissertation wurde am 06.10.2010 Bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.03.2012 angenommen

*Meinen Eltern gewidmet*

**Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

Originalarbeiten:

**Xenon Reduces *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl- 4-isoxazolepropionic acid (AMPA) Receptor Mediated Synaptic Transmission in the Amygdala**

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Eckle VS, Zieglgänsberger W, Rammes G.

Anesthesiology. 2008 Dec;109(6):998-1006

**The xenon-mediated antagonism against the NMDA receptor is non-selective for receptors containing either NR2A or NR2B subunits in the mouse amygdala**

Haseneder R.\* , Kratzer S.\*, Kochs E., Höfelmann D., Auberson Y., Eder M., Rammes G.

Eur J Pharmacol. 2009 Oct 1;619(1-3):33-7

**Xenon Attenuates Excitatory Synaptic Transmission in the Rodent Prefrontal Cortex and Spinal Cord Dorsal Horn**

Haseneder R\* , Kratzer S\*, Kochs E, Mattusch C, Eder M, Rammes G.

Anesthesiology. 2009 Dec;111(6):1297-307

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Inhalationsanästhetikum Xenon .....	1
1.1.1	Physikochemische Eigenschaften .....	1
1.1.2	Klinischer Einsatz von Xenon .....	1
1.1.3	Xenon – ein ideales Anästhetikum? .....	1
1.2	Synaptische Transmission.....	3
1.2.1	Glutamaterge Transmission .....	3
1.2.2	GABAerge Transmission .....	8
1.3	Neuronale Wirkmechanismen der Anästhesie .....	10
1.4	Wirkung von inhalativen Anästhetika in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems .....	11
1.4.1	Basolaterale Amygdala .....	11
1.4.2	Präfrontaler Kortex .....	12
1.4.3	Hinterhorn des Rückenmarks .....	13
1.5	Die Wirkung von Xenon auf Neurotransmittersysteme – Übersicht über den aktuellen Forschungsstand .....	15
1.5.1	Exzitatorische Neurotransmitter .....	15
1.5.2	Inhibitorische Neurotransmitter.....	15
1.5.3	Andere Neurotransmittersysteme .....	16
1.5.4	Die Wirkung von Xenon an spannungsabhängigen Ionenkanälen und Ionentransportern .....	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1	Herstellung der Schnittpräparate .....	18
2.1.1	Präparation der Hirnschnitte .....	18
2.1.2	Präparation der lumbalen Rückenmarksschnitte .....	19
2.2	Infrarotmikroskopisch gelenkte Photostimulation .....	20
2.2.1	Infrarot-Videomikroskopie .....	20
2.2.2	Laser-Photostimulation.....	22

2.3	Elektrophysiologie .....	24
2.3.1	Versuchsaufbau .....	24
2.3.2	Ganzzelleableitung und Stimulation .....	25
2.3.3	Postsynaptische Ströme.....	28
2.3.4	Miniatur EPSC.....	28
2.4	Bestimmung der Xenonkonzentration in der Messkammer.....	29
2.5	Auswertung und Statistik.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1	Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Transmission in der basolateralen Amygdala.....	34
3.1.1	Basale synaptische Transmission .....	34
3.1.2	Inhibitorische GABAerge Transmission .....	36
3.1.3	Konzentrationsabhängigkeit der Xenonwirkung auf die glutamaterge Transmission.....	45
3.2	Einfluss von Xenon auf die synaptische Transmission im präfrontalen Kortex und in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks .....	47
3.2.1	Basale synaptische Transmission .....	47
3.2.2	Inhibitorische GABAerge Transmission .....	48
3.2.3	Glutamaterge Transmission .....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
4.1	Diskussion der Kontrollbedingungen und der klinischen Relevanz der Xenon-Konzentration.....	53
4.2	Wirkung von Xenon auf die GABAerge synaptische Transmission .....	54
4.3	Beeinflussung der glutamatergen synaptischen Transmission .....	55
4.3.1	Xenonwirkung auf die NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission	55
4.3.2	Xenonwirkung auf die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission	57
4.3.3	Postsynaptische Mechanismen .....	58
4.3.4	Wirkung von Xenon auf AMPA eEPSC unter Blockade der Desensibilisierung ..	59
4.3.5	Konzentrationsabhängigkeit der Xenonwirkung .....	59
4.4	Klinische Relevanz der Messergebnisse .....	61

4.4.1	Basolaterale Amygdala .....	61
4.4.2	Präfrontaler Kortex .....	61
4.4.3	Substantia gelatinosa .....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>A-1</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	A-1
	Verwendete Substanzen.....	A-3
	Danksagung .....	A-5
	Verzeichnis eigener Publikationen .....	A-6
	Lebenslauf .....	A-8

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.2.1:</b> Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes. ....	6
<b>Abb. 1.2.2:</b> Der GABA <sub>A</sub> -Rezeptor. ....	9
<b>Abb. 1.4.1:</b> Schematische Darstellung des kortikalen Aufbaus. ....	13
<b>Abb. 1.4.2:</b> Transversalschnitt des Rückenmarks. ....	14
<b>Abb. 2.1.1:</b> Präparation der Rückenmarksschnitte. ....	19
<b>Abb. 2.2.1:</b> Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops mit IR-gelenkter Photostimulation. ....	21
<b>Abb. 2.2.2:</b> Infrarot-Videomikroskopiebild von vitalen Nervenzellen. ....	22
<b>Abb. 2.2.3:</b> CNB-caged-Glutamat. ....	23
<b>Abb. 2.5.1:</b> Berechnung der Messgrößen aus dem abgeleiteten Stromzeitverlauf. ....	32
<b>Abb. 3.1.1:</b> Xenon reduziert die synaptische Transmission in der BLA. ....	35
<b>Abb. 3.1.2:</b> Das Inhalationsanästhetikum verändert die Amplitude von GABA <sub>A</sub> -Rezeptor vermittelter IPSC nicht. ....	37
<b>Abb. 3.1.3:</b> Xenon reduziert NMDA-vermittelte-Ströme bei elektrischer und bei photolytischer Stimulation gleichermaßen. ....	39
<b>Abb. 3.1.4:</b> Die Wirkung von Xenon auf NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten unter Blockade der NR2A- bzw. NR2B-Untereinheit unterscheidet sich nicht von der Xenonwirkung auf NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten ohne Untereinheitenblockade. ....	40
<b>Abb. 3.1.5:</b> Xenon reduziert im gleichem Ausmaß AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme auf elektrische bzw. photolytische Stimulation. ....	41
<b>Abb. 3.1.6:</b> Xenon hat keinen Einfluss auf die Kinetik NMDA bzw. AMPA-Rezeptor vermittelter Stromantworten in der Amygdala. ....	42
<b>Abb. 3.1.7:</b> Die Blockade der Desensitisierung der AMPA-Rezeptoren verringert den Effekt von Xenon auf AMPA eEPSC. ....	43
<b>Abb. 3.1.8:</b> Xenon reduziert die Amplitude von AMPA mEPSC in der BLA, hat jedoch keinen Einfluss auf deren Frequenz. ....	44
<b>Abb. 3.1.9:</b> Kumulative Wahrscheinlichkeiten des inter-Event Intervalls und der Amplituden unter Kontrollbedingungen und dem Einfluss von Xenon. ....	45
<b>Abb. 3.1.10:</b> Xenon reduziert NMDA eEPSC und NMDA pC konzentrationsabhängig. ....	46
<b>Abb. 3.1.11:</b> Xenon verringert AMPA eEPSC und AMPA pC konzentrationsabhängig. ....	46
<b>Abb. 3.2.1:</b> Xenon hemmt die basale synaptische Transmission im präfrontalen Kortex und in der Substantia gelatinosa. ....	48
<b>Abb. 3.2.2:</b> Xenon hat keinen Einfluss auf die inhibitorische GABAerge Transmission im PFC und in der SG. ....	49
<b>Abb. 3.2.3:</b> Im PFC hemmt Xenon die durch NMDA bzw. AMPA-Rezeptoren vermittelte glutamaterge Transmission. ....	50
<b>Abb. 3.2.4:</b> In der Substantia gelatinosa des Rückenmarks hemmt Xenon die glutamaterge exzitatorische Transmission. ....	51
<b>Abb. 3.2.5:</b> In beiden Arealen des ZNS reduzierte Xenon die Amplitude, jedoch nicht die Frequenz der AMPA mEPSC. ....	52

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1.1:</b> Die passiven Membraneigenschaften der abgeleiteten Neurone werden durch Xe nicht verändert.....	36
<b>Tabelle 3.1.2:</b> Xenon verlängert die schnelle Zeitkomponente der Deaktivierungszeitkonstante des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors.....	38
<b>Tabelle 3.1.3:</b> Xenon hat keine Einfluss auf die Kinetik NMDA-Rezeptor-vermittelter Antworten in der BLA. ....	39
<b>Tabelle 3.1.4:</b> Xe beeinflusst die Kinetik der AMPA-Rezeptoren in der BLA nicht.....	42
<b>Tabelle 3.2.1:</b> Xenon hatte keinen Einfluss auf die Deaktivierungszeitkonstanten und den Ladungstransfer im PFC und in der SG. ....	49



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Inhalationsanästhetikum Xenon

### 1.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Das farb- und geruchlose Gas Xenon gehört neben Helium, Neon, Argon, Krypton und Radon zur Gruppe der Edelgase (Hauptgruppe VIII des Periodensystems der Elemente). Der Name leitet sich aus dem griechischen ξενος [xenos] ab und bedeutet „Fremder“. Es wurde 1898 von Sir William Ramsay und Morris Travers entdeckt. Seine relative Atommasse beträgt 131,293. Xenon ist sehr reaktionsträge und bildet nur unter extremen Bedingungen Verbindungen mit anderen Elementen (Chernick et al., 1962). Als chemisches Element ist Xenon nicht synthetisierbar, die Gewinnung erfolgt ausschließlich durch fraktionierte Destillation flüssiger Luft im sog. Linde-Verfahren. Der Anteil von Xenon in der atmosphärischen Luft beträgt lediglich  $0.086 \cdot 10^{-6}$  Vol.-% (Glueckauf und Kitt 1956).

### 1.1.2 Klinischer Einsatz von Xenon

Die anästhetischen und analgetischen Eigenschaften von Xenon sind bereits seit Ende der 30er Jahre bekannt, der erste klinische Einsatz als Narkosegas wurde 1951 beschrieben (Cullen und Gross 1951). Xenon konnte sich jedoch aufgrund seiner enorm hohen Kosten, v. a. bei Verwendung in halbgeschlossenen Narkosegeräten, nicht als Routine-Inhalationsanästhetikum durchsetzen. Die Einführung geschlossener Narkosesysteme mit extrem niedriger Frischgaszufuhr in den letzten Jahren sowie die Entwicklung von Verfahren, welche Xenon aus der Expirationsluft zu recyceln vermögen (Dingley und Mason 2007), könnten jedoch eine breitere Verwendung Xenons auch unter ökonomischen Aspekten möglich werden lassen. In den letzten Jahren zeigten Multicenterstudien, dass Xenon auch an größeren Patientenkollektiven effizient und sicher angewendet werden kann (Rossaint et al., 2003; Sanders et al., 2004).

### 1.1.3 Xenon – ein ideales Anästhetikum?

Im Vergleich zu den bisher in der klinischen Routine eingesetzten Inhalationsanästhetika besitzt Xenon eine Reihe von Eigenschaften, die den Anforderungen an ein ideales Anästhetikum sehr nahe kommen. Die anästhetische Potenz eines Inhalationsanästhetikums wird mit dem MAC (*minimal alveolar concentration*)-Wert angegeben. Der MAC-Wert ist die alveoläre Konzentration einer Substanz, die bei 50 % der Probanden eine motorische Reaktion auf einen definierten Schmerzreiz (Hautinzision an der Unterarminnenseite) unterdrückt (Merkel und Eger 1963). Der MAC-Wert von Xenon wurde ursprünglich mit

70 Vol.-% angegeben (Cullen et al., 1969), liegt aber einer neueren Studie zufolge mit 63 Vol.-% etwas niedriger (Nakata et al., 2001). Xenon ist somit potenter als Lachgas ( $N_2O$ ), dessen MAC-Wert bei über 100 Vol.-% liegt (Hornbein et al., 1982). Im klinischen Einsatz stellte sich Xenon als Anästhetikum mit besonders gering ausgeprägter kardiozirkulatorisch depressiver Wirkung heraus. Überdies konnte in verschiedenen tierexperimentellen Arbeiten gezeigt werden, dass Xenon kardioprotektive (Preckel et al., 2000; Baumert et al., 2007), sowie neuroprotektive Wirkungen (Wilhelm et al., 2002; Schmidt et al., 2005; Dingley et al., 2006) hat. Somit wären Eingriffe an kardialen Hochrisikopatienten, oder Eingriffe, die mit erhöhtem Risiko einer intracerebralen Schädigung einhergehen, prädestinierte Anwendungsbereiche für Xenon als Narkosegas.

Die An- und Abflutungszeit eines Anästhetikums wird wesentlich durch den Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten (BGVK) beeinflusst. Dieser beschreibt das Lösungsverhalten eines Gases im Blut. Er gibt die Konzentration eines Stoffes im Blut im Verhältnis zur alveolären Konzentration an (Steward et al., 1973). Somit beschreibt er die Menge des anästhetischen Gases, die gelöst werden muss, bis es zu einem Ausgleich zwischen dem alveolaren Partialdruck und dem Partialdruck des Gases im Blut kommt. Ein niedriger BGVK bedeutet also, dass es schnell zu einem Ausgleich kommt, An- und Abflutungszeiten also kurz sind. Klinisches Resultat ist entsprechend eine gut steuerbare Narkose. Xenon besitzt im Vergleich zu anderen Inhalationsanästhetika mit 0,115 (Goto et al., 1998) den niedrigsten BGVK. Verglichen mit Narkoseregimen bestehend aus Lachgas kombiniert Sevofluran bzw. Isofluran konnten deutlich kürzere Aufwachzeiten nach Beendigung der Xenonzufuhr gezeigt werden (Goto et al., 1997; Rossaint et al., 2003).

Ähnlich wie Lachgas hat Xenon eine analgetische Wirkung. So konnten Yagi et al. z.B. eine analgetische Wirkung an gesunden Probanden zeigen, wenn Xenon in subanästhetischen Dosierungen appliziert wurde (Yagi et al., 1995). Inwiefern diese analgetische Wirkung tatsächlich klinisch relevant, d. h. Opiat-einsparend ist, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt: Während ältere Studien einen geringeren Opiatbedarf bei Xenon-anästhesierten Patienten zeigen konnten (Lachmann et al., 1990), zeigte sich ein solcher Effekt im Rahmen einer vor kurzem publizierten Studien nicht (Luginbuhl et al., 2005).

Diesen Vorteilen stehen in Bezug auf die Verwendung von Xenon als Inhalationsanästhetikum nur wenige Nachteile gegenüber. So ist der Einsatz bei Patienten mit schweren pulmonalen Erkrankungen problematisch. Ein wesentliches Problem ist, dass bei einem MAC-Wert von 63 Vol.-% maximal 37 Vol.-% Sauerstoff in der Inspirationsluft angeboten werden können, wodurch bei pulmonal stark kompromittierten Patienten u. U. keine ausreichende Gewebeoxygenierung zu gewährleisten ist. Darüber hinaus führt Xenon aufgrund seiner hohen Dichte und Viskosität tierexperimentell zu einer Erhöhung des

Atemwegswiderstandes (Zhang et al., 1995; Calzia et al., 1999), wobei gezeigt werden konnte, dass die klinische Relevanz dieser Wirkung nicht sehr ausgeprägt ist (Lachmann et al., 1990; Baumert et al., 2002). Darüber hinaus wird der Einfluss von Xenon auf den zerebralen Blutfluss (CBF) kontrovers diskutiert. Einige tierexperimentelle Studien zeigten eine Erhöhung des CBF (Hartmann et al., 1987; Schmidt et al., 2001), wohingegen z.B. (Yao et al., 1992; Fink et al., 2000) das Gegenteil beschreiben. Eine Positronenemissions-Tomographie-Studie, die unter Xenonmonoanästhesie bei gesunden Probanden durchgeführt wurde, zeigt ebenfalls eine Verminderung des CBF (Laitio et al., 2007). Aufgrund dieser nicht eindeutigen Datenlage wird der Einsatz von Xenon – trotz neuroprotektiver Eigenschaften – bei Pat. mit erhöhtem intrakraniellen Druck derzeit nicht empfohlen (Sanders et al., 2004). Bei Operationen, bei denen es unter extrakorporaler Zirkulation zu zerebralen Luftembolien kommt, scheint Xenon das neurokognitive sowie das histologische Outcome zu verschlechtern (Jungwirth et al., 2006).

## **1.2 Synaptische Transmission**

Die Kommunikation der Nervenzellen erfolgt über spezialisierte Kontaktstellen, die Synapsen. Prinzipiell können zwei Transmissionswege unterschieden werden. Bei sogenannten chemischen Synapsen löst ein in der präsynaptischen Terminale ankommendes Aktionspotential die Freisetzung von Neurotransmitter-Molekülen aus. Diese diffundieren über den synaptischen Spalt und binden an für sie spezifische postsynaptische Rezeptoren. So wird die chemische Information des Transmitters erneut in ein elektrisches Signal zurückverwandelt. Eine durch die Transmitter-Rezeptor-Interaktion bedingte Depolarisation führt zur Erregung der postsynaptischen Nervenzelle, eine Hyperpolarisation zur Hemmung. Bei der zweiten Möglichkeit der synaptischen Informationsübertragung sind Neurone direkt über sogenannte „gap junctions“ miteinander verbunden. Dabei erfolgt die Informationsübertragung direkt elektrisch, d. h. ohne Transmittersubstanz.

Die für die chemische Informationsübertragung im ZNS wichtigsten Transmittersysteme sind das exzitatorische glutamaterge (Monaghan et al., 1989) und das inhibitorische GABAerge Transmittersystem (Fahn und Cote 1968; Perry et al., 1971).

### **1.2.1 Glutamaterge Transmission**

Glutamat wird vorwiegend in den Nervenendigungen aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Ammoniumionen durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase synthetisiert. Über Glutamat-Transporter erfolgt die Aufnahme in Vesikel, in denen Glutamat gespeichert wird. Nach der Freisetzung werden die synaptischen Effekte schnell durch in den Nervenendigungen bzw. in den Astrozyten lokalisierte Glutamattransporter (EAAT; excitatory amino acid transporter) beendet, die Glutamat in die Zellen aufnehmen (Beart und O'Shea 2007; Benarroch 2010).

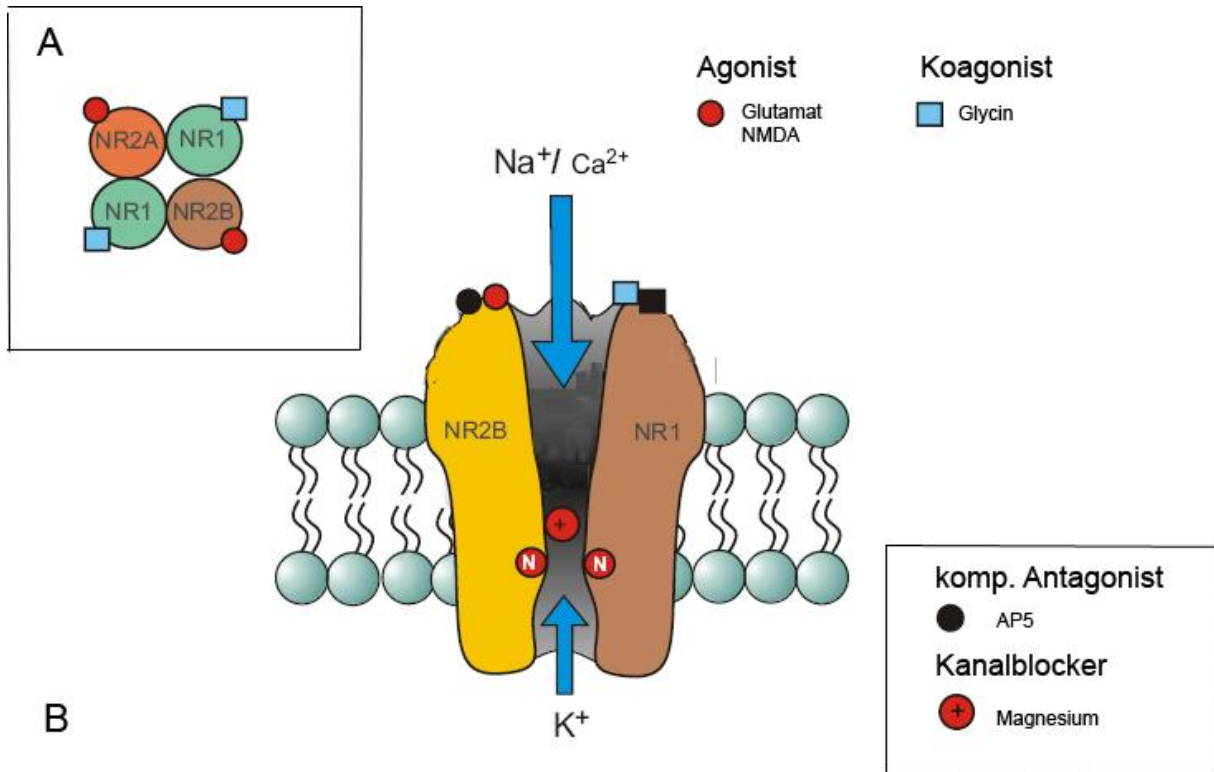
Entsprechend ihrer Funktion können Rezeptoren, deren natürlicher Agonist L-Glutamat ist, in zwei Klassen unterteilt werden: Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch einen Natriumeinstrom eine schnelle Depolarisation des postsynaptischen Neurons bewirken. Ionotrope Glutamatrezeptoren lassen sich anhand ihrer Sensitivität zu artifiziell hergestellten Agonisten wiederum in drei Untergruppen unterteilen: *N*-methyl-D-Aspartat (NMDA)-,  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)- sowie Kainat-Rezeptoren. Die zweite Klasse der Glutamatrezeptoren bilden die metabotropen Glutamatrezeptoren, die G-Protein-gekoppelt, also indirekt über intrazelluläre Signalkaskaden, ihre Wirkung entfalten. In der Elektrophysiologie ist zudem die Unterteilung der ionotropen Glutamatrezeptoren in NMDA und nonNMDA-Rezeptoren üblich. Die Gruppe der nonNMDA-Rezeptoren beinhaltet entsprechend die AMPA- und die Kainat-Rezeptoren.

### 1.2.1.1 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren spielen hauptsächlich eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung, bei der synaptischen Plastizität sowie bei Pathologien des zentralen Nervensystems (Monaghan et al., 1989; Dingledine et al., 1999). Der NMDA-Rezeptor besitzt neben seinem Liganden Glutamat noch eine Bindungsstelle für Glycin, das für die Aktivierung des Kanals essentiell ist. Da weder Glutamat, noch Glycin den Ionenkanal alleine öffnen können, werden beide als Koaktivatoren bezeichnet (Kleckner und Dingledine 1988). Der Ionenkanal des NMDA-Rezeptor-Kanal-Komplexes ist gut permeabel für  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Monaghan et al., 1989). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ioneneinstrom löst intrazelluläre Prozesse aus, die sowohl für die neuronale Plastizität, wie auch für die NMDA-Rezeptor vermittelte Neurotoxizität verantwortlich zu sein scheinen (Lipton und Rosenberg 1994; Lee et al., 1999; Hardingham und Bading 2003). Der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors wird spannungsabhängig durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen blockiert (Nowak et al., 1984). Diese Blockierung löst sich, wenn das Ruhemembranpotential des Neurons positiver als  $-20$  bis  $-30$  mV wird (Mayer et al., 1984). Ein weiteres Charakteristikum des NMDA-Rezeptors ist der langsame Zeitverlauf der durch ihn vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC, excitatory postsynaptic currents; Lester et al. 1990).

Der NMDA-Rezeptor ist ein Protein, welches aus vier verschiedenen transmembranären Untereinheiten zusammengesetzt ist (Cull-Candy et al., 2001). Die für die Funktion des Rezeptors essentielle NR1-Untereinheit wird von nur einem Gen kodiert. Für dieses sind acht Splice-Varianten bekannt, die sich in ihrer Verteilung sowie in ihrer Funktion unterscheiden (Dingledine et al., 1999). Für die NR2-Untereinheit existieren vier verschiedene Gene und somit die Subtypen NR2A-NR2D, für die NR3-Untereinheit nur zwei Subtypen (NR3A und NR3B). Die NR3-Untereinheit scheint eine regulatorische Funktion zu

besitzen, da bei NMDA-Rezeptoren, die die NR3-Untereinheit enthalten, die Leitfähigkeit insbesondere auch für Calciumionen geringer ist (Das et al., 1998; Nakanishi et al., 2009). Zusätzlich können aus NR1- und NR3A-B-Untereinheiten alleine glycinerge exzitatorische Rezeptoren entstehen (Chatterton et al., 2002). Im NMDA-Rezeptor-Kanal-Komplex gibt es verschiedene Bindungsstellen für Liganden, die z. T. nur modulatorische Funktionen besitzen. Es sind folgende Bindungsstellen bekannt (Monaghan et al., 1989; Scatton 1993; Hollmann und Heinemann 1994; Dingledine et al., 1999): (A) Die Agonistenbindungsstelle, die von der NR2A-D-Untereinheit gebildet wird, (B) die Glycin-Bindungsstelle, die von der NR1-Untereinheit gebildet wird, (C) eine Bindungsstelle für Antagonisten wie Phenylcyclidin, (D) eine spannungsabhängige  $Mg^{2+}$ -Ionen Bindungsstelle an der auch der NMDA-Rezeptorantagonist Memantine bindet, (E) eine Bindungsstelle für die den Kanal spannungsabhängig blockierenden  $Zn^{2+}$ -Ionen, (F) eine Bindungsstelle für die modulatorisch wirkenden Polyamine Spermin und Spermidin sowie (G) eine Bindungsstelle für Protonen. Der in dieser Arbeit verwendete kompetitive NMDA-Rezeptorantagonist AP5 (siehe Kapitel 2.3.3) bindet an die Agonistenbindungsstelle des Glutamats. Zusätzlich kann die Aktivität der Rezeptoren auch durch Phosphorylierung der intrazellulären Anteile der transmembranösen Glykolisierungsstellen erfolgen.



**Abb. 1.2.1: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes.**

**A** Der Rezeptor ist aus vier oder fünf verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Es existieren die Untereinheiten NR1, NR2 und NR3, wobei es für die letzten beiden verschiedene Subtypen gibt. In der basolateralen Amygdala zum Beispiel ist eine Kombination aus NR1- und NR2A- oder NR2B-Untereinheiten zu finden. An der NR1-Untereinheit findet sich die Bindungsstelle für den Koaktivator Glycin, wohingegen die Bindungsstelle des Agonisten Glutamat an NR2 Untereinheiten lokalisiert ist.

**B** Die transmembranären Untereinheiten bilden eine zentrale Ionenpore. Diese ist spannungsabhängig durch  $Mg^{2+}$ -Ionen blockiert. Bei Depolarisation der Zellmembran löst sich diese Blockade und der Rezeptor wird permeabel für  $Na^+$ -,  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen. Durch den  $Ca^{2+}$ -Ionen-Einstrom können intrazelluläre Prozesse ausgelöst werden, die für die neuronale Plastizität sowie die NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotoxizität verantwortlich sind. Abb. verändert nach Parsons (2007).

An vielen exzitatorischen Synapsen sind NMDA-Rezeptoren mit AMPA-Rezeptoren kolokalisiert. Eine präsynaptische Ausschüttung von Glutamat kann somit zur AMPA-Rezeptor-vermittelten Vordepolarisation der postsynaptischen Zelle führen. Dadurch löst sich der  $Mg^{2+}$ -Block aus dem Ionenkanal des NMDA-Rezeptors, in der Folge können NMDA-Rezeptor-vermittelte Ionenströme fließen.

### 1.2.1.2 AMPA-Rezeptoren

Der AMPA-Rezeptor ist permeabel für  $Na^+$ -,  $K^+$ - und teilweise auch für  $Ca^{2+}$ -Ionen. Im Gegensatz zu den NMDA-Rezeptoren, deren Hauptfunktion eher die Modulation der synaptischen Transmission ist, vermitteln AMPA-Rezeptoren mehr die schnelle exzitatorische synaptische Übertragung per se. Während die Anzahl der NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran größtenteils konstant ist, unterliegen die AMPA-Rezeptoren einem hohen Turnover und werden rasch in die postsynaptische Membran ein-

und ausgebaut (Contractor und Heinemann 2002; Malinow und Malenka 2002). Die Anzahl der postsynaptischen AMPA-Rezeptoren bestimmt also die Stärke der synaptischen Übertragung (deSouza und Ziff 2002). AMPA-Rezeptoren weisen eine pentamere Struktur auf. Es wurden vier verschiedene Untereinheiten beschrieben, GLUR1–GLUR4 (Hollmann und Heinemann 1994; Paas 1998). Für jede der Untereinheiten bestehen zwei verschiedene Splicevarianten, die als Flip und Flop Varianten bezeichnet werden (Sommer et al., 1990). Die Untereinheiten sind jeweils aus einem Polypeptid mit ca. 900 Aminosäuren aufgebaut, welches drei Transmembrandomänen (TM1, TM3 und TM4) beinhaltet. TM2 bildet intrazellulär eine Schleife, und diese einzelnen Schleifen der jeweiligen Untereinheiten bilden gemeinsam den Ionenkanal. Die Varianten unterscheiden sich nicht wesentlich bezüglich ihrer pharmakologischen Eigenschaften, jedoch aktiviert Glutamat „Flip-Kanäle“ effektiver als „Flop-Kanäle“. Somit können Neurone die Glutamatsensitivität ihrer Rezeptoren alleine durch Veränderung der Splicevariante vergrößern bzw. verkleinern (Sommer et al., 1990; Dingledine et al., 1999).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren werden also durch die Untereinheiten bestimmt. Ein Rezeptor kann entweder homomer oder heteromer zusammengesetzt sein. Eine besondere Rolle nimmt die GLUR2-Untereinheit ein. Heteromere oder Homomere aus der GLUR2-Untereinheit besitzen eine sehr geringe Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Hollmann et al., 1991). Zusätzlich zeigen Rezeptoren, die die GLUR2-Untereinheit besitzen ein lineares Strom-Spannungsverhältnis (Pellegrini-Giampietro et al., 1997). Im Gegensatz dazu lässt sich bei Rezeptoren ohne GLUR2 Untereinheit ein einwärtsgerichtetes Strom-Spannungsverhältnis finden (Hollmann und Heinemann 1994). Die Stromkurven heteromerer AMPA-Rezeptoren sind deutlich größer als die der entsprechenden Homomere, so dass man davon ausgeht, dass die Untereinheiten als funktioneller heteromerer Rezeptorkomplex interagieren (Boulter et al., 1990; Sakimura et al., 1990).

Die kompetitiven nonNMDA-Antagonisten CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion) und NBQX (1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid) zeigen keine bzw. eine geringe Selektivität für die einzelnen Untereinheiten des AMPA-Rezeptors. Sie binden jeweils an die Glutamatbindungsstelle. Der selektive AMPA-Antagonist GYKI 52466 (4-(8-Methyl-9H-1,3-dioxolo[4,5-h][2,3]benzodiazepin-5-yl)-benzenamin Hydrochlorid) wirkt nichtkompetitiv über einen allosterischen Mechanismus (Parsons et al., 1994; Rammes et al., 1994). Ein elektrophysiologisches Charakteristikum der AMPA-Rezeptoren ist die sog. Desensibilisierung. Bei Patch-Clamp-Messungen in Expressionssystemen zeigt sich nach Applikation von Glutamat ein rascher Anstieg der Stromantwort bis hin zum Maximum. Bei längerer Applikation von Glutamat verkleinert sich die Stromantwort aufgrund der

Desensibilisierung bis zu einer konstanten Amplitude. Nach Beendigung der Agonistenapplikation reduziert sich der Strom aufgrund Deaktivierung der Rezeptoren bis auf das Ausgangsniveau. Cyclothiazid hemmt die Desensibilisierung und verlangsamt die Deaktivierung (Partin et al., 1996; Rammes et al., 1999).

## 1.2.2 GABAerge Transmission

Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS ist  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid). GABA wird im Zytosol durch Decarboxylierung von Glutamat durch das Enzym GAD (glutamic acid decarboxylase) synthetisiert und danach von Transportern (VIAAT; vesicular inhibitory amino acid transporter) in Vesikel eingebracht. Neben sogenannten bestimmten Projektionen wie z. B. vom Striatum in die Substantia nigra (long-axoned GABA cells) werden GABAerge Projektionen hauptsächlich von Interneuronen gebildet. Jedoch kann GABA neben seiner Hauptfunktion, nämlich die neuronale „Feuerrate“ zu senken, auch exzitatorisch wirken (Cherubini et al., 1991; Farrant und Kaila 2007). Hier ist Exzitation jedoch nicht als Depolarisation zu verstehen, sondern als Steigerung der Wahrscheinlichkeit, dass die postsynaptische Zelle ein Aktionspotential generiert (Farrant und Kaila 2007). Zusätzlich zur Beeinflussung der postsynaptischen Exzitabilität scheint die Aktivität von GABAergen Projektionen wichtige Einflüsse auf die Ausbildung neuronaler Netze zu haben (McBain und Fisahn 2001; Jonas et al., 2004).

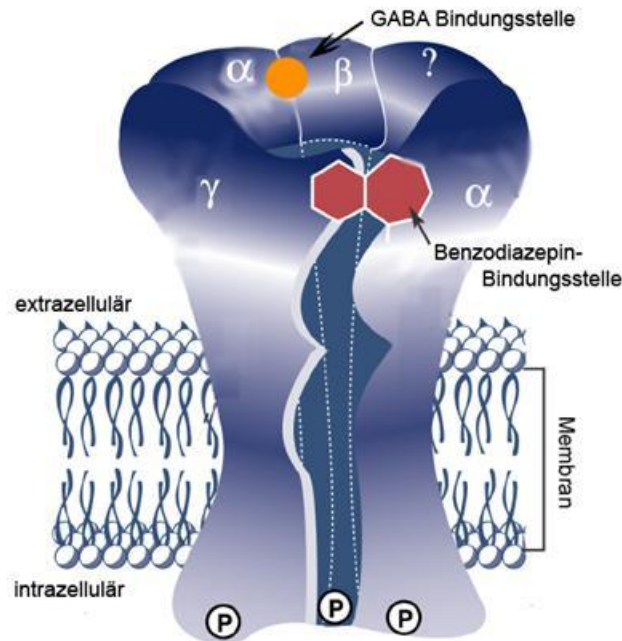
GABA Rezeptoren lassen sich in die Gruppe der ionotropen ( $\text{GABA}_A$  und  $\text{GABA}_C$ ) und der metabotropen Rezeptoren ( $\text{GABA}_B$ ) einteilen.

### 1.2.2.1 Ionotrope GABA Rezeptoren

Die ionotropen  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren gehören wie auch die nikotineren Acetylcholinrezeptoren, Glycinrezeptoren und die  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren (Serotonin-Rezeptoren) zur Familie der sogenannten „cys-loop“ ligandengesteuerten Ionenkanäle (cl-LGIC, cis-loop ligand-gated ion channels). Dieser Name beruht auf der Tatsache, dass Cysteine in der aminoterminalen Domäne eine Disulfidbrücke ausbilden (Simon et al., 2004). Wie bei allen Rezeptoren dieser Klasse bilden Untereinheiten mit je vier Transmembrandomänen (TM1-TM4) ein Pentamer mit einer zentralen Ionenpore (Abb. 1.2). Die Untereinheiten sind in 19 verschiedenen Genen kodiert und lassen sich in 8 Klassen einteilen (Barnard et al., 1998; Korpi et al., 2002; Sieghart und Sperk 2002; Farrant und Kaila 2007). Die Untereinheitenzusammensetzung unterscheidet sich in verschiedenen Hirnregionen, wobei sich der im ZNS von Säugetieren am häufigsten vorkommende  $\text{GABA}_A$ -Rezeptorsubtyp aus den Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$  zusammensetzt (Sieghart und Sperk 2002; Farrant und Kaila 2007). Es existieren mehrere Bindungsstellen am  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor. Die Bindungsstelle von



GABA liegt extrazellulär und wird von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gebildet (Stephenson 1995).



**Abb. 1.2.2: Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor.**

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal. Er besitzt eine Bindungsstelle für den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des ZNS,  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Der Rezeptor ist ein Pentamer aus 5 Untereinheiten, die zentral eine Ionenpore bilden. Der im ZNS von Säugetieren am häufigsten vorkommende GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtyp setzt sich aus den Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$  zusammen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bilden zusammen die GABA Bindungsstelle, an die auch der Antagonist Bicucullin kompetitiv bindet. Bei Bindung von GABA öffnet sich der Ionenkanal und wird permeabel für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Somit führt die Öffnung des Kanals unter physiologischen Bedingungen durch einen  $\text{Cl}^-$ -Einstrom zur Hyperpolarisation. Die Benzodiazepinbindungsstelle wird von der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheit gebildet. Abb. verändert nach Mihic (1997).

Binden Agonisten an diese beiden Untereinheiten ergibt sich eine Konformationsänderung des Rezeptors und der Ionenkanal wird permeabel für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Der Einstrom von  $\text{Cl}^-$  in die postsynaptische Zelle führt zur Hyperpolarisation. Zwischen der  $\alpha$ - und der  $\gamma$ -Untereinheit befindet sich die sogenannte Benzodiazepinbindungsstelle. Diese Substanzen öffnen den Kanal nicht direkt, sondern verstärken die Aktivität des Rezeptors durch Steigerung der GABA-Affinität (Walters et al., 2000). Sie wirken klinisch anxiolytisch, sedierend, muskelrelaxierend und antikonvulsiv. Hingegen bindet der in dieser Arbeit verwendete selektive GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist Bicucullin (BIM, Bicucullinmethiodid; siehe Kapitel 2.3.3) kompetitiv an die GABA-Bindungsstelle des Rezeptors.

GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind homomere Zusammensetzungen aus  $\rho$ -Untereinheiten. Sie sind nicht bicucullinsensitiv. Die Bezeichnung als GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren wird inzwischen nicht mehr

befürwortet, diese Rezeptoren werden vielmehr als Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors angesehen (Barnard et al., 1998; Farrant und Kaila 2007).  $\rho$ -Untereinheiten wurden meist aus retinalem Gewebe kloniert.

#### 1.2.2.2 *Metabotrope GABA-Rezeptoren*

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Neurotransmitterrezeptoren. Sie bestehen aus einem Protein mit sieben Transmembrandomänen. Die Aktivierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren führt zur Hyperpolarisation der Zelle über eine Verringerung der Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit und bildet über Steigerung der K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit den langsamen Teil der GABA vermittelten inhibitorischen postsynaptische Ströme (Kuriyama et al., 1993; Ranft et al., 2004). Diese Rezeptoren sind insensitiv gegenüber Bicucullin. Baclofen entfaltet als typischer Agonist an diesen Rezeptoren seine myotonolytische Wirkung (Bowery 1993). Ein typischer Antagonist ist das in dieser Arbeit verwendete CGP 35348 (Olpe et al., 1990).

### 1.3 Neuronale Wirkmechanismen der Anästhesie

Unter Allgemeinanästhesie wird ein medikamentös hervorgerufener Zustand aus Bewusstseinsverlust (Hypnose), Amnesie, Muskelrelaxation, Analgesie bzw. Antinozizeption und vegetativer Abschirmung verstanden. Moderne Narkoseregime erreichen diese Grundeigenschaften der Anästhesie durch eine Kombination aus verschiedenen Medikamenten. Die Muskelrelaxation zur Erleichterung der Intubation und einer kontrollierten Beatmung wird durch Muskelrelaxantien ausgelöst. Der Bewusstseinsverlust (Hypnose) wird durch Anästhetika verursacht, und Schmerzfremheit des Patienten wird durch Analgetika wie z. B. Opioide erreicht. Bei den Anästhetika unterscheidet man zwischen intravenösen und inhalativen Substanzen. Letztere können dampfförmig (volatil), wie z. B. Isofluran oder Sevofluran, oder gasförmig wie Xenon oder N<sub>2</sub>O sein. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren ist der Wirkmechanismus der Inhalationsanästhetika bis heute nicht vollständig geklärt.

Nachdem Overton und Meyer eine Korrelation zwischen der anästhetischen Potenz und der Löslichkeit in Olivenöl beschrieben haben (Meyer 1899; Overton 1901), bestand lange Zeit die Theorie, dass Anästhetika unspezifisch an hydrophoben Lipidkomponenten der Zellen wirken. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass Anästhetika ihre Wirkung viel spezifischer durch eine Modulation membranständiger Ionenkanäle hervorrufen (Franks und Lieb 1994; Campagna et al., 2003; Rudolph und Antkowiak 2004). Anästhesie kann dabei durch Verschieben des neuronalen Erregungsgleichgewichts zwischen Exzitation und

Inhibition in Richtung der Inhibition erzeugt werden. So wurden zahlreiche inhibitorische Ionenkanäle wie z. B. der GABA<sub>A</sub>-, der Glycin-, und der 5-HT<sub>3</sub>-(Serotonin)-Rezeptor sowie auch die exzitatorischen Kanäle des glutamatergen Systems und der nikotinerge Acetylcholinrezeptor als Zielstrukturen verschiedener inhalativer Anästhetika beschrieben (Krasowski und Harrison 1999). Exzitatorische Rezeptoren werden dabei in ihrer Wirkung in der Regel vermindert, inhibitorische Rezeptoren verstärkt.

#### **1.4 Wirkung von inhalativen Anästhetika in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems**

Bis heute ist noch nicht genau geklärt, inwiefern bestimmte Areale des Gehirns bzw. des ZNS für die Vermittlung der Wirkung von Inhalationsanästhetika verantwortlich sind. In den letzten Jahren sind jedoch einige Areale mit Anästhetika-sensitiven Funktionen in den Fokus anästhesiologischer Grundlagenforschung geraten (Campagna et al., 2003). So geht man zum Beispiel davon aus, dass motorische Reaktionen auf einen Schmerzreiz eher auf Rückenmarksebene unterdrückt werden. Hinweise dafür lieferten Tierexperimente, in denen eine zervikale Durchtrennung des Rückenmarks keinen Einfluss auf den MAC-Wert bei Stimulation der Extremitäten hatte (Rampil 1994). Im Gegensatz dazu werden Amnesie und Hypnose auf supraspinaler Ebene vermittelt. Das retikuläre-aktivierende System, Thalamus, Pons, Amygdala und der Hippocampus sind beteiligt an Wahrnehmung, Gedächtnisleistungen, Lernen, Schlaf und Aufmerksamkeit (Goodman und Mann 1967; Angel 1993; Campagna et al., 2003). Für den Verlust des Bewusstseins durch Anästhetika spielt neben dem Thalamus und der thalamokortikalen Vernetzung auch der Kortex selbst eine wichtige Rolle (Rudolph und Antkowiak 2004; Alkire und Miller 2005).

##### **1.4.1 Basolaterale Amygdala**

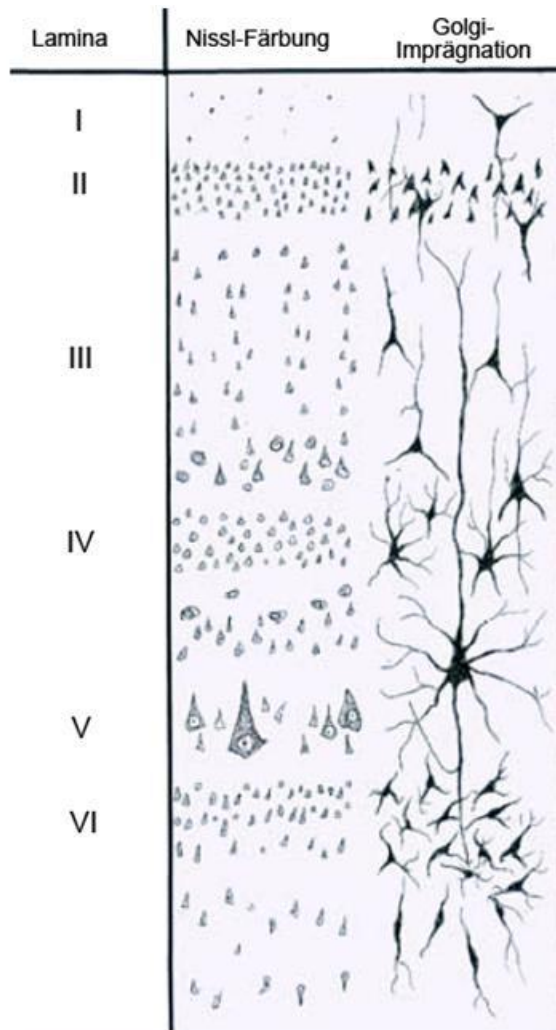
Die Amygdala (Mandelkern) ist Teil des limbischen Systems und besonders wichtig für die Verarbeitung von Emotionen. Ein Funktionsverlust der Amygdala durch entsprechende Läsionen verursacht eine Verminderung negativer Emotionen wie Angst und Wut (Weiskrantz 1956; Zola-Morgan et al., 1991), wohingegen eine Stimulation der Amygdala Angst und Furcht auslöst (Kaada 1951; Chapman et al., 1954). Die Amygdala liegt im Temporallappen rostro-medial und besteht aus mehreren Kernen (Pitkänen und Amaral, 1998), die sich funktionell in drei Hauptkerngebiete unterteilen lassen: die basolaterale, die oberflächliche und die zentralomediale Amygdala. Die basolaterale Amygdala (BLA) erhält Informationen aus den Sinnessystemen (gustatorisch, visuell, olfaktorisch, auditorisch und somatosensorisch), sowie aus dem Hippocampus und dem Kortex (Sah et al., 2003). Aufgabe des basolateralen Komplexes ist es, bestimmten Stimuli einen affektiven bzw. emotionalen Wert zuzuordnen. Der Mandelkern spielt somit z. B. bei der

Angstkonditionierung eine wesentliche Rolle, ist aber auch an der Vermittlung der durch Anästhetika induzierten Amnesie beteiligt (Dutton et al., 2001; Alkire und Nathan 2005). Desweiteren nimmt die Amygdala Aufgaben in der Schmerzverarbeitung wahr (Neugebauer et al., 2003) und ist an der Regulation des vegetativen Nervensystems beteiligt (Sajdyk und Shekhar 1997). Möglicherweise spielt daher die Amygdala in Bezug auf die beiden Anästhesie-Endpunkte Amnesie und Analgesie eine wesentliche Rolle.

### **1.4.2 Präfrontaler Kortex**

Der Neokortex macht beim Menschen ca. 80 % des Hirnvolumens aus. Der Kortex besteht aus verschiedenen Zelltypen, die in unterschiedlichen Schichten zu finden sind. Dadurch entsteht eine Schichtung des Neokortex, die in die Laminae I bis VI unterteilt werden (Mountcastle 1997). In der Lamina V finden sich hauptsächlich Pyramidenneurone, die größten Zellen des Neokortex. Sie verarbeiten synaptische Eingänge aus allen Laminae des Kortex sowie aus dem Thalamus und leiten diese an subkortikale Regionen weiter (Molnar und Cheung 2006).

Als präfrontalen Kortex (PFC, prefrontal cortex) bezeichnet man den Teil des Frontallappens, der nicht zum motorischen, prämotorischen oder supplementärmotorischen System gehört. Die wesentlichen Aufgaben des PFC sind die kognitive Kontrolle im Sinne der Anpassung von Verhaltensmustern an die gegebene Situation, und er spielt eine wesentliche Rolle in Bezug auf das Bewusstsein. Über eine Desintegration der kortikalen Informationsverarbeitung (sog. kortikales unbinding) führen Anästhetika möglicherweise zum Bewusstseinsverlust (Mashour 2004; Rudolph und Antkowiak 2004; Alkire und Miller 2005). Der PFC wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit modellhaft also als ZNS-Areal gewählt, das an der Vermittlung der hypnotischen Komponente einer Allgemeinanästhesie beteiligt sein könnte. Darüber hinaus ist der PFC wegen der dort wahrgenommener Gedächtnisfunktionen und, in diesem Zusammenhang stehend, der dort vermittelten Amnesie anästhesiologisch relevant (Rudolph und Antkowiak 2004).



**Abb. 1.4.1: Schematische Darstellung des kortikalen Aufbaus.**

**Verändert nach Benninghoff (2002).**

**Lamina I** (Lamina molecularis): Hier finden sich nur vereinzelt kleine Neurone. Diese Schicht besteht hauptsächlich aus Dendriten und Axonen.

**Lamina II** (L. granularis externa): kleine Pyramidenzellen und dicht gedrängte Interneurone (Körnerzellen).

**Lamina III** (L. pyramidalis externa): kleine und locker verteilte Pyramidenzellen.

**Lamina IV** (L. granularis interna): Hier finden sich vorwiegend Sternpyramidenzellen und Interneurone (Körnerzellen). Dies ist das Hauptziel der Afferenzen aus dem Thalamus.

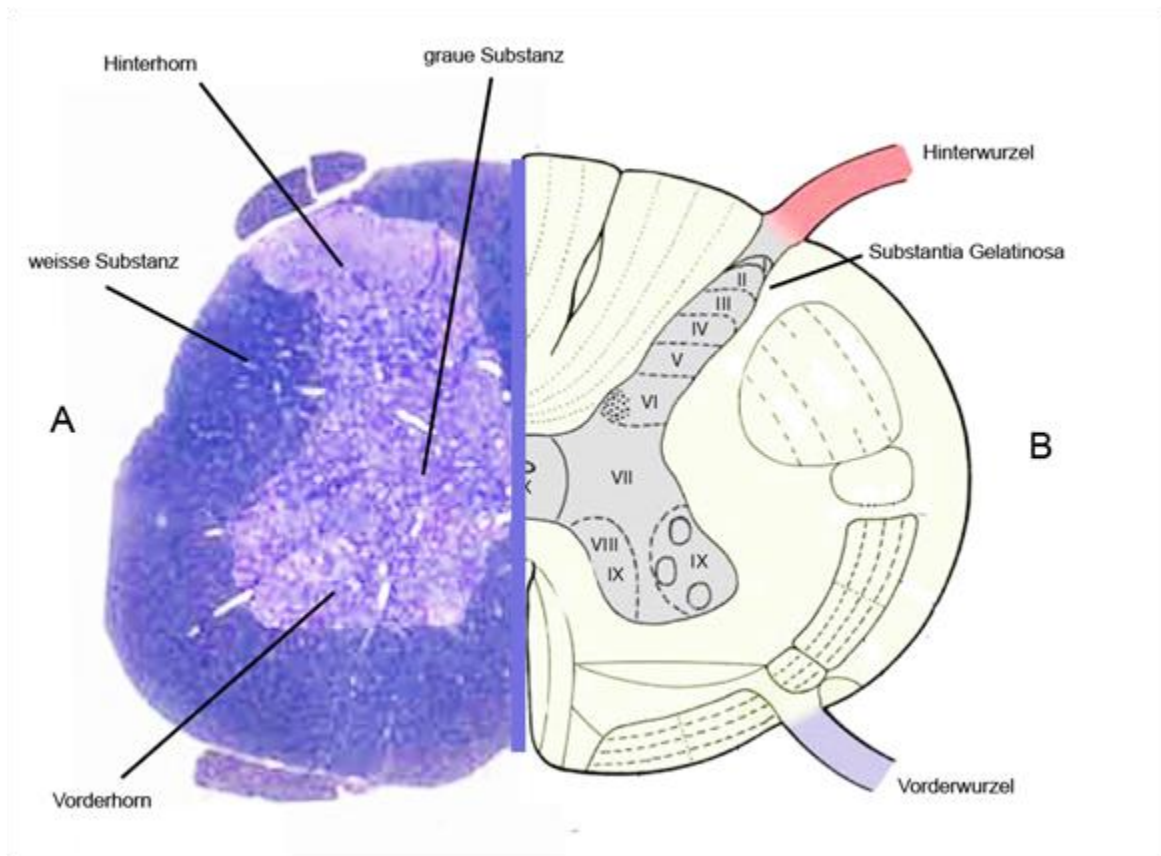
**Lamina V** (L. pyramidalis interna): In dieser Schicht sind die großen Pyramidenzellen lokalisiert, deren Axone zu subkortikalen Arealen ziehen. Im motorischen Kortex sind die Pyramidenzellen besonders groß und werden dort Betz-Zellen genannt. Zusätzlich finden sich noch Interneurone.

**Lamina VI** (L. multiformis): Unterschiedliche Neurone (Spindelzellen und Interneurone), fließender Übergang zur weißen Substanz.

### 1.4.3 Hinterhorn des Rückenmarks

Somatosensorische Informationen aus der Peripherie gelangen durch sensorische Nervenfasern über die Hinterwurzel ins Rückenmark. Im Hinterhorn der grauen Substanz findet die Verschaltung auf das zweite Neuron und eine lokale Informationsverarbeitung statt. Die graue Substanz des Rückenmarks lässt sich in zehn Laminae unterteilen (Rexed 1952), wovon die Laminae I–VI das Hinterhorn bilden (Abb. 1.4.2). Während die sensorischen Informationen der Haut über große A $\beta$ -Fasern eher in die tiefen Laminae III bis VI geleitet werden (Todd 2002), werden in den oberflächlichen Laminae I und II hauptsächlich Informationen der Schmerzverarbeitung (Nozizeption) verarbeitet (Millan 1999). Als Substantia gelatinosa (SG) bezeichnet man die Lamina II, in der nozizeptive Informationen verschaltet werden. Diese werden über die dicken, schnellen A $\delta$ -Schmerzfasern, bzw. die dünnen, langsameren C-Schmerzfasern in dieses Areal geleitet. Die SG ist das wichtigste Areal für die Schmerzverarbeitung auf spinaler Ebene (Coggeshall et al. 1997; Furue et al. 2004). Eine Inhibition der neuronalen Aktivität in der SG gilt als ein wesentlicher Wirkmechanismus für analgetisch wirkende Substanzen (Moore et al., 2000). Anästhetika

wie Xenon, welche zusätzlich zu ihrer hypnotischen Wirkung auch eine analgetische Wirkung haben, könnten also diese über eine Modulation der neuronalen Erregbarkeit in der SG hervorrufen. Zusätzlich findet, wie bereits aufgeführt, die Unterdrückung motorischer Reaktionen auf einen Schmerzreiz hauptsächlich auf Rückenmarksebene statt (Campagna et al., 2003). Dies kann entweder durch eine Verminderung der neuronalen Aktivität der Motorneurone im Vorderhorn, oder durch eine Verminderung des nozizeptiven Inputs im Hinterhorn ausgelöst werden. Insofern könnte auch der Anästhesie-Endpunkt Immobilisation z. T. auf Ebene der SG-Neurone vermittelt sein.



**Abb. 1.4.2: Transversalschnitt des Rückenmarks.**

**A** Toluidin-Blau angefärbter Schnitt des Rückenmarks einer Ratte. Verändert nach Mi (2007). **B** Schematische Darstellung. In der Hinterwurzel ziehen die afferenten Fasern ins Hinterhorn des Rückenmarks, wo sie synaptisch verschaltet werden. Die Substantia gelatinosa (Lamina II) ist das wichtigste Areal für die Schmerzverarbeitung. Von darin enthaltenen Neuronen wurden in dieser Arbeit Stromantworten mit Patch-Clamp Technik durchgeführt. Verändert nach Duus (1995).

## 1.5 Die Wirkung von Xenon auf Neurotransmittersysteme – Übersicht über den aktuellen Forschungsstand

Die Wirkung von Xenon auf Rezeptor-Ionenkanal-Ebene wurde bis heute in verschiedenen Studien ausschließlich in sog. Expressionssystemen oder an kultivierten Neuronen untersucht.

### 1.5.1 Exzitatorische Neurotransmitter

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter, glutamaterge Stromantworten werden durch Xenon vermindert. Strittig ist jedoch nach wie vor, an welchem Subtyp der Glutamat-Rezeptoren Xenon seine Hauptwirkung entfaltet (Preckel et al., 2006). Erste Arbeiten zur neuronalen Wirkung von Xenon postulierten eine nahezu alleinige Wirkung am NMDA-Rezeptor (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000). In diesen Studien wurden glutamaterge Stromantworten aus „Autapsen“-bildenden, dissoziierten Hippocampusneuronen untersucht, wobei Xenon den NMDA-Rezeptor-vermittelten Anteil dieser Antworten weit mehr reduzierte als den nonNMDA-Rezeptor-vermittelten Anteil. Autapsen stellen ein maximal reduziertes synaptisches Modellpräparat dar, daran gewonnene Ergebnisse besitzen daher nur eingeschränkte Aussagekraft. Yamakura konnte zeigen, dass Xenon die Stromantworten von rekombinanten, heterolog exprimierten NMDA-Rezeptoren reduziert (Yamakura et al. 2000). Zwischenzeitlich konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Stromantworten heterolog exprimierter nonNMDA-Rezeptoren (Plested et al. 2004; Dinse et al. 2005) sowie nonNMDA-Rezeptor-vermittelte Antworten aus kultivierten Kortexneuronen (Dinse et al. 2005) durch Xenon reduziert werden. Eine neuere Arbeit am Modellorganismus *C. elegans*<sup>1</sup> beschreibt darüber hinaus diverse mit Anästhesie korrelierende Verhaltensänderungen, die durch Xenon über Inhibition von AMPA-Rezeptoren, jedoch nicht NMDA-Rezeptoren, hervorgerufen werden (Nagele et al., 2005).

### 1.5.2 Inhibitorische Neurotransmitter

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor gilt als wichtigster inhibitorisch wirksamer Ionenkanal. Eine Verstärkung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Inhibition gilt als wichtiger möglicher Mechanismus für die Wirkung von Anästhetika auf neuronaler Ebene.

Es gibt Hinweise, dass der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor einen Angriffsort für das Inhalationsanästhetikum Xenon darstellt. Eine Erhöhung GABA-induzierter Stromantworten von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung wurde *in vitro* nachgewiesen (Hapfelmeier et al., 2000; Yamakura & Harris, 2000). In diesen Studien wurden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf verschiedenen Kulturzellen, nämlich humanen embryonalen Nierenzellen

---

<sup>1</sup>Caenorhabditis elegans = Fadenwurm aus der Ordnung der Rhabditiden

(HEK 293 Zellen) bzw. *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert. Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf eine erhöhte Affinität von GABA zum Rezeptor zu (Hapfelmeier et al., 2000). Dies würde *in vivo* eine verstärkte Inhibition durch eine erhöhte GABAerge synaptische Transmission verursachen.

Demgegenüber steht eine Arbeit, in der von dissoziierten, „Autapsen“-bildenden Hippocampusneuronen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte inhibitorische Stromantworten (GABA<sub>A</sub>-IPSC) abgeleitet wurden, und diese von Xenon nicht beeinflusst wurden (de Sousa et al., 2000). Eine andere Arbeit verneint ebenfalls eine Xenon-Wirkung auf Stromantworten exprimierter GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Franks et al., 1998).

Die Wirkung von Xenon auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wird also kontrovers diskutiert. Sie ist zumindest weit weniger stark ausgeprägt und weniger eindeutig belegt, als es die verstärkende Wirkung anderer Inhalationsanästhetika (z. B. N<sub>2</sub>O, Isofluran) auf das GABA-System ist (Campagna et al. 2003; Preckel et al. 2006).

### 1.5.3 Andere Neurotransmittersysteme

Die Datenlage zur Wirkung von Xenon an anderen Neurotransmitter-Rezeptoren ist wenig umfangreich. Einige Arbeiten beschreiben an heterolog exprimierten Glycin-Rezeptoren eine Potenzierung (Daniels et al. 1998; Yamakura et al. 2000), sowie an heterolog exprimierten 5-HT<sub>3</sub>- (Suzuki et al. 2002) bzw. nACh-Rezeptoren (Yamakura et al. 2000; Suzuki et al. 2003) eine Inhibition durch Xenon. Inwiefern diese Wirkungen jedoch eine Relevanz für das Herbeiführen des klinischen Zustandes Anästhesie besitzen, ist ungeklärt (Preckel et al., 2006)

### 1.5.4 Die Wirkung von Xenon an spannungsabhängigen Ionenkanälen und Ionentransportern

In verschiedenen Studien wurde der Effekt von Xenon auf Kaliumkanäle untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Xenon heterolog-exprimierte humane TREK<sub>1</sub>-Kanäle<sup>2</sup> aktiviert. Jedoch scheinen TASK-Kanäle (Gruss et al., 2004) und K<sub>ir</sub>-Kanäle<sup>3</sup> in Myozyten (Stowe et al. 2000; Huneke et al. 2001) von Xenon nicht beeinflusst zu werden.

Spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle scheinen durch Xenon ebenfalls nicht moduliert zu werden. So hat Xenon keine Wirkung auf die Funktion von heterolog exprimierten N-Typ

<sup>2</sup> TREK<sub>1</sub>-Kanäle (= TWIK-related K<sup>+</sup>-Kanal) und TASK-Kanäle (= TWIK-related acid sensitive K<sup>+</sup>-Kanal) sind auswärts-rektifizierenden K<sup>+</sup>-Kanäle, die zur Gruppe der TWIK-Kanäle (= Twin-Pore-K<sup>+</sup>-Kanal) gehören. Diese bestehen aus vier transmembranäre Segmente mit zwei Porenregionen.

<sup>3</sup> einwärts-rektifizierende (inwardly rectifying) K<sup>+</sup>-Kanäle



Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (White et al., 2005) sowie L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in Myozytenkultur (Stowe et al. 2000; Huneke et al. 2001; Fassl et al. 2003). Es liegen keine Arbeiten darüber vor, ob Xenon an T-Typ, P/Q-Typ oder R-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen modulierend wirkt.

Jedoch konnte eine inhibierende Wirkung von Xenon auf die Plasmamembran-Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Franks et al. 1994; Horn et al. 1995) gezeigt werden, wobei gefolgert wird, dass die daraus resultierende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung die neuronale Signalverarbeitung verändern und somit einen Mechanismus darstellen kann, welcher Anästhesie vermittelt.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die neuronalen Mechanismen, über die Xenon seine anästhetischen und analgetischen Eigenschaften vermittelt, sind nicht vollständig geklärt. Die bisher gewonnenen elektrophysiologischen Kenntnisse über die Wirkung von Xenon an Ionenkanälen wurden ausschließlich an Kulturzellen – meist mit heterolog exprimierten Rezeptoren – erhoben. Im Gegensatz dazu sollten im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens neuronale Wirkmechanismen von Xenon in weniger artifizialen *in vitro* Modellen untersucht werden. Diese Modelle sind sog. Akut-Hirnschnittpräparate verschiedener ZNS-Regionen, in denen die Neurone in ihrem im wesentlichen erhaltenen Netzwerk erhalten bleiben, und an denen somit die Wirkung Xenons auf die synaptische Transmission und auf die Rezeptorfunktion *in situ* untersucht werden kann.

Als Untersuchungsareale wurden wegen ihrer möglichen Relevanz für die Anästhesie-Endpunkte Amnesie, Hypnose und Analgesie die basolaterale Amygdala, der präfrontale Kortex, sowie das Hinterhorn des Rückenmarks gewählt.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Wie beeinflusst Xenon die GABAerge, NMDAerge- und nonNMDAerge synaptische Transmission?
2. Beeinflusst Xenon die präsynaptische Glutamatfreisetzung?
3. Zeigen sich in den jeweiligen ZNS-Arealen unterschiedliche Xenonwirkungen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Herstellung der Schnittpräparate

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene sog. Akut-Schnittpräparate benutzt. Die Experimente in der basolateralen Amygdala wurden in Koronarschnitten, die Experimente im präfrontalen Kortex in Sagittalschnitten von Mäusegehirnen durchgeführt. Die Experimente in der Substantia gelatinosa erfolgten in Transversalschnitten des lumbalen Rückenmarks männlicher Ratten.

#### 2.1.1 Präparation der Hirnschnitte

Für die Präparation der Hirnschnitte wurde männliche C57JCrI Black 6 Mäuse verwendet. Aufgrund der besseren Hypoxietoleranz und der erleichterten Bedingungen für Patch-Clamp-Ableitungen wurden Tiere mit einem Alter zwischen 21 und 49 Tagen für die Präparation benutzt.

Die Tiere wurden mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten in eisgekühlter und mit Carbogengas (95% Sauerstoff / 5% Kohlendioxid) gesättigter künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, artificial cerebrospinal fluid; Zusammensetzung (mM): NaCl 125; KCl 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgCl<sub>2</sub> 1; Glucose 25; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub> 2; pH 7,37). Nach Freilegung des Schädelknochens erfolgten zwei Transversalschnitte von kaudal und ein flach geführter Sagittalschnitt entlang der Mittellinie des Schädels nach rostral. Die eröffnete Schädelkalotte wurde mit einer Pinzette beidseits aufgebogen um den Zugang zum Gehirn zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gehirn vorsichtig nach Durchtrennung der Nervi optici mit einem abgerundeten Spatel aus der Schädelhöhle herausgelöst und entnommen. Zur Präparation der Koronarschnitte für die Ableitungen in der Amygdala wurde mit einer Rasierklinge das Kleinhirn in koronarer Schnitfführung entfernt, um somit eine gerade Standfläche zu erhalten, auf der das Gehirn anschließend mittels Cyanoakrylatklebstoff (Histoakryl, B. Braun, Melsungen, Deutschland) auf einen Metallblock geklebt werden konnte. Zur Präparation der sagittalen Hirnschnitte für die Experimente im PFC wurde das Gehirn nach Entfernung des Kleinhirns mittels sagittaler Schnitfführung in die beiden Hemisphären geteilt, und eine der beiden Hemisphären anschließend an der Schnittfläche auf einen Metallblock geklebt.

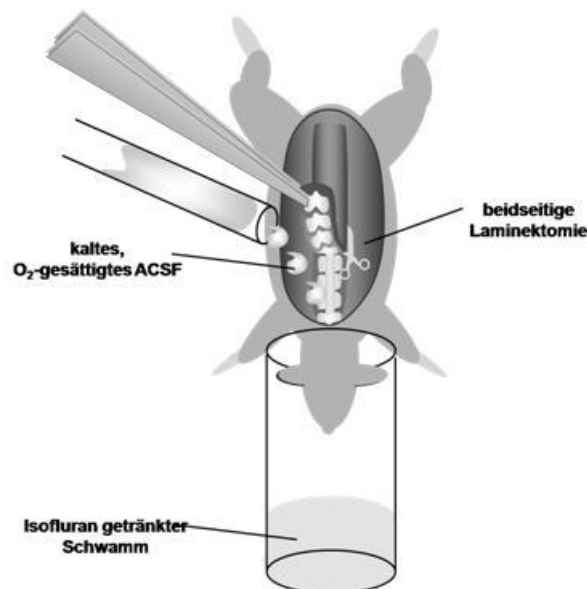
Bei beiden Präparationen wurde der Metallblock anschließend in ein mit gekühlter und Carbogen-gesättigter ACSF gefülltes Schneidegefäß eingelegt. Anschließend wurde das Gehirn mit einem Vibratom (HM 650 V, Microm International, Walldorf, Deutschland) in 350 µm dicke Sagittal- bzw. Koronarschnitte zerteilt. Mit dem weiten Ende der Pasteurpipette

wurden die fertigen Hirnschnitte in Gefäße mit Carbogen-gesättigter ACSF transferiert und sodann 30 Minuten bei 34 °C inkubiert. Anschließend wurden sie bis zur Überführung in die Messkammer des Patch-Clamp-Setups bei Raumtemperatur (22–24 °C) unter ständiger Zufuhr von Carbogengas aufbewahrt.

### 2.1.2 Präparation der lumbalen Rückenmarksschnitte

Zur Präparation der Rückenmarksschnitte wurden 14–28 Tage alte männliche Wistar-Ratten verwendet. Die Ratten wurden zunächst mit Isofluran in einer Kammer anästhesiert. Zur Aufrechterhaltung einer ausreichend tiefen Narkose wurde der Kopf während der Präparation in einem Gefäß fixiert, an dessen Ende sich ein mit Isofluran getränkter Schwamm befand. Um die Ratte nicht durch eine Überdosierung mit Isofluran zu töten, wurde die Narkosetiefe anhand der Spontanatmung der Ratte kontrolliert.

Zur Freilegung der Wirbelsäule erfolgte am Rücken des Tieres zuerst von kranial nach kaudal eine mediane Hautinzision. Nachdem die Wirbelsäule zugänglich war, wurde die Ratte durch Durchtrennung der Halswirbelsäule mit einer Schere getötet. Anschließend erfolgte mit einer Schere von kranial bis kaudal eine beidseitige Laminektomie, um den Zugang zum Rückenmark zu ermöglichen. Während der Präparation wurde das Rückenmark mit eisgekühlter, Carbogengas gesättigter ACSF gekühlt (siehe Abb. 2.1.1).



**Abb. 2.1.1: Präparation der Rückenmarksschnitte.**

Die Ratte wurde mit Isofluran anästhesiert. Nach Hautinzision erfolgte die Durchtrennung der Halswirbelsäule und anschließend eine kraniokaudale Bilaminektomie. Während der Präparation wurde das Rückenmark mit Carbogengas gesättigter, gekühlter ACSF umspült.

Nach kompletter Entfernung sämtlicher Wirbelbögen konnte das Rückenmark nach Abtrennung des sakralen Anteils vorsichtig entnommen werden. Es wurde anschließend in eine mit Carbogen-gesättigter ACSF gefüllten Petrischale gelegt. Die weitere Präparation erfolgte unter Binokularsicht mit 6-facher Vergrößerung (Wild-Heerbrugg, Heerbrugg, Schweiz). Nach Ablösung der Dura mater wurden die Wurzelfasern vom Präparat abgetrennt. Das zervikothorakalen Rückenmark wurde schließlich entfernt und das lumbale Rückenmark auf der ventralen Seite auf einen Agarblock der Länge nach mit Cyanoakrylklebstoff aufgeklebt. Der Agarblock wurde auf einen Metallblock fixiert. Der Metallblock mit dem aufgeklebten Rückenmark wurde dann in ein mit Carbogen-gesättigter ACSF gefülltes Schnittgefäß transferiert. Anschließend wurden mit einem Vibratom 500 µm dicke Transversalschnitte des Rückenmarks gefertigt. Die fertigen Schnitte wurden mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette in ein Gefäß mit Carbogen-gesättigter ACSF überführt und anschließend ungefähr 30 Minuten bei 34 °C inkubiert. Bis zum Überführen in die Ableitkammer wurden die Präparate bei Raumtemperatur (22–24 °C) aufbewahrt.

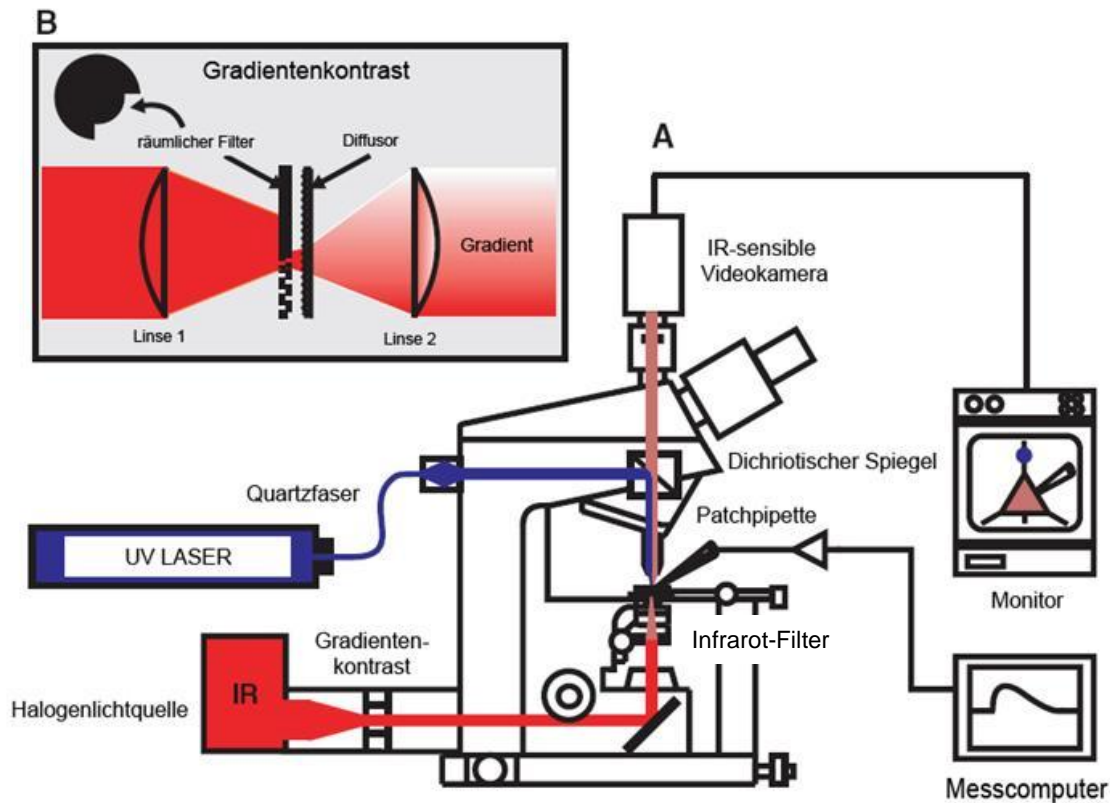
## **2.2 Infrarotmikroskopisch gelenkte Photostimulation**

Durch die Infrarotmikroskopisch gelenkte Photostimulation können unter visueller Kontrolle an bestimmten Strukturen (z. B. Dendriten) der Neurone Substanzen appliziert werden. Die Technik ist eine Kombination aus Infrarot-Videomikroskopie und Photostimulation. Aufgrund der hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung ist diese Methodik sehr gut geeignet um synaptische Transmissionsvorgänge zu imitieren (Dodt et al., 2002). Sie ermöglicht somit einen Rückschluss darauf, ob eine untersuchte Substanz ihre Wirkung eher auf präsynaptischer oder auf postsynaptischer Ebene erzielt.

### **2.2.1 Infrarot-Videomikroskopie**

Mit Hilfe der Infrarot-(IR)-Videomikroskopie können Neuronen im vitalen Hirnschnitt sichtbar gemacht werden (MacVicar 1984; Dodt et al. 1990; Dodt et al. 1994). Da im Hirnschnitt viele Neuronen dicht nebeneinander liegen, wird sichtbares Licht durch diese Zellverbände sehr stark gestreut. Um diese Streuung zu minimieren, wird statt sichtbarem langwelliges Licht im Infrarotbereich verwendet. Die besten Resultate sind mit IR-Licht mit einer Wellenlänge von 780 nm zu erreichen (Dodt und Zieglgänsberger 1994), das auch für die Versuche der vorliegenden Arbeit benutzt wurde. Eine Verstärkung des Kontrasts wurde einerseits durch eine in der Videokamera eingebaute Kontrastverstärkung und andererseits durch ein Gradientenkontrast-(GC)-Verfahren (Dodt et al., 2002) erreicht. Das Prinzip des GC-Verfahrens (Abbildung 2.2.1) ist die Minimierung von Streulicht und die Erzeugung eines Beleuchtungsgradienten in zwei orthogonalen Richtungen. Dadurch kann im Gegensatz zum

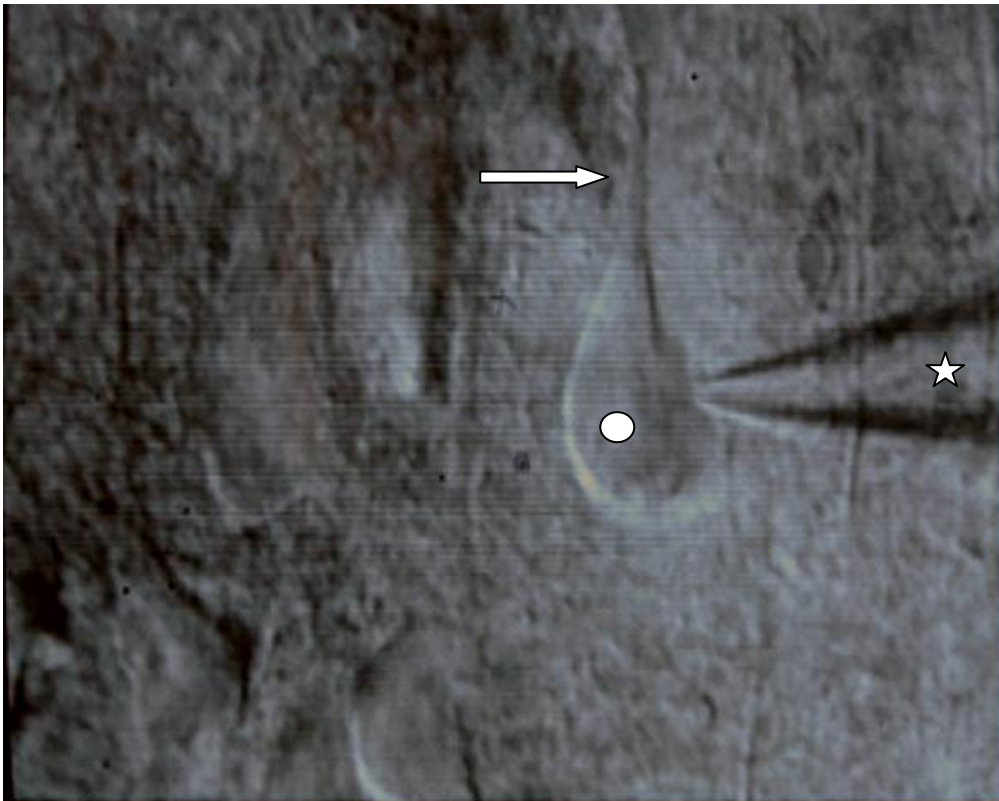
sog. Interferenzkontrast nach Nomarski eine größere Visualisierungstiefe im Schnitt und ein sehr viel höherer Kontrast erreicht werden.



**Abb. 2.2.1: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops mit IR-gelenkter Photostimulation.**

**A** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Die Neurone werden mit Hilfe der IR-Videomikroskopie visualisiert. Gleichzeitig wird ein Laserimpuls über eine Quarzfaser in das Mikroskop geleitet und durch einen dichroitischen Spiegel und das Objektiv auf das abgeleitete Neuron fokussiert. **B** Prinzip des Gradientenkontrasts. Das Streulicht wird durch eine Viertelfeldbeleuchtung und einen nachgeschalteten Diffusor minimiert. Dadurch kann ein höherer Kontrast und eine größere Visualisierungstiefe erreicht werden. Verändert nach Dodt et al. (2002).

Für die Infrarot-Videomikroskopie wurde ein Axioskop-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Bei diesem Mikroskop gelangt durch einen zwischen der Halogenlampe und Kondensator positionierten IR-Interferenzfilter lediglich IR-Licht mit der Wellenlänge 780 nm in den Strahlengang. Das Mikroskop ist mit einem 60× Wasser-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgestattet. Das Bild wird nach zweifacher Vergrößerung in einem Vergrößerungstubus (Barlow-Linse) auf eine infrarotsensitive Videokamera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) projiziert. Das Videobild wird letztendlich auf einem Monitor sichtbar gemacht (Abbildung 2.2.2).



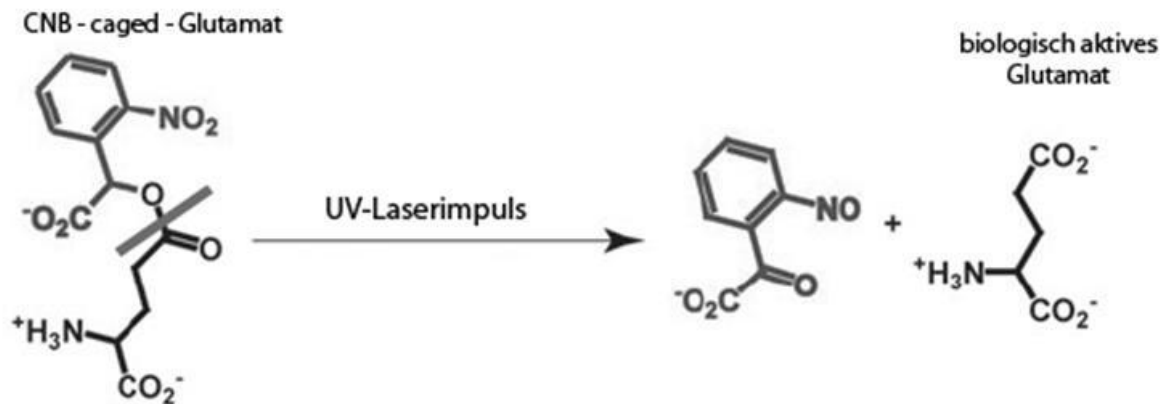
**Abb. 2.2.2: Infrarot-Videomikroskopiebild von vitalen Nervenzellen.**

Die Abbildung zeigt Pyramidenneurone der Lamina V des Neokortex einer Maus. Der Dendrit (Pfeil) und das Soma (Punkt) sind deutlich zu erkennen. Im rechten Teil des Bildes sieht man die Patchpipette (Stern). Auf Höhe des Pfeils würde der Laserspot für die Photostimulation auf den Dendriten gerichtet werden. Verändert nach Dodt & Zieglängsberger (1998).

### 2.2.2 Laser-Photostimulation

Das Grundprinzip der Laser-Photostimulation besteht in der photolytischen Freisetzung einer biologisch aktiven Substanz aus einer durch Veresterung inaktivierten Verbindung („caged“-Verbindung; Abb. 2.2.3). Durch diese Imitierung einer präsynaptischen Transmitterfreisetzung können gezielt postsynaptische Stromantworten untersucht werden. Bei Bestrahlung der „caged“-Verbindung durch energiereiches ultraviolettes (UV) Licht wird die kovalente Esterbindung photolytisch gespalten und somit das biologisch aktive Molekül freigesetzt. Durch diesen schnellen Prozess kann man unmittelbar einen Konzentrationsanstieg von z.B. Neurotransmittern oder sekundären Botenstoffen bewirken (McCray et al. 1989; Adams et al. 1993; Hess et al. 1995).

Durch zusätzliche Fokussierung des UV-Lichts auf einen kleinen Punkt kann die Freisetzung der biologisch aktiven Substanzen räumlich begrenzt, und damit gezielt einzelne Neurone oder sogar kleinere neuronale Abschnitte pharmakologisch beeinflusst werden.



**Abb. 2.2.3: CNB-caged-Glutamat.**

Das Glutamat ist durch Veresterung inaktiviert. Durch einen UV-Laserimpuls wird die Esterbindung innerhalb von 21  $\mu\text{s}$  photolytisch gespalten und das in der Folge biologisch wirksame Glutamat kann an die glutamatergen Rezeptoren binden. Verändert nach Kramer (2005).

Für die Experimente dieser Arbeit wurde zur photolytischen Spaltung von „caged“-Glutamat ein UV-Laser (Nd:YVO<sub>4</sub>, 100 kHz Pulswiederholrate; DPSS Lasers, San Jose, USA) verwendet. Die UV-Strahlung des Lasers wurde über eine Quarzfasern mit einem Durchmesser von 25  $\mu\text{m}$  in den Strahlengang des Mikroskops eingeleitet und über einen dichroitischen Strahlenteiler (FT 460) von oben in das Objektiv eingesiegelt. Durch den dichroitischen Spiegel konnte ausschließlich Licht mit einer Wellenlänge von unter 460 nm auf die Hirnschnitte gelangen. Der UV-Laser emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 355 nm. Nachdem das Laser-Licht in das Objektiv eingeleitet wurde, wurde der Lichtstrahl des Lasers in den Brennpunkt des Objektivs (60x, numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland) und somit in die Fokalebene gebündelt. Der daraus resultierende Lichtpunkt hatte einen Durchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$ . Da die Strahlung des Lasers während des Experiments im Hirnschnitt nicht genau lokalisierbar ist, wurde der Lichtpunkt mit Hilfe eines fluoreszierenden Papiers vor dem Experiment auf eine Markierung am Bildschirm eingestellt. Durch diese Markierung konnte während des Experiments der Lichtpunkt, und damit der Ort der photolytischen Stimulation genau eingestellt werden. Die Lichtleistung des Lasers lag bei den Experimenten zwischen 50 und 100 mW, diese konnte mit Hilfe eines Polarisationsfilters variiert werden. Die Dauer des Lichtpulses und die Öffnung eines zwischen Laser und Mikroskop geschalteten Shutters wurde über einen Computer mit entsprechender Software (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) und einem AD-Wandler gesteuert. Dadurch konnte die Dauer des Lichtimpulses auf 3–5 ms eingestellt werden.

Für die Experimente dieser Arbeit wurde  $\gamma$ -( $\alpha$ -Carboxy-2-nitrobenzyl)-glutamat (CNB-caged-Glutamat; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 100  $\mu$ M verwendet. Vorteile der CNB-Gruppe gegenüber anderen "caged"-Verbindungen sind eine höhere Wasserlöslichkeit und eine höhere „uncaging“ Rate. Durch ausreichende Beleuchtung mit UV-Licht wird physiologisch aktives Glutamat innerhalb von 21  $\mu$ s zu 90 % freigesetzt (Wieboldt et al., 1994). Das CNB-caged-Glutamat ist biologisch äußerst inert und im Hirnschnitt physiologisch inaktiv: In Vorarbeiten wurde beschrieben, dass CNB-caged-Glutamat *per se* keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone hat (Schubert et al. 2001), und glutamaterge Rezeptoren nicht durch spontane Hydrolyse des CNB-caged-Glutamat desensitisiert werden (Eder et al. 2002).

## 2.3 Elektrophysiologie

### 2.3.1 Versuchsaufbau

Das Infrarot-Mikroskop war für die elektrophysiologischen Experimente mit motorisierten Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) ausgestattet. Dadurch konnten die Ableitkammer, das Mikroskop sowie auch die Patch-Clamp-Pipette in allen drei Raumrichtungen unabhängig voneinander bewegt werden. Dies ermöglichte es, die Hirn- bzw. Rückenmarksschnitte nach für die Ableitung geeigneten Zellen abzusuchen. Die Schnittpräparate wurden vorsichtig in die Ableitkammer gelegt und mit einem mit dünnen Nylonfäden bespannten Platinrahmen (sog. Grid) fixiert.

Die Ableitkammer wurde mit ACSF perfundiert, welche unter Kontrollbedingungen mit 30 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 65 % N<sub>2</sub> gesättigt war. Unter diesen Kontrollbedingungen mit relativ niedriger O<sub>2</sub>-Konzentration ließen sich ausreichend große Antworten ableiten. War die Amplitude und Kinetik der gemessenen Stromantworten mindestens 15 min stabil, wurde die ACSF mit einer Gasmischung aus 30 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 65 % Xenon gesättigt. 15–30 min nach Beginn des Xenon-Einwaschens wurde die ACSF wieder mit dem Ausgangs-Gasgemisch gesättigt (= Auswasch). Die Reduzierung des Sauerstoffgehalts auf 30 % im Gegensatz zu 95 % bei Carbogengas hatte keinen Einfluss auf die Rezeptorkinetik bzw. das Ruhemembranpotential der Neurone (Ranft et al. 2007). Um die Hypoxietoleranz der vitalen Schnitte zu vergrößern wurden die Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die ACSF zirkulierte über dünne Teflon-Schläuche von der Ableitkammer zum Flüssigkeitsreservoir. Im Reservoir erfolgte die kontinuierliche Sättigung der ACSF. Durch die Rezirkulation und die kontinuierliche Sättigung konnte eine konstante Versorgung der Schnitte in der Ableitkammer mit Sauerstoff bzw. eine konstante Perfusion mit Xenon gewährleistet werden. Das Zirkulationsvolumen der ACSF betrug 20 ml. Die Konzentrationen



der Sauerstofffraktion bzw. der Kohlendioxidfraktion in den Gasgemischen wurden mit einem kalibrierten Gasmonitor (Datex Capnomac Ultima, Duisburg, Deutschland) kontrolliert. Die Flussraten der Reservoirbegasung betragen 0,3–0,5 l/min.

Die Positionierung der Stimulationselektrode, sowie das Auffinden der für die Ableitungen geeigneten Neurone erfolgte abhängig von der untersuchten ZNS-Region.

#### Basolaterale Amygdala:

Die Koronarschnitte für die Ableitungen in der BLA wurden mittels Grid in der Kammer fixiert. Anschließend wurde die Amygdala lichtmikroskopisch aufgesucht und die Stimulationselektrode (siehe Kapitel 2.3.2.3) auf die Capsula externa gesetzt. Anschließend wurde die BLA nach geeigneten Projektionsneuronen durchsucht.

#### Präfrontaler Kortex:

Am rostralen Ende des Sagittalschnittes wurde zunächst Infrarot-videomikroskopisch die Lamina V anhand der charakteristischen Pyramidenzellen identifiziert. Anschließend wurde die Lamina V nach geeigneten Neuronen durchsucht, und danach die Stimulationselektrode oberhalb des entsprechenden Areals in der Lamina II/III platziert.

#### Rückenmark – Substantia gelatinosa:

Nach Fixierung der Transversalschnitte mit dem Platin-Grid wurde lichtmikroskopisch anhand des typischen Bilds die Substantia gelatinosa (Lamina II) identifiziert. Die Stimulationselektrode wurde auf die Eintrittszone der Hinterwurzel (dorsal root entry zone) gesetzt.

### **2.3.2 Ganzzelleableitung und Stimulation**

Die Ableitung der einzelnen Neurone erfolgte mit der „Patch-Clamp“-Technik (Stuart et al., 1993). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Ableitung mit scharfen Mikroelektroden besteht vor allem im sehr hohen Abdichtungswiderstand zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran, der im Bereich von  $G\Omega$  („giga-seal“) liegt. Neben dem guten Rausch/Signal-Verhältnis, das es ermöglicht auch kleine Ströme bzw. Potentialänderungen zu messen, kann bei dieser Methode auch die elektrische Aktivität der gesamten Zelle in der sog. „Whole-Cell“-Konfiguration (= Ganzzelleableitung) gemessen werden (Blanton et al. 1989; Edwards et al. 1989). Zusätzlich können der Pipettenlösung auch Pharmaka zugesetzt werden, die gezielt intrazellulär Ionenkanäle blockieren. Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen erfolgten in der Ganzzelleableitung.

### 2.3.2.1 Pipetten

Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Innenfilament (Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mit einem Horizontalziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz, Martinsried, Deutschland) angefertigt und hitzepoliert. Der Innendurchmesser der Kapillaren betrug 1,17 mm, der Außendurchmesser 1,5 mm. Durch genaue Einstellung einzelner Parameter am Ziehgerät konnte der Spitzendurchmesser (ca. 1  $\mu\text{m}$ ) und somit der Gleichstromwiderstand der gefüllten Pipetten (4–7 M $\Omega$ ) eingestellt werden. Die Intrazellulärlösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): K-Gluconat 130; KCl 5; HEPES 10; EGTA 0,5; Mg-ATP 2; Glucose 5. Der pH-Wert wurde mit 0,1 molarem KOH auf 7,3 eingestellt, die Osmolarität betrug 260–270 mosM (Andreasen und Hablitz 1994). Bei einigen Experimenten wurde Lidocain-Natrium-N-ethylchlorid (5 mM) zur Intrazellulärlösung hinzugefügt, um bei hohen Ruhemembranpotentialen Na<sup>+</sup>-Kanal-Stromantworten (sog. Spikes), zu verhindern.

### 2.3.2.2 Herstellung der Ganzzelleableitung

Die Neurone wurden in der „Whole-Cell“-Konfiguration im Voltage-Clamp-Modus abgeleitet. Die mit der Intrazellulärlösung gefüllte Patchpipette war über einen chlorierten Silberdraht mit dem Patch-Clamp-Verstärker (SEC 10L, NPI electronic, Tamm, Deutschland) verbunden. Für den Voltage-Clamp-Modus arbeitete der Verstärker im diskontinuierlichen Einzelelektroden-„Voltage-Clamp“-Verfahren (dSEVC, „discontinuous single electrode voltage clamp“). Dies bedeutet, dass der Verstärker mit einer voreingestellten Frequenz (50–60 Hz) zwischen Spannungsmessung und Injektion des Kompensationsstroms zur Erhaltung des eingestellten Membranpotentials hin- und herwechselt.

Zur Herstellung der Ganzzelleableitung wurde zunächst nach einem geeigneten Neuron gesucht und anschließend die Pipette vorsichtig dem Zellsoma genähert. Vor Erreichen des Neurons wurde die Kapazität und der Widerstand der Pipette abgeglichen. Dies erfolgte im sog. „Bridge-Mode“ (Wheatstone'sche Brücke). Über eine 50 ml Spritze konnte von extern Überdruck auf die Pipette gegeben werden, um ein Verstopfen während der Bewegung durch das Schnittpräparat zu verhindern. War die Pipette unmittelbar an die Zellmembran gebracht, wurde dieser Druck vorsichtig abgelassen und durch einen langsam stärker werdenden Unterdruck zunächst die „Cell-attached“-Konfiguration hergestellt. Anschließend wurde die Membran unter der Pipettenöffnung mit einem kurzen, stärkeren Sog durchbrochen und somit die „Whole-Cell“-Konfiguration hergestellt. Somit wurde die Pipette mit dem Zellinneren leitend verbunden. Als umladbarer Widerstand zwischen zwei leitenden

Flüssigkeiten (Intrazellulärlösung und Extrazellulärlösung) ist die Zellmembran ein Kondensator und hat somit neben ihrem Membranwiderstand ( $R_M$ ) noch kapazitative Eigenschaften ( $C_M$ ). Darüber hinaus liegt zwischen dem in der Pipette liegenden Silberdraht und dem Zellsoma ein Widerstand, der in Serie mit dem Membranwiderstand der Zelle verbunden ist und somit als Serienwiderstand ( $R_S$ ) bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.5). Zusätzlich zum Pipettenwiderstand wird dieser durch Zellfragmente gebildet, die beim Öffnen der Zelle in den Mündungsbereich der Pipette gezogen werden und diesen somit verlegen.

### 2.3.2.3 Elektrische und photolytische Stimulation

Zur Messung der postsynaptischen Ströme wurden die Neurone elektrisch und photolytisch stimuliert. Die beiden Stimulationsarten erfolgten abwechselnd im Abstand von jeweils 15 s.

Die elektrische Stimulation erfolgte über eine bipolare, konzentrische Stimulationselektrode aus Wolfram (Außendurchmesser 200  $\mu\text{m}$ , Innendurchmesser 100  $\mu\text{m}$ , SNEX-100X, Hugo-Sachs-Elektronik -Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland). Die Stimulationselektrode wurde mittels Mikromanipulatoren sanft auf den Schnitt aufgelegt. Sie war bei allen Schnittpräparaten so positioniert, dass der abgeleiteten Zelle vorgeschaltene Axone stimuliert werden konnten. Diese wurden dadurch überschwellig erregt und stimulierten wiederum das postsynaptische, abgeleitete Neuron orthodrom (Ichinose et al. 1996; Shao et al. 1996). Die Stimulationselektrode war mit einem Stimulationsgerät verbunden, das über einen Computer mit einem AD-Wandler von der Aufzeichnungssoftware (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) getriggert wurde. Am Stimulationsgerät konnte sowohl die Dauer des Stromimpulses (0,05–0,5 ms), als auch die Intensität eingestellt werden (0,1–100 V).

Zur photolytischen Stimulation wurde nach Herstellung der Ganzzelleableitung CNB-caged-Glutamat mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zur ACSF hinzugegeben. Nach ungefähr 10 min Einwaschzeit konnte mit der photolytischen Stimulation begonnen werden. Dazu wurde der Laserpunkt auf den Dendriten der abgeleiteten Zelle gerichtet, und die Laserintensität so eingestellt, dass eine Stromantwort von ca. 50–200 pA abgeleitet werden konnte.

### 2.3.3 Postsynaptische Ströme

#### 2.3.3.1 NMDA EPSC

Wie in Kapitel 1.2.1.1 beschrieben, setzen sich die NMDA-Rezeptoren aus NR1- und NR2-Untereinheiten zusammen (Hollmann und Heinemann 1994), wobei es von den NR2-Untereinheiten vier verschiedene Isoformen (NR2A-D) gibt. In der Amygdala ist der NMDA-Rezeptor aus einer Kombination aus NR1- mit NR2A- und/oder NR2B-Untereinheiten zusammengesetzt (Walker und Davis 2008). Um zu untersuchen, ob die Effekte von Xenon auf eine der beiden NR2-Untereinheiten zurückzuführen sind, wurden NMDA-Rezeptor-Stromantworten von Rezeptoren, die diese NR2-Untereinheiten enthalten, pharmakologisch isoliert. Zur Isolation von NR1/NR2A-NMDA-Rezeptoren wurde Ro 25-6981 (0,5  $\mu\text{M}$ ) eingewaschen, welches ein selektiver Antagonist der NMDA-Rezeptoren ist, die die NR2B-Untereinheit enthalten (Fischer et al., 1997). NR1/NR2B-NMDA-Rezeptoren wurden durch Zugabe von NVP-AAM077 (100  $\mu\text{M}$ ), einem Antagonisten für NMDA-Rezeptoren, die die NR2A-Untereinheit enthalten (Auberson et al. 2002; Berberich et al. 2005), isoliert.

#### 2.3.3.2 NonNMDA EPSC

Unter nonNMDA-Glutamat-Rezeptoren werden AMPA- und Kainat-Rezeptoren zusammengefasst. Die Zugabe von GYKI 52466, einem selektiven AMPA-Rezeptor-Antagonisten (Ouardouz und Durand 1991), blockierte zuvor gemessene nonNMDA EPSC vollkommen. Somit scheinen Kainat-Rezeptor-vermittelte Ionenströme bei der Vermittlung von nonNMDA EPSC nur eine geringe Rolle zu spielen, so dass im folgenden von AMPA EPSC gesprochen wird. Um zu untersuchen, inwiefern Xenon einen Einfluss auf die Desensibilisierung der AMPA-Rezeptoren hat, wurde Cyclothiazid (100  $\mu\text{M}$ ), ein selektiver Desensibilisierungsblocker (Partin et al. 1994; Fucile et al. 2006), zur ACSF hinzugegeben und danach die Wirkung von Xenon auf die AMPA-Rezeptor vermittelte glutamaterge Transmission untersucht.

### 2.3.4 Miniatur EPSC

Auch ohne vorausgehendes Aktionspotential werden aus den synaptischen Terminalen der Neurone spontan Transmitter-Vesikel freigesetzt. Diese lösen in der postsynaptischen Zelle Rezeptor-vermittelte Ionenströme aus, die als sogenannte miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) aufgezeichnet werden können. Eine Veränderung der Frequenz der mEPSC würde für eine verminderte präsynaptische Freisetzung von Vesikeln und somit für einen präsynaptischen Effekt einer pharmakologisch aktiven Substanz sprechen. Die mEPSC wurden unter Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Tetrodotoxin (TTX) aufgezeichnet. TTX ist ein Natriumkanalblocker, der verhindert, dass eine synaptische Transmitterfreisetzung durch spontan entstehende Aktionspotentiale ausgelöst wird. Somit entstehen unter diesen

Bedingungen die gemessenen mPSCs ausschließlich durch spontan an der Präsynapse freigesetzte Vesikel. Zur Isolierung von AMPA-Rezeptor vermittelten mEPSC wurden 50  $\mu\text{M}$  AP5, 200  $\mu\text{M}$  CGP35348 und 20  $\mu\text{M}$  BIM zur ACSF hinzugefügt. Die mEPSC wurden im Voltage-Clamp Modus bei einem eingestelltem Haltepotential von  $-70$  mV aufgezeichnet.

## 2.4 Bestimmung der Xenonkonzentration in der Messkammer

Nach 15 minütiger Sättigung des ACFS-Reservoirs mit der Xenongasmischung wurden aus der Messkammer des Mikroskops Proben entnommen und luftdicht verschlossen. In diesen wurden in Kooperation mit der Firma RCC Ltd. (Ittingen, Schweiz) mit Headspace Gaschromatographie die Konzentration von Xenon bestimmt. Diese betrug bei Sättigung mit 65 % Xe / 30 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>  $1,9 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$  (n=5).

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Xenonwirkung zu untersuchen wurden in einem Teil der Experimente zusätzlich niedrigere Konzentrationen von Xenon appliziert. Die Sättigung der ACSF mit Gasgemischen mit einem Anteil von 30, 18 und 5 Vol.-% Xenon führte zu gelösten Xenonkonzentrationen von  $1,1 \pm 0,1 \text{ mM}$ ,  $0,6 \pm 0,1 \text{ mM}$  und  $0,2 \pm 0,1 \text{ mM}$  (ebenfalls gaschromatographische Bestimmung, n = 4 je Konzentration).

## 2.5 Auswertung und Statistik

Die Ganzzelleableitungen wurden verstärkt, mit einem Tiefpass-Filter gefiltert (3 kHz) und danach mit einer Sampling-Frequenz von 9 kHz digitalisiert (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corp., Port Wahsington, USA). Die Aufzeichnung der Stromantworten erfolgte mit der Software „HEKA Pulse“ (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland), die Auswertung anschließend mit der Software Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA). Vor jeder elektrischen Stimulation wurde die Kommandospannung des Verstärkers sprunghaft für die Dauer von 200 ms um 10 mV gesenkt und die Zelle dadurch hyperpolarisiert. Dies führte zur einer Umladung der Zellmembran, welche in Abb. 2.5.1 als kapazitative Stromspitzen zu erkennen ist. Mit Hilfe dieses sog. Testpulses lassen sich die Membraneigenschaften der Zelle ( $R_M$ ,  $C_M$ ) und die Qualität der Ganzzelleableitung ( $R_S$ ) während des Experiments erfassen. Neben der Bestimmung der Amplitude des Stromflusses durch die Membran nach einer Stimulation wurde auch der Zeitverlauf der Stromantwort (Deaktivierungszeitkonstante, Ladungstransfer) ausgewertet. Im Einzelnen wurden folgende Parameter bestimmt:

Stromamplitude („peak“):

Die Stromamplitude beschreibt die maximale Auslenkung der Stromantwort von der Ausgangslinie in pA.

Ladungstransfer:

Der Ladungstransfer beschreibt den Ionenstrom, der über eine bestimmte Zeit, in diesem Fall für die Zeit der Ionenkanalöffnung, fließt. Er entspricht der Fläche unter dem Strom-Zeit-Diagramm und kann durch Integration der Fläche unter der Kurve bestimmt werden. Der Ladungstransfer wird in pAs angegeben.

Deaktivierungszeitkonstante ( $\tau$ ; Decay):

Der Stromabfall wird als Deaktivierung bezeichnet und üblicherweise mit einer Zeitkonstante  $\tau$  (in ms) angegeben. Diese Zeitkonstante kann computergestützt berechnet werden. Dazu wird mit einem Iterationsverfahren eine auf einer Exponentialfunktion basierenden Kurve so lange an die Messkurve angenähert, bis der Abstand zwischen beiden möglichst gering ist. Die Deaktivierungszeitkonstante kann dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$I(\tau) = I_0 \frac{1}{e}$$

Neben diesem monoexponentiellen Deaktivierungsverlauf kann auch ein biexponentieller Verlauf mit zwei Zeitkonstanten vorliegen. Dies ist z. B. bei Stromantworten üblich, die durch NMDA- oder GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren vermittelt werden. In diesem Fall wird das o. g. Iterationsverfahren mit einer auf einer Biexponentialfunktion basierenden Kurve durchgeführt.

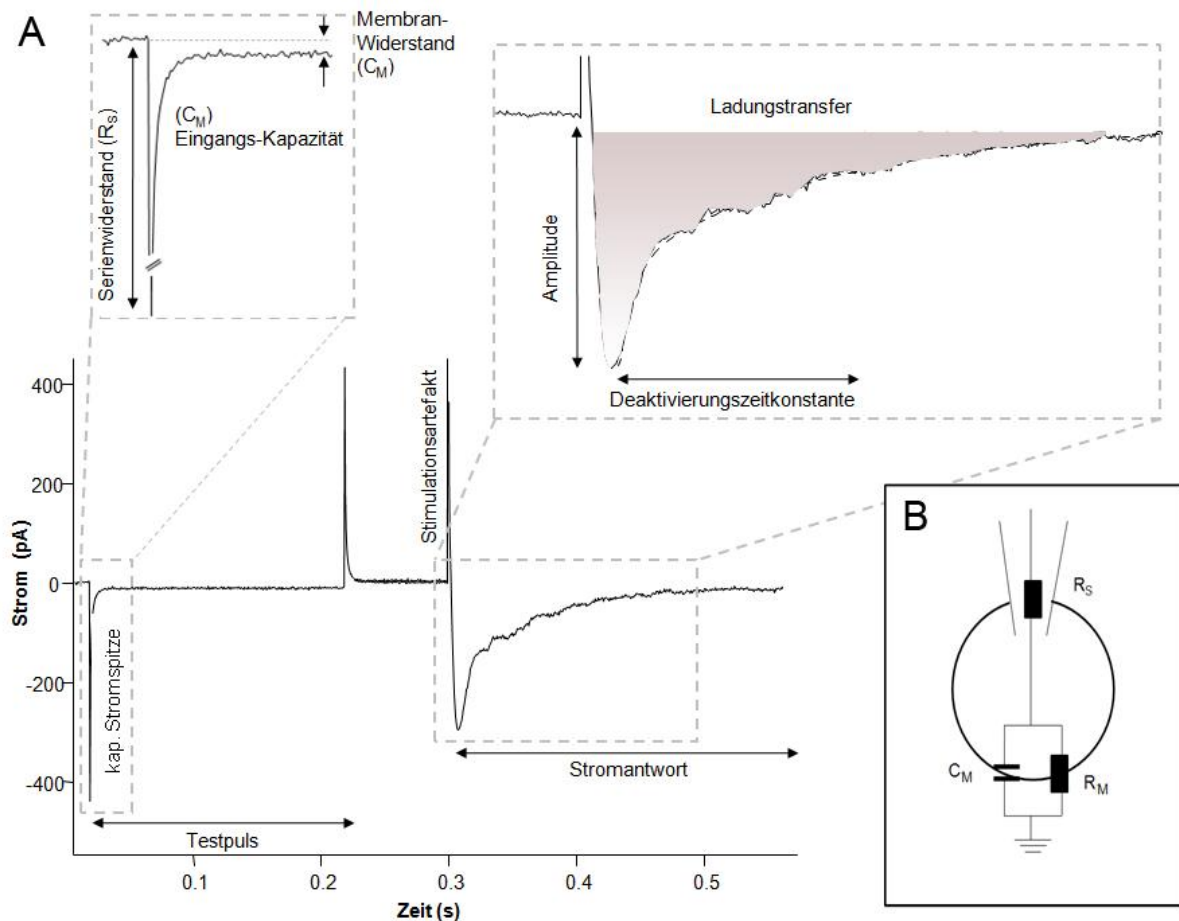
Membranwiderstand ( $R_M$ ):

Der Membranwiderstand wird durch den Ohm'schen Widerstand der Zellmembran gebildet. Aus dem Testpuls kann er aus der Stromdifferenz vor und nach der kapazitiven Stromspitze errechnet werden. Nachdem die Zellmembran im Testpuls vollständig umgeladen ist, wird der kapazitative Widerstand sehr groß. Somit fließt der Erhaltungsstrom ( $I_{\text{offset}}$ ), der das eingestellte Potential gegenüber dem Bad aufrechterhalten soll, durch den Membranwiderstand. Dieser kann also dann durch die Gleichung  $R_m = U / I_{\text{offset}}$  berechnet

werden. Hier wird vorausgesetzt, dass der Serienwiderstand ( $R_S$ ) viel kleiner als der Membranwiderstand ist und somit  $R_S$  vernachlässigt werden kann.

Serienwiderstand ( $R_S$ ):

Der Serienwiderstand wird durch den Widerstand der Pipetten sowie den Widerstand von Zellfragmenten, die die Pipettenmündung verlegen, gebildet. Während des Umladeprozesses hat der Kondensator einen sehr geringen, zu vernachlässigenden Widerstand. Somit wird der Membranwiderstand kurzgeschlossen und es ist nur noch der Serienwiderstand wirksam. Folglich kann der Serienwiderstand in der frühen Phase des Testpulses mit der Formel  $R_S = U / I_{\max}$  berechnet werden.



**Abb. 2.5.1: Berechnung der Messgrößen aus dem abgeleiteten Stromzeitverlauf.**

**A** Vor jeder Stimulation wurde das Kommandopotential des Verstärkers sprunghaft für die Dauer von 200 ms um 10 mV gesenkt (sog. Testpuls; links unten im Bild). Dies führt zu einer Umladung der Zellmembran, die an den kapazitiven Stromspitzen zu erkennen ist. Durch Bestimmung der Länge dieser kapazitiven Stromspitzen kann der Serienwiderstand ( $R_S$ ) errechnet werden. Nach vollkommener Umladung der Zellmembran ist der kapazitative Widerstand sehr hoch, so dass der Potentialerhaltungsstrom ( $I_{\text{offset}}$ ) über den Membranwiderstand abfließt.  $I_{\text{offset}}$  kann über Bestimmung der Differenz zwischen dem Strom vor und nach Umladung der Zelle errechnet werden. Nach dem Testpuls erfolgt nach einer kurzen Latenzphase die Stimulation. Durch Stimulation der synaptischen Verbindung zur abgeleiteten Zelle kommt es zur synaptischen Transmitterausschüttung und somit zum Ionenfluss durch die konsekutiv offenen ligandengesteuerten Ionenkanäle. Dieser ist in der Grafik als Stromantwort dargestellt. An der Stromantwort lässt sich die absolute Amplitude ablesen. Die Berechnung der Deaktivierungszeitkonstante erfolgt durch Annäherung einer auf einer Exponential- bzw. Biexponentialfunktion basierender Kurve an die Messkurve. Durch Integration der Fläche unterhalb der Stromantwort kann der Ladungstransfer (in pAs) bestimmt werden. **B** Schematische Darstellung der Ganzzelleableitung. Die Zelle ist in der Ganzzelleableitung mit dem Zellinneren leitend verbunden. Die Zellmembran ist ein umladbarer Widerstand zwischen zwei leitenden Medien und somit ein Kondensator mit einer bestimmten Kapazität ( $C_M$ ). Zusätzlich hat sie einen eigenen Widerstand ( $R_M$ ; Membranwiderstand), mit dem der Serienwiderstand ( $R_S$ ) in Serie geschaltet ist.



Um die einzelnen Experimente vergleichbar zu machen, wurden die Antworten der letzten 5 Minuten vor Beginn des Xenon-Einwasches auf 1,0 normalisiert und die Änderung der Amplituden als relative Veränderung zu diesem normalisierten Ausgangsniveau berechnet (relative Amplituden).

Zur Detektion der mEPSC wurde die Schwelle zur Detektion der Amplituden als dreifache Standardabweichung des Grundrauschens definiert. Die mEPSC wurden computergestützt detektiert und anschließend visuell verifiziert. Danach wurden die Frequenz und die Amplitude der Ereignisse bestimmt.

Die Datenzusammenfassung und die statistische Analyse erfolgten über Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Messwerte wurden mit Hilfe des Student's t-Test für unabhängige bzw. abhängige Daten auf signifikante Unterschiede überprüft. Signifikanz wurde ab  $p < 0,05$  angenommen. Mittelwerte werden in dieser Arbeit grundsätzlich mit dem zugehörigen SEM („standard error of the mean“)-Wert angegeben.

### 3 Ergebnisse

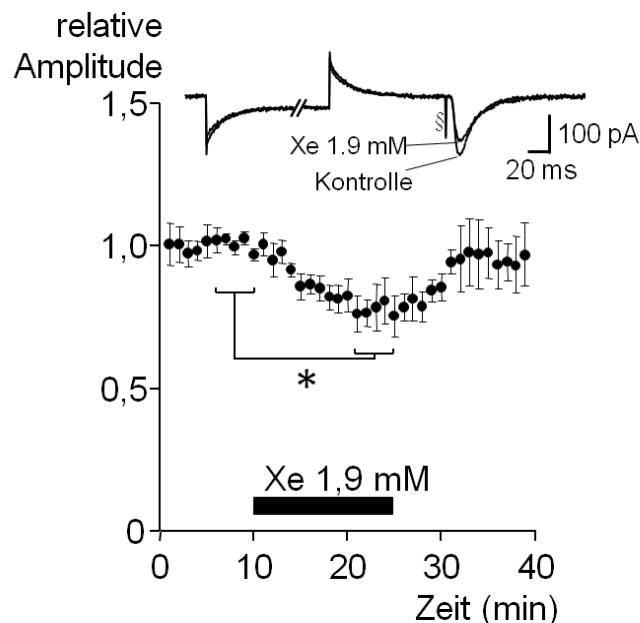
In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Inhalationsanästhetikums Xenon auf die synaptische Transmission in verschiedenen Arealen des ZNS untersucht. Zunächst wurde die Wirkung des Edelgases in der basolateralen Amygdala ausführlich charakterisiert. Darüberhinaus wurden Experimente in zwei weiteren Arealen des ZNS, dem präfrontalen Kortex sowie in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks durchgeführt, um eventuelle Differenzen bzgl. der Wirkung in diesen funktionell unterschiedlichen Arealen zu identifizieren.

#### 3.1 Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Transmission in der basolateralen Amygdala

Zunächst wurde der Einfluss von Xenon auf die basale synaptische Transmission untersucht. Hierzu wurden der ACSF keine Rezeptor-Antagonisten beigefügt. Anschließend wurden die einzelnen, Rezeptoren-spezifischen exzitatorischen und inhibitorischen Antworten pharmakologisch isoliert.

##### 3.1.1 Basale synaptische Transmission

Zur Untersuchung der Xenonwirkung auf die basale synaptische Transmission wurden die Zellen in der Ganzzelleableitung im Voltage-Clamp Modus auf  $-70$  mV geklemmt. Unter Sättigung der ACSF mit der Kontroll-Gasmischung (65 %  $N_2$  / 30 %  $O_2$  / 5 %  $CO_2$ ) wurden postsynaptische Stromantworten, evoziert durch elektrische Stimulation von Afferenzen aus dem lateralen Kerngebiet der Amygdala, aufgenommen. Waren die Antworten unter diesen Kontrollbedingungen mindestens zehn Minuten lang hinsichtlich ihrer Größe und Kinetik stabil, wurde die Stickstofffraktion der Begasung gegen Xenon ausgetauscht. Unter 15 minütiger Xenonapplikation wurden die basalen PSC auf  $80,2 \pm 4,2$  % der Kontrollantworten reduziert. Nach Beendigung der Xenonapplikation (Washout) erreichten die EPSC wieder das Ausgangsniveau (Abb. 3.1.1).



**Abb. 3.1.1: Xenon reduziert die synaptische Transmission in der BLA.**

Die videomikroskopisch identifizierten Neurone in der BLA wurden im Voltage Clamp Modus auf  $-70$  mV geklemmt und anschließend die durch elektrische Stimulation der Capsula externa hervorgerufenen Stromantworten in der Ganzzelleableitung aufgenommen.

Die oben abgebildeten Stromkurven zeigen Antworten eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von Xenon. Vor dem Stimulationsartefakt (§) findet sich der sog. Testpuls, bei dem die Zelle  $200$  ms um  $-10$  mV hyperpolarisiert wird. Hieraus lassen sich die Eigenschaften der Zelle wie der Haltestrom, der Serienwiderstand (Pipettenwiderstand) und der Eingangswiderstand (Membranwiderstand) bestimmen, und somit die Ableitbedingungen während des Experiments überwachen.

In der Grafik sind die relativen Amplituden (y-Achse) über der Zeit (x-Achse) aufgetragen. Die Symbole des Diagramms stellen die gemittelten relativen Amplituden der einzelnen Experimente  $\pm$  SEM dar.

Unter Kontrollbedingungen wurde die ACSF mit einem Gasgemisch aus  $65\%$   $N_2$ ,  $30\%$   $O_2$  und  $5\%$   $CO_2$  gesättigt bis die Amplituden der EPSC über mindestens zehn Minuten ein stabiles Niveau erreicht hatten. Zur Applikation von Xenon wurde der Stickstoffanteil im Gasgemisch gegen Xenon ( $65\%$ ) ausgetauscht. Die gaschromatographische Bestimmung des gelösten Xenon in der ACSF ergab eine Konzentration von  $1,9 \pm 0,2$  mM Xe. Um die Experimente vergleichbar zu machen wurden Amplituden während der letzten fünf Aufnahmeminuten unter Kontrollbedingungen auf  $1,0$  ( $100\%$ ) normalisiert und dann die relativen Amplituden der einzelnen Experimente gemittelt. Xenon reduzierte die Amplituden der basalen PSC auf  $80,2 \pm 4,2$  ( $n = 5$ ). Nach Beendigung der Xenonapplikation erreichten die Stromantworten wieder das Ausgangsniveau. \*  $p < 0,05$ .

Die passiven Membraneigenschaften der Zellen (Membranwiderstand, Serienwiderstand und Ruhemembranpotential) änderten sich unter Xenonapplikation nicht (Tab. 3.1.1).

### Passive Eigenschaften der Neurone

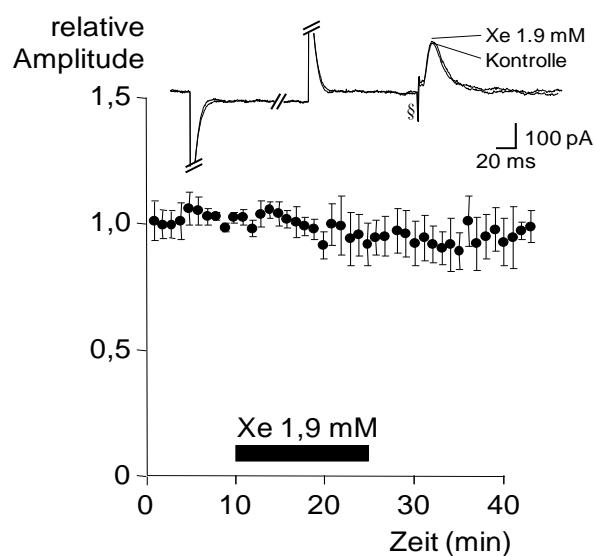
	Kontrolle	Xe 1,9 mM	Washout
RMP (mV)	$-66,4 \pm 1,1$	$-65,1 \pm 1,5$ (#)	$-66,5 \pm 1,5$ (##)
$R_M$ (M $\Omega$ )	$292,2 \pm 28,1$	$281,1 \pm 27,2$ (#)	$270,2 \pm 30,0$ (##)
$R_S$ (M $\Omega$ )	$15,5 \pm 1,4$	$15,9 \pm 1,5$ (#)	$15,3 \pm 1,4$ (##)

**Tabelle 3.1.1: Die passiven Membraneigenschaften der abgeleiteten Neurone werden durch Xe nicht verändert.**

Das Ruhemembranpotential (RMP) wurde vor, während sowie nach Xenonapplikation durch Umschalten des Verstärkers in den sog. Bridge-Mode kontrolliert, und der Membranwiderstand ( $R_M$ ) sowie der Serienwiderstand ( $R_S$ ) wurden während des Experiments aufgezeichnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der einzelnen Experimente  $\pm$  S.E.M ( $n = 5-13$ ). Xe hatte keinen Einfluss auf die passiven Membraneigenschaften sowie das Ruhemembranpotential der abgeleiteten Neurone. # nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; ## nicht signifikant unterschiedlich zur Xenongruppe.

### 3.1.2 Inhibitorische GABAerge Transmission

Zur Ableitung GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelter IPSC wurden die exzitatorischen Rezeptoren sowie der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor pharmakologisch blockiert und das Haltepotential während der Aufzeichnung auf  $-50$  mV gesetzt. Xenon hatte keinen Einfluss auf die Amplitude der GABA<sub>A</sub> IPSC (Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.1.2: Das Inhalationsanästhetikum verändert die Amplitude von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelter IPSC nicht.**

Um den Einfluss von Xenon auf die GABA<sub>A</sub>erge Transmission zu untersuchen wurden GABA<sub>A</sub> IPSC pharmakologisch isoliert. Dazu wurden die Schnittpräparate mit den spezifischen Antagonisten AP5 (NMDA-Rezeptorantagonist), NBQX (AMPA- und Kainatrezeptorantagonist) und CGP 35348 (GABA<sub>B</sub>-Rezeptorantagonist) inkubiert. Xenon hatte keinen Einfluss auf die Amplitude der GABA<sub>A</sub> IPSC.

GABA<sub>A</sub> IPSC weisen typischerweise eine biexponentielle Deaktivierungskinetik auf (Jones et al. 1995; Krampfl et al. 1998). Entsprechend wurden zur Beschreibung dieser Kinetik zwei Zeitkonstanten „ $\tau_{\text{decay}}$  schnell“ und „ $\tau_{\text{decay}}$  langsam“ ermittelt. Xenon verlängerte statistisch signifikant und reversibel die schnelle Komponente des Stromabfalls ( $\tau_{\text{decay}}$  schnell) GABA<sub>A</sub>erger IPSC. Xenon hatte jedoch keinen Einfluss auf die langsame Komponente des Stromabfalls ( $\tau_{\text{decay}}$  langsam) und auf den Ladungstransfer (charge), der durch Integration der Fläche unter den jeweiligen Stromkurven bestimmt wurde (Tab. 3.1.2).

**GABA<sub>A</sub> IPSC**

	Kontrolle	Xenon 1,9 mM	Washout
$\tau_{\text{decaV}}$ schnell (ms)	15,4 ± 2,2	21,2 ± 3,3 (*)	15,7 ± 1,4 (*)
$\tau_{\text{decay}}$ langsam (ms)	33,8 ± 11,8	30,8 ± 9,2 (#)	43,5 ± 26,5 (##)
Ladungstransfer (pAs)	4,3 ± 1,5	3,9 ± 1,0 (#)	3,6 ± 0,7 (##)

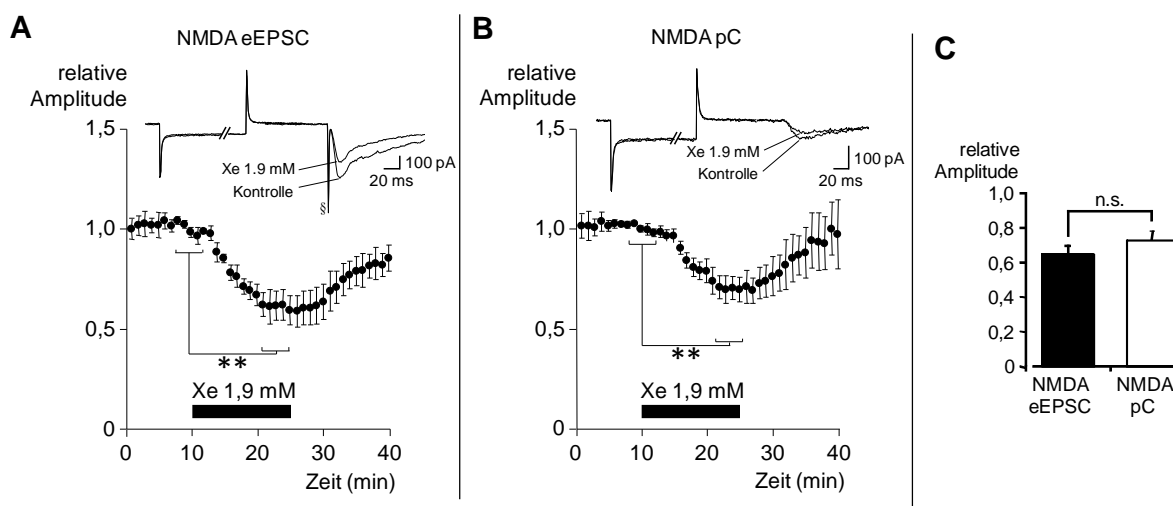
**Tabelle 3.1.2: Xenon verlängert die schnelle Zeitkomponente der Deaktivierungszeitkonstante des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors.**

Durch Annäherung einer auf einer biexponentiellen Funktion basierenden Kurve an die Messkurve wurden die beiden Zeitkomponenten ( $\tau_{\text{decaV}}$  schnell und  $\tau_{\text{decay}}$  langsam) der Deaktivierungszeitkonstante (decay)  $\tau$  bestimmt. Zusätzlich wurde der Ladungstransfer durch Integration der Fläche unter der Stromkurve berechnet. Xenon verlängerte  $\tau_{\text{decaV}}$  schnell signifikant und reversibel, wohingegen die langsame Konstante unverändert blieb. Die Verlängerung der schnellen Komponente des Decay wirkte sich aber nicht im Sinne einer Vergrößerung des Ladungstransfers aus, der unter Xenonapplikation nicht signifikant verändert wurde. (\*  $p < 0,05$  Xenon versus Kontrolle bzw. Washout versus Xenon; # nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; ## nicht signifikant unterschiedlich zu Xenon).

Die glutamaterge synaptische Transmission wird durch NMDA- und AMPA-Rezeptoren vermittelt. Um die Wirkung von Xenon auf NMDA bzw. AMPA-Rezeptor vermittelte EPSC zu untersuchen, wurden die jeweiligen EPSC durch spezifische Antagonisten isoliert. Die Stromantworten wurden dabei einerseits durch elektrische Stimulation (eEPSC), andererseits durch photolytische Freisetzung von Glutamat (pC) hervorgerufen.

### 3.1.2.1 NMDA-Rezeptor-vermittelte Stromantworten

Zur pharmakologischen Isolierung NMDA-Rezeptor-vermittelter Antworten wurden die Schnittpräparate mit den spezifischen Antagonisten NBQX, CGP 35348 und Bicucullin inkubiert. Um eine Vordepolarisation des Neurons und damit Verminderung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockade der NMDA-Rezeptoren zu erzielen, wurde bei einem Haltepotential von  $-40\text{mV}$  aufgezeichnet. Xenon reduzierte die elektrisch evozierten NMDA-Ströme (NMDA eEPSC) reversibel auf  $64,6 \pm 5,3$  % des Ausgangsniveaus ( $n = 6$ ; Abb. 3.1.3 A). Die durch photolytische Freisetzung von Glutamat hervorgerufenen Stromantworten (NMDA pC) wurden ebenfalls reversibel auf  $72,9 \pm 5,1$  % ( $n = 6$ ) verringert (Abb. 3.1.3 B), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen dem Effekt von Xenon auf NMDA eEPSC und NMDA pC festzustellen war ( $p > 0,05$ ; Abb. 3.1.3 C).



**Abb. 3.1.3: Xenon reduziert NMDA-vermittelte-Ströme bei elektrischer und bei photolytischer Stimulation gleichermaßen.**

Zur Untersuchung der Xenonwirkung auf NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme wurden zwei unterschiedliche Stimulationsarten verwendet. Einerseits wurden die synaptischen Verbindungen zur abgeleiteten Zelle elektrisch stimuliert (NMDA eEPSC; **A**) und andererseits wurde durch Infrarot gelenkte photolytische Spaltung von CNB-caged-Glutamat (100  $\mu$ M) mit Hilfe eines UV-Lasers die synaptische Transmitterfreisetzung imitiert (NMDA pC; **B**). Durch Applikation von Xenon (1,9 mM) wurden NMDA eEPSC auf  $64,6 \pm 5,3$  % (**A**,  $n = 6$ ), photolytisch evozierte NMDA pC auf  $72,9 \pm 5,1$  % (**B**,  $n = 6$ ) verringert. **C** Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Xenonbedingten Reduktion von NMDA eEPSC und NMDA pC ( $p > 0,05$ ). Als Balkendiagramm dargestellt sind hier jeweils die über die letzten 5 Minuten des Xenoneinwasches gemittelten relativen Amplituden von NMDA eEPSC und NMDA pC. (\*\*  $p < 0,01$ ).

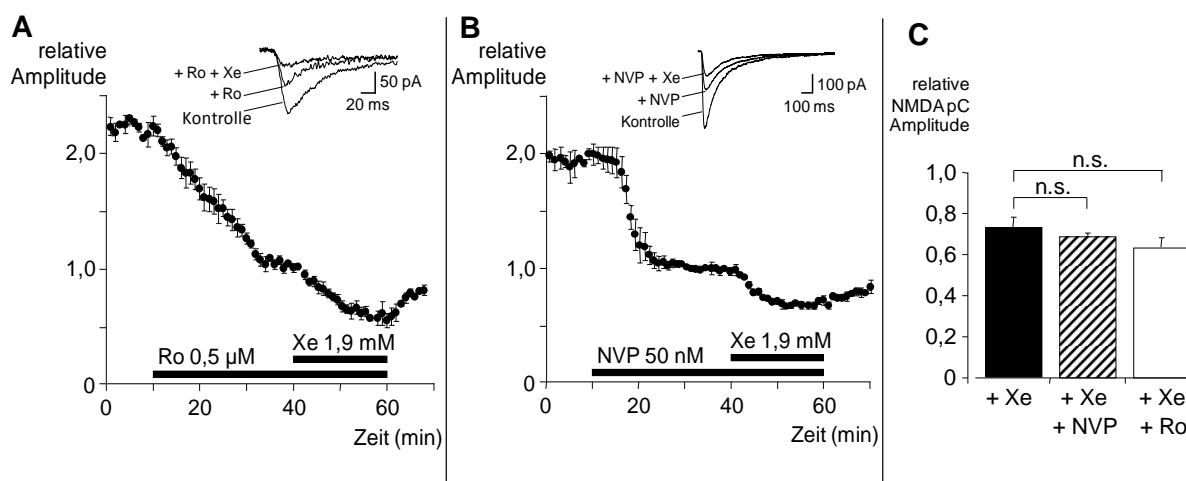
Die Deaktivierungskinetik NMDA-Rezeptor-vermittelter Stromantworten lässt sich typischerweise durch eine biexponentielle Funktion, d. h. durch zwei Zeitkonstanten beschreiben. Das Inhalationsanästhetikum Xenon veränderte diese Deaktivierungs-Zeitkonstanten nicht (Tabelle 3.1.3 und Abb. 3.1.6.).

	NMDA eEPSC		
	Kontrolle	Xenon 1,9 mM	Washout
$\tau_{\text{decaV}}$ schnell (ms)	$14,4 \pm 3,7$	$17,2 \pm 2,7$ (#)	$22,5 \pm 9,1$ (##)
$\tau_{\text{decay}}$ langsam (ms)	$55,2 \pm 14,5$	$44,6 \pm 14,8$ (#)	$62,5 \pm 23,7$ (##)

**Tabelle 3.1.3: Xenon hat keine Einfluss auf die Kinetik NMDA-Rezeptor-vermittelter Antworten in der BLA.**

Weder die schnelle noch die langsame Zeitkonstante der Deaktivierungskinetik der NMDA eEPSC wurde durch Xenon verändert. (# nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; ## nicht signifikant unterschiedlich zu Xenon).

In der Amygdala setzt sich der NMDA-Rezeptor aus den Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B zusammen (Monyer et al. 1992; Sah et al. 2003). Um zu untersuchen, inwiefern die Wirkung von Xenon auf NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme abhängig von der NR2A- bzw. NR2B-Untereinheit des Rezeptors ist, wurden NMDA pC aufgezeichnet und durch selektive Antagonisten jeweils eine der beiden Untereinheiten blockiert (Abb. 3.1.4 A & B). Die dann gemessenen postsynaptischen Ströme wurden also nur von NMDA-Rezeptoren vermittelt, die die jeweils blockierte Untereinheit nicht enthielten. Nach Applikation der Antagonisten nahmen die Amplituden der NMDA-Stromantworten stark ab und erreichten nach 20–30 Minuten ein stabiles Niveau. Die darauffolgende zusätzliche Reduktion der NMDA pC durch Xenon zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen ohne Blockade der NR2A- bzw. der NR2B-Untereinheit (Abb. 3.1.4 C).



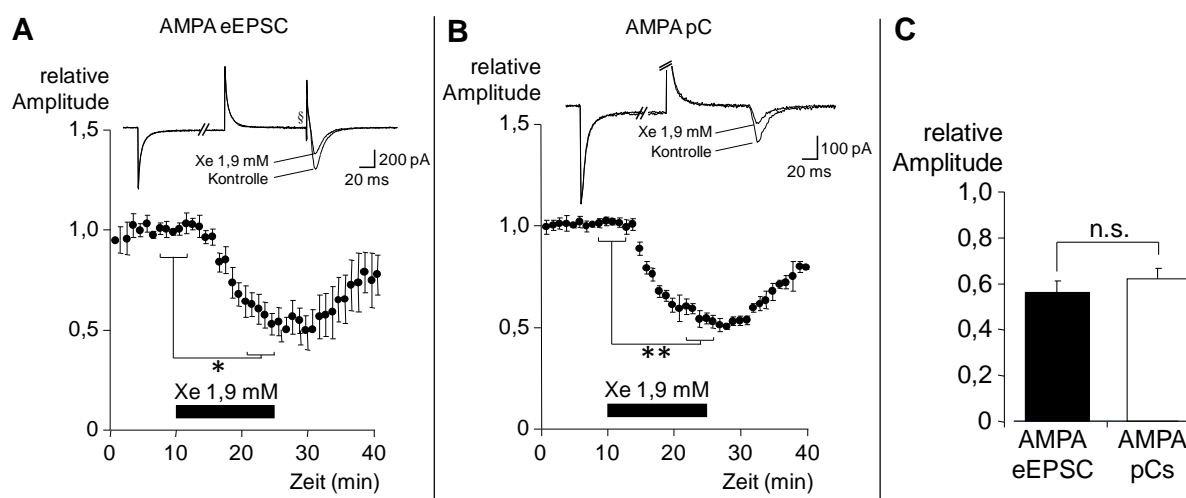
**Abb. 3.1.4: Die Wirkung von Xenon auf NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten unter Blockade der NR2A- bzw. NR2B-Untereinheit unterscheidet sich nicht von der Xenonwirkung auf NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten ohne Untereinheitenblockade.**

**A** Die Applikation von Ro 25–6981, ein selektiver Antagonist der NR2B-Untereinheit, bewirkte eine deutliche Reduktion von NMDA pCs. Da die NR2B-Untereinheit für die langandauernde Öffnung des Kanals mit entsprechend langsamer Deaktivierungskinetik der Stromantworten verantwortlich ist, verkürzten sich dabei auch die Stromantworten. Ca. 40 Minuten nach Beginn der Ro 25–6981-Applikation hatten die Antworten ein stabiles Niveau erreicht, sodass dann mit der Applikation von Xenon begonnen wurde. Xenon reduzierte die Amplitude zusätzlich reversibel auf  $69,8 \pm 3,7$  % ( $n = 6$ ) des Kontrollniveaus (unter NR2B-Blockade). **B** NVP-AAM077, ein Antagonist, der vorzugsweise die NR2A-Untereinheit blockiert, bewirkte ebenfalls eine Verringerung der NMDA pC, sowie eine Verlängerung der Deaktivierungskinetik der NMDA pC. Unter konsekutiver Xenonapplikation verringerte sich die Amplitude der NMDA pC zusätzlich reversibel auf  $68,9 \pm 1,5$  % ( $n = 6$ ) des Kontrollniveaus (unter NR2A-Blockade). **C** Die Xenon-bedingte Reduktion von NMDA pC ohne Blockade der NR2A oder NR2B Untereinheiten unterschied sich nicht von der Reduktion von NMDA pC mit blockierter NR2A oder NR2B Untereinheit. Die Balkendiagramm stellen jeweils die über die letzten fünf Minuten des Xenoneinwasches gemittelten relativen Amplituden der NMDA pC dar.



### 3.1.2.2 AMPA-Rezeptoren

AMPA eEPSC und AMPA pC wurden bei einem Haltepotential von  $-70$  mV und in Anwesenheit spezifischer Antagonisten der GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>B</sub>-, und NMDA-Rezeptoren aufgezeichnet. Die Applikation von Xenon verringerte signifikant AMPA vermittelte eEPSC auf  $56,2 \pm 4,9\%$  ( $n = 6$ ; Abb. 3.1.5 A, bzw. AMPA pC auf  $62,1 \pm 4,8\%$  ( $n = 6$ ; Abb. 3.1.5 B) des Ausgangswertes. Die Reduktion der Amplituden war reversibel und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Reduktion der elektrisch bzw. photolytisch hervorgerufenen Stromantworten (Abb. 3.1.5 C).



**Abb. 3.1.5: Xenon reduziert im gleichem Ausmaß AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme auf elektrische bzw. photolytische Stimulation.**

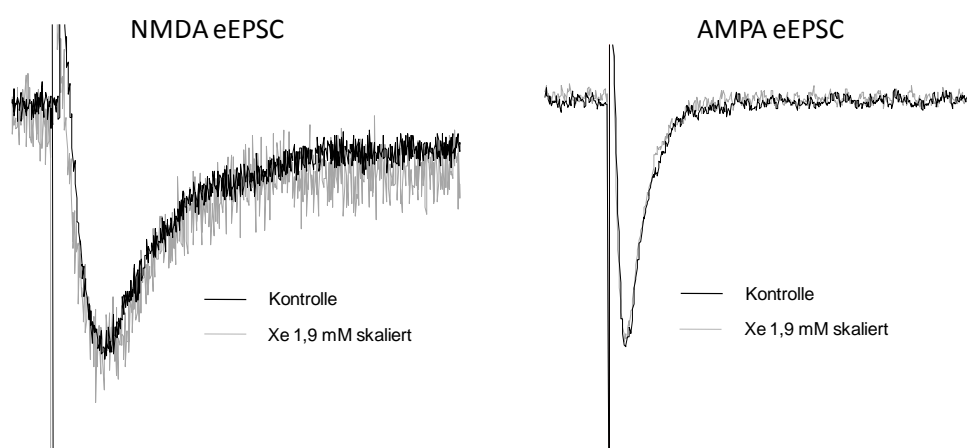
Im vitalen Hirnschnittpräparat der basolateralen Amygdala wurden sowohl durch elektrische Stimulation (AMPA eEPSC, **A**) als auch durch photolytische Freisetzung von Glutamat (AMPA pC, **B**) hervorgerufene AMPA-Rezeptor vermittelte Antworten durch Xenon reversibel vermindert. **C** Zwischen der Xenon-vermittelten Reduktion der Amplituden der AMPA eEPSC bzw. AMPA pC war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dieser fehlende Unterschied lässt sich am ehesten durch einen postsynaptischen Mechanismus erklären.

Die Deaktivierungsphase von AMPA eEPSC wird typischerweise mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben. Die daraus errechnete Deaktivierungszeitkonstante  $\tau$  änderte sich unter Xenon-Applikation nicht (Tabelle 3.1.4 und Abb. 3.1.6.).

AMPA eEPSC			
	Kontrolle	Xe 1,9 mM	Washout
$\tau_{\text{decay}}$ (ms)	10,4 ± 1,0	9,7 ± 1,4 (#)	10,9 ± 1,7 (##)

**Tabelle 3.1.4: Xe beeinflusst die Kinetik der AMPA-Rezeptoren in der BLA nicht.**

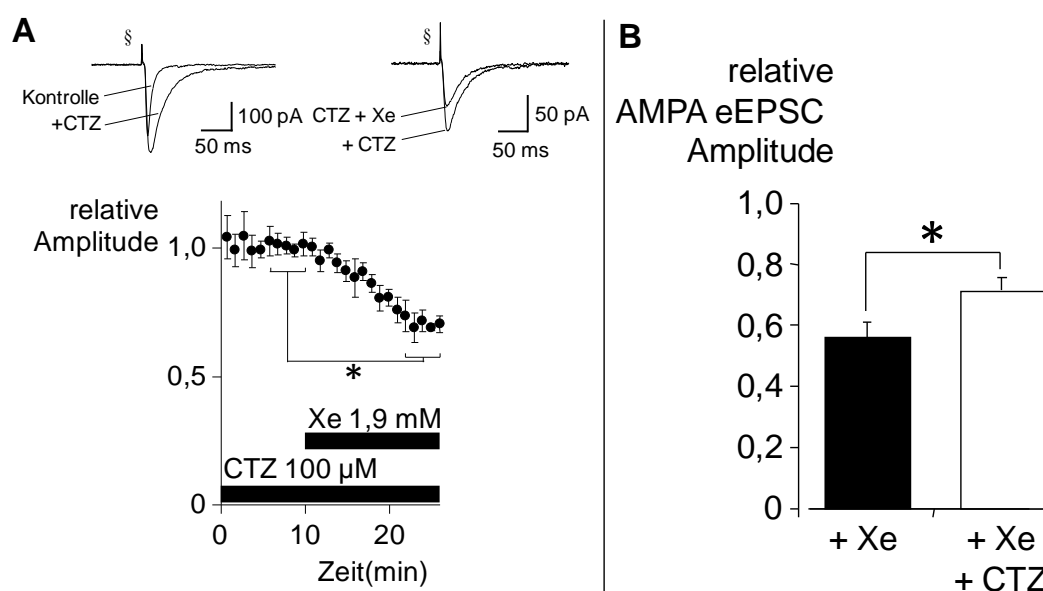
Die Deaktivierungszeitkonstante  $\tau$  der AMPA eEPSC wurde durch Xenon nicht verändert. (# nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; ## nicht signifikant unterschiedlich zu Xenon)



**Abb. 3.1.6: Xenon hat keinen Einfluss auf die Kinetik NMDA bzw. AMPA-Rezeptor vermittelter Stromantworten in der Amygdala.**

Die Abbildung zeigt Original-Stromantworten repräsentativer Experimente, aufgenommen von Neuronen der basolateralen Amygdala. Jeweils in Schwarz ist eine Stromantwort unter Kontrollbedingungen dargestellt, in Grau sind Antworten unter Xenon-Applikation abgebildet. Diese sind so skaliert, dass die Amplituden mit denen der Kontrollantworten übereinstimmen. In der Abbildung ist gut zu erkennen, dass der Verlauf des Stromabfalls der Kontrollantworten und der skalierten Antworten unter Xenonapplikation nahezu nicht unterscheidet.

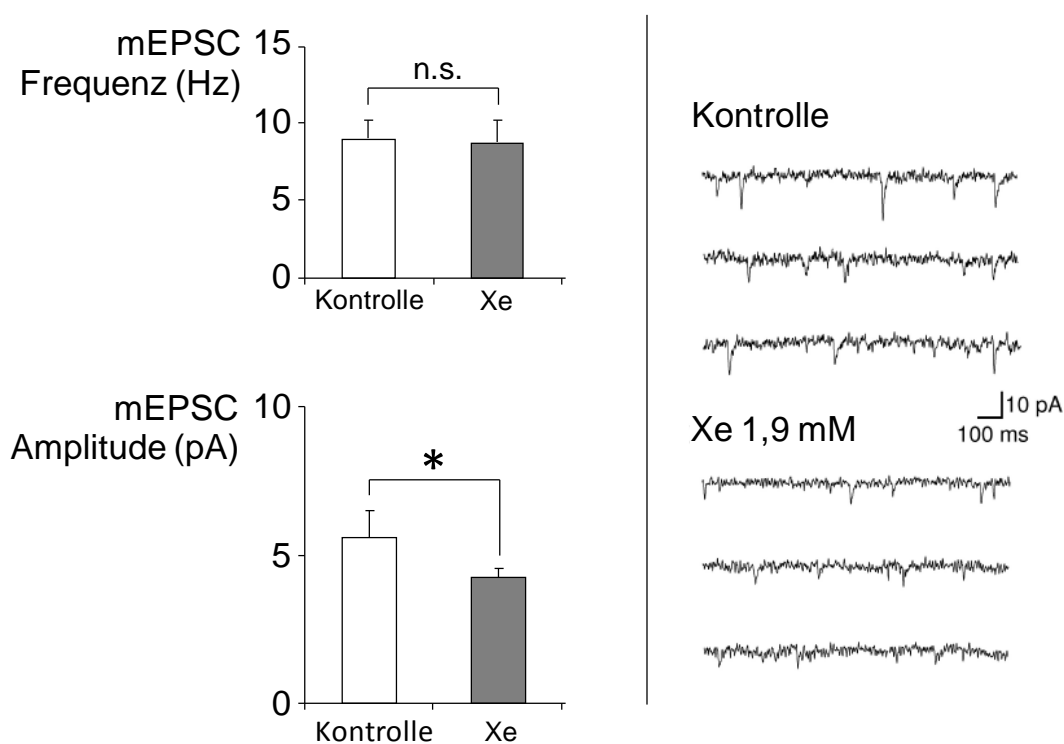
Eine Arbeit mit an heterolog exprimierten AMPA-Rezeptoren durchgeführten Experimenten beschreibt, dass AMPA-Rezeptor vermittelte Antworten nur dann von Xenon beeinflusst werden, wenn die Rezeptoren nur gering desensibilisieren (Plested et al., 2004). Desensibilisierung beschreibt eine Abnahme des Stromfluss in der Gegenwart des Agonisten. In den folgenden Experimenten wurde versucht, diese Ergebnisse an Stromantworten im vitalen Hirn-Schnittpräparat nachzuvollziehen. Dabei wurden AMPA eEPSC in Anwesenheit des Desensibilisierungsblockers Cyclothiazid (CTZ; 100  $\mu$ M) aufgezeichnet. Die Xenon-bedingte Reduktion der Amplitude der AMPA eEPSC betrug unter CTZ  $71,4 \pm 3,7\%$  ( $n = 5$ ) und war damit signifikant geringer als die Xenon-bedingte Reduktion bei Experimenten, bei denen die Desensibilisierung nicht durch CTZ blockiert wurde.



**Abb. 3.1.7: Die Blockade der Desensibilisierung der AMPA-Rezeptoren verringert den Effekt von Xenon auf AMPA eEPSC.**

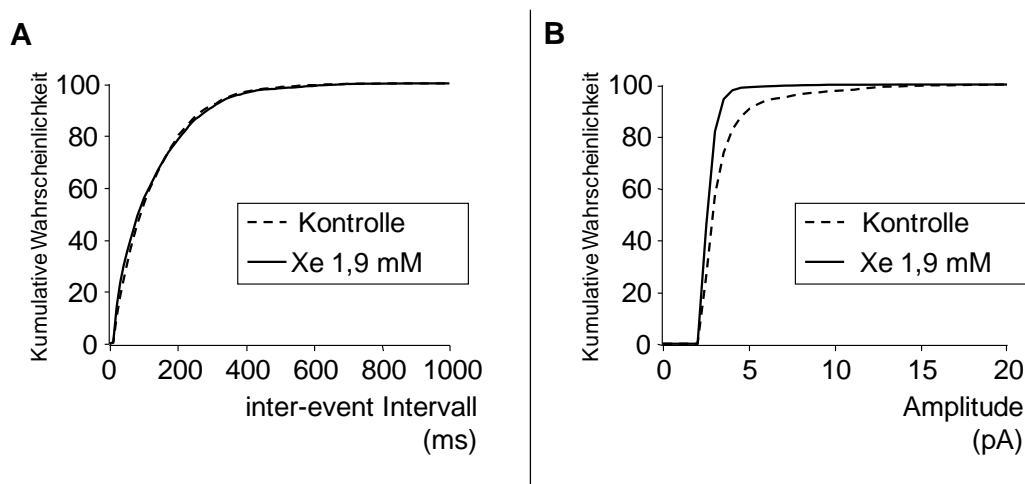
Cyclothiazid (CTZ) hemmt die Desensibilisierung der AMPA-Rezeptoren. Um zu untersuchen, ob Xenon einen Einfluss auf die Desensibilisierung der AMPA-Rezeptoren hat, wurde Experimente unter Anwesenheit von CTZ durchgeführt. **A** Durch Blockade der Desensibilisierung mittels CTZ (100  $\mu$ M) verlängerte sich die Öffnungszeit des Rezeptors und die Amplitude nahm zu (oben rechts). Anschließende Xenonapplikation führte zu einer Verringerung der AMPA eEPSC auf  $71,4 \pm 3,7\%$  ( $n = 5$ ) des Ausgangsniveaus. **B** Unter Anwesenheit von CTZ war der Effekt von Xe auf die Amplitude der AMPA eEPSC signifikant geringer als bei den Experimenten ohne CTZ ( $71,4 \pm 3,7\%$  mit CTZ bzw.  $56,2 \pm 4,9\%$  ohne CTZ;  $p < 0,05$ ).

Die AMPA-Rezeptor vermittelten mEPSC wurden bei einem Haltepotential von  $-70$  mV und pharmakologischer Blockade der NMDA-, GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aufgezeichnet. Zunächst wurde getestet, ob sich von den abgeleiteten Neuronen auf elektrische Stimulation hin AMPA eEPSCs aufzeichnen ließen. Anschließend wurde Tetrodotoxin (TTX), ein Antagonist der spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanäle, zur ACSF hinzugefügt, um die Ausbildung spontaner Aktionspotentiale zu verhindern. Unter diesen Bedingungen repräsentieren mEPSC ausschließlich Stromantworten welche auf spontane präsynaptische Vesikelfreisetzen zurückzuführen sind. Die gemittelte Frequenz der mEPSC betrug  $8,9 \pm 1,3$  Hz bei einer mittleren Amplitude von  $5,6 \pm 0,9$  pA. Nach Applikation von Xenon verringerte sich die gemittelte Amplitude der mEPSC signifikant auf  $4,1 \pm 0,3$  pA, die Frequenz hingegen änderte sich nicht (Abb. 3.1.8 und 3.1.9).



**Abb. 3.1.8: Xenon reduziert die Amplitude von AMPA mEPSC in der BLA, hat jedoch keinen Einfluss auf deren Frequenz.**

Die durch spontane Transmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Terminale zustande kommenden postsynaptischen Stromantworten werden als Miniatur EPSC (mEPSC) bezeichnet. **A** Die Frequenz der abgeleiteten mEPSC in der BLA betrug  $8,9 \pm 1,3$  Hz und änderte sich unter dem Einfluss von Xenon nicht. Die mittlere Amplitude der mEPSC betrug  $5,6 \pm 0,9$  pA und verringerte sich nach Applikation von Xenon signifikant auf  $4,1 \pm 0,3$  pA ( $n = 5$ ). **B** zeigt die Original-mEPSC eines repräsentativen Experiments. Deutlich erkennbar ist die Abnahme der Amplitude bei unveränderter Frequenz.

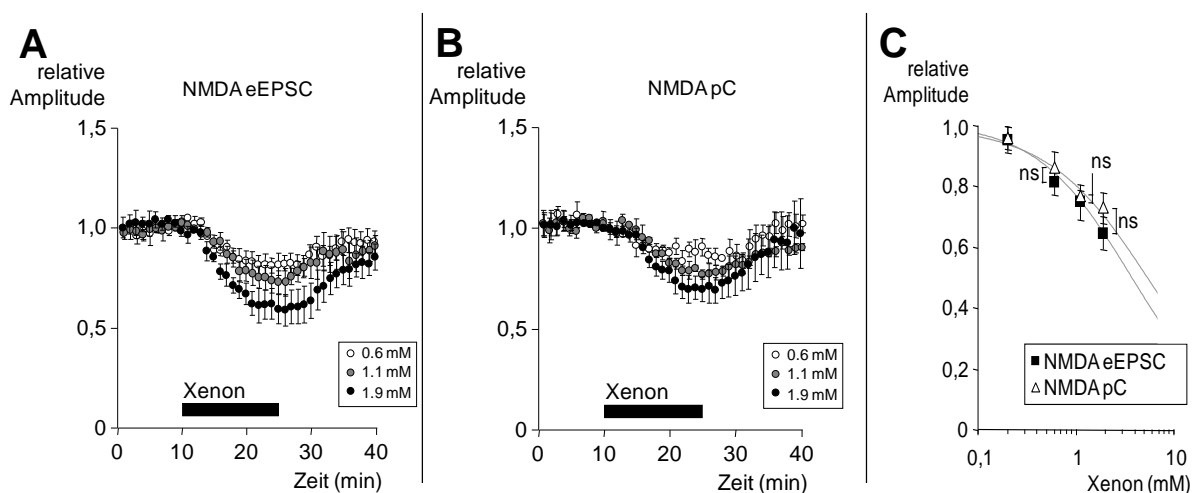


**Abb. 3.1.9: Kumulative Wahrscheinlichkeiten des inter-Event Intervalls und der Amplituden unter Kontrollbedingungen und dem Einfluss von Xenon.**

In den Diagrammen sind zum einen die kumulative Wahrscheinlichkeit für die Intervalle zwischen einzelnen mEPSC (sog. Inter-Event-Intervalle; **A**), zum anderen die kumulative Wahrscheinlichkeit für mEPSC Amplituden (**B**) jeweils mit und ohne Xenon dargestellt. Die Verteilung der Inter-Event-Intervalle der Kontroll- und Xenon-mEPSC unterscheidet sich nicht, die Verteilung der Amplituden ist unter Xenon jedoch in Richtung kleinerer Amplituden verschoben.

### 3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Xenonwirkung auf die glutamaterge Transmission

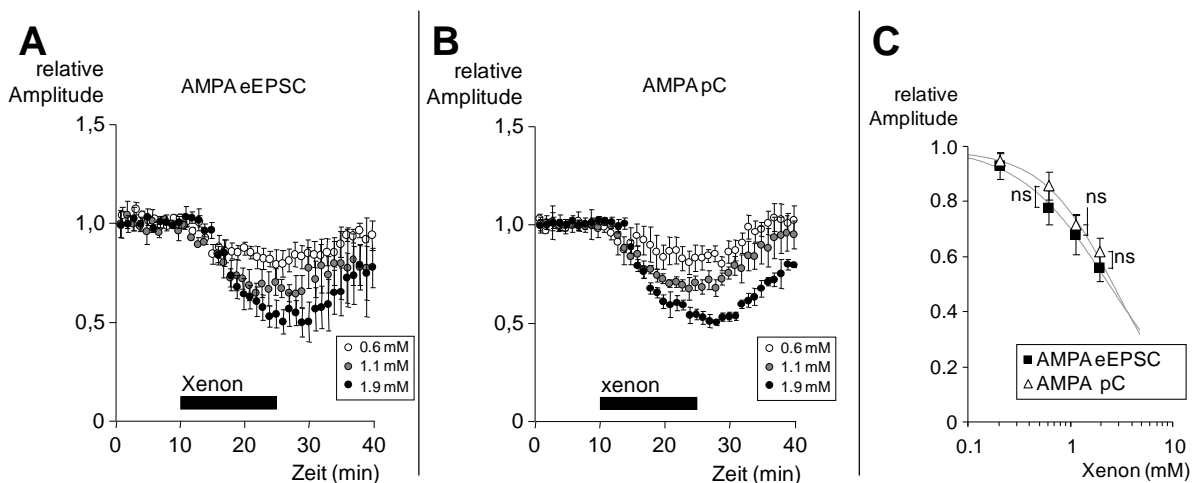
In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Wirkung von Xenon auf AMPA und NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten konzentrationsabhängig ist. Dazu wurden Gasgemische mit 30 % (1,1 mM) bzw. 18 % (0,6 mM) Xenon verwendet. Der Stickstoffanteil wurde in den Gasgemischen entsprechend vergrößert, wobei die Sauerstoff- sowie die Kohlendioxidfraktion unverändert blieben. Unter dem Einfluss von 1,1 mM (0,6 mM) Xenon wurden die elektrisch evozierten NMDA eEPSC auf  $74,8 \pm 5,9$  % ( $81,2 \pm 4,1$  %) und die photolytisch stimulierten NMDA pC auf  $76,8 \pm 1,9$  % ( $86,3 \pm 4,9$  %) des Ausgangsniveaus ( $n = 4$  je Konzentration und Messparameter) reduziert (Abb. 3.1.10). Bei keiner Konzentration zeigten sich signifikante Unterschiede bzgl. der Xenon-bedingten Reduktion der elektrisch evozierten und photolytisch hervorgerufen NMDA-Rezeptor-Stromantworten.



**Abb. 3.1.10: Xenon reduziert NMDA eEPSC und NMDA pC konzentrationsabhängig.**

**A und B** Unter Applikation von 1,1 mM Xenon verminderte sich die Amplitude der NMDA eEPSC auf  $74,8 \pm 5,9 \%$  ( $n = 4$ ) und die der NMDA pC auf  $76,8 \pm 1,9 \%$  ( $n = 4$ ) des Ausgangsniveaus. Die Unterschiede zwischen Applikation von 1,9 mM Xenon und 1,1 mM Xenon waren nicht signifikant. **C** Xenon reduziert NMDA eEPSC und NMDA pC dosisabhängig. Das Ausmaß der Xenon-bedingten Reduktion von NMDA eEPSC versus NMDA pC war bei keiner der Xenonkonzentrationen unterschiedlich.

Bei AMPA eEPSC bzw. AMPA pC bewirkte 1,1 mM (0,6 mM) Xenon eine Abnahme der Amplitude auf  $68,3 \pm 7,2 \%$  ( $78,0 \pm 6,1 \%$ ) bzw.  $71,9 \pm 3,2 \%$  ( $86,0 \pm 5,0 \%$ ) (Abb. 3.1.11;  $n = 4$  je Konzentration und Messparameter).



**Abb. 3.1.11: Xenon verringert AMPA eEPSC und AMPA pC konzentrationsabhängig.**

**A und B** Reversible, konzentrationsabhängige Reduktion von AMPA eEPSC und AMPA pC durch 1,1 bzw. 0,6 mM Xenon. ( $n = 4$  je Konzentration und Messparameter) **C** Das Ausmaß der Xenon-bedingten Reduktion von AMPA eEPSC versus AMPA pC war bei keiner der Xenonkonzentrationen unterschiedlich.

Die Applikation von 0,2 mM Xenon bewirkte keine signifikante Abnahme der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme (NMDA eEPSC  $95,3 \pm 4,3$  %; NMDA pC  $96,0 \pm 3,8$  %; jeweils  $n = 5$ ) bzw. der AMPA-Rezeptor-vermittelten-Ströme (AMPA eEPSC  $93,1 \pm 4,7$  %; AMPA pC  $95,3 \pm 2,9$  %; jeweils  $n = 6$ ).

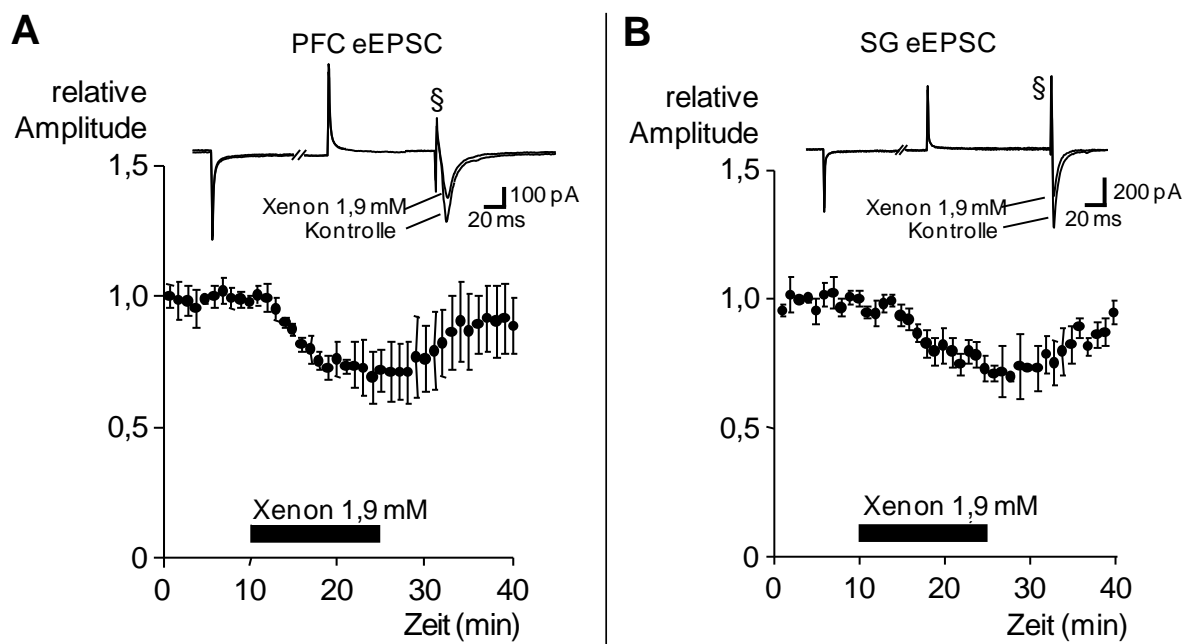
Der berechnete  $IC_{50}$ -Wert von Xenon betrug 3,5 mM (Hill-Koeffizient: -1,0) bei NMDA eEPSC und 2,3 mM (Hill-Koeffizient: -1,0) bei AMPA eEPSC. Für die durch photolytische Freisetzung von Glutamat evozierten NMDA pC bzw. AMPA pC ergaben sich eine  $IC_{50}$  von 5,6 (Hill-Koeffizient: -0,8) bzw. 2,7 (Hill-Koeffizient: -1,2).

### **3.2 Einfluss von Xenon auf die synaptische Transmission im präfrontalen Kortex und in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks**

Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Charakterisierung der Wirkung von Xenon auf die synaptische Transmission in der BLA wurde der Einfluss des Inhalationsanästhetikums in zwei weiteren Arealen des ZNS untersucht. Als kortikales Areal wurde exemplarisch der präfrontale Kortex gewählt. Um die Wirkung von Xenon auf spinaler Ebene zu charakterisieren wurden Experimente in der Substantia gelatinosa des Rückenmark-Hinterhorns durchgeführt. Die elektrische Stimulation der Afferenzen zu den Neuronen des Hinterhorns erfolgte dabei in der Eingangszone der Hinterwurzel (DREZ; dorsal root entry zone).

#### **3.2.1 Basale synaptische Transmission**

Im PFC sowie in der SG wurden zunächst Summenantworten bei einem Haltepotential von -70 mV aufgezeichnet. In den Pyramiden-Neuronen der Lamina V des PFC verminderte Xenon (1,9 mM) die Amplitude der Stromantworten reversibel auf  $70,1 \pm 10,3$  % ( $n = 5$ ) und in den Neuronen der SG auf  $74,3 \pm 4,2$  % des Ausgangsniveaus ( $n = 6$ ; Abb. 3.2.1).



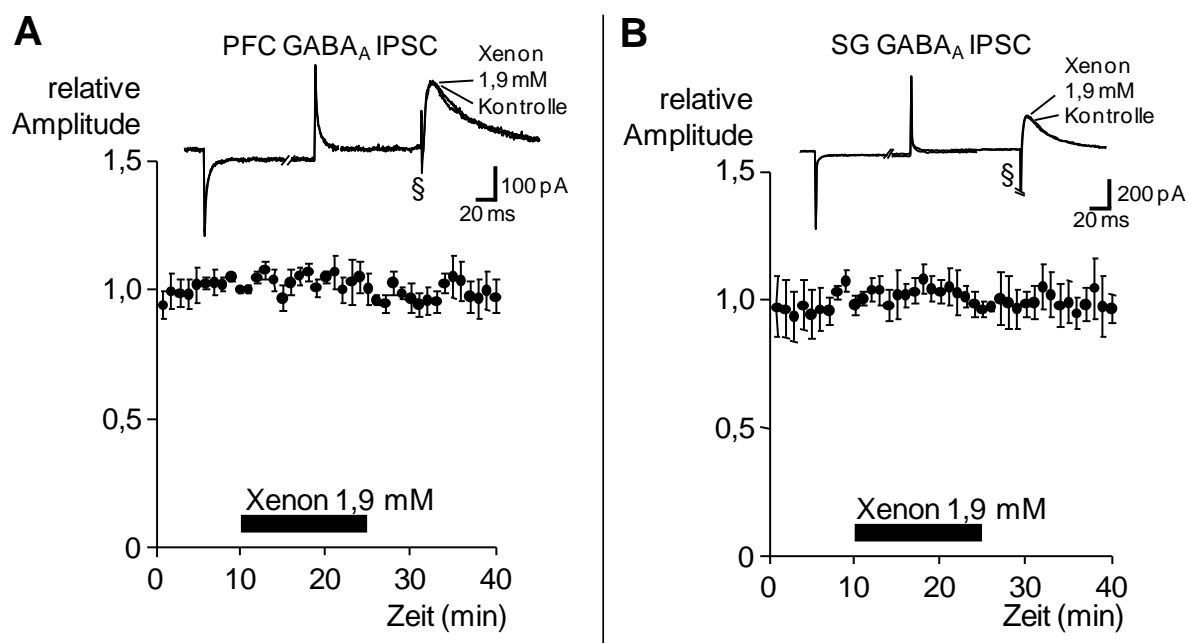
**Abb. 3.2.1: Xenon hemmt die basale synaptische Transmission im präfrontalen Kortex und in der Substantia gelatinosa.**

Von Pyramiden-Neuronen der Lamina V des präfrontalen Kortex und von Neuronen der Substantia gelatinosa (Lamina II) des Rückenmark-Hinterhorns wurden Summenantworten aufgezeichnet. Die Applikation von Xenon reduzierte die postsynaptischen Ströme im PFC auf  $70,1 \pm 10,3\%$  (**A**) und die in der SG auf  $74,3 \pm 4,2\%$  (**B**). Nach Beendigung der Xenonzufuhr erreichten die Ströme wieder ihr Ausgangsniveau.

### 3.2.2 Inhibitorische GABAerge Transmission

Pharmakologisch isolierte, durch elektrische Stimulation hervorgerufene GABA<sub>A</sub> IPSC wurden bei einem Haltepotential von  $-50$  mV in beiden Arealen aufgezeichnet. Wie auch in der BLA hatte Xe keinen Einfluss auf die Amplituden (Abb. 3.2.2) oder den Ladungstransfer (Tab. 3.2.1) GABA<sub>A</sub> Rezeptor-vermittelter IPSC. Anders als in der Amygdala zeigten sich unter Xenon keinerlei signifikante Veränderungen der Deaktivierungszeitkonstanten GABA<sub>A</sub> Rezeptor-vermittelter IPSC (Tab. 3.2.1).





**Abb. 3.2.2: Xenon hat keinen Einfluss auf die inhibitorische GABAerge Transmission im PFC und in der SG.**

Die Aufzeichnung elektrisch evozierter GABA<sub>A</sub> IPSC im PFC und in der SG erfolgte wie in der basolateralen Amygdala. Nachdem die Antworten unter Kontrollbedingungen mindestens zehn Minuten stabil waren, wurde mit der Applikation von Xenon (1,9 mM) begonnen. Das Anästhetikum hatte keinen Einfluss auf die Amplitude der IPSC (PFC: n = 5; SG: n = 4).

### GABA<sub>A</sub> IPSC

PFC	Kontrolle	Xe 1,9 mM	Washout
$\tau_{\text{decay}}$ schnell (ms)	25,5 ± 1,6	26,7 ± 1,7 (#)	32,6 ± 1,9 (##)
$\tau_{\text{decay}}$ langsam (ms)	75,7 ± 5,4	71,0 ± 2,2 (#)	68,6 ± 4,7 (##)
Ladungstransfer (pAs)	7,8 ± 2,1	8,8 ± 2,0 (#)	7,6 ± 0,7 (##)
SG	Kontrolle	Xe 1,9 mM	Washout
$\tau_{\text{decay}}$ schnell (ms)	21,0 ± 4,4	19,8 ± 4,1 (#)	21,5 ± 0,5 (##)
$\tau_{\text{decay}}$ langsam (ms)	29,8 ± 4,7	34,5 ± 8,2 (#)	29,5 ± 5,5 (##)
Ladungstransfer (pAs)	1,7 ± 0,9	1,5 ± 0,7 (#)	1,2 ± 0,4 (##)

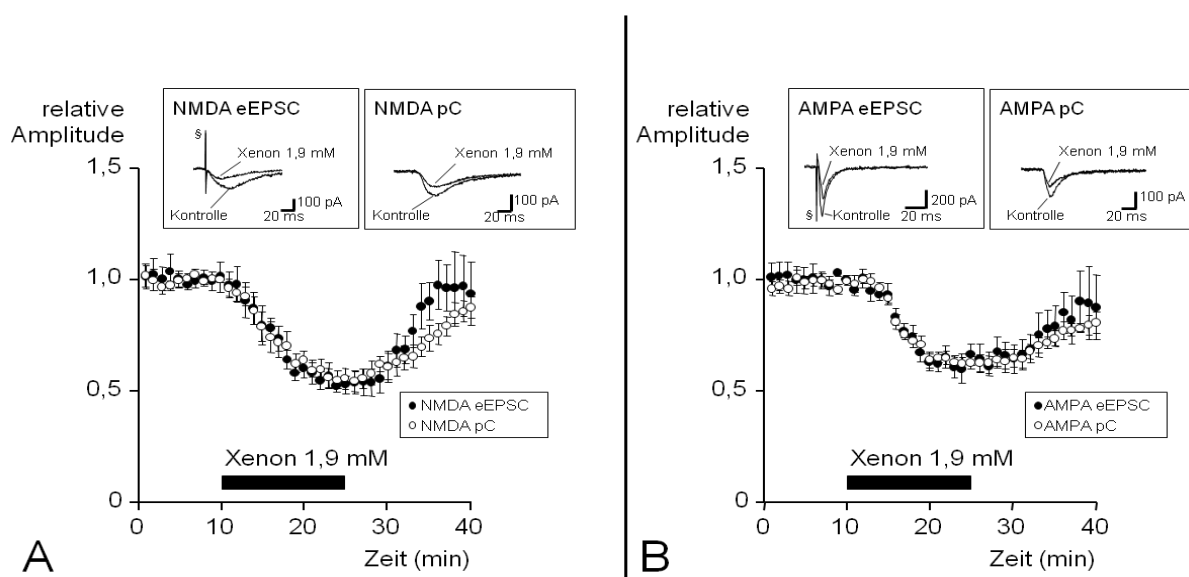
**Tabelle 3.2.1: Xenon hatte keinen Einfluss auf die Deaktivierungszeitkonstanten und den Ladungstransfer im PFC und in der SG.**

Analog zu den Experimenten in der BLA wurden im PFC und in der SG die Deaktivierungszeitkonstanten und der Ladungstransfer für GABA<sub>A</sub> IPSC bestimmt. Sowohl die schnelle, als auch die langsame Deaktivierungszeitkonstante und auch der Ladungstransfer blieben durch Xenon im PFC wie auch in der SG unverändert. # nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; ## nicht signifikant unterschiedlich zu Xenon.

### 3.2.3 Glutamaterge Transmission

Entsprechend den Versuchen in der BLA wurde im PFC wie auch in der SG die Wirkung von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission untersucht. Dazu wurden durch spezifische Antagonisten NMDA- bzw. AMPA-Rezeptorströme pharmakologisch isoliert. Die Rezeptorströme wurden entweder durch elektrische oder durch photolytische Glutamatfreisetzung hervorgerufen.

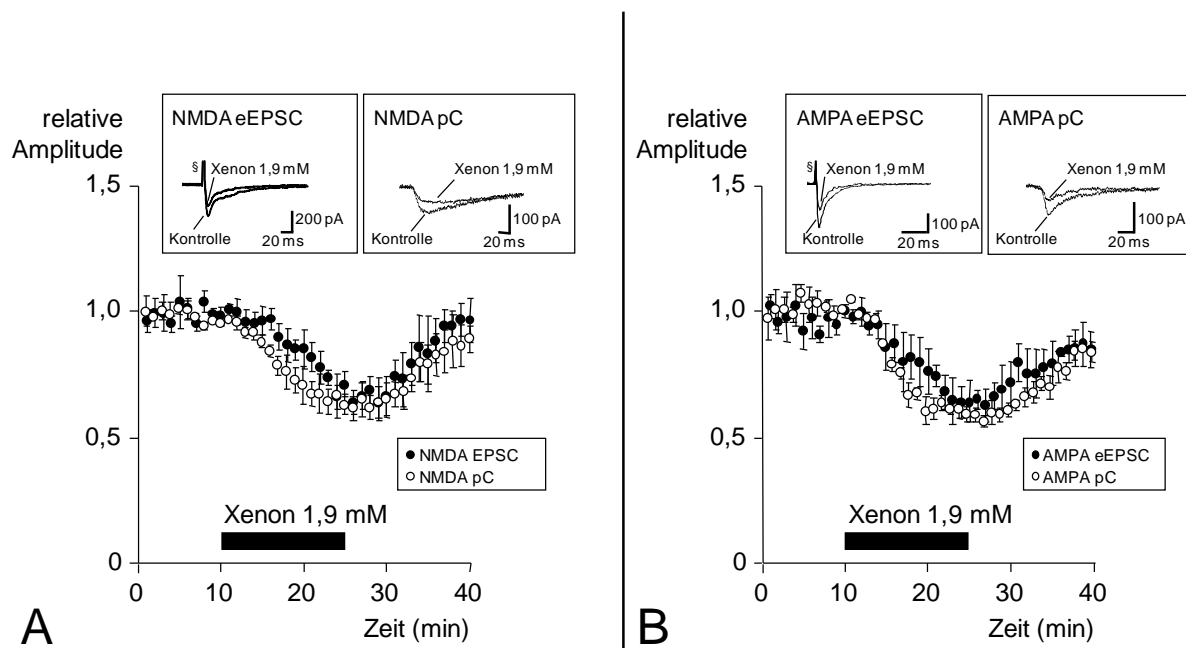
Unter Zufuhr von Xenon verringerten sich die Amplituden der NMDA eEPSC bzw. NMDA pC im PFC reversibel auf  $57,7 \pm 4,4\%$ , bzw.  $58,6 \pm 3,6\%$  (Abb. 3.2.3 A; jeweils  $n = 6$ ). Das Ausmaß der Xenon-bedingten Reduktion von NMDA eEPSC und NMDA pC war dabei nicht signifikant unterschiedlich. Die nach pharmakologischer Isolation aufgenommenen AMPA-Rezeptorströme wurden ebenfalls durch Xenon vermindert. Im PFC verringerte das Inhalationsanästhetikum die AMPA eEPSC (AMPA pC) auf  $66,9 \pm 4,1$  ( $63,7 \pm 2,9\%$ ; jeweils  $n = 6$ ; Abb. 3.2.3 B).



**Abb. 3.2.3: Im PFC hemmt Xenon die durch NMDA bzw. AMPA-Rezeptoren vermittelte glutamaterge Transmission.**

Wie in der Amygdala wurden im PFC NMDA- bzw. AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten pharmakologisch isoliert. **A** Nach Applikation von Xenon reduzierte sich die Amplitude der NMDA eEPSC reversibel auf  $57,7 \pm 4,4 \%$  ( $n = 6$ ), die Amplitude der photolytisch evozierten NMDA pC auf  $58,6 \pm 3,6 \%$  ( $n = 6$ ). **B** AMPA eEPSC wurden durch Xenon auf  $66,9 \pm 4,1 \%$  des Ausgangsniveaus, AMPA pC auf  $63,7 \pm 2,9 \%$  (jeweils  $n = 6$ ) verringert.

Die NMDA-Rezeptorströme in der SG wurden durch Xenon auf  $71.9 \pm 3.4\%$  (NMDA eEPSC;  $n = 5$ ) bzw.  $71.5 \pm 5.6\%$  (NMDA pC;  $n = 5$ ) verringert (Abb. 3.2.4 A). Auch hier war kein signifikanter Unterschied festzustellen. AMPA eEPSC (AMPA pC) wurden in der SG durch Xenon auf  $64,5 \pm 6,5\%$  ( $58,2 \pm 3,1\%$ ; jeweils  $n = 5$ ) des Ausgangsniveaus reduziert (Abb. 3.2.4 B). Auch hier zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß der Xenon-bedingten Reduktion der AMPA eEPSC versus AMPA pC.



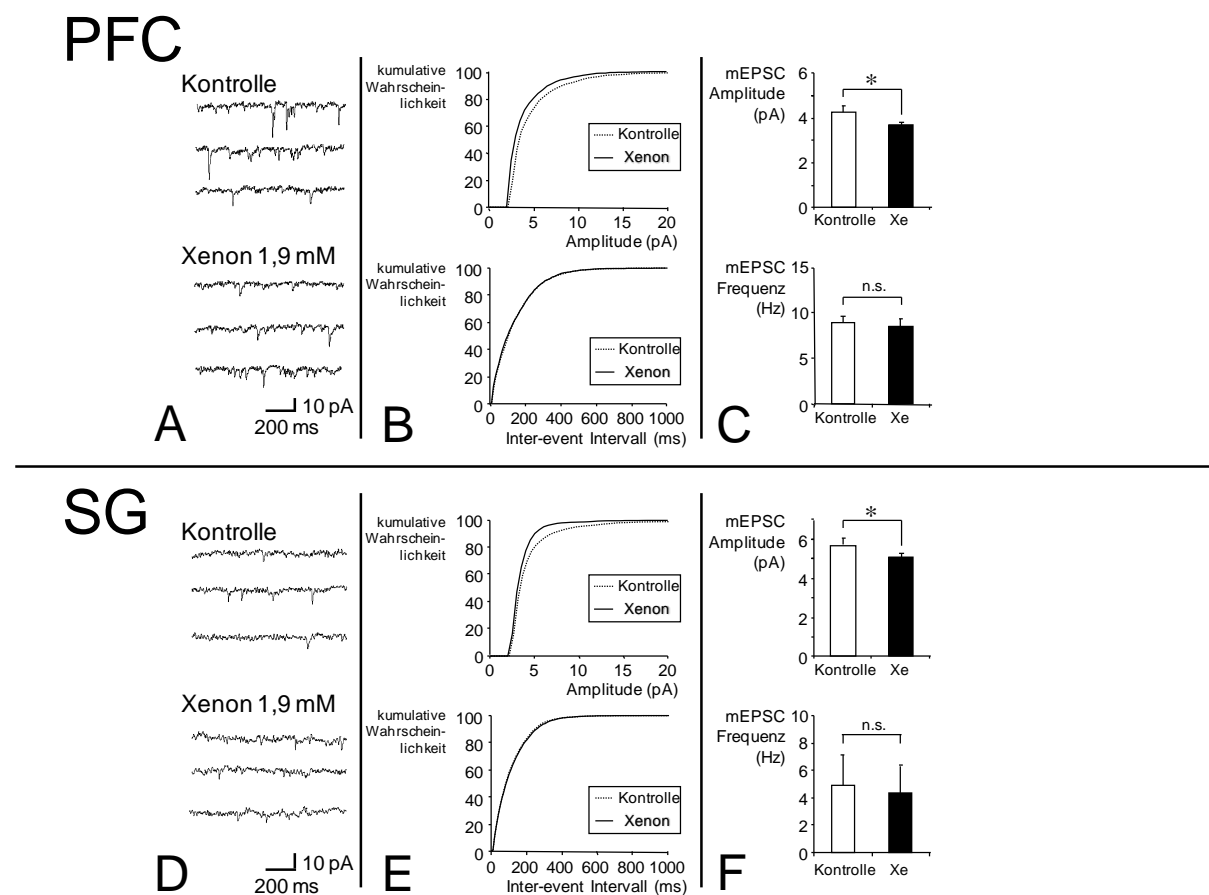
**Abb. 3.2.4: In der Substantia gelatinosa des Rückenmarks hemmt Xenon die glutamaterge exzitatorische Transmission.**

Zusätzlich zur elektrischen Stimulation der Afferenzen in der Eingangszone der Hinterwurzel wurden die abgeleiteten Nervenzellen durch photolytische Freisetzung von Glutamat stimuliert. **A** Xenon verringerte die Amplituden der NMDA eEPSC und die der photolytisch evozierten NMDA pC auf das gleiche Niveau ( $n = 5$  je Messparameter). **B** AMPA eEPSC wurden durch Xenon auf  $64,5 \pm 6,5\%$  ( $n = 5$ ), AMPA pC auf  $58,2 \pm 3,1\%$  des Ausgangsniveaus ( $n = 5$ ) reduziert.

Analog zu den entsprechenden Versuchen in der BLA wurden auch im PFC von Lamina V Pyramidenneuronen sowie von den Neuronen der SG AMPA mEPSC aufgezeichnet. Unter Kontrollbedingungen ergab sich im PFC eine mittlere mEPSC-Frequenz von  $9,0 \pm 0,7$  Hz ( $n = 5$ ; Abb. 3.2.5). Die Xenonapplikation änderte die mEPSC-Frequenz nicht. Die mittlere Amplitude der mEPSC wurde jedoch durch Xenon von  $4,2 \pm 0,3$  pA auf  $3,7 \pm 0,1$  pA ( $p < 0,05$ ) verringert.

AMPA mEPSC traten bei SG-Neuronen mit einer mittleren Frequenz von  $4,9 \pm 2,1$  Hz ( $n = 5$ ) und einer mittleren Amplitude von  $5,1 \pm 0,6$  pA ( $n = 5$ ) auf. Xe reduzierte die Amplitude der

mEPSC auf  $3,7 \pm 0,1$  pA ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), wohingegen kein signifikanter Einfluss auf die Frequenz nachweisbar war (Abb. 3.2.5).



**Abb. 3.2.5: In beiden Arealen des ZNS reduzierte Xenon die Amplitude, jedoch nicht die Frequenz der AMPA mEPSC.**

Es wurden mEPSC von Lamina-V-Pyramiden-Neuronen des PFC (PFC; **A**, **B**, **C**) und von Neuronen der Substantia gelatinosa des Rückenmarks (SG; **D**, **E**, **F**) bei einem Haltepotential vom -70 mV aufgezeichnet. **A** und **D** zeigen repräsentative Original-mEPSC jeweils eines Experiments. In den Diagrammen **B** und **E** sind zum einen die kumulative Wahrscheinlichkeit für die Intervalle zwischen einzelnen mEPSC (sog. Inter-Event-Intervalle), zum anderen die kumulative Wahrscheinlichkeit für mEPSC Amplituden jeweils mit und ohne Xenon dargestellt. Die Verteilung der Inter-Event-Intervalle blieb durch Xenon unverändert, die Verteilung der Amplituden wurde jedoch in Richtung kleinerer Amplituden verschoben. Die Balkendiagramme **C** und **F** zeigen zusammengefasste Daten aus jeweils 5 Experimenten. Xe verringerte im PFC wie auch in der SG signifikant die Amplitude der mEPSC ohne Wirkung auf deren Frequenz.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Wirkung des gasförmigen Anästhetikums Xenon auf die synaptische Transmission in der basolateralen Amygdala, dem präfrontalen Kortex sowie im Hinterhorn des lumbalen Rückenmarks in Einzelzelleitungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Xenon in vitalen Schnittpräparaten der oben genannten ZNS-Areale keinen Einfluss auf die GABAerge synaptische Transmission hat, jedoch deutlich hemmend auf AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelte Stromantworten wirkt. Die erhobenen Daten sprechen dabei dafür, dass Xenon diese Hemmung vorwiegend über postsynaptische Mechanismen hervorruft.

### 4.1 Diskussion der Kontrollbedingungen und der klinischen Relevanz der Xenon-Konzentration

Im Großteil der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde die ACSF, mit der die Schnittpräparate perfundiert wurden, mit einem Gasgemisch bestehend aus 65 % Xenon, 30 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> gesättigt. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurde die Präparate bei der Aufzeichnung der Kontrollantworten mit ACSF perfundiert, welche mit 65 % N<sub>2</sub> (Inertgas), 30 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> gesättigt war. Unter dieser relativ niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentration von 30 % ließen sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Xenonapplikation genügend große und im Zeitverlauf stabile intrazellulär abgeleitete Antworten aufzeichnen (nicht gezeigte Kontrolleexperimente). Außerdem konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit aus dem eigenen Labor gezeigt werden, dass eine Reduktion der angebotenen O<sub>2</sub>-Konzentration von 95 % auf 30 % weder zu einer Änderung des Ruhemembranpotentials und Eingangswiderstands der abgeleiteten Neurone, noch zu einer Änderung der Kinetik von NMDA-Rezeptor-Antworten oder einer Änderung von Amplitude oder Frequenz von AMPA-mEPSC führt (Ranft et al., 2007).

Gaschromatographisch bestimmt ergab sich unter 65 % Xenon in der Gasphase eine in der ACSF gelöste Xenon-Konzentration von 1,9 mM. Der MAC-Wert (siehe 1.1.3, S. 8) von Xenon wird mit 63 bis 71 Vol.-% angegeben (Cullen et al., 1969; Nakata et al., 2001). Mit einem Löslichkeitskoeffizienten Xenons von 0,0887 (Weathersby und Homer 1980) errechnen sich daraus *in-vitro*-MAC-Äquivalente gelösten Xenons von 2,2 bis 2,5 mM. Die unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen applizierte Xenonmenge von 1,9 mM bei Sättigung mit 65 Vol.-% Xenon liegt demzufolge im MAC-äquivalenten, also klinisch relevanten Bereich.

## 4.2 Wirkung von Xenon auf die GABAerge synaptische Transmission

Eine Verstärkung der inhibitorischen GABAergen synaptischen Transmission gilt als wichtiger Mechanismus, wie Anästhetika die neuronale Aktivität im ZNS hemmen und damit *in vivo* Anästhesie erzeugen (Übersichtsarbeiten: Franks et al. 1994; Campagna et al. 2003; Rudolph et al. 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen jedoch dafür, dass das Inhalationsanästhetikum Xenon die GABAerge synaptische Transmission nahezu nicht beeinflusst. In den Pyramidenneuronen der Lamina V des PFC, sowie in Neuronen der SG zeigte sich unter Xenon keinerlei Modulation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten IPSC. In der BLA verlängerte Xenon die schnelle Komponente der Deaktivierungs-Zeitkonstante der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten IPSC. Der Ladungstransfer jedoch, der für die Stärke der Inhibition verantwortlich ist (Mody et al. 1994; Hentschke et al. 2005), blieb unter Xenon unverändert. Volatile Anästhetika, die ihre anästhetische Wirkung wahrscheinlich hauptsächlich über eine Verstärkung der GABAergen synaptischen Transmission vermitteln (Campagna et al., 2003), verlängern die Deaktivierungszeitkonstante GABAerger IPSC auf 200–500 % des Ausgangsniveaus, und dies führt konsekutiv zu einem vergrößerten Ladungstransfer (Banks et al. 1999; Nishikawa et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist die in dieser Arbeit festgestellte Verlängerung des „ $\tau_{\text{decay}}$  schnell“ auf 138 % unter Xenon zwar statistisch signifikant, jedoch nicht mit einer Vergrößerung des Ladungstransfers verbunden.

Diese Ergebnisse sind in Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass Xenon keinen Einfluss auf GABA<sub>A</sub> IPSC hat, die von Autapsen-bildenden Hippocampusneuronen abgeleitet wurden (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000). Zwei andere Arbeiten jedoch zeigten unter Xenon eine etwa 20 bzw. 40%ige Vergrößerung des Cl<sup>-</sup>-Ionenstroms von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die in *Xenopus* Oozyten (Yamakura et al. 2000) bzw. HEK 293 Zellen (Hapfelmeier et al., 2000) heterolog exprimiert waren. Diese zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit widersprüchlichen Befunde lassen sich dabei auf folgende Weise erklären:

Zum einen wurden in o. g. Arbeiten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit bestimmten Untereinheiten-Kombinationen (Yamakura et al. 2000:  $\alpha_1\beta_2$  und  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ ; Hapfelmeier et al. 2000:  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ ) untersucht, während in der vorliegenden Arbeit native, d. h. in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung nicht definierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren untersucht wurden. Im ZNS von Säugetieren sind GABA<sub>A</sub> Rezeptoren mit der Untereinheitenzusammensetzung  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  am häufigsten (Farrant und Kaila 2007), während z. B. in der BLA die häufigste Untereinheitenzusammensetzung  $\alpha_2\beta_n\gamma_1$  ist (McKernan und Whiting 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der  $\beta$ -Untereinheit (Jurd et al., 2003; Reynolds et al., 2003) oder die zusätzliche Anwesenheit von  $\delta$ - (Mihalek et al., 1999) oder  $\theta$ -Untereinheiten (Bonnert et al., 1999) die Sensitivität von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren gegenüber neuronal

wirksamen Substanzen, wie z. B. Anästhetika kritisch beeinflussen. Somit könnten unterschiedliche Untereinheitenzusammensetzungen auch die unterschiedliche Sensitivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für Xenon erklären. Ein wesentliches Merkmal der in der vorliegenden Arbeit verwendeten ZNS-Schnittpräparate ist das Vorhandensein nativer Rezeptoren, deren Untereinheiten-Zusammensetzung damit eher die Verhältnisse *in vivo* widerspiegelt.

Zum anderen trat die Xenon-bedingte Verstärkung der Cl<sup>-</sup>-Stromantworten sowohl bei Yamakura et al. (2000) als auch bei Hapfelmeier et al. (2000) nur bei niedrigen, nicht-sättigenden GABA-Konzentrationen auf. Die tatsächlich an der Synapse auftretenden Transmitter-Konzentrationen sind jedoch deutlich höher (Mody et al., 1994) und damit in einem Bereich, in dem auch die o. g. Arbeiten keine Verstärkung unter Xenon zeigen konnten. Die potenzierende Wirkung Xenons auf durch niedrige GABA-Konzentrationen ausgelöste Cl<sup>-</sup>-Stromantworten könnte aber darauf hindeuten, dass die sog. tonische Inhibition durch Xenon beeinflusst wird. Die tonische Inhibition wird über extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die bereits durch niedrige GABA-Konzentrationen aktiviert werden, vermittelt (Hemmings et al., 2005; Walker und Semyanov 2008). Eine solche Wirkung Xenons kann durch die Experimente der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

Eine nachweisbare Wirkung von Xenon auf die inhibitorische *synaptische Transmission* zeigte sich bei den vorliegenden Experimenten also nicht. In Zusammenschau mit einer neueren *in vivo* Arbeit, die gezeigt hat, dass unter Xenonnarkose die Bindung von radioaktiv markierten Flumazenil<sup>4</sup> unverändert ist (Salmi et al., 2008), sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit daher dafür, dass die pharmakologischen Eigenschaften Xenons höchstwahrscheinlich nicht über eine Verstärkung der GABAergen Inhibition erfolgt.

### **4.3 Beeinflussung der glutamatergen synaptischen Transmission**

Das Edelgas Xenon verminderte in den drei untersuchten ZNS-Arealen die basale synaptische Transmission und somit die neuronale Erregungsübertragung. Dies könnte maßgeblich für den Zustand der Anästhesie unter Xenon verantwortlich zu sein. Bei Neuronen, bei denen das Membranpotential während der Patch-Clamp-Ableitung bei -70 mV gehalten wird, wird die basale synaptische Transmission hauptsächlich durch AMPA- und in geringerem Maße durch NMDA-Rezeptoren vermittelt.

#### **4.3.1 Xenonwirkung auf die NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission**

Anästhetische und analgetische Wirkungen können prinzipiell durch Blockade von sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren erklärt werden (Hudspith 1997). In den untersuchten

---

<sup>4</sup> kompetitiver Antagonist an der Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors

Arealen des ZNS bewirkte Xenon eine reversible Reduktion der NMDA-Rezeptor-vermittelten Stromantworten. Ein Antagonismus am NMDA-Rezeptor wurde bereits für verschiedene Anästhetika wie Propofol, Lachgas, Ketamin und volatile Anästhetika beschrieben (Rudolph und Antkowiak 2004). Auch für Xenon wurde bereits vielfach eine Hemmung NMDA-Rezeptor-vermittelter Stromantworten gezeigt, wobei z. T. postuliert wurde, dass dies der Hauptmechanismus für die anästhetischen Eigenschaften dieses Gases sei (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000; Übersichtsarbeit: Preckel et al. 2006). In Bezug auf die Weitergabe exzitatorischer Informationen spielt der NMDA-Rezeptor innerhalb der basalen synaptischen Transmission jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Insofern ist die Bedeutung der durch Xenon verursachten Depression der NMDAergen synaptischen Transmission für den *in vivo*-Zustand Anästhesie möglicherweise geringer als vielfach postuliert. Viel entscheidender als im Rahmen der "normalen" synaptischen Transmission ist die Bedeutung des NMDA-Rezeptors bei repetitiver Stimulation. Dann nämlich werden über nun aktivierte NMDA-Rezeptoren Mechanismen der synaptischen Plastizität, welche ein neuronales Korrelat für Gedächtnis darstellt, und Exzitotoxizität induziert (Übersichtsarbeit: Hardingham 2009). Ein Antagonismus am NMDA-Rezeptor könnte daher vielmehr einerseits zur – im Rahmen einer Allgemeinanästhesie gewünschten – Amnesie führen und andererseits die neuroprotektiven Eigenschaften (Homi et al. 2003; Dingley et al. 2006; Ma et al. 2006; Martin et al. 2007) von Xenon vermitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde in der basolateralen Amygdala zusätzlich untersucht, inwiefern die Xenon-Wirkung von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten abhängig ist. Eine Untereinheiten-spezifische Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor könnte das pharmakologische Profil einer Substanz entscheidend prägen (Parsons 2001). Eine Untereinheiten-spezifische Wirkung am NMDA-Rezeptor konnte z. B. für analgetisch (Xiao et al., 2008) oder neuroprotektiv (Leaver et al., 2008) wirkende Substanzen gezeigt werden. Die Stöchiometrie des NMDA-Rezeptors ist zwar noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass NMDA-Rezeptoren Tetramere sind, welche meist aus zwei obligatorischen NR1-Untereinheiten sowie zwei NR2-Untereinheiten gleichen oder unterschiedlichen Subtyps bestehen (Hatton et al. 2005; Paoletti et al. 2007). In der Amygdala handelt es sich dabei um die NR2-Subtypen NR2A und NR2B (Monyer et al. 1992; Monyer et al. 1994; Wenzel et al. 1997; Vicini et al. 1998; Walker et al. 2008). Um zu untersuchen, ob Xenon seine Wirkung auf NMDA-Rezeptor-vermittelte Antworten auch zeigt, wenn die NR2A- oder NR2B-Untereinheit blockiert ist, wurden Experimente in Anwesenheit von Antagonisten dieser Untereinheiten durchgeführt. NVP-AAM077 ist ein kompetitiver Antagonist mit einer ca. 12fach höheren Selektivität für die NR2A- gegenüber der NR2B-Untereinheit (Neyton et al. 2006; Paoletti et al. 2007). Ro 25-6981 ist ein Ifenprodil-Derivat mit einer etwa 3000fachen Selektivität für die NR2B- gegenüber den anderen NR2-



Untereinheiten. Weder die Blockade der NR2A-, noch die Blockade der NR2B-Untereinheit bewirkte eine Veränderung der antagonistischen Potenz von Xenon auf NMDA-Rezeptor-vermittelte, durch photolytische Transmitterfreisetzung hervorgerufene Stromantworten. Aufgrund der oben beschriebenen Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoren in der Amygdala spricht dieses Ergebnis stark für eine Wirkung von Xenon über die NR1-Untereinheit. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Arbeit: Dickinson et al. (2007) konnten mit Hilfe einer speziellen Protein-Bindungs-Simulation sowie durch Experimente an heterolog exprimierten NMDA-Rezeptoren zeigen, dass Xenon wahrscheinlich kompetitiv an der Glycin-Bindungsstelle bindet. Die Glycin-Bindungsstelle liegt in der extrazellulären Domäne der NR1-Untereinheit.

#### **4.3.2 Xenonwirkung auf die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission**

Die ersten Arbeiten, die zu den neuronal-molekularen Wirkmechanismen von Xenon veröffentlicht wurden, zeigten eine deutliche Reduktion von NMDA-Rezeptor vermittelten Antworten bei fehlender Wirkung auf AMPA-Rezeptor vermittelte Antworten (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000). Man ging daher bislang davon aus, dass der NMDA-Rezeptor die wichtigste Zielstruktur für die Xenon-Wirkung sei. Neueren Arbeiten zufolge beeinflusst Xenon jedoch auch die Funktion von nonNMDA-Rezeptoren. So konnte gezeigt werden, dass die Stromantworten sowohl von heterolog exprimierten AMPA-Rezeptoren (Plested et al., 2004) als auch Kainatrezeptoren (Dinse et al. 2005) unter Xenon reduziert werden. Ebenso reduziert Xenon die Stromantworten von nonNMDA-Rezeptoren, die von kultivierten Mäuse-Kortexneuronen aufgezeichnet wurden (Dinse et al. 2005). Eine andere Arbeit zeigte, dass Xenon über Inhibition von AMPA-Rezeptoren, jedoch nicht NMDA-Rezeptoren, am Modellorganismus *C. elegans* Verhaltensänderungen hervorruft, welche mit Anästhesie in Verbindung gebracht werden (Nagele et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Xenon deutlich und reversibel AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission in der basolateralen Amygdala, dem präfrontalen Kortex sowie der Substantia gelatinosa im Hinterhorn des lumbalen Rückenmarks reduziert. Da die Weitergabe exzitatorischer Information an den Synapsen zu einem wesentlichen Teil über AMPA-Rezeptoren geschieht, würde die beobachtete Depression dieser Rezeptoren mit einer deutlichen Verminderung der neuronaler Erregungsleitung unter Xenon einhergehen. Diese könnte ein *in vitro*-Korrelat darstellen für neuere *in vivo*-Befunde, die einen über einen reinen NMDA-Antagonismus hinausgehenden Mechanismus bei der Xenonanästhesie nahelegen (Nagele et al., 2005; Rex et al., 2006; Laitio et al., 2007; Rex et al., 2008).

### 4.3.3 Postsynaptische Mechanismen

Die Stärke der synaptischen Übertragung kann prinzipiell über präsynaptische (z. B. Modulation der Transmitterfreisetzung, -wiederaufnahme oder -speicherung, Änderung der  $Ca_2+$ -Konzentration in der präsynaptische Terminale) oder postsynaptische Mechanismen (z. B. Änderung der Anzahl oder Empfindlichkeit der postsynaptischen Ionenkanäle) modifiziert werden. Präsynaptische Wirkmechanismen wurden z. B. für die Inhalationsanästhetika Halothan (Asai et al., 2002), Isofluran (MacIver et al., 1996; Larsen et al., 1997; Sasaki et al., 2002; Haseneder et al., 2004), Sevofluran (Moe et al., 2002) und  $N_2O$  (Ranft et al., 2007) beschrieben. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob Xenon NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten rein postsynaptisch oder unter Beteiligung präsynaptischer Mechanismen reduziert. Die Wirkung Xenons auf durch photolytische Glutamat-Freisetzung hervorgerufene NMDA- und AMPA-Rezeptor-vermittelte Antworten wurde daher untersucht und mit der Wirkung Xenons auf NMDA eEPSCs und AMPA eEPSCs verglichen. Die photolytische Freisetzung von Glutamat simuliert und ersetzt damit die präsynaptische Transmitterfreisetzung, womit die aufgezeichneten NMDA- und AMPA-pC weitgehend unabhängig von Mechanismen der präsynaptischen Terminale sind (Dodt et al., 1999; Rammes et al., 2007). Die Xenon-bedingte Reduktion von NMDA- bzw. AMPA-pC war in allen drei untersuchten ZNS-Regionen nicht unterschiedlich zur Xenon-bedingten Reduktion von NMDA-eEPSCs bzw. AMPA-eEPSCs. Dies spricht gegen eine bedeutsame Beteiligung der präsynaptischen Terminale am Wirkmechanismus Xenons. Zusätzlich wurde die Xenonwirkung auf AMPA mEPSC untersucht. Xenon reduzierte in allen drei ZNS-Regionen die mEPSC Amplitude ohne Einfluss auf die Frequenz der mEPSC. Dies spricht dafür, dass die Xenon-vermittelte Reduktion der synaptischen Transmission nicht auf einer weniger häufigen präsynaptischen Glutamatvesikel-Freisetzung beruht. Die Reduktion der Amplitude der mEPSC kann jedoch entweder durch eine Modulation postsynaptischer Rezeptoren oder durch einen verminderten Glutamatgehalt der einzelnen Transmittervesikel zustande gekommen sein. Zwischen diesen beiden Mechanismen kann mit den verwendeten Methoden nicht unterschieden werden. In Zusammenschau jedoch mit dem Befund, dass Xenon NMDA eEPSC und NMDA pC bzw. AMPA eEPSC und AMPA pC in jeweils gleichem Maß reduziert, erscheint ein rein postsynaptischer Xenon-Mechanismus viel wahrscheinlicher als ein zusätzlicher Einfluss Xenons auf die Größe der präsynaptischen Transmitter-Quanten.

#### 4.3.4 Wirkung von Xenon auf AMPA eEPSC unter Blockade der Desensitisierung

An glutamatergen Synapsen liegt die Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt bei 1–5 mM, und der Transmitter wird in der Regel innerhalb 0,2–2 ms wieder aus diesem entfernt (Clements 1996). Somit deaktivieren AMPA-Rezeptoren nach der schnellen Entfernung des Transmitters eher, während die sog. Desensitisierung an schnellen Synapsen nur eine untergeordnete Rolle spielt (Rammes et al., 1998). Die Xenon-bedingte Reduktion der AMPA eEPSC auch bei den Experimenten dieser Dissertation ist also weitgehend unabhängig von der Desensitisierung. Paradoxe Weise berichtete eine Studie über einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Xenon und der Rezeptordesensitisierung. Xenon wirkte nur hemmend auf AMPA Rezeptorstromantworten, wenn die Desensitisierung verhindert wurde, und zwar entweder durch Zugabe des Agonisten Kainat, der neben seiner agonistischen Wirkung auch eine Desensitisierungshemmende Wirkung hat, oder durch Zugabe des Desensitierungshemmers CTZ (Plested et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Studie könnten jedoch durch die relativ langsame Agonistenapplikation bei der Messung an *Xenopus* Oozyten beeinflusst sein. In einer weiteren Arbeit (Clements 1996), in der ein Applikationssystem benutzt wurde, bei dem innerhalb von 1 ms die Agonistenapplikation unterbrochen werden konnte, konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der AMPA Rezeptoren gegenüber Xenon nicht davon abhängt, ob desensitisierende oder nicht-desensitisierende Agonisten appliziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Desensitisierung der AMPA Rezeptoren durch Zugabe von CTZ blockiert. Trotz dieser Blockade verringerte Xenon unter physiologischeren Bedingungen in vitalen Schnittpräparaten signifikant die Amplitude der AMPA eEPSC. Die Zugabe von CTZ verlängerte dabei die Deaktivierungszeitkonstanten, wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Glutamataffinität (Fleck et al., 1996; Rammes et al., 1996). Die Befunde der vorliegenden Arbeit sprechen also dafür, dass die Abnahme der Amplitude der AMPA eEPSC nicht durch eine Modulation der Desensitisierung, sondern zumindest teilweise durch eine Abnahme der Glutamataffinität zustande gekommen ist.

#### 4.3.5 Konzentrationsabhängigkeit der Xenonwirkung

In der basolateralen Amygdala wurden zusätzliche Experimente mit niedrigeren Xenon-Konzentrationen (0,1, 0,6 und 1,1 mM) durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass Xenon NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten konzentrationsabhängig reduziert. Eine vollständig aussagekräftige Dosis-Wirkungs-Kurve ließ sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen jedoch nicht erstellen. Hierzu wäre die Lösung von noch höheren Xenon-Konzentrationen, die die jeweilige Stromantworten auf mehr als nur ~56–73 % des Ausgangsniveaus vermindern, notwendig. Die Applikation höherer Xenon-Konzentrationen ist jedoch limitiert durch die maximale Löslichkeit von Xenon: Die höchste

Konzentration unter normobaren Bedingungen gelösten Xenons wird in der Literatur mit 3,9 mM angegeben (Hapfelmeier et al., 2000). Bei dieser Arbeit aus dem eigenen Labor wurden 100 Vol.-% Xenon verwendet, und die Applikation erfolgte nicht – wie in der vorliegenden Arbeit – über eine sog. offene Messkammer, d. h. es ist von einem weit geringeren Verlust auszugehen. Um in der vorliegenden Arbeit überhaupt  $IC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten angeben zu können, musste angenommen werden, dass es sich bei Xenon um einen vollständigen Antagonisten handelt. Die bisher in der Literatur angegebenen maximale Verringerung von NMDA- bzw. AMPA-Rezeptor-vermittelten Antworten betragen 70 bzw. 60%, und wurden unter 80 bzw. 84 Vol.-% Xenon (entsprechend 3,4 bzw. 3,54 mM gelösten Xenons) erzielt (de Sousa et al., 2000; Dinse et al., 2005). Unter normobaren Bedingungen konnte also bisher kein vollständiger Antagonismus Xenons an glutamatergen Ionenkanälen gezeigt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch höhere, unter hyperbaren Bedingungen gelöste Xenon-Konzentrationen, diese Kanäle komplett blockieren. Die in der vorliegenden Arbeit angebenen  $IC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten sind also als extrapolierte Werte zu verstehen. Durch diese Limitierung lassen sich auch möglicherweise die (statistisch nicht signifikant) unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werte der NMDA-Stromantworten gegenüber denen der AMPA-Stromantworten erklären. Insofern ist also eher von einer equipotenten Wirkung Xenons auf beide Rezeptor-Typen auszugehen.

1,9 mM gelöstes Xenon entsprechen dem *in-vitro*-MAC-Äquivalent Xenons (siehe 4.1, Seite 52). Während sich dieses MAC-Äquivalent auf den Konzentrationsbereich bezieht, ab dem Xenon immobilisierende Eigenschaften vermittelt (sog.  $MAC_{immobility}$ , Definition siehe 1.1.3, Seite 1f), handelt es sich bei der sog.  $MAC_{awake}$  als diejenige Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, ab der eine Substanz hypnotisch wirkt (Stoelting et al., 1970). Der  $MAC_{awake}$  von Xenon am Menschen wird mit 33 Vol.-% angegeben, dass entsprechende *in vitro*-Äquivalent in der vorliegenden Arbeit ist die Xenonkonzentration von 1,1 mM. Es konnte gezeigt werden, dass Inhalationsanästhetika in einer Dosierung im Bereich des  $MAC_{awake}$  die Gedächtnisbildung unterdrücken. Vor dem Hintergrund, dass die basolaterale Amygdala eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Anästhetika-induzierten Amnesie spielt (ausführliche Diskussion unter 4.4.1), könnte die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Depression der exzitatorischen synaptischen Transmission bereits durch 1,1 mM Xenon an der Vermittlung einer amnestischen Wirkung von Xenon im Bereich der  $MAC_{awake}$  beteiligt sein.

#### 4.4 Klinische Relevanz der Messergebnisse

Als Teilaspekte einer Narkose *in vivo* gelten Hypnose, Immobilisation, Amnesie, Analgesie und kardiovaskuläre Stabilität. Diese Aspekte werden z. T. über verschiedene ZNS-Areale vermittelt (Kendig 1993; Eger et al. 1997; Kissin 1997; Campagna et al. 2003; Sonner et al. 2003; Rudolph et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte eine hemmende Wirkung von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission in der basolateralen Amygdala, im präfrontalen Kortex und in der Substantia gelatinosa des Rückenmark-Hinterhorns gezeigt werden.

##### 4.4.1 Basolaterale Amygdala

Die Amygdala spielt eine wichtige Rolle für autonome Funktionen sowie für die Gedächtnisbildung. Insbesondere unter emotional geladenen Umständen wie Furcht, spielt die Amygdala im Lernprozess eine wichtige Rolle. Darüberhinaus verhindern Läsionen der Amygdala die amnestischen Wirkungen verschiedener Anästhetika (Alkire et al. 2001; Alkire et al. 2005). Somit scheint die Amygdala eine wichtige Rolle in der Vermittlung der durch Anästhetika hervorgerufenen Amnesie zu spielen. Dies konnte sowohl für Diazepam (Tomaz et al. 1992), Propofol (Alkire et al., 2001) als auch für Sevofluran (Alkire und Nathan 2005) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass Xenon die neuronale Aktivität in der basolateralen Amygdala über eine Verminderung der AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Transmission reduziert. Verschiedenen klinische Studien beschreiben bei Patienten nach Xenon-Anästhesie eine retrograde Amnesie (Lachmann et al. 1990; Rossaint et al. 2003), und bis heute sind unter Xenon-Narkose keine Awareness-Fälle beschrieben. Diese Amnesie könnte u. a. durch die in dieser Arbeit beschriebene Wirkung von Xenon in der basolateralen Amygdala vermittelt werden.

Darüberhinaus spielt die Amygdala eine wichtige Rolle bei der Schmerzverarbeitung. In der basolaterale Amygdala erfolgt die Verarbeitung nozizeptiver Inputs aus dem Thalamus und dem Kortex (Pitkanen et al. 1997; Doron et al. 1999; Linke et al. 1999; Smith et al. 2000). Läsionen oder eine vorübergehende Inaktivierung der Amygdala vermindern emotionale Schmerzreaktionen (Neugebauer et al. 2003). Eine Inhibition der exzitatorischen synaptischen Übertragung in der Amygdala könnte somit zumindest teilweise an der analgetischen Wirkung von Xenon beteiligt sein.

##### 4.4.2 Präfrontaler Kortex

Der PFC spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Arbeitsgedächtnisses (Fritts et al. 1998; Wall et al. 2001; Vertes 2002). Aus anästhesiologischer Sicht könnte also der PFC – ähnlich wie die basolaterale Amygdala – ein wichtiges Areal für die gewünschte

Amnesie unter Narkose zu sein. Darüberhinaus ist eine Beeinträchtigung der kortikalen Informationsverarbeitung beteiligt an der hypnotischen Wirkung von Anästhetika (Alkire und Miller 2005; Velly et al., 2007). Dabei sind die genauen Mechanismen, die der Anästhetika-induzierten Bewusstlosigkeit zugrunde liegen, bis heute nicht geklärt. Es scheinen sowohl eine Suppression der neuronalen Aktivität und Erregbarkeit (Alkire et al. 2000) als auch eine Anästhetika-bedingte Störung der Kohärenz, d. h. Phasengleichheit neuronaler Aktivität beteiligt zu sein (Cariani 2000; Mashour 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutlich hemmende Wirkung von Xenon auf NMDA- bzw. AMPA-Rezeptor-vermittelte Stromantworten der großen Pyramidenneuronen in der Lamina V des PFC gezeigt werden. Diese Verminderung der neuronalen Exzitabilität könnte einen Mechanismus darstellen, wie Xenon über eine Modulation der intrakortikalen Informationsverarbeitung Bewusstseinsverlust und Amnesie verursacht. Da die Pyramidenzellen der Lamina V das Hauptausgangssystem aus dem Kortex bilden (Sesack et al., 1989) könnte eine Beeinträchtigung dieser Efferenzen durch Xenon zusätzlich zu einer Beeinflussung subkortikaler Prozesse führen.

#### 4.4.3 Substantia gelatinosa

Afferente nozizeptive A $\delta$ - und C-Fasern projizieren in die oberflächlichen Laminae des Rückenmark-Hinterhorns, insbesondere in die Substantia gelatinosa, in denen sie erstmalig synaptisch verschaltet werden (Graham et al., 2007). Eine Verminderung der neuronalen Exzitabilität in der Substantia gelatinosa könnte einen wesentlichen Mechanismus für Analgesie darstellen (Moore et al., 2000). So konnte z. B. für Opioid-Analgetika (Glaum et al. 1994; Kohno et al. 1999) aber auch für die volatilen Anästhetika Halothan (Asai et al., 2002) und Isofluran (Haseneder et al. 2004) eine Verminderung der exzitatorischen synaptischen Transmission in der SG gezeigt werden. Xenon besitzt neben seinen hypnotischen auch analgetische Eigenschaften (Yagi et al., 1995). Daten aus tierexperimentellen *in vivo* (Utsumi et al., 1997) sowie *in vitro* (Watanabe et al., 2004) Studien brachten Evidenz, dass Xenon seine analgetischen Eigenschaften möglicherweise durch eine Reduktion der neuronalen Erregbarkeit in den oberflächlichen Teilen des Rückenmark-Hinterhorns vermittelt. Arbeiten zum genauen Mechanismus und die hierbei beteiligten Transmitter-Systeme auf spinal-neuronaler Ebene fehlen jedoch bisher. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Xenon die Erregbarkeit der SG-Neurone hemmt, und zwar über eine – v. a. über postsynaptische Mechanismen bewirkte – Reduktion der exzitatorischen NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelten synaptischen Transmission. Dies könnte ein wesentlicher Mechanismus für die analgetischen Eigenschaften des Inhalationsanästhetikums Xenon sein.

Darüberhinaus herrscht mittlerweile Konsens, dass ein weiterer wichtiger Teilaspekt von Anästhesie, nämlich Immobilisation, zu einem wesentlichen Teil auf spinaler Ebene vermittelt wird (Antognini und Schwartz 1993; Rampil 1994; Antognini et al., 2002; Asai et al., 2002). Hierbei ist neben einer Depression der neuronalen Aktivität im Rückenmark-Vorderhorn (Rampil und King 1996) auch eine Verminderung der neuronalen Aktivität im Hinterhorn beteiligt (Sonner et al., 2003). Insofern könnten die von uns beobachtete Depression der synaptischen Transmission auf Substantia gelatinosa-Neurone unter Xenon auch den immobilisierenden Eigenschaften dieses Gases zugrunde liegen.

## 5 Zusammenfassung

Aus klinischer Sicht erfüllt Xenon viele Bedingungen, die an ein "ideales" Anästhetikum gestellt werden. Der breite klinische Einsatz wird im Wesentlichen nur durch die geringe Verfügbarkeit und den damit verbundenen hohen Preis verhindert.

Die neuronal-molekularen Mechanismen, wie Xenon seine anästhetischen und analgetischen Eigenschaften vermittelt, sind bisher nicht erschöpfend geklärt. Bisher veröffentlichte Arbeiten hierzu beschränken sich im Wesentlichen auf die Untersuchung von verschiedenen Anästhesie-relevanten Ionenkanälen in isolierten Expressionssystemen oder Zellkulturen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher die Wirkung von Xenon auf verschiedene Komponenten der synaptischen Transmission in weniger artifiziellen Modellen, nämlich in Mäuse- bzw. Ratten-Schnittpräparaten Anästhesie-relevanter ZNS-Regionen (Amygdala, Kortex, Hinterhorn des Rückenmarks), untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Xenon in den untersuchten Arealen die exzitatorische synaptische Transmission deutlich vermindert, jedoch keine Wirkung auf die inhibitorische, GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission hat. NMDA- und AMPA-Rezeptor-vermittelte Stromantworten wurden durch Xenon in gleichem Maße reduziert. Die erhobenen Daten sprechen jeweils für einen hauptsächlich postsynaptischen Mechanismus.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte potente Hemmung der exzitatorischen synaptischen Übertragung durch Xenon in einer kortikalen, subkortikalen und spinalen ZNS-Region könnte einen wesentlichen Teil des neuronalen Wirkmechanismus Xenons darstellen und damit den klinischen Wirkungen Hypnose, Amnesie und Analgesie zugrunde liegen.



## Literaturverzeichnis

- Alkire, M. T., Miller, J. (2005). "General anesthesia and the neural correlates of consciousness." *Prog Brain Res* 150: 229-44.
- Alkire, M. T., Nathan, S. V. (2005). "Does the amygdala mediate anesthetic-induced amnesia? Basolateral amygdala lesions block sevoflurane-induced amnesia." *Anesthesiology* 102(4): 754-60.
- Alkire, M. T., Vazdarjanova, A., Dickinson-Anson, H., White, N. S., Cahill, L. (2001). "Lesions of the basolateral amygdala complex block propofol-induced amnesia for inhibitory avoidance learning in rats." *Anesthesiology* 95(3): 708-15.
- Andreasen, M., Hablitz, J. J. (1994). "Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: a patch-clamp study in rat hippocampus in vitro." *J Neurophysiol* 72(1): 326-36.
- Angel, A. (1993). "Central neuronal pathways and the process of anaesthesia." *Br J Anaesth* 71(1): 148-63.
- Antognini, J. F., Carstens, E., Atherley, R. (2002). "Does the immobilizing effect of thiopental in brain exceed that of halothane?" *Anesthesiology* 96(4): 980-6.
- Antognini, J. F., Schwartz, K. (1993). "Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain." *Anesthesiology* 79(6): 1244-9.
- Asai, T., Kusudo, K., Ikeda, H., Takenoshita, M., Murase, K. (2002). "Effect of halothane on neuronal excitation in the superficial dorsal horn of rat spinal cord slices: evidence for a presynaptic action." *Eur J Neurosci* 15(8): 1278-90.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., Langer, S. Z. (1998). "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." *Pharmacol Rev* 50(2): 291-313.

- Baumert, J. H., Hein, M., Gerets, C., Baltus, T., Hecker, K. E., Rossaint, R. (2007). "The effect of xenon anesthesia on the size of experimental myocardial infarction." *Anesth Analg* 105(5): 1200-6, table of contents.
- Baumert, J. H., Reyle-Hahn, M., Hecker, K., Tenbrinck, R., Kuhlen, R., Rossaint, R. (2002). "Increased airway resistance during xenon anaesthesia in pigs is attributed to physical properties of the gas." *Br J Anaesth* 88(4): 540-5.
- Beart, P. M., O'Shea, R. D. (2007). "Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement." *Br J Pharmacol* 150(1): 5-17.
- Benarroch, E. E. (2010). "Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease." *Neurology* 74(3): 259-64.
- Benninghoff, A., Drenckhahn, D. (2004). *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Bd. 1. 16. Auflage.* München - Jena, Urban & Fischer.
- Bonnert, T. P., McKernan, R. M., Farrar, S., le Bourdelles, B., Heavens, R. P., Smith, D. W., Hewson, L., Rigby, M. R., Sirinathsinghji, D. J., Brown, N., Wafford, K. A., Whiting, P. J. (1999). "theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9891-6.
- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., Heinemann, S. (1990). "Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes." *Science* 249(4972): 1033-7.
- Bowery, N. G. (1993). "GABAB receptor pharmacology." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 109-47.
- Calzia, E., Stahl, W., Handschuh, T., Marx, T., Froba, G., Bader, S., Georgieff, M., Radermacher, P. (1999). "Respiratory mechanics during xenon anesthesia in pigs: comparison with nitrous oxide." *Anesthesiology* 91(5): 1378-86.
- Campagna, J. A., Miller, K. W., Forman, S. A. (2003). "Mechanisms of actions of inhaled anesthetics." *N Engl J Med* 348(21): 2110-24.
- Cariani, P. (2000). "Anesthesia, neural information processing, and conscious awareness." *Conscious Cogn* 9(3): 387-95.

- Chapman, W. P., Schroeder, H. R., Geyer, G., Brazier, M. A., Fager, C., Poppen, J. L., Solomon, H. C., Yakovlev, P. I. (1954). "Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man." *Science* 120(3127): 949-50.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D. (2002). "Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits." *Nature* 415(6873): 793-8.
- Chernick, C. L., Claassen, H. H., Fields, P. R., Hyman, H. H., Malm, J. G., Manning, W. M., Matheson, M. S., Quarterman, L. A., Schreiner, F., Selig, H. H., Sheft, I., Siegel, S., Sloth, E. N., Stein, L., Studier, M. H., Weeks, J. L., Zirin, M. H. (1962). "Fluorine Compounds of Xenon and Radon." *Science* 138(3537): 136-138.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., Ben-Ari, Y. (1991). "GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life." *Trends Neurosci* 14(12): 515-9.
- Clements, J. D. (1996). "Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function." *Trends Neurosci* 19(5): 163-71.
- Contractor, A., Heinemann, S. F. (2002). "Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity." *Sci STKE* 2002(156): RE14.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 327-35.
- Cullen, S. C., Eger, E. I., 2nd, Cullen, B. F., Gregory, P. (1969). "Observations on the anesthetic effect of the combination of xenon and halothane." *Anesthesiology* 31(4): 305-9.
- Cullen, S. C., Gross, E. G. (1951). "The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton." *Science* 113(2942): 580-2.
- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A., Nakanishi, N. (1998). "Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A." *Nature* 393(6683): 377-81.

- de Sousa, S. L., Dickinson, R., Lieb, W. R., Franks, N. P. (2000). "Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon." *Anesthesiology* 92(4): 1055-66.
- deSouza, S., Ziff, E. B. (2002). "AMPA receptors do the electric slide." *Sci STKE* 2002(156): PE45.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999). "The glutamate receptor ion channels." *Pharmacol Rev* 51(1): 7-61.
- Dingley, J., Mason, R. S. (2007). "A cryogenic machine for selective recovery of xenon from breathing system waste gases." *Anesth Analg* 105(5): 1312-8, table of contents.
- Dingley, J., Tooley, J., Porter, H., Thoresen, M. (2006). "Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia." *Stroke* 37(2): 501-6.
- Dinse, A., Fohr, K. J., Georgieff, M., Beyer, C., Bulling, A., Weigt, H. U. (2005). "Xenon reduces glutamate-, AMPA-, and kainate-induced membrane currents in cortical neurones." *Br J Anaesth* 94(4): 479-85.
- Dodt, H., Eder, M., Frick, A., Zieglgansberger, W. (1999). "Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation." *Science* 286(5437): 110-3.
- Dodt, H. U., Eder, M., Schierloh, A., Zieglgansberger, W. (2002). "Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices." *Sci STKE* 2002(120): PL2.
- Dodt, H. U., Zieglgansberger, W. (1994). "Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function." *Trends Neurosci* 17(11): 453-8.
- Dutton, R. C., Maurer, A. J., Sonner, J. M., Fanselow, M. S., Laster, M. J., Eger, E. I., 2nd (2001). "The concentration of isoflurane required to suppress learning depends on the type of learning." *Anesthesiology* 94(3): 514-9.
- Duus, P. (1995). *Neurologisch-topische Diagnostik. 6. Auflage*. Stuttgart - New York, Thieme.
- Fahn, S., Cote, L. J. (1968). "Regional distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey." *J Neurochem* 15(3): 209-13.

- Farrant, M., Kaila, K. (2007). "The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling." *Prog Brain Res* 160: 59-87.
- Fink, H., Blobner, M., Bogdanski, R., Hanel, F., Werner, C., Kochs, E. (2000). "Effects of xenon on cerebral blood flow and autoregulation: an experimental study in pigs." *Br J Anaesth* 84(2): 221-5.
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J. N., Mohacsi, E., Heitz, M. P., Kemp, J. A. (1997). "Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro." *J Pharmacol Exp Ther* 283(3): 1285-92.
- Fleck, M. W., Bähring, R., Patneau, D. K., Mayer, M. L. (1996). "AMPA receptor heterogeneity in rat hippocampal neurons revealed by differential sensitivity to cyclothiazide." *J Neurophysiol* 75(6): 2322-33.
- Franks, N. P., Dickinson, R., de Sousa, S. L., Hall, A. C., Lieb, W. R. (1998). "How does xenon produce anaesthesia?" *Nature* 396(6709): 324.
- Franks, N. P., Lieb, W. R. (1994). "Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia." *Nature* 367(6464): 607-14.
- Glueckauf, E., Kitt, G. P. (1956). "The Krypton and Xenon Concentrations of Atmospheric Air." *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 234(1199): 557-565.
- Goodman, S. J., Mann, P. E. (1967). "Reticular and thalamic multiple unit activity during wakefulness, sleep and anesthesia." *Exp Neurol* 19(1): 11-24.
- Goto, T., Saito, H., Shinkai, M., Nakata, Y., Ichinose, F., Morita, S. (1997). "Xenon provides faster emergence from anesthesia than does nitrous oxide-sevoflurane or nitrous oxide-isoflurane." *Anesthesiology* 86(6): 1273-8.
- Goto, T., Suwa, K., Uezono, S., Ichinose, F., Uchiyama, M., Morita, S. (1998). "The blood-gas partition coefficient of xenon may be lower than generally accepted." *Br J Anaesth* 80(2): 255-6.

- Graham, B. A., Brichta, A. M., Callister, R. J. (2007). "Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits." *J Neurophysiol* 98(3): 1057-63.
- Gruss, M., Bushell, T. J., Bright, D. P., Lieb, W. R., Mathie, A., Franks, N. P. (2004). "Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane." *Mol Pharmacol* 65(2): 443-52.
- Hapfelmeier, G., Zieglgansberger, W., Haseneder, R., Schneck, H., Kochs, E. (2000). "Nitrous oxide and xenon increase the efficacy of GABA at recombinant mammalian GABA(A) receptors." *Anesth Analg* 91(6): 1542-9.
- Hardingham, G. E., Bading, H. (2003). "The Yin and Yang of NMDA receptor signalling." *Trends Neurosci* 26(2): 81-9.
- Hartmann, A., Wassman, H., Czernicki, Z., Dettmers, C., Schumacher, H. W., Tsuda, Y. (1987). "Effect of stable xenon in room air on regional cerebral blood flow and electroencephalogram in normal baboons." *Stroke* 18(3): 643-8.
- Haseneder, R., Kurz, J., Dodt, H. U., Kochs, E., Zieglgansberger, W., Scheller, M., Rammes, G., Hapfelmeier, G. (2004). "Isoflurane reduces glutamatergic transmission in neurons in the spinal cord superficial dorsal horn: evidence for a presynaptic site of an analgesic action." *Anesth Analg* 98(6): 1718-23, table of contents.
- Hemmings, H. C., Jr., Akabas, M. H., Goldstein, P. A., Trudell, J. R., Orser, B. A., Harrison, N. L. (2005). "Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action." *Trends Pharmacol Sci* 26(10): 503-10.
- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991). "Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition." *Science* 252(5007): 851-3.
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). "Cloned glutamate receptors." *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
- Hornbein, T. F., Eger, E. I., 2nd, Winter, P. M., Smith, G., Wetstone, D., Smith, K. H. (1982). "The minimum alveolar concentration of nitrous oxide in man." *Anesth Analg* 61(7): 553-6.

- Hudspith, M. J. (1997). "Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury." *Br J Anaesth* 78(6): 731-47.
- Jonas, P., Bischofberger, J., Fricker, D., Miles, R. (2004). "Interneuron Diversity series: Fast in, fast out--temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons." *Trends Neurosci* 27(1): 30-40.
- Jungwirth, B., Gordan, M. L., Blobner, M., Schmehl, W., Kochs, E. F., Mackensen, G. B. (2006). "Xenon impairs neurocognitive and histologic outcome after cardiopulmonary bypass combined with cerebral air embolism in rats." *Anesthesiology* 104(4): 770-6.
- Jurd, R., Arras, M., Lambert, S., Drexler, B., Siegwart, R., Crestani, F., Zaugg, M., Vogt, K. E., Ledermann, B., Antkowiak, B., Rudolph, U. (2003). "General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit." *FASEB J* 17(2): 250-2.
- Kaada, B. R. (1951). "Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippocampus-fornix and amygdala." *Acta Physiol Scand Suppl* 24(83): 1-262.
- Kleckner, N. W., Dingledine, R. (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." *Science* 241(4867): 835-7.
- Korpi, E. R., Grunder, G., Luddens, H. (2002). "Drug interactions at GABA(A) receptors." *Prog Neurobiol* 67(2): 113-59.
- Krasowski, M. D., Harrison, N. L. (1999). "General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels." *Cell Mol Life Sci* 55(10): 1278-303.
- Kuriyama, K., Hirouchi, M., Nakayasu, H. (1993). "Structure and function of cerebral GABAA and GABAB receptors." *Neurosci Res* 17(2): 91-9.
- Lachmann, B., Armbruster, S., Schairer, W., Landstra, M., Trouwborst, A., Van Daal, G. J., Kusuma, A., Erdmann, W. (1990). "Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anaesthetic." *Lancet* 335(8703): 1413-5.

- Laitio, R. M., Kaisti, K. K., Laangsjo, J. W., Aalto, S., Salmi, E., Maksimow, A., Aantaa, R., Oikonen, V., Sipila, H., Parkkola, R., Scheinin, H. (2007). "Effects of xenon anesthesia on cerebral blood flow in humans: a positron emission tomography study." *Anesthesiology* 106(6): 1128-33.
- Larsen, M., Hegstad, E., Berg-Johnsen, J., Langmoen, I. A. (1997). "Isoflurane increases the uptake of glutamate in synaptosomes from rat cerebral cortex." *Br J Anaesth* 78(1): 55-9.
- Leaver, K. R., Allbutt, H. N., Creber, N. J., Kassiou, M., Henderson, J. M. (2008). "Neuroprotective effects of a selective N-methyl-D-aspartate NR2B receptor antagonist in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(11): 1388-94.
- Lee, J. M., Zipfel, G. J., Choi, D. W. (1999). "The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms." *Nature* 399(6738 Suppl): A7-14.
- Lipton, S. A., Rosenberg, P. A. (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." *N Engl J Med* 330(9): 613-22.
- Luginbuhl, M., Petersen-Felix, S., Zbinden, A. M., Schneider, T. W. (2005). "Xenon does not reduce opioid requirement for orthopedic surgery." *Can J Anaesth* 52(1): 38-44.
- MacIver, M. B., Mikulec, A. A., Amagasa, S. M., Monroe, F. A. (1996). "Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions." *Anesthesiology* 85(4): 823-34.
- Malinow, R., Malenka, R. C. (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* 25: 103-26.
- Mashour, G. A. (2004). "Consciousness unbound: toward a paradigm of general anesthesia." *Anesthesiology* 100(2): 428-33.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B. (1984). "Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones." *Nature* 309(5965): 261-3.
- McBain, C. J., Fisahn, A. (2001). "Interneurons unbound." *Nat Rev Neurosci* 2(1): 11-23.



- McKernan, R. M.,Whiting, P. J. (1996). "Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?" *Trends Neurosci* 19(4): 139-43.
- Merkel, G.,Eger, E. I., 2nd (1963). "A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency." *Anesthesiology* 24: 346-57.
- Meyer, H. (1899). "Theorie der Alkoholnarkose." *Arch Exp Pathol Pharmacol* 42: 109-118.
- Mihalek, R. M., Banerjee, P. K., Korpi, E. R., Quinlan, J. J., Firestone, L. L., Mi, Z. P., Lagenaur, C., Tretter, V., Sieghart, W., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., Fanselow, M. S., Guidotti, A., Spigelman, I., Li, Z., DeLorey, T. M., Olsen, R. W.,Homanics, G. E. (1999). "Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12905-10.
- Mihic, S. J.,Harris, R. A. (1997). "GABA and the GABAA receptor." *Alcohol Health Res World* 21(2): 127-31.
- Millan, M. J. (1999). "The induction of pain: an integrative review." *Prog Neurobiol* 57(1): 1-164.
- Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T. S.,Soltesz, I. (1994). "Bridging the cleft at GABA synapses in the brain." *Trends Neurosci* 17(12): 517-25.
- Moe, M. C., Berg-Johnsen, J., Larsen, G. A., Roste, G. K.,Vinje, M. L. (2002). "Sevoflurane reduces synaptic glutamate release in human synaptosomes." *J Neurosurg Anesthesiol* 14(3): 180-6.
- Molnar, Z.,Cheung, A. F. (2006). "Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons." *Neurosci Res* 55(2): 105-15.
- Monaghan, D. T., Bridges, R. J.,Cotman, C. W. (1989). "The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 365-402.
- Moore, K. A., Baba, H.,Woolf, C. J. (2000). "Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn." *Prog Brain Res* 129: 63-80.

- Mountcastle, V. B. (1997). "The columnar organization of the neocortex." *Brain* 120 ( Pt 4): 701-22.
- Nagele, P., Metz, L. B., Crowder, C. M. (2005). "Xenon acts by inhibition of non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*." *Anesthesiology* 103(3): 508-13.
- Nakanishi, N., Tu, S., Shin, Y., Cui, J., Kurokawa, T., Zhang, D., Chen, H. S., Tong, G., Lipton, S. A. (2009). "Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor." *J Neurosci* 29(16): 5260-5.
- Nakata, Y., Goto, T., Ishiguro, Y., Terui, K., Kawakami, H., Santo, M., Niimi, Y., Morita, S. (2001). "Minimum alveolar concentration (MAC) of xenon with sevoflurane in humans." *Anesthesiology* 94(4): 611-4.
- Neugebauer, V., Li, W., Bird, G. C., Bhave, G., Gereau, R. W. t. (2003). "Synaptic plasticity in the amygdala in a model of arthritic pain: differential roles of metabotropic glutamate receptors 1 and 5." *J Neurosci* 23(1): 52-63.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." *Nature* 307(5950): 462-5.
- Olpe, H. R., Karlsson, G., Pozza, M. F., Brugger, F., Steinmann, M., Van Riezen, H., Fagg, G., Hall, R. G., Froestl, W., Bittiger, H. (1990). "CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors." *Eur J Pharmacol* 187(1): 27-38.
- Ouardouz, M., Durand, J. (1991). "GYKI 52466 antagonizes glutamate responses but not NMDA and kainate responses in rat abducens motoneurons." *Neurosci Lett* 125(1): 5-8.
- Overton, C. (1901). *Studien über die Narkose*. Jena, Gustav Fischer Verlag.
- Paas, Y. (1998). "The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors." *Trends Neurosci* 21(3): 117-25.
- Parsons, C. G. (2001). "NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain." *Eur J Pharmacol* 429(1-3): 71-8.

- Parsons, C. G., Gruner, R., Rozental, J. (1994). "Comparative patch clamp studies on the kinetics and selectivity of glutamate receptor antagonism by 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) and 1-(4-amino-phenyl)-4-methyl-7,8-methylendioxy-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI 52466)." *Neuropharmacology* 33(5): 589-604.
- Partin, K. M., Fleck, M. W., Mayer, M. L. (1996). "AMPA receptor flip/flop mutants affecting deactivation, desensitization, and modulation by cyclothiazide, aniracetam, and thiocyanate." *J Neurosci* 16(21): 6634-47.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Gorter, J. A., Bennett, M. V., Zukin, R. S. (1997). "The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in neurological disorders." *Trends Neurosci* 20(10): 464-70.
- Perry, T. L., Berry, K., Hansen, S., Diamond, S., Mok, C. (1971). "Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy." *J Neurochem* 18(3): 513-9.
- Plested, A. J., Wildman, S. S., Lieb, W. R., Franks, N. P. (2004). "Determinants of the sensitivity of AMPA receptors to xenon." *Anesthesiology* 100(2): 347-58.
- Preckel, B., Mullenheim, J., Moloschavij, A., Thamer, V., Schlack, W. (2000). "Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo." *Anesth Analg* 91(6): 1327-32.
- Preckel, B., Weber, N. C., Sanders, R. D., Maze, M., Schlack, W. (2006). "Molecular mechanisms transducing the anesthetic, analgesic, and organ-protective actions of xenon." *Anesthesiology* 105(1): 187-97.
- Rammes, G., Eder, M., Zieglgansberger, W., Dodt, H. U. (2007). "Infrared-guided laser stimulation as a tool for elucidating the synaptic site of expression of long-term synaptic plasticity." *Methods Mol Biol* 403: 113-22.
- Rammes, G., Parsons, C., Muller, W., Swandulla, D. (1994). "Modulation of fast excitatory synaptic transmission by cyclothiazide and GYKI 52466 in the rat hippocampus." *Neurosci Lett* 175(1-2): 21-4.
- Rammes, G., Swandulla, D., Collingridge, G. L., Hartmann, S., Parsons, C. G. (1996). "Interactions of 2,3-benzodiazepines and cyclothiazide at AMPA receptors: patch

- clamp recordings in cultured neurones and area CA1 in hippocampal slices." *Br J Pharmacol* 117(6): 1209-21.
- Rammes, G., Swandulla, D., Spielmanns, P., Parsons, C. G. (1998). "Interactions of GYKI 52466 and NBQX with cyclothiazide at AMPA receptors: experiments with outside-out patches and EPSCs in hippocampal neurones." *Neuropharmacology* 37(10-11): 1299-320.
- Rammes, G., Zeilhofer, H. U., Collingridge, G. L., Parsons, C. G., Swandulla, D. (1999). "Expression of early hippocampal CA1 LTP does not lead to changes in AMPA-EPSC kinetics or sensitivity to cyclothiazide." *Pflugers Arch* 437(2): 191-6.
- Rampil, I. J. (1994). "Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats." *Anesthesiology* 80(3): 606-10.
- Rampil, I. J., King, B. S. (1996). "Volatile anesthetics depress spinal motor neurons." *Anesthesiology* 85(1): 129-34.
- Ranft, A., Kurz, J., Becker, K., Dodt, H. U., Zieglgansberger, W., Rammes, G., Kochs, E., Eder, M. (2007). "Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) pre- and postsynaptically attenuates NMDA receptor-mediated neurotransmission in the amygdala." *Neuropharmacology* 52(3): 716-23.
- Ranft, A., Kurz, J., Deuringer, M., Haseneder, R., Dodt, H. U., Zieglgansberger, W., Kochs, E., Eder, M., Hapfelmeier, G. (2004). "Isoflurane modulates glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the amygdala." *Eur J Neurosci* 20(5): 1276-80.
- Rex, S., Meyer, P. T., Baumert, J. H., Rossaint, R., Fries, M., Bull, U., Schaefer, W. M. (2008). "Positron emission tomography study of regional cerebral blood flow and flow-metabolism coupling during general anaesthesia with xenon in humans." *Br J Anaesth* 100(5): 667-75.
- Rex, S., Schaefer, W., Meyer, P. H., Rossaint, R., Boy, C., Setani, K., Bull, U., Baumert, J. H. (2006). "Positron emission tomography study of regional cerebral metabolism during general anesthesia with xenon in humans." *Anesthesiology* 105(5): 936-43.
- Rexed, B. (1952). "The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat." *J Comp Neurol* 96(3): 414-95.

- Reynolds, D. S., Rosahl, T. W., Cirone, J., O'Meara, G. F., Haythornthwaite, A., Newman, R. J., Myers, J., Sur, C., Howell, O., Rutter, A. R., Atack, J., Macaulay, A. J., Hadingham, K. L., Hutson, P. H., Belelli, D., Lambert, J. J., Dawson, G. R., McKernan, R., Whiting, P. J., Wafford, K. A. (2003). "Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms." *J Neurosci* 23(24): 8608-17.
- Rossaint, R., Reyle-Hahn, M., Schulte Am Esch, J., Scholz, J., Scherpereel, P., Vallet, B., Giunta, F., Del Turco, M., Erdmann, W., Tenbrinck, R., Hammerle, A. F., Nagele, P. (2003). "Multicenter randomized comparison of the efficacy and safety of xenon and isoflurane in patients undergoing elective surgery." *Anesthesiology* 98(1): 6-13.
- Rudolph, U., Antkowiak, B. (2004). "Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics." *Nat Rev Neurosci* 5(9): 709-20.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez De Armentia, M., Power, J. (2003). "The amygdaloid complex: anatomy and physiology." *Physiol Rev* 83(3): 803-34.
- Sajdyk, T. J., Shekhar, A. (1997). "Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acid A receptor blockade in the basolateral amygdala of rats." *J Pharmacol Exp Ther* 283(2): 969-77.
- Sakimura, K., Bujo, H., Kushiya, E., Araki, K., Yamazaki, M., Meguro, H., Warashina, A., Numa, S., Mishina, M. (1990). "Functional expression from cloned cDNAs of glutamate receptor species responsive to kainate and quisqualate." *FEBS Lett* 272(1-2): 73-80.
- Salmi, E., Laitio, R. M., Aalto, S., Maksimow, A. T., Langsjo, J. W., Kaisti, K. K., Aantaa, R., Oikonen, V., Metsahonkala, L., Nagren, K., Korpi, E. R., Scheinin, H. (2008). "Xenon does not affect gamma-aminobutyric acid type A receptor binding in humans." *Anesth Analg* 106(1): 129-34, table of contents.
- Sanders, R. D., Ma, D., Maze, M. (2004). "Xenon: elemental anaesthesia in clinical practice." *Br Med Bull* 71: 115-35.
- Sasaki, R., Hirota, K., Roth, S. H., Yamazaki, M. (2002). "Extracellular magnesium ion modifies the actions of volatile anesthetics in area CA1 of rat hippocampus in vitro." *Anesthesiology* 96(3): 681-7.

- Scatton, B. (1993). "The NMDA receptor complex." *Fundam Clin Pharmacol* 7(8): 389-400.
- Schmidt, M., Marx, T., Gloggl, E., Reinelt, H., Schirmer, U. (2005). "Xenon attenuates cerebral damage after ischemia in pigs." *Anesthesiology* 102(5): 929-36.
- Schmidt, M., Marx, T., Kotzerke, J., Luderwald, S., Armbruster, S., Topalidis, P., Schirmer, U., Reinelt, H. (2001). "Cerebral and regional organ perfusion in pigs during xenon anaesthesia." *Anaesthesia* 56(12): 1154-9.
- Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H., Bunney, B. S. (1989). "Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin." *J Comp Neurol* 290(2): 213-42.
- Sieghart, W., Sperk, G. (2002). "Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes." *Curr Top Med Chem* 2(8): 795-816.
- Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M., Barnard, E. A. (2004). "Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome." *J Biol Chem* 279(40): 41422-35.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1990). "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." *Science* 249(4976): 1580-5.
- Sonner, J. M., Antognini, J. F., Dutton, R. C., Flood, P., Gray, A. T., Harris, R. A., Homanics, G. E., Kendig, J., Orser, B., Raines, D. E., Rampil, I. J., Trudell, J., Vissel, B., Eger, E. I., 2nd (2003). "Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration." *Anesth Analg* 97(3): 718-40.
- Stephenson, F. A. (1995). "The GABAA receptors." *Biochem J* 310 ( Pt 1): 1-9.
- Steward, A., Allott, P. R., Cowles, A. L., Mapleson, W. W. (1973). "Solubility coefficients for inhaled anaesthetics for water, oil and biological media." *Br J Anaesth* 45(3): 282-93.
- Stoelting, R. K., Longnecker, D. E., Eger, E. I., 2nd (1970). "Minimum alveolar concentrations in man on awakening from methoxyflurane, halothane, ether and fluroxene anesthesia: MAC awake." *Anesthesiology* 33(1): 5-9.

- Stuart, G. J., Dodt, H. U., Sakmann, B. (1993). "Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy." *Pflugers Arch* 423(5-6): 511-8.
- Todd, A. J. (2002). "Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor." *Exp Physiol* 87(2): 245-9.
- Utsumi, J., Adachi, T., Miyazaki, Y., Kurata, J., Shibata, M., Murakawa, M., Arai, T., Mori, K. (1997). "The effect of xenon on spinal dorsal horn neurons: a comparison with nitrous oxide." *Anesth Analg* 84(6): 1372-6.
- Velly, L. J., Rey, M. F., Bruder, N. J., Gouvitsos, F. A., Witjas, T., Regis, J. M., Peragut, J. C., Gouin, F. M. (2007). "Differential dynamic of action on cortical and subcortical structures of anesthetic agents during induction of anesthesia." *Anesthesiology* 107(2): 202-12.
- Walker, D. L., Davis, M. (2008). "Amygdala infusions of an NR2B-selective or an NR2A-preferring NMDA receptor antagonist differentially influence fear conditioning and expression in the fear-potentiated startle test." *Learn Mem* 15(2): 67-74.
- Walker, M. C., Semyanov, A. (2008). "Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors." *Results Probl Cell Differ* 44: 29-48.
- Walters, R. J., Hadley, S. H., Morris, K. D., Amin, J. (2000). "Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms." *Nat Neurosci* 3(12): 1274-81.
- Watanabe, I., Takenoshita, M., Sawada, T., Uchida, I., Mashimo, T. (2004). "Xenon suppresses nociceptive reflex in newborn rat spinal cord in vitro; comparison with nitrous oxide." *Eur J Pharmacol* 496(1-3): 71-6.
- Waxham, M. N., Ed. (1999). *Neurotransmitter Receptors*. Fundamental Neuroscience. San Diego, Academic Press.
- Weathersby, P. K., Homer, L. D. (1980). "Solubility of inert gases in biological fluids and tissues: a review." *Undersea Biomed Res* 7(4): 277-96.

- Weiskrantz, L. (1956). "Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys." *J Comp Physiol Psychol* 49(4): 381-91.
- White, I. L., Franks, N. P., Dickinson, R. (2005). "Effects of isoflurane and xenon on Ba<sup>2+</sup>-currents mediated by N-type calcium channels." *Br J Anaesth* 94(6): 784-90.
- Wieboldt, R., Gee, K. R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B. K., Hess, G. P. (1994). "Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8752-6.
- Wieser, M. E. (2006). "Atomic Weights of the Elements 2005 (IUPAC Technical Report)." *Pure Appl. Chem.* 78(11): 2051-2066.
- Wilhelm, S., Ma, D., Maze, M., Franks, N. P. (2002). "Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal injury." *Anesthesiology* 96(6): 1485-91.
- Xiao, C., Huang, Y., Dong, M., Hu, J., Hou, S., Castellino, F. J., Prorok, M., Dai, Q. (2008). "NR2B-selective conantokin peptide inhibitors of the NMDA receptor display enhanced antinociceptive properties compared to non-selective conantokins." *Neuropeptides* 42(5-6): 601-9.
- Yagi, M., Mashimo, T., Kawaguchi, T., Yoshiya, I. (1995). "Analgesic and hypnotic effects of subanaesthetic concentrations of xenon in human volunteers: comparison with nitrous oxide." *Br J Anaesth* 74(6): 670-3.
- Yao, L. P., Bandres, J., Nemoto, E. M., Boston, J. R., Darby, J. M., Yonas, H. (1992). "Effect of 33% xenon inhalation on whole-brain blood flow and metabolism in awake and fentanyl-anesthetized monkeys." *Stroke* 23(1): 69-74.
- Zhang, P., Ohara, A., Mashimo, T., Imanaka, H., Uchiyama, A., Yoshiya, I. (1995). "Pulmonary resistance in dogs: a comparison of xenon with nitrous oxide." *Can J Anaesth* 42(6): 547-53.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., Alvarez-Royo, P., Clower, R. P. (1991). "Independence of memory functions and emotional behavior: separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala." *Hippocampus* 1(2): 207-20.



## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (...propionic acid)
BLA	Basolaterale Amygdala
CGP35348	p-(3-Aminopropyl)-P-diethoxymethylphosphinsäure
$C_M$	Spezifische Membrankapazität
CNB	$\alpha$ -Carboxy-2-nitrobenzyl
AP5	D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
EGTA	bis-(Aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraacetat
eEPSC	elektrisch evozierter Exzitatorischer postsynaptischer Strom (...current)
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (...current)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure (...acid)
GC	Gradientenkontrast (...contrast)
GluR	Glutamatrezeptor
$I_{\text{offset}}$	Potentialerhaltungsstrom
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (...current)
IR	Infrarot
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	N-methyl-D-aspartat
pC	photolytisch evozierter Strom („... current“)
PFC	Präfrontaler Kortex („prefrontal cortex“)

PSC	Postsynaptischer Strom (...current)
$R_M$	Spezifischer Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
$R_s$	Serienwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SG	Substantia gelatinosa
TM	Transmembransegment
TTX	Tetrodotoxin
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

**Verwendete Substanzen**

ACSF:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl <sub>2</sub>	2	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	1	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,37 (unter Sättigung mit Carbogen)

Intrazellulärlösung:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
EGTA	5	Sigma Aldrich
Glucose	5	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
K-Gluconat	130	Sigma Aldrich
KCl	5	Sigma Aldrich
Mg-ATP	2	Sigma Aldrich
Lidocain-Na-N-ethylchlorid	5	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,3 (mit KOH eingestellt)

Weitere Chemikalien:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
CNB-caged- Glutamat	100 µM	Sigma Aldrich
Gyki 52466		Tocris Bioscience
Cyclothiazid	100 µM	Sigma Aldrich
Tetrodotoxin	1 µM	Sigma Aldrich
CGP 35348	200 µM	Ciba Geigy
D-AP5	50 µM	Sigma Aldrich
Biccuculin methiodid	20 µM	Sigma Aldrich
NBQX	5 µM	Sigma Aldrich
Ro 25-6981	0,5 µM	Roche
NVP-AAM077	50 nM	Novartis

## Danksagung

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

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

Herrn Prof. Dr. G. Rammes für, die hervorragende Betreuung meiner experimentellen Arbeit, sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung der Arbeit.

Herrn Dr. R. Haseneder für die ausgezeichnete Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die vorzügliche Betreuung und die Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit zu jeder Zeit.

Herrn Prof. Dr. Zieglgänsberger und Dr. M. Eder, dass ich die Räumlichkeiten der AG Zieglgänsberger/Eder im Max-Planck-Institut für Psychiatrie nutzen konnte, sowie für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppen Zieglgänsberger/Eder am Max-Planck-Institut für Psychiatrie für die gute und angenehme Zusammenarbeit.

## Verzeichnis eigener Publikationen

Originalarbeiten:

**Xenon Reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) Receptor Mediated Synaptic Transmission in the Amygdala**

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Eckle VS, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Anesthesiology. 2008 Dec;109(6):998-1006

**The xenon-mediated antagonism against the NMDA receptor is non-selective for receptors containing either NR2A or NR2B subunits in the mouse amygdala**

Haseneder R\*, Kratzer S\*, Kochs E., Höfelmann D., Auberson Y., Eder M., Rammes G.  
Eur J Pharmacol. 2009 Oct 1;619(1-3):33-7

**Xenon Attenuates Excitatory Synaptic Transmission in the Rodent Prefrontal Cortex and Spinal Cord Dorsal Horn**

Haseneder R\*, Kratzer S\*, Kochs E, Mattusch C, Eder M, Rammes G.  
Anesthesiology. 2009 Dec;111(6):1297-307

**Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation**

Haseneder R, Kratzer S, von Meyer L, Eder M, Kochs E, Rammes G.  
Eur J Pharmacol. 2009 Nov 25;623(1-3):47-51. Epub 2009 Sep 16.

Abstracts / Kongressbeiträge

**Xenon Reduces Synaptic Transmission in the Mouse Amygdala, Prefrontal and Somatosensory Cortex but Does not Affect Synaptic Transmission in the Motor Cortex.**

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Eur J Anaesthesiol 2006;24 (supplS39)

**Xenon Reduces NMDA- and Non-NMDA-Receptor Mediated Synaptic Transmission Via Postsynaptic Mechanisms**

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Anesthesiology 2007; 107: A132

**Xenon reduziert die exzitatorische synaptische Transmission im präfrontalen Kortex über postsynaptische Mechanismen**

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Deutscher Anästhesie Congress, 2008

**Xenon reduces NMDA-receptor mediated synaptic transmission in the mouse amygdala via postsynaptic mechanisms and independent on the NR2A or NR2B subunit**

R Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
First Price, Best abstracts competition session, Eur J Anaesthesiol 2008;25(suppl 44):ESAPC1-1

**Xenon reduziert im präfrontalen Kortex die exzitatorische synaptische Transmission über postsynaptische Mechanismen**

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Anästhesiol Intensivmed 2008, 7:363-405

**Xenon Reduces Glutamatergic Synaptic Transmission to Neurons in the Spinal Cord Dorsal Horn**

Kratzer S, Haseneder R, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Anesthesiology 2008; 109: A720

**Xenon Reduces NMDA Receptor Mediated Synaptic Transmission in the Prefrontal Cortex and Spinal Cord Dorsal Horn via Postsynaptic Mechanisms**

Kratzer S, Haseneder R, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
J Neurosurg Anesthesiol 2008 Oct;20(4):324-5

**Xenon Blocks Hippocampal Long-term Potentiation in Acute Mice Brain Slices**

Kratzer S., Haseneder R, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G  
Eur J Anaesthesiol 2009;26(suppl 45): 7AP4-7

**Xenon-induced Reduction of AMPA Receptor-mediated Postsynaptic Currents in the Mouse Amygdala is Dependent on Receptor Deactivation.**

Haseneder R., Kratzer S., Kochs E., Eder M., Rammes G.  
Eur J Anaesthesiol 2009;26(suppl 45): 7AP4-8

**Xenon Reduces Synaptic Transmission to Substantia Gelatinosa Neurons Via Postsynaptic Mechanism**

Kratzer S., Haseneder R, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G.  
Anesthesiology 2009; 111:A783

**Lebenslauf****Stephan Alexander Kratzer**

geboren am 19.10.1981 in München als Sohn von Rudolf Kratzer (Rechtsanwalt) und Rita Kratzer, geb. Krieg (Richterin)

## Schulbildung:

1988-2001                      Grundschule und Gymnasium Planegg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

2001-2002                      Urologische Klinik München-Planegg

## Hochschulbildung:

2001-2008                      Medizinstudium im Reformstudiengang Medizin, Charité  
Universitätsmedizin Berlin

2008-2009                      Praktisches Jahr an der Technischen Universität  
München

Seit 2006                        Experimenteller Teil dieser Dissertation und  
anschließend wissenschaftliche Mitarbeit in der Klinik für  
Anaesthesiologie der TU München, Klinikum rechts der  
Isar

Seit 2010                        Arzt in Weiterbildung / Klinik für Anaesthesiologie der TU  
München, Klinikum rechts der Isar