

Arbeit aus der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. Phys. E. Kochs)  
und aus dem Zentrum für Präklinische Forschung der Technischen Universität München  
(Leitung: PD Dr. med. vet. J. Henke und Dr. med. vet. T. Brill)

angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. M. Blobner

vorgelegt über Univ.-Prof. med.vet. Dr. B. Aigner,  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf)  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf)

**LANGZEITPOTENZIERUNG IM HIPPOKAMPUS UND  
REZEPTOREXPRESSSION IN DEN FÜR DIE KOGNITION  
BESONDERS RELEVANTEN GEHIRNREGIONEN  
24 STUNDEN NACH DER ISOFLURAN-NARKOSE BEI  
MÄUSEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Alexandra Piroshka Plack  
aus  
Nürnberg

München 2008

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Für meine Eltern

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b> .....	<b>2</b>
2.1	Anatomische und neurophysiologische Grundlagen .....	2
2.1.1	Hippokampale Formation .....	2
2.1.1.1	Anatomie des Hippokampus .....	2
2.1.1.2	Innerhippokampale Verbindungen .....	3
2.1.1.3	Verbindungen zwischen dem Hippokampus und dem Kortex .....	4
2.1.2	Rezeptoren und Neurotransmitter .....	5
2.1.2.1	Glutamat-Rezeptoren .....	6
2.1.2.2	Acetylcholin-Rezeptor .....	8
2.1.2.3	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor .....	9
2.1.3	Extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen im Nervengewebe .....	11
2.1.4	Synaptische Plastizität .....	11
2.1.4.1	Langzeitpotenzierung .....	12
2.1.4.2	Langzeitdepression .....	19
2.2	Modifikation der synaptischen Übertragungsstärke durch verschiedene volatile Anästhetika .....	19
2.2.1	Inhalationsanästhetikum Isofluran .....	19
2.2.1.1	Physikalische und chemische Eigenschaften .....	19
2.2.1.2	Anästhetische Potenz .....	20
2.2.1.3	Zentraler Wirkmechanismus .....	21
2.2.1.4	Modifikation der synaptischen Plastizität .....	24
2.2.2	Einfluss weiterer volatiler Anästhetika auf die Langzeitpotenzierung .....	25
2.2.2.1	Sevofluran .....	25
2.2.2.2	Halothan und Methoxyfluran .....	25
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b> .....	<b>26</b>
3.1	Zielvorstellung .....	26
3.2	Material und Methodik .....	26
3.2.1	Versuchstiere .....	26
3.2.2	Haltungsbedingungen .....	27
3.2.3	Versuchsplan .....	27
3.2.4	Narkosemanagement .....	27
3.2.5	Extrazelluläre elektrophysiologische Untersuchung .....	30
3.2.5.1	Präparation der Gehirnschnitte .....	30
3.2.5.2	Elektrophysiologische Ableitungen .....	32
3.2.6	Western-Blot Verfahren .....	35
3.2.6.1	Entnahme des Gehirns .....	35
3.2.6.2	Isolierung der Gehirnareale .....	35
3.2.6.3	Homogenisierung der Membranproteine .....	36
3.2.6.4	Proteinbestimmung nach Lowry und Denaturierung der homogenisierten Gewebebeobten .....	37
3.2.6.5	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese System .....	38
3.2.6.6	Transfer der Proteine .....	39
3.2.6.7	Blockieren der Membran und Inkubation mit den Antikörpern .....	39
3.2.6.8	Entwicklung und Auswertung des Western-Blots .....	41
3.2.7	Zusammensetzung der Puffer und der Gele für die Elektrophoresekammer .....	42
3.3	Statistik .....	45
3.4	Ergebnisse .....	46
3.5	Erhobene Parameter der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen .....	47
3.5.1.1	Reizmuster der Theta-Burst Stimulation .....	47
3.5.1.2	Reizmuster des 2 * 100 Hertz / 1 Sekunde-Stimulus .....	53

3.5.1.3	Reizmuster des 1 * 100 Hertz / 1 Sekunde-Stimulus .....	59
3.5.2	Werte der Western-Blot Analyse .....	65
3.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	73
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
4.1	Diskussion der Methoden.....	74
4.1.1	Narkosemanagement .....	74
4.1.2	Extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen.....	76
4.1.3	Western-Blot Analyse .....	78
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	78
4.2.1	Parameter der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen.....	78
4.2.2	Parameter der Western-Blot Analyse .....	81
4.2.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>109</b>

# 1 Einleitung

Postoperative kognitive Defizite (POCD) treten besonders häufig bei älteren Menschen auf. So sind 10 % bis 14 % der Patienten auch drei Monate nach dem Eingriff noch von einer Beeinträchtigung der neurokognitiven Leistungsfähigkeit betroffen (MOLLER et al., 1998). Die Ätiologie der POCD ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Man geht davon aus, dass es sich bei diesem Phänomen um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Eine potenzielle Korrelation zwischen der POCD und der Allgemeinanästhesie ist seit einigen Jahren ein Forschungsschwerpunkt der anästhesiologischen Intensivmedizin und wird kontrovers diskutiert.

Volatile Anästhetika, zum Beispiel Isofluran, nehmen Einfluss auf die Funktionalität des Gehirns, indem sie neuronale Membranen, den zerebralen Blutfluss, Rezeptoren, Ionenkanäle sowie die Expression der Neurotransmitter modifizieren und beeinflussen somit die synaptische Transmission (FRANKS und LIEB, 1994).

Eine potenzielle Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung durch volatile Anästhetika ist ein möglicher Faktor der Pathogenese der POCD. Dem entgegengesetzt stehen die Analyseergebnisse von Forschergruppen, die eine Steigerung der kognitiven Leistungen sowohl im Nagelmodell als auch bei humanmedizinischen Patienten nach einer Isofluran-Narkose konstatieren (KOMATSU et al., 1993; LANGER et al., 1995).

Während die Analyse der akuten molekularbiologischen Effekte von Anästhetika auf das zentrale Nervensystem (ZNS) bereits seit einigen Jahren ein Forschungsschwerpunkt der Medizin ist, existieren bislang jedoch nur sehr wenige Erkenntnisse über die längerfristige Beeinflussung der synaptischen Plastizität durch Anästhetika. In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig der Einfluss des volatilen Anästhetikums Isofluran auf die synaptische Plastizität 24 Stunden nach der Inhalations-Narkose mithilfe einer extrazellulären elektrophysiologischen Analysemethodik erfasst. Ferner wird anhand der Western-Blot Analyse überprüft, inwiefern Isofluran auf die Expression verschiedener Rezeptorsubtypen, in Gehirnregionen die für die kognitive Leistungsfähigkeit besonders relevant sind, Einfluss nimmt.

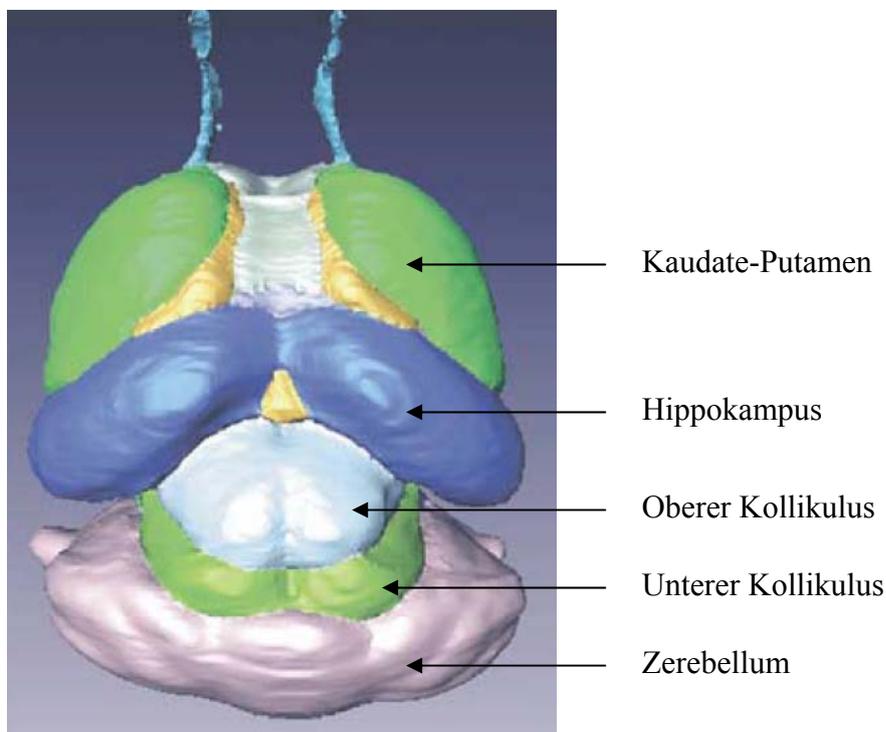
## 2 Schrifttum

### 2.1 Anatomische und neurophysiologische Grundlagen

#### 2.1.1 Hippokampale Formation

##### 2.1.1.1 Anatomie des Hippokampus

Ein wesentlicher Bestandteil des so genannten limbischen Systems ist der Hippokampus (Abbildung 1). Diese anatomische Struktur umfasst mehrere Gebiete, welche sich in ihrer Architektur unterscheiden, und durch ein engmaschiges Netz von Nervenbahnen miteinander verbunden sind. So differenziert man zwischen Gyrus dentatus, Hippokampus proper, dem Subikulum sowie dem entorhinalen Kortex (SITOH und TIEN, 1997).



**Abbildung 1:** Dreidimensionale Darstellung des Gehirns einer adulten C57BL/6 Maus nach der Resektion von Neokortex, Bulbus olfaktorius und der externen Kapsel, modifiziert nach MA et al. (2005).

Der Gyrus dentatus besteht zytoarchitektonisch aus der Körnerzellschicht, der an Nervenzellkörpern armen Molekularzellschicht, und einer aus einem Konglomerat an polymorphen Zellen zusammengesetzten Schicht. Axone der Dendriten der Körnerzellschicht bilden die so genannten Moosfasern. Eine Unterteilung des Hippokampus proper in die Regionen CA1 bis CA4 ist möglich, wobei nur die Regionen CA1 und CA3 von besonderer funktionaler und anatomischer Bedeutung für die neurophysiologischen Prozesse sind. Die laminare Struktur dieses Gebiets des Hippokampus ist mehrschichtig und besteht aus dem so genannten Stratum oriens, dem Stratum lucidum, welches nur in der CA3-Region lokalisiert ist und dem Stratum lacunosum moleculare (AMARAL und WITTER, 1995). Die anatomische Position des Subikulums ist zwischen der CA1-Region des Hippokampus proper und dem entorhinalen Kortex lokalisiert. Einzelne Anteile des Subikulums werden unter dem Begriff „Subikulum-Komplex“ zusammengefasst. Das Subikulum proper, das Presubikulum und das Parasubikulum sind Untereinheiten dieses Komplexes. Eine für die hippokampale Formation typische Dreischichtung findet sich auch im Subikulum wieder. Dieses setzt sich aus einer Molekularschicht, einer Pyramidenzellschicht und einer Schicht aus polymorphen Zellen zusammen (O'MARA, 2005). Gemäß AMARAL und WITTER (1995) lassen sich innerhalb der Pyramidenzellschicht viele kleinere Neurone identifizieren, welche als die Interneurone des Subikulums klassifiziert werden. Der entorhinale Kortex setzt sich ebenfalls aus mehreren Schichten zusammen. Die Unterteilung erfolgt in insgesamt sechs Schichten. Innerhalb dieses Aufbaus unterscheidet man vier zelluläre Schichten (II, III, V und VI) sowie zwei Schichten ohne spezifische Zellstruktur (I und IV) (MARK et al., 1993). Die Gesamtheit dieser anatomischen Strukturen ist durch ein komplexes Netzwerk neuromodulatorischer Bahnen miteinander verbunden (AMARAL und WITTER, 1995).

### **2.1.1.2 Innerhippokampale Verbindungen**

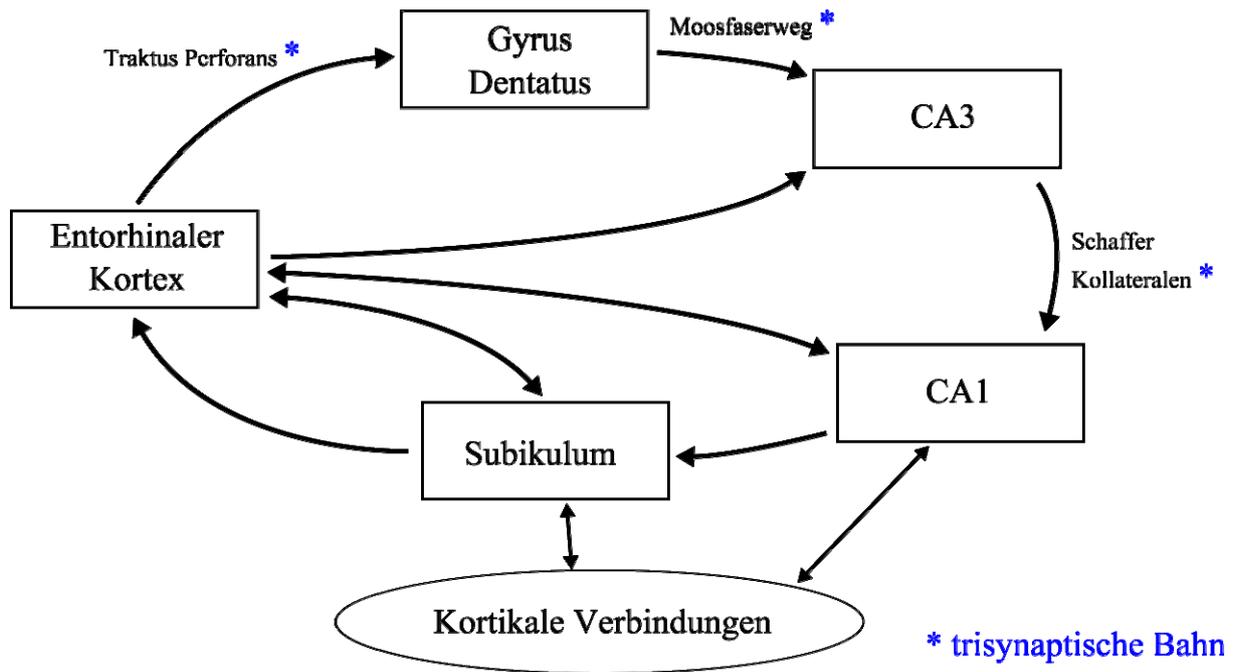
Innerhalb des neuronalen Netzwerkes des Hippokampus existieren drei maßgebliche afferente Verbindungswege, die unter dem Begriff „trisynaptische Bahn“ zusammengefasst werden (Abbildung 2). Diese anatomische Struktur nimmt ihren Ursprung in dem Tractus perforans. Der Tractus perforans erhält Faserzüge maßgeblich aus den Schichten II und III des entorhinalen Kortex, welche die neuronale Erregung über glutamaterge Fasern zum Gyrus dentatus, dem Stratum lacunosum moleculare der CA3- und CA1-Region des Hippokampus

proper sowie zum Subikulum weiterleiten (WITTER et al., 2000). Eine weitere Komponente der trisynaptischen Bahn sind die Moosfasern. Sie verbinden die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus mit den Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippokampus. Den dritten Anteil dieses Leitsystems bilden die Schaffer-Kollateralen, welche die Pyramidenzellen der CA3-Region mit den Pyramidenzellen der CA1-Region verknüpfen. Gemäß ihres Aufbaus und ihrer Funktionalität ist die trisynaptische Bahn unidirektional und die exzitatorische Hauptkomponente der hippokampalen Formation (HENZE et al., 2000).

Die innerhippokampalen Verbindungen, die von der CA1-Region des Hippokampus ausgehen sind hingegen bidirektional. So projiziert der entorhinale Kortex einerseits zu den Neuronen der CA1-Region, erhält aber auch Informationen aus diesem Gebiet. Die Fasern der CA1-Gegend leiten die Erregung weiter zum Subikulum, welches ebenfalls eine bidirektionale Verbindung zum entorhinalen Kortex aufweist (AMARAL und WITTER, 1995).

### **2.1.1.3 Verbindungen zwischen dem Hippokampus und dem Kortex**

Das Subikulum ist eine maßgebliche Schnittstelle zwischen der Hippokampusformation und subkortikalen sowie kortikalen Regionen, da eine Vielzahl efferenter Bahnen an dieser Stelle ihren Ursprung nehmen (Abbildung 2). Efferente Bahnen verlassen ebenfalls die CA1-Region des Hippokampus und den entorhinalen Kortex in Richtung Formationen des Subkortex sowie des Kortex (MARK et al., 1995).



**Abbildung 2:** Schematische Abbildung der Verbindungen zwischen dem Hippokampus und dem Kortex, modifiziert nach AMARAL und WITTER (1995).

Diese Vielzahl von Signaltransduktionswegen ist beweisend für eine dreidimensionale Organisation der hippokampalen Formation (AMARAL und WITTER, 1989).

### 2.1.2 Rezeptoren und Neurotransmitter

Eine Weiterleitung der Erregung innerhalb des ZNS erfolgt überwiegend über Neurotransmitter. Die über die Neurotransmitter induzierte Signaltransduktion wird zu den spezifischen Rezeptoren im postsynaptischen Kompartiment weitergeleitet.

Die Stoffklasse der Neurotransmitter umfasst eine heterogene Gruppe biochemisch wirksamer Substanzen: biogene Amine, Neuropeptide, Aminosäuren und lösliche Gase. Je nach Wirkungsform unterscheidet man erregende und hemmende Neurotransmitter. Der bedeutendste erregende Neurotransmitter im ZNS ist die Aminosäure Glutamat. Ein Großteil der hemmenden Effekte im ZNS wird hingegen über die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) vermittelt. Gemäß der klassischen Lehrmeinung erfolgt die Weiterleitung der Erregung durch Neurotransmitter im ZNS an Synapsen. Botenstoffe, wie zum Beispiel Glutamat, werden in den Vesikeln der präsynaptischen Nervenendigung gespeichert und durch ein Aktionspotenzial freigesetzt (APPLEGATE et al., 1987). Es folgt eine Diffusion der Neurotransmitter durch den synaptischen Spalt und Bindung im Bereich der postsynaptischen

Membran an Rezeptoren, welche mit einer Permeabilitäts- oder Potenzialänderung reagieren, dies wiederum führt zu einer De- oder Hyperpolarisation der Membran. Neueste Studien widerlegen die Aussage, dass der Ort der Erregungsübertragung auf die Synapsen beschränkt ist. Eine Weiterleitung der Signale erfolgt demnach zwar zum überwiegenden Teil über die klassische Kontaktstelle zwischen zwei Synapsen, aber die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat ist auch entlang von Axonen im Bereich der weißen Substanz in Absenz von Nervenendigungen gewährleistet (KUKLEY et al., 2007; ZISKIN et al., 2007).

### **2.1.2.1 Glutamat-Rezeptoren**

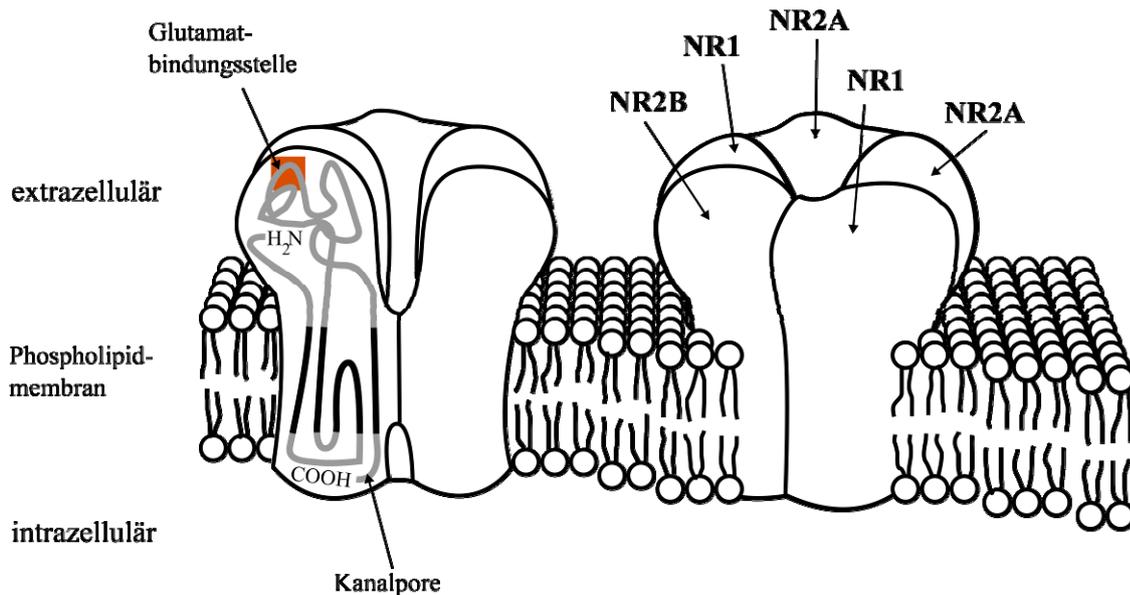
Gemäß ihres Aufbaus und ihrer Funktionalität lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Gruppen von Glutamat-Rezeptoren unterscheiden, die ionotropen sowie die metabotropen Glutamat-Rezeptoren.

#### Ionotrope Glutamat-Rezeptoren

Eine Bindung von L-Glutamat an die ionotropen Rezeptoren katalysiert die Ausbildung einer kationenselektiven Kanalpore (HOLLMANN und HEINEMANN, 1994). Demzufolge repräsentieren die Glutamat-Rezeptoren ligandengesteuerte Ionenkanäle, welche postsynaptische Ströme mit sehr schnellen Anstiegs- und Abfallzeiten des Aktionspotenzials im Millisekundenbereich vermitteln. Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGlu) zählen zu den exzitatorischen Aminosäure-Rezeptoren (ASR) und werden in drei bedeutende Subtypen klassifiziert. Hierzu gehören der NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), der AMPA-Rezeptor ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure-Rezeptor) sowie der Kainat-Rezeptor (MORI und MISHINA, 1995).

- *N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor*

Ein Großteil der exzitatorischen synaptischen Übertragung wird über NMDA-Rezeptoren vermittelt. Diese sind langsamer aber andauernder in der Rezeptorantwort als die Non-NMDA-Rezeptoren (STARK et al., 2000). Die NMDA-Rezeptoren sind membranständig und aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Man unterscheidet drei Klassen von Untereinheiten: den NR1-Subtyp (Abbildung 3), von dem insgesamt acht unterschiedliche Varianten kloniert wurden (NR1A bis H); den NR2-Subtyp, welcher sich aus vier Untereinheiten (NR2A bis NR2D) zusammensetzt, sowie den NR3 (A und B)-Subtyp.



**Abbildung 3:** Skizze des Aufbaus des *N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors*, modifiziert nach STARK et al. (2000).

Der NMDA-Rezeptor besitzt eine entscheidende Funktion für die Etablierung von Lern- und Gedächtnisprozessen. Mutierte Mäuse, die Defizite im Bereich des NMDA-Rezeptors aufweisen, zeigen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutlich schlechtere Lernleistung in verschiedenen Verhaltenstests, welche die Beurteilung des visuellen Erinnerungsvermögens sowie den Grad kontextabhängiger Konditionierung ermöglichen (SHIMIZU et al., 2000).

- *α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptor*

Der AMPA-Rezeptor zählt zu der Gruppe der Non-NMDA-Rezeptoren und ist aus den vier Untereinheiten GluR1 bis GluR4 aufgebaut. Seine Funktionalität besteht in einer Vermittlung der schnellen Komponente des postsynaptischen Stromes. Die Untereinheiten des Rezeptors existieren in zwei Varianten, der „Flip“- oder „Flop“-Form. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer Morphologie durch die An- beziehungsweise Abwesenheit eines gespleißten Exons, sondern auch bezüglich ihrer Funktionalität. So bedingt innerhalb des AMPA-Rezeptors die „Flip“-Form ein geringeres Maß an Rezeptordesensitivierung als die „Flop“-Form. Diese Potenz zur Herabregulation der Autorezeptoren ist ein charakteristisches Merkmal der Non-NMDA-Rezeptoren und dient zur Protektion vor einer durch Glutamat vermittelten Toxizität. Die Kombination der Untereinheiten GluR1 bis GluR4 bestimmt die Ionenspezifität der AMPA-Rezeptoren, insbesondere für die Kalzium-Ionen. Die Untereinheiten GluR1, GluR3

und GluR4 sind permeabel für Kalzium-Ionen, wohingegen die Vertreter des AMPA-Rezeptors, die eine GluR2-Untereinheit besitzen, dies nicht sind (BETTNER und MULLE, 1995).

- *Kainat-Rezeptor*

Ebenfalls zu den Non-NMDA-Rezeptoren zählt der Kainat-Rezeptor. Die Kainat-Rezeptoren sind von großer Bedeutung für die Induktion der Verstärkung der synaptischen Übertragung (BORTOLOTTI et al., 1999). Diese Rezeptoren setzen sich aus vier oder fünf Rezeptoruntereinheiten GluR5 bis GluR7, von denen verschiedene Spleißvarianten existieren, sowie den Regionen KA1 und KA2 zusammen (MELLOR, 2006). Die Untereinheiten des Rezeptors differieren nicht nur in ihrem Aufbau sondern auch in ihrer Funktionalität. So sind nur die Untereinheiten GluR5 bis GluR7 Ionenkanäle, welche ein langsames exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP) vermitteln. Sie arbeiten nach einem ionotropen Prinzip.

### Metabotrope Glutamat-Rezeptoren

Die KA1 und KA2 Region des Kainat-Rezeptors agieren metabotrop, das heißt die Signaltransduktion erfolgt über Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine und „second messenger“ Kaskaden, die Signale in das Zellinnere weiterleiten. Dieser indirekte Wirkmechanismus bedingt Ionenströme mit längeren Latenzen als sie bei der Signaltransduktion über ionotrope Rezeptoren beobachtet werden können. Es lassen sich acht verschiedene metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR1 bis mGluR8) klassifizieren. Es wird diskutiert, inwieweit die neuromodulatorischen Effekte, welche über die metabotropen Glutamat-Rezeptoren vermittelt werden, auch in Plastizitätsvorgängen an den Synapsen involviert sind (PIN und DUVOISIN, 1995).

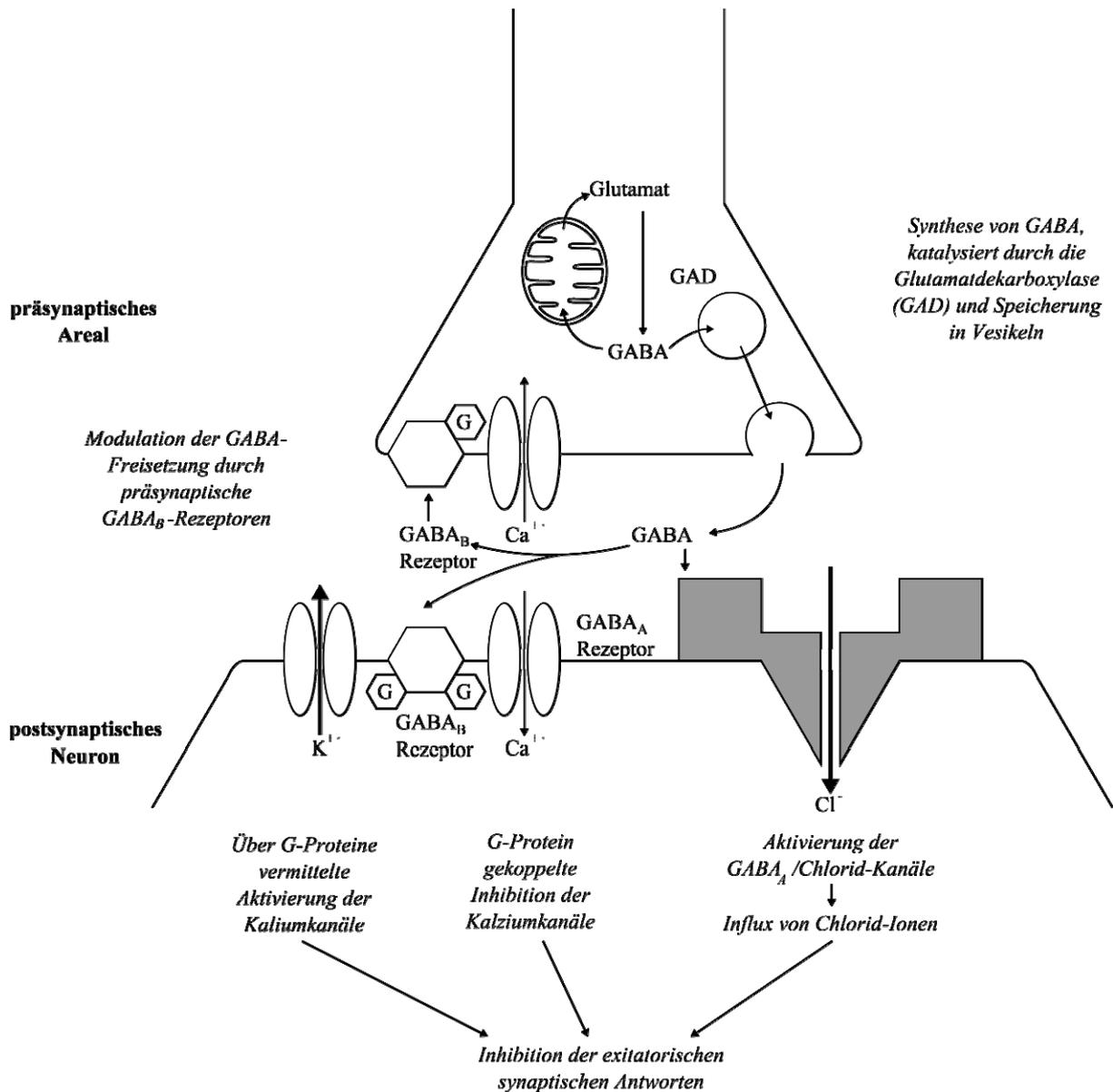
### **2.1.2.2 Acetylcholin-Rezeptor**

Den Acetylcholin-Rezeptoren dient der Neurotransmitter Acetylcholin als Substrat. Es existieren zwei Varianten des Acetylcholin-Rezeptors. Man unterscheidet die muskarinerge sowie die nikotinerge Form. Die muskarinergen Rezeptoren sind an ein Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt. Bei dem nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor handelt es sich gemäß seiner Funktionalität um einen ionotropen Rezeptor, der sich aus

insgesamt fünf Untereinheiten zusammensetzt. Die enge Korrelation zwischen der durch den Neurotransmitter Acetylcholin vermittelten Signaltransduktion und Lernleistung sowie Gedächtnisprozessen, ist Inhalt einer Vielzahl pharmakologischer Studien und Habituerungsprotokollen. So verbessern beispielsweise direkte Injektionen cholinergischer Agonisten in die hippocampale Gehirnregion die Resultate von Mäusen in Habituerungsprotokollen, die den T-Maze mit einem Fußschock bei Aufsuchen der „inkorrekten“ Zielbox kombinieren. Die Injektion der Pharmaka resultiert in einer positiven Modifikation der Erinnerungsleistung im passiven Vermeidungslernen von Nagern (FARR et al., 2000).

### **2.1.2.3 $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor**

Transmembranproteine von Nervenzellen, die eine Bindungsstelle für den Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) aufweisen, werden als GABA-Rezeptoren deklariert. Es lassen sich drei große Gruppen klassifizieren: der GABA<sub>A</sub>-, der GABA<sub>B</sub>- sowie der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor setzt sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammen. Mithilfe von Genomanalysen ist es gelungen, insgesamt neunzehn verschiedene Untereinheiten zu identifizieren (BARNARD et al., 1998). Eine bedeutende Untereinheit ist die GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1, welche ubiquitär im zerebralen Kortex, Thalamus, Zerebellum und Hippokampus exprimiert wird, und anteilig in 40 % aller GABA-Rezeptoren des Gehirns enthalten ist. Gemäß seiner Funktionalität zählt der GABA-Rezeptor zu der Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Er agiert demnach ionotrop. Die Bindung des Neurotransmitters GABA resultiert in einer Kanalöffnung des Rezeptors und der Aussendung eines inhibitorischen Signals. Eine Aktivierung des Ionenkanals setzt eine Bindung von GABA an zwei verschiedenen, sich entsprechenden  $\beta$ -Untereinheiten des Rezeptors voraus. Die GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind aus sieben Untereinheiten zusammengesetzt. Sie zählen zu den metabotropen Rezeptoren, der Effekt an den Kalium- und Kalzium-Kanälen im post- sowie präsynaptischen Kompartiment, wird über „second messenger“ Kaskaden vermittelt (Abbildung 4) (BLAIR et al., 1999).



**Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus und der Funktionalität des GABA-Rezeptors, modifiziert nach TANELIAN et al. (1993).**

Einige Forscher postulieren die Existenz einer dritten Gruppe von GABA-Rezeptoren, die so genannten GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren oder auch „atypischen“ GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die auch als ligandengesteuerte Ionenkanäle fungieren (DREW et al., 1984). Diese Terminologie wird jedoch kontrovers diskutiert, da weitere Studien den Beweis erbracht haben, dass es sich bei dem vermeintlichen dritten Subtyp des GABA-Rezeptors tatsächlich um eine Variante des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors handelt, deren strukturelle Kombination  $\rho$ -Untereinheiten enthält (BARNARD et al., 1998). Es gilt als erwiesen, dass die GABA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Modifikation der Effekte der synaptischen Übertragung einnehmen (DAVIES et al., 1991).

### **2.1.3 Extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen im Nervengewebe**

Die Aktivität der Nervenzellen basiert maßgeblich auf einem Ionenstrom, der vom Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum des Neurons und umgekehrt fließt. „Ein- und Austrittspunkt“ des Stromes entlang der Membran können jedoch variieren, in diesem Fall erfolgt ein Schluss des Stromkreises über den Extrazellulärraum, resultierend in Potenzialdifferenzen, die man in Form von Feldpotenzialen messen kann. In der Neurobiologie wird demzufolge ein elektrisches Potenzial, welches sich bei einer neuronalen Erregung extrazellulär ableiten und messen lässt, als Feld-Exzitatorisches Postsynaptisches Potenzial (Feld-EPSP) bezeichnet. Als besonders gut geeignet für in vitro Messungen der Feld-EPSPs hat sich der Hippokampus erwiesen. Die zytoarchitektonische Struktur der hippokampalen Formation ist gekennzeichnet durch eine parallele Anordnung der Pyramidenzellen und eine Zonierung der wichtigsten Afferenzen an den Dendriten, diese neuronale Anordnung wird als engl. „Open Field“-Struktur bezeichnet (HUBBARD et al., 1969). Das Resultat dieser räumlich eng konzentrierten, hohen Synapsendichte und ihrer spezifischen Organisation sind relativ große Feld-EPSPs nach einem Stimulus. Die Folge eines überschwelligeren Reizes ist ein hohes Maß an exzitatorischer synaptischer Aktivität, die wiederum die Ausbildung eines Aktionspotenzials (AP) katalysiert. An der Messelektrode wird dieses AP als negative Stromsenke gemessen.

### **2.1.4 Synaptische Plastizität**

Die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung wird als synaptische Plastizität definiert (HEBB, 1949). Gemäß der Hebb'schen Regel basieren Lern- und Gedächtnisvorgänge auf Modifikationen der synaptischen Übertragungsstärke zwischen Neuronen, die gleichzeitig aktiv sind. Die Deklaration der synaptischen Plastizität als etabliertes Modell für die Manifestation insbesondere von Langzeiterinnerungsprozessen, wird jedoch kontrovers diskutiert. Ein bedeutender Kritikpunkt ist, dass strukturelle Veränderungen synaptischer Verbindungen die Basis für mitunter lebenslange Gedächtnisleistungen bilden sollen. Als alternatives Modell wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass das andauernde Erinnerungsvermögen auf Modifikationen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Neuronen basiert (CRICK, 1984). Aktuelle Studien beweisen, dass zumindest die Induktion der synaptischen Plastizität im Hippokampus von einer dynamischen kovalenten chemischen Modifikation der DNA, im Sinne einer DNA-

Methylierung, katalysiert wird. Daraus folgt eine Aktivierung von Genen, wie zum Beispiel „reelin“, die eine positive Modifikation der Gedächtnisleistung zur Folge hat (LEVENSON et al., 2006; MILLER und SWEATT, 2007).

Grundsätzlich lassen sich zwei Formen der aktivitätsabhängigen Änderung der Übertragungsstärke unterscheiden: die Potenzierung oder die Depression eines Signals. Die Verminderung oder auch Depression der synaptischen Effizienz wird entsprechend der Dauer der Wirksamkeit als Kurzzeitdepression (Short Term Depression, STD) oder Langzeitdepression (Long Term Depression, LTD) definiert. Eine Verstärkung der synaptischen Übertragung bezeichnet man als Potenzierung. Es existieren zwei Varianten: die Kurzzeitpotenzierung (STP) sowie die Langzeitpotenzierung (LTP). Die LTP ist ein etabliertes zelluläres Modell für die Ausbildung von Lern- und Gedächtnisinhalten (BLISS und COLLINGRIDGE, 1993).

#### **2.1.4.1 Langzeitpotenzierung**

Es lassen sich zwei Formen der LTP unterscheiden. Die „frühe Phase“ der LTP (engl. early-LTP, E-LTP) wird durch eine einzelne hochfrequente Stimulation ausgelöst (HUANG und KANDEL, 2005), und zeigt eine Wirkung, die lediglich bis zu vier Stunden nach dem Stimulus nachweisbar ist. Die Expression der E-LTP basiert auf einer post-translationellen Modifikation von Proteinen, die im Bereich der postsynaptischen Membran stattfindet. Die Effekte der „späten Phase“ (engl. late-LTP, L-LTP) werden durch Stimulationen bei 100 Hertz (Hz) ausgelöst. Eine Sonderform der L-LTP stellt die so genannte Theta-LTP dar. Die Induktion der Theta-LTP basiert auf Signalfolgen von Stimulationen bei 100 Hz, welche auf einem niederfrequenten Level von 5 Hz für 30 Sekunden wiederholt werden. Es lassen sich demzufolge zwei Formen der L-LTP unterscheiden: die durch höherfrequente Stimuli ausgelöste LTP, sowie die Theta-LTP (HUANG und KANDEL, 2005). Die durch höherfrequente Stimulation ausgelöste Form der L-LTP basiert auf einer de novo Synthese von Proteinen und ist sowohl von Transkriptions- als auch von Translationsprozessen abhängig. Die Neusynthese und die Regulation der Expression von Proteinen erfolgt sowohl präsynaptisch im Zellkörper als auch in postsynaptischen Kompartimenten (CRACCO et al., 2005). Diese Prozesse basieren auf einem Vorgang, der im englischen Sprachgebrauch als „synaptic tagging / capture“ bezeichnet wird. Untersuchungen mit *Aplysia* Zellkulturen (MARTIN et al., 1997) und Hippokampus-Schnitten (FREY und MORRIS, 1998) zeigen,

dass komplexe Vorgänge, wie Transkriptionsprozesse nur an aktivierten und durch einen „synaptischen“ Marker gekennzeichneten Synapsen beobachtet werden können. Ein komplexes Zusammenspiel von Ionenkanälen, Adhäsionsmolekülen, dem Aktin-Netzwerk und aktivierten Kinasen wird als Grundlage für die Identifikation der entsprechenden Synapsen diskutiert (MARTIN und KOSIK, 2002). Dieser Marker existiert jedoch nur für eine bestimmte Zeit, und weist in vivo eine Halbwertszeit von 30 Minuten auf (REYMANN und FREY, 2007). In vitro beträgt die Halbwertszeit des Markers bei 32 °C hingegen 1 bis 2 Stunden (SAJIKUMAR und FREY, 2004). In vitro kann der Marker auch durch eine niederfrequente Stimulation kurz nach der Induktion der E-LTP zurückgesetzt, und so die längerfristige Manifestierung von Lern- sowie Gedächtnisprozessen gestoppt werden (SAJIKUMAR und FREY, 2004).

Neben den Transkriptions- und Translationsprozessen im Zellkörper sind für die Proteinsynthese auch die Vorgänge in postsynaptischen Kompartimenten, wie den Dendriten von entscheidender Bedeutung (STEWART und SCHUMAN, 2001). Diese These wird gestützt durch die Identifikation von spezifischen mRNAs, tRNAs sowie Polyribosomen, welche ubiquitär in den Dendriten vorkommen und für Translationsprozesse essenziell sind (JOB und EBERWINE, 2001).

Diese Gesetzmäßigkeiten lassen sich nicht auf die Theta-LTP, die nur lokal in den isolierten Cornu ammonis1 (CA1) Dendriten ausgebildet wird, übertragen. Diese Variante ist unabhängig von Transkriptionsprozessen, basiert jedoch auf Translationsabläufen. Des Weiteren führt die Theta-LTP nicht zu dem Phänomen des engl. „synaptic capture“, alle Effekte bleiben auf das jeweilige synaptische Kompartiment beschränkt (HUANG und KANDEL, 2005).

### **Mechanismen zur Auslösung der Langzeitpotenzierung**

Komplexe Interaktionen zwischen Rezeptoren und Enzymkaskaden bilden die Basis für die Induktion der LTP. Grundsätzlich lassen sich die Induktionsmechanismen in zwei große Varianten unterteilen, mit sowie ohne Beteiligung des NMDA-Rezeptors.

## NMDA-Rezeptor-abhängige Induktion der LTP

Eine Induktion der LTP erfolgt überwiegend über den vom NMDA-Rezeptor-abhängigen Weg. Hierzu wird eine nahezu gleichzeitige Koinzidenz von synaptischer Aktivität und adäquater postsynaptischer Depolarisation benötigt (NICOLL und MALENKA, 1999).

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erfolgt nach dem Koagonismusprinzip. Zwei Liganden (N-Methyl-D-Aspartat oder L-Glutamat, sowie Glycin) müssen an den jeweiligen Aktivierungsstellen binden, um eine Kanalöffnung und einen Ionenfluss (Ionenspezifität des Rezeptors für Natrium, Kalium und Kalzium) (Abbildung 5 A und B) zu erzielen (COLLINGRIDGE, 2003). Des Weiteren ist der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors bei einem Membranpotenzial unter -50 mV durch Magnesium-Ionen blockiert. Eine Aufhebung der Blockade und somit eine Öffnung des Kanals erfolgt erst nach einer ausreichenden Depolarisation des Neurons. Dies kann durch eine tetanische Reizung oder alternativ durch die Stimulation eines nahe gelegenen AMPA-Rezeptors erfolgen und wird als synaptische Koinzidenz bezeichnet. Die Depolarisation des Neurons, und die ausreichende Aktivierung des NMDA-Rezeptors für die Auslösung der LTP korreliert ferner eng mit dem GABAergen Transmittersystem. So hemmt GABA während eines hochfrequenten Stimulus seine eigene Ausschüttung durch die Aktivierung der GABA<sub>B</sub>-Autorezeptoren (DAVIES et al., 1991).

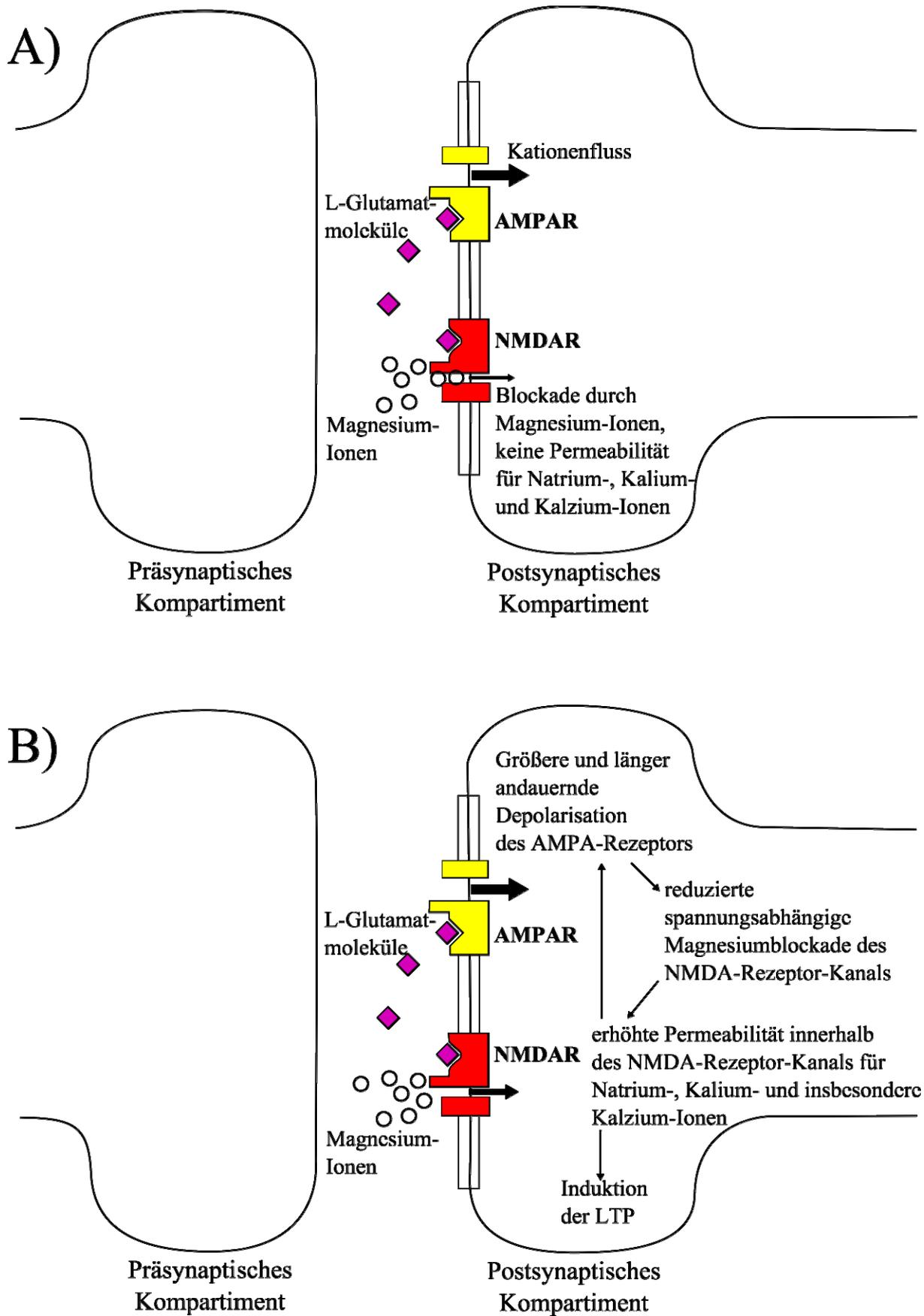


Abbildung 5: Schemata der Verhältnisse an der Präsynapse und Postsynapse vor dem Stimulus (A) bzw. nach der Reizung (B), modifiziert nach COLLINGRIDGE (2003).

Eine wichtige Rolle bei der Induktion der E-LTP spielt die Kalzium / Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) (LLEDO et al., 1995). Diese katalysiert den vesikulären Einbau sowie die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren. Das Resultat dieser Modifikationen ist eine Verstärkung der Ionenleitfähigkeit und demzufolge eine Verstärkung der synaptischen Übertragung. Aktiviertes CaMK II ist mindestens eine Stunde nach der LTP-Induktion nachweisbar (LISMAN et al., 2002). Die Schlussfolgerung, dass aktiviertes CaMK II nicht nur ein Signalgeber sondern auch essenziell für die Expression der LTP ist, konnte jedoch in experimentellen Studien nicht eindeutig nachgewiesen werden (LENGYEL et al., 2004). Neben der CaMK II sind auch die Proteinkinase C (PKC) und die Protein-Tyrosin Kinase für post-translationelle Modifikationen, wie die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit, und demzufolge für die Induktion der E-LTP essenziell (KLANN et al., 1993).

Die Auslösung der L-LTP basiert hingegen auf der Kombination von zwei Enzymkaskaden. Neben der CaMK II ist auch die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) von essenzieller Bedeutung für die Induktion der L-LTP. Die MAPK zählt zu den extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (extracellular signal-regulated kinase, erk). Diese sind die Prototypen molekularer Regulation von Zellteilung sowie Differenzierung, werden aber auch in großer Anzahl in Neuronen exprimiert (SWEATT, 2001). Initiale Studien haben den Beweis erbracht, dass die Aktivierung der MAPK sowohl für die NMDA-Rezeptor-unabhängige, als auch für die vom NMDA-Rezeptor-abhängige Form der Induktion der LTP maßgeblich ist (COOGAN et al., 1999; WU et al., 1999).

#### NMDA-Rezeptor-unabhängige LTP-Induktion

Im Bereich der Moosfasersynapsen ist eine besondere Form der synaptischen Plastizität nachgewiesen worden, eine vom NMDA-Rezeptor-unabhängige präsynaptische LTP, die auch als Moosfaser-LTP bezeichnet wird (ZALUTSKY und NICOLL, 1990). Eine wichtige Rolle bei der präsynaptischen Induktion und Expression der Moosfaser-LTP kommt den Kainat-Rezeptoren zu. Nach einer synaptischen Aktivierung und der damit verbundenen Glutamat-Freisetzung diffundiert das Glutamat wieder durch den synaptischen Spalt und die präsynaptischen Kainat-Rezeptoren, wodurch Kalzium aus den internen Speichern freigesetzt wird, was letztendlich zu einer Induktion der LTP führt (BORTOLOTTI et al., 2005).

Ein weiterer Mechanismus, der zu einer präsynaptischen Induktion der LTP im Bereich der Moosfasern der CA3-Region des Hippokampus führt, wird über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) vermittelt (LONART und SÜDHOF, 1998). Dabei interagiert das

synaptische Vesikel-assoziierte Protein Rab3A mit zwei Effektorproteinen, dem Rabphilin und dem RIM1 $\alpha$ , beide stellen präsynaptische Substrate der PKA dar (HUANG et al., 2005). Im Anschluss an diese Interaktion der beiden Substrate katalysiert die PKA die Phosphorylierung der GluR6-Untereinheit des Kainat-Rezeptors und erhöht so die Empfindlichkeit der Rezeptoren für den Neurotransmitter Glutamat (RAYMOND et al., 1993).

### **Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung**

Experimentelle Studien bezüglich der Aufrechterhaltung der LTP liefern Hinweise auf eine Konsolidierung von andauernden Lern- und Gedächtnisinhalten sowohl im postsynaptischen Kompartiment als auch in präsynaptischen Arealen.

Eine postsynaptische Expression der LTP wird hauptsächlich durch die AMPA-Rezeptoren vermittelt. Der LTP-Expressionsmechanismus basiert in diesem Bereich maßgeblich auf einer Phosphorylierung und den zusätzlichen Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran, initiiert durch einen erhöhten Kalzium-Einstrom in die Zelle als Folge einer tetanischen Stimulation (SODERLING und DERKACH, 2000).

Die LTP-Expression in präsynaptischen Arealen wird kontrovers diskutiert. Für eine bestimmte Form der E-LTP, die neonatal und bis zum Ende der ersten Lebenswoche exprimiert wird, ist jedoch eindeutig ein präsynaptischer Expressionsmechanismus nachgewiesen worden (LAURI et al., 2001; PALMER et al., 2004).

Neben der Diskussion um das Kompartiment der Expression der LTP richtet sich der Fokus der Forschung insbesondere auf die Mechanismen der Signalsignaltransduktionskaskaden, die zu einer Expression der LTP führen. Während die E-LTP lediglich auf einer post-translationalen Modifikation von Proteinen beruht, ist die Expression der L-LTP komplex. So basiert die molekularbiologische Grundlage der Expression der L-LTP im Hippokampus auf der Beteiligung verschiedener Enzymkaskaden, und resultiert in einer Expression von Genen, die essenziell für die Aufrechterhaltung der L-LTP ist (MIYAMOTO, 2006).

Der cAMP / PKA Signaltransduktionsweg ist für die Ausbildung der L-LTP von großer Bedeutung. Die PKA katalysiert die Phosphorylierung der GluR6-Untereinheit des Kainat-Rezeptors und erhöht so die Empfindlichkeit der Rezeptoren für den Neurotransmitter Glutamat (RAYMOND et al., 1993). Des Weiteren ist für die Expression der L-LTP die Aktivierung der CaM Kinase IV und der MAPK essenziell. Die Aktivierung der MAPK wird

über verschiedene Neurotransmitter und den so genannten „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) reguliert. Der BDNF zählt zu der Neutrophin-Familie von Proteinen und ist zunächst als ein für den Fortbestand der peripheren Nerven essenzieller Faktor identifiziert worden. Weitere Studien zeigen, dass dieses Protein eine entscheidende Rolle bei der Regulation der synaptischen Entwicklung und Plastizität im ZNS einnimmt (PANG und LU, 2004). Die PKA, die MAPK und die CaM Kinase IV sind in der Lage, das engl. Cyclic-Adenosin-Monophosphat-Response-Element-Binding-Protein (CREB) zu phosphorylieren (PANG und LU, 2004; MIYAMOTO, 2006). Durch diesen Phosphorylierungsschritt wird CREB stimuliert und transloziert in den Zellkern, um dort an die CRE-Region zu binden. Diese Kopplung initialisiert eine Aktivierung der RNA-Polymerase II an der Promotorregion cAMP-induzierbarer Gene. Als Resultat lässt sich ein Anstieg der Transkriptionsaktivität und der Neusynthese von Proteinen, die essenziell für die dauerhafte Änderung der neuronalen Plastizität sind, nachweisen. Bindungsstellen für CREB sind unter anderem in der Promotorregion von so genannten „immediate-early genes“ (IEGs) zum Beispiel bei c-Fos entdeckt worden (GINTY et al., 1994; MIYAMOTO, 2006). Die Züchtung von transgenen Mäusen, die sich durch eine Mutation der alpha und delta Isoform des CREB auszeichnen, hat die große Bedeutung der CREB vermittelten Transkriptionsmechanismen für Lern- und Gedächtnisleistungen bewiesen. Alle Mutanten zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine deutlich verminderte Fähigkeit zu Langzeiterinnerungsprozessen im Morris-Water-Maze (BOURTCHULADZE et al., 1994).

Innerhalb des komplexen Systems der Signaltransduktionskaskade ist nicht nur die Interaktion von Rezeptor und Enzymkaskaden essenziell, sondern auch die Expression „retrograder Messenger“ notwendig. Es werden verschiedene „retrograde Messenger“ diskutiert. Von besonderer Bedeutung ist ein Signalsystem, welches über das Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird (VOLGUSHEV et al., 2000; HARDINGHAM und FOX, 2006). So induziert die Ausschüttung von Glutamat aus Vesikeln des präsynaptischen Kompartiments die Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren und einen Influx der Kalzium-Ionen durch die NMDA-Rezeptoren. Der in Folge erhöhte Kalzium-Level aktiviert dann die Stickstoffmonoxid-Synthase im postsynaptischen Areal. Diese diffundiert ungerichtet durch das Zytosol und die präsynaptische Membran und wird von der Haemgruppe der Stickstoffmonoxid (NO) sensitiven Guanylatzyklase absorbiert. Das Resultat, vermittelt durch das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP), ist eine erhöhte Ausschüttung von Neurotransmittern an der Präsynapse, was letztendlich die Expression der LTP moduliert (HÖLSCHER, 1997).

#### **2.1.4.2 Langzeitdepression**

In vitro wird die Auslösung der Langzeitdepression (LTD), und damit die langfristige Verminderung der synaptischen Effizienz, durch einen lang dauernden, afferenten und niederfrequenten 0.5 bis 3 Hz Stimulus katalysiert (BEAR und ABRAHAM, 1996). Durch eine Modulation der Stimulationsfrequenz kann in der CA1-Region des Hippokampus, je nach Höhe der Frequenz und Dauer des Stimulus, an identischen synaptischen Kompartimenten sowohl LTP als auch LTD ausgelöst werden (DUDEK und BEAR, 1993). Die Induktion der LTD wird überwiegend über NMDA-Rezeptoren und einen moderaten postsynaptischen Kalzium-Influx vermittelt. Eine Aktivierung bestimmter Protein-Phosphatasen, unter anderem der Serin-Threonin-Phosphatase-Kaskade, bewirkt in der Folge die Auslösung der LTD (MASSEY und BASHIR, 2007). Korrespondierend zu den Verhältnissen bei der LTP existiert auch im Falle der LTD eine Signaltransduktionskaskade, die unabhängig vom NMDA-Rezeptor induziert werden kann, die so genannte Moosfaser-LTD (MANABE, 1997). Die Rolle der LTD innerhalb neuronaler Netzwerke des Hippokampus und ihre Bedeutung für die Ausbildung von Lern- und Gedächtnisprozessen sind nicht eindeutig geklärt. Eine Theorie besagt, dass die Depotenzierung der LTP infolge von Stress oder Neuerungen ein notwendiger Mechanismus ist, um die Manifestation neuer Informationen wiederum durch LTP zu ermöglichen (MASSEY und BASHIR, 2007).

## **2.2 Modifikation der synaptischen Übertragungsstärke durch verschiedene volatile Anästhetika**

### **2.2.1 Inhalationsanästhetikum Isofluran**

Isofluran zählt aufgrund seiner positiven physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie seiner guten anästhetischen Potenz zu den bedeutendsten Inhalationsanästhetika in der Human- und Tiermedizin.

#### **2.2.1.1 Physikalische und chemische Eigenschaften**

Isofluran ist ein Isomer von Enfluran, das sich von diesem durch einen niedrigeren Siedepunkt und eine geringere Lipidlöslichkeit auszeichnet (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Physikalische und chemische Eigenschaften von Isofluran, modifiziert nach STEFFEY (1997)**

<b>Strukturformel</b>	$  \begin{array}{ccccccc}  & & \text{F} & & \text{H} & & \text{F} \\  & &   & &   & &   \\  \text{H} & - & \text{C} & - & \text{O} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{F} \\  & &   & &   & &   \\  & & \text{F} & & \text{Cl} & & \text{F}  \end{array}  $
<b>Molekulargewicht</b>	185 Da
<b>Siedepunkt</b>	49 °C
<b>Spezifisches Gewicht</b>	1.49
<b>Dampfdruck</b> 20 °C 24 °C	240 mmHg 286 mmHg
<b>Konservierungsmittel</b>	Keine notwendig
<b>Stabilität in Sodakalk</b>	Vorhanden
<b>Stabilität in UV-Licht</b>	Vorhanden

### 2.2.1.2 Anästhetische Potenz

Die minimale alveolare Konzentration (MAC) ist definiert als die alveolare Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, bei der 50 % der Patienten keine gezielten Abwehrbewegungen auf einen definierten Schmerzreiz mehr zeigen. Der MAC-Wert ist demnach ein Maß für die anästhetische Potenz eines Anästhetikums (EGER et al., 1965). Die MAC variiert je nach Spezies und Wahl des Anästhetikums. Zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen von Mäusen existieren signifikante Unterschiede bezüglich der MAC. Diese Variationen werden durch die Existenz multipler Gene, deren Allele den MAC-Wert unterschiedlich beeinflussen, begründet. So liegt der Wert für Isofluran bei dem Mäusestamm C57BL/6 zwischen  $1.30 \pm 0.11$  % (MW  $\pm$  SD) in atm (SONNER et al., 2000).

### 2.2.1.3 Zentraler Wirkmechanismus

Das volatile Anästhetikum Isofluran potenziert kurzfristig die Effekte der inhibitorischen Signaltransduktionskaskaden und hemmt exzitatorische Neurotransmittersysteme im ZNS (DE SOUSA et al., 2000). Die anästhetische Wirksamkeit von Isofluran im ZNS wird durch multiple Effekte, vorwiegend im präsynaptischen Areal, katalysiert (LARSEN und LANGMOEN, 1998).

#### **Modifikation von Ionenkanälen im präsynaptischen Kompartiment**

Im Bereich der Präsynapse ist insbesondere eine Hemmung der synaptischen Transmission von Bedeutung. Diese basiert auf einer geringeren Expression des Neurotransmitters Glutamat, und einer Abschwächung der Amplitude des Aktionspotenzials im präsynaptischen Kompartiment (MAC IVER et al., 1996; LARSEN und LANGMOEN, 1998; WU et al., 2004). Ein bedeutender Mechanismus, der zu einer durch Anästhetika vermittelten Depression der Transmitterausschüttung führt, besteht in einer Inhibition der spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle (STUDY, 1994). Gemäß der pharmakologischen und molekularbiologischen Hintergründe unterscheidet man sechs verschiedene Subtypen, den T-, L-, N-, P-, Q- und R-Kalzium-Kanal. In welchem Ausmaß die einzelnen Kalzium-Kanal-Subtypen an der verminderten Expression von Glutamat beteiligt sind, wird kontrovers diskutiert (HALL et al., 1994; STUDY, 1994; KAMEYAMA et al., 1999). Die Auswirkungen auf die Amplitude des Aktionspotenzials durch Isofluran werden über Modifikationen der Natrium- und Kalium-Kanäle im ZNS während der Anästhesie vermittelt (REHBERG et al., 1996; RIES und PUIL, 1999). Eine Suppression der Natrium-Kanäle hat eine Minimierung der Amplitude des Aktionspotenzials zur Folge, und kann sowohl auf Potenzial-unabhängigen Mechanismen als auch auf spannungsabhängigen Prozessen basieren (REHBERG et al., 1996). Isofluran induziert des Weiteren eine Aktivierung und Öffnung der „Zweiporen-Domäne“- (2P)-Kalium-Kanäle. Es wird postuliert, dass die daraus resultierende Hyperpolarisation der Neurone eine Blockade des Aktionspotenzials bewirkt, und eine raschere Anflutung des Anästhetikums ermöglicht (GOLDSTEIN et al., 2001). Mittlerweile sind 15 Subtypen der 2P-Kalium-Kanäle identifiziert worden. Besonders sensitiv auf eine pharmakologische Beeinflussung durch volatile Anästhetika reagiert der so genannten TREK-1, welcher ubiquitär im ZNS exprimiert wird. Die eminente Bedeutung des TREK-1 für die anästhetische Potenz von Isofluran ist anhand von homozygoten „TREK-1 Knock out“ (TREK-1<sup>-/-</sup>) Mäusen nachgewiesen worden (HEURTEAUX et al., 2004).

Die Vertreter der TRESK-Familie (engl. TWIK [tandem pore domain weak inward rectifying channel]-related spinal cord K channel) sind insbesondere für die Vermittlung anästhesiologischer Effekte des Isoflurans auf spinaler Ebene relevant. Mittlerweile ist jedoch auch TRESK-RNA in humanen Neuronen des Gehirns nachgewiesen worden (LIU et al., 2004). Gemäß aktuelleren Studien existieren deutliche Spezies spezifische Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit des TRESK auf Isofluran. Es wird postuliert, dass humanes TRESK deutlich sensitiver als TRESK von Mäusen und Ratten auf klinisch relevante Konzentrationen von Isofluran reagiert (KESHAVAPRASAD et al., 2005).

### **Regulation der Neurotransmitteraufnahme im synaptischen Spalt**

Die Bedeutung der exzitatorischen Aminosäure Transporter (excitatory amino acid transporters, EAATS), von denen insgesamt fünf verschiedene Varianten identifiziert worden sind, besteht in einer Aufnahme des extrazellulär lokalisierten Glutamats, und den Transport in das intrazelluläre Kompartiment, um so die Glutamat-Neurotransmission zu regulieren. Der EAAT Typ 3 ist am intensivsten erforscht. In einer experimentellen Studie ist nachgewiesen worden, dass die Inkubation von COS-7 Zellkultur-Linien mit 2 Vol.-% Isofluran in einer verstärkten Aktivität des EAAT Typ 3, und somit einer Reduktion der Glutamat-induzierten Stromantwort resultiert. Diese Aktivitätssteigerung wird durch eine Phosphorylierung der Serin-465 Domäne des EAAT Typ 3 durch die Phosphokinase C  $\alpha$  katalysiert (HUANG et al., 2006).

### **Wechselwirkung von Isofluran an postsynaptischen Rezeptoren**

#### NMDA- und Non-NMDA-Rezeptoren

Gemäß DE SOUSA et al. (2000) induziert Isofluran in vitro eine äquivalente Minderung des exzitatorischen postsynaptischen Stromes sowohl an den NMDA- als auch an den Non-NMDA-Rezeptoren. Diese These wird jedoch kontrovers diskutiert. Die in vitro Resultate an Hippokampusschnitten anderer Forschergruppen belegen, dass es in Bezug auf das Ausmaß der Interaktion von Isofluran mit den postsynaptischen Rezeptoren maßgeblich ist, zwischen der Klasse der NMDA- und der Non-NMDA-Rezeptoren zu unterscheiden. Eine durch NMDA-Rezeptoren katalysierte fEPSP-Amplitude wird demnach durch Isofluran deutlich mehr abgeschwächt als jene die durch die Non-NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (NISHIKAWA und MAC IVER, 2000). Die Forscher ziehen eine zusätzliche postsynaptische

Komponente der Isofluranwirkung am NMDA-Rezeptor als Ursache für die erhöhte Sensitivität gegenüber Isofluran in Betracht (NISHIKAWA und MAC IVER, 2000).

### GABA-Rezeptoren

Die anästhetische Potenz von Isofluran basiert nicht nur auf präsynaptischen Effekten, sondern ist zum Teil auch auf eine Modifikation des postsynaptisch lokalisierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Chlorid-Ionen-Kanal-Komplexes zurückzuführen (JONES et al., 1992; TANELIAN et al., 1993). Das volatile Anästhetikum katalysiert eine Bindung von GABA an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Chlorid-Ionen-Kanal, und bewirkt damit eine länger andauernde Öffnung des Kanals (TANELIAN et al., 1993). Neuere experimentelle Studien lassen vermuten, dass eine mögliche Inhibition des postsynaptischen Potenzials im ZNS am GABA-Rezeptor sowohl von der Dosierung des Anästhetikums, als auch der Konzentration des Agonisten GABA-abhängig ist (NEUMAHR et al., 2000; HAPFELMEIER et al., 2001). So induziert eine nur geringe Isoflurankonzentration hauptsächlich eine verminderte Dissoziation von GABA und führt zu einer Potenzierung der Stromantwort. Höhere Isoflurankonzentrationen hingegen führen zu einer reduzierten Amplitude des Ionenstromes durch einen Offenkanalblock (NEUMAHR et al., 2000). Dieser hemmende Effekt auf die Amplitude des Ionenstromes lässt sich auch bei klinisch relevanten Konzentrationen des Anästhetikums evozieren (HAPFELMEIER et al., 2001).

### Acetylcholin-Rezeptoren

Isofluran beeinflusst sowohl die nikotinergen, als auch die muskarinergen Rezeptoren des cholinergen Systems.

#### *Nikotinerge Rezeptoren*

In vitro lässt sich die inhibitorische Wirkung von Isofluran sowohl an ruhenden als auch an aktivierten neuronalen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor-(nAChR)-Kanälen nachweisen (SCHELLER et al., 1997; YAMASHITA et al., 2005). Es wird vermutet, dass Isofluran die Nikotin-induzierten Ionenströme am nAChR hemmt, indem es die Öffnungszeiten und die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals verringert und die Dauer des geschlossenen Zustandes verlängert (YAMASHITA et al., 2005). Des Weiteren erhöht die Applikation von Isofluran die Agonistenaffinität in moderatem Maße (RADA et al., 2003), resultierend in einer Potenzierung der Stromantwort auch bei geringen Agonistenkonzentrationen. Die durch

Isofluran vermittelten Effekte sind, bis auf die Verstärkung der Agonistenaffinität, auch bei sehr geringen Konzentrationen des volatilen Anästhetikums reproduzierbar (SCHELLER et al., 1997).

#### *Muskarinerge Rezeptoren*

Isofluran inhibiert die Signaltransduktionskaskade am m3-Rezeptorsubtyp der muskarinergen Rezeptoren, hat aber keinen Effekt auf die m1-Rezeptoren (NIETGEN et al., 1998; DO et al., 2001).

#### **2.2.1.4 Modifikation der synaptischen Plastizität**

Der Fokus der Forschung war in den letzten Jahrzehnten insbesondere auf die Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen gerichtet, die mit einer durch Isofluran gesteuerten Inhalations-Narkose in Kontext stehen und während oder kurz nach der Narkose analysiert werden können. Über den direkten Zusammenhang zwischen Isofluran-Narkose und den Auswirkungen auf in vitro Induktion und Aufrechterhaltung der LTP sowie der LTD ist vergleichsweise wenig publiziert worden. Der Einfluss klinisch relevanter Dosierungen von Isofluran mittels sukzessiver Zugabe des Anästhetikums in das Perfusionssystem auf die Induktion der LTD und LTP an Hippokampusschnitten von Mäusen wurde erstmals von SIMON et al. (2001) untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Isofluran die Induktion der LTP über GABAerge Mechanismen unterdrückt und diese Effekte in vitro reversibel sind. In Abhängigkeit von Isofluran kann nach niederfrequenter Stimulation auch kein LTD induziert werden (SIMON et al., 2001).

Die Wirkung von Isofluran auf molekularbiologischer Ebene ist auch durch die Analyse der genomischen Expression sechs Stunden nach der Kurznaarkose im Bereich der Amygdala von Ratten genauer untersucht worden (RAMPIL et al., 2006). Zielsetzung der Studie von RAMPIL et al. (2006) war es die Effekte von Isofluran im Kernbereich der Amygdala über die „akute Phase“ hinaus zu analysieren. Die Untersuchung der gewonnenen Präparate resultiert in vielfältigen Variationen der Genexpression. So induziert Isofluran beispielsweise die erhöhte Expression von Rab8a, einer GTPase, die eine wichtige Funktion im Rahmen der Expression der LTP einnimmt. Diese Analyseergebnisse deuten im Gegensatz zu den Ergebnissen von SIMON et al. (2001), welche die akute Wirkung Isoflurans auf die LTP-

Induktion analysieren, auf eine positive Modifikation der Expression der LTP durch Isofluran hin.

## **2.2.2 Einfluss weiterer volatiler Anästhetika auf die Langzeitpotenzierung**

### **2.2.2.1 Sevofluran**

Klinisch relevante Konzentrationen von 1,5 Vol.-% des Anästhetikums Sevofluran hemmen postsynaptisch die cholinerge exzitatorische synaptische Transmission an Neuronen von Weichtieren (NARUO et al., 2005). Jedoch hat die Forschergruppe erstmalig nachgewiesen, dass in vitro weder die Induktion noch die Aufrechterhaltung der Kurzzeitpotenzierung durch Sevofluran beeinflusst wird. Ein direkter Zusammenhang der Inhalations-Narkose mit Sevofluran und Modifikationen der Lern- und Gedächtnisleistung ist nicht verifiziert worden.

### **2.2.2.2 Halothan und Methoxyfluran**

Im Rahmen einer in vitro Studie an Hippokampusschnitten von Ratten ist nachgewiesen worden, dass die volatilen Anästhetika Halothan und Methoxyfluran zwar beide die synaptische Transmission im ZNS modifizieren, aber bezüglich der Effekte auf die LTP-Induktion und Expression deutlich differieren. Die Resultate zeigen, dass nur Halothan die Induktion der LTP verhindert, die sukzessive Zugabe von Methoxyfluran hingegen keinerlei Effekt auf die Ausbildung der LTP hat. Die genauen Mechanismen, die dieser Ambivalenz der Ergebnisse zugrunde liegen, sind unklar (MAC IVER et al., 1989).

## 3 Eigene Untersuchungen

### 3.1 Zielvorstellung

Mit dieser Studie soll erstmalig analysiert werden, inwiefern Isofluran die synaptische Plastizität im Hippokampus der Maus 24 Stunden nach der Narkose beeinflusst. Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen untersucht werden: ob bei den am Vortag narkotisierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Veränderung der hippokampalen Langzeitpotenzierung (LTP) eruiert werden kann. Des Weiteren wird analysiert welches der drei Induktionsparadigma, Theta-Burst Stimulation (TBS, impliziert 7 aufeinander folgende Viererreize von 100 Hz mit einem Interstimulusintervall von jeweils 200 ms), 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus oder 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus am besten geeignet ist, die Zielsetzung der Studie zu realisieren. Ferner soll untersucht werden inwiefern die Analyseergebnisse der extrazellulären elektrophysiologischen Untersuchung mit einer Modifikation der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Arealen des Gehirns korrelieren.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105, zuletzt geändert durch Artikel 4 des Gesetzes vom 21. Dezember 2006, BGBl I S. 3294) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 3.2 Material und Methodik

#### 3.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere stehen männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 (Charles River, Sulzberg) im Alter zwischen 4 bis 5 Monaten zur Verfügung. Die standardisierte Akklimatisationsphase beträgt 21 Tage, um eine ausreichende Adaptation an die neue Umgebung zu gewährleisten.

### **3.2.2 Haltungsbedingungen**

Die Tiere werden in einem speziell für die Versuchstierhaltung konzipiertem Raum untergebracht. Die Einhaltung der folgenden Parameter wird täglich kontrolliert und protokolliert: Temperatur von 19 °C bis 24 °C, Luftfeuchtigkeit 40 % bis 60 % und ein Hell-Dunkel Rhythmus von je 12 Stunden. Alle Tiere verweilen vom Zeitpunkt ihres Einsetzens bis zum Versuchsende in Standardkäfigen Makrolon Typ-II. Die Mäuse erhalten Futter (Altromin1324<sup>®</sup>, Altromin GmbH, Lage-Lippe) und Leitungswasser aus Nippeltränken zur freien Verfügung. Das Wasser wird täglich ausgetauscht. Die Einstreu der Mäuse besteht aus entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat (Altromin-Faser<sup>®</sup>, Altromin GmbH, Lage-Lippe), dieses wird bei dem zweimal wöchentlichen Umsetzen der Tiere in autoklavierte Käfige komplett erneuert. Als Nestbaumaterial steht ihnen noch zusätzlich Zellstoff zur Verfügung.

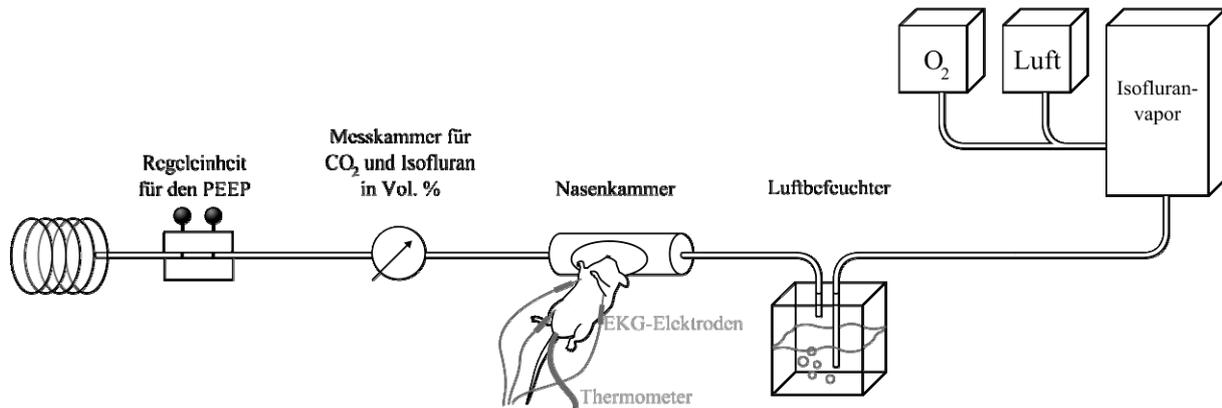
### **3.2.3 Versuchsplan**

Der gesamte Versuch besteht aus zwei Untersuchungsgängen: der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitung und der Western-Blot Analyse. Am Tag nach der Narkose werden die Tiere der Isoflurangruppe, gemäß einer im Vorfeld erstellten Randomisierungsliste, einer der zwei Untergruppen zugeteilt. Die Einteilung der Kontrolltiere erfolgt nach einem analogen Schema.

### **3.2.4 Narkosemanagement**

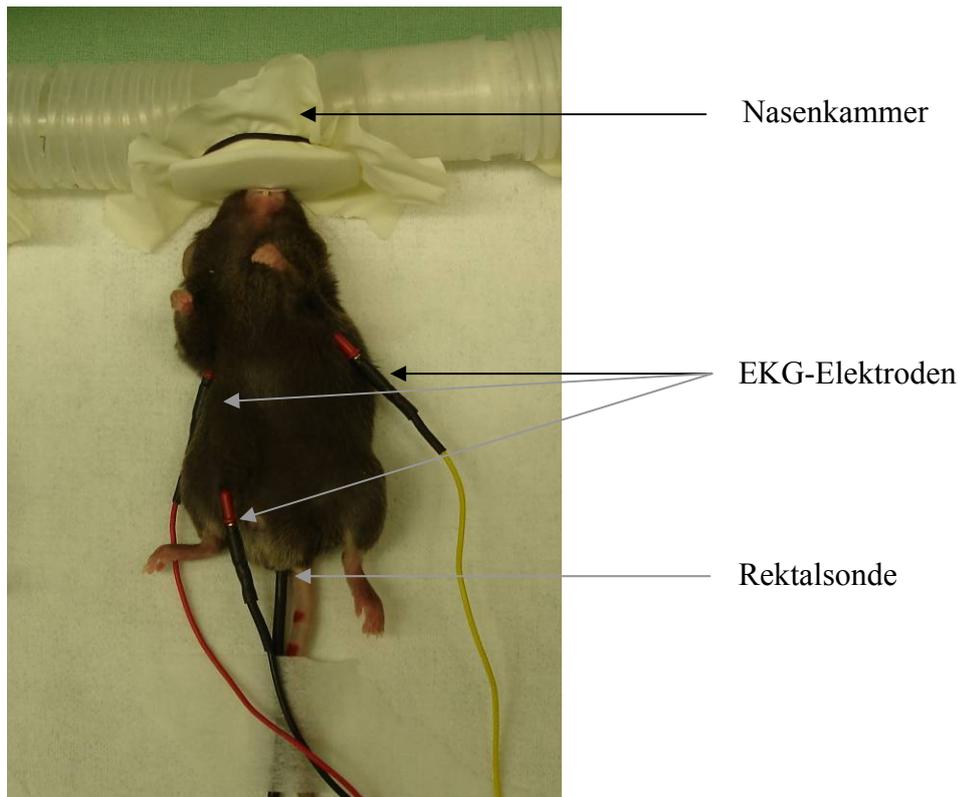
Am Tag der Narkose (Tag 0) verbringt man die dafür vorgesehenen Versuchstiere in eine Narkosebox (eigene Herstellung) aus Plexiglas. Gemäß dem Versuchsprotokoll erfolgt die Einleitung der Anästhesie durch Zugabe des volatilen Anästhetikums. Die Einstellung am Verdampfer beträgt 2,5 Vol.-% Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) bis zum Verlust des Stellreflexes. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt über ein Nasenkammersystem (eigene Herstellung, Abbildung 6). Die Konstruktion der Nasenkammer umfasst zwei gegenüberliegende Anschlüsse, die eine Integration der Kammer in ein Kreissystem und einen Durchfluss des volatilen Anästhetikums von 3 l / min ermöglichen.

In dieses Kreissystem ist noch zusätzlich ein Luftbefeuchter (Kendall, Respiflo lyco healthcare GmbH, Neustadt) integriert. Dieser wirkt einer Dehydratation der narkotisierten Tiere durch Feuchtigkeitsverluste über die Respiration, entgegen. In den folgenden zwei Stunden atmen die Tiere ein Luft-Sauerstoffgemisch ( $FiO_2 = 0,5$ ), dieser Gasverbindung wird 1 MAC Isofluran zugemischt.



**Abbildung 6: Skizze des Versuchsaufbaus für die Anästhesie der Mäuse.**

Die Konzentration des volatilen Anästhetikums variiert je nach Tier zwischen 1,5 bis 1,7 Vol.-% Isofluran. Eine wichtige Maßnahme, um die Entstehung von pulmonalen Atelektasen zu verhindern, ist die Einstellung eines positiv endexpiratorischen Drucks (PEEP) von 3 mm Hg. Während der Narkose ist die Kornea durch den unvollständigen Lidschluss exponiert und dadurch gefährdet, auszutrocknen. Dem wird durch die Applikation von Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) vorgebeugt. Das Narkosemanagement umfasst auch die Kontrolle der Vitalparameter, wie Temperatur, Herzfrequenz und Atemfrequenz in regelmäßigen Intervallen. Eine Analyse der Herzfrequenz erfolgt durch ein entsprechendes EKG-Gerät (Cardiocap™, Datex). Ein Wärmeregulationssystem (Warm Touch®, Mallinkrodt Medical, Irland) dient dazu, die Körpertemperatur konstant zwischen 37,6 °C und 38,0 °C, gemessen mit einer Rektalsonde (Medical Temperature Probe™ für Neonaten, Exacon, Asmuth, Minden) zu halten (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Anästhesie einer Maus mit Hilfe eines Nasenkammersystems** (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).

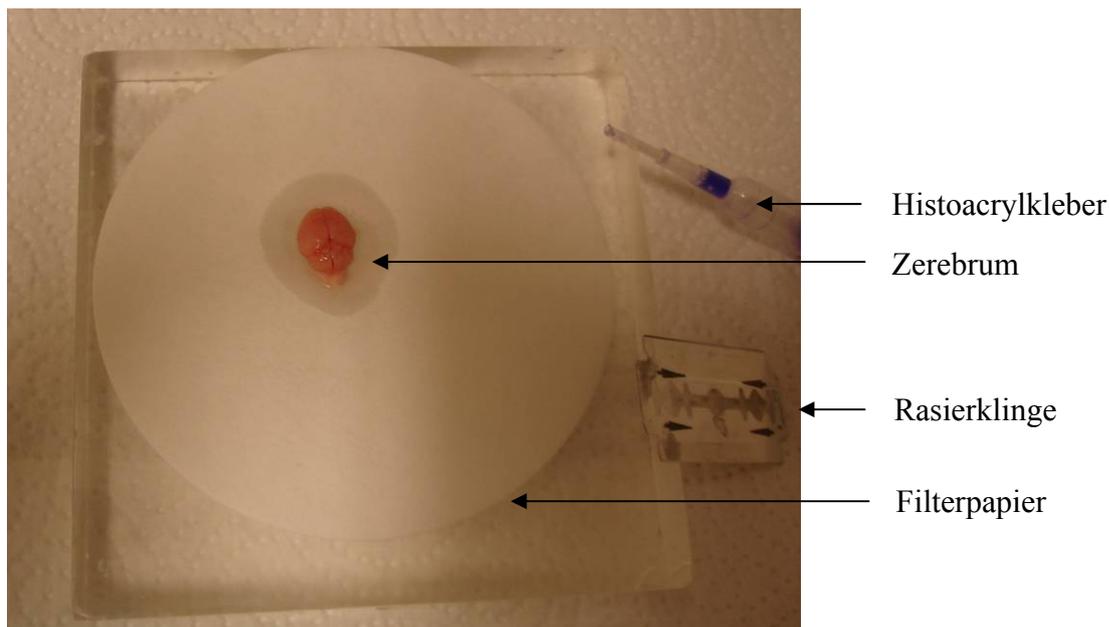
Die Aufwachphase verleben die Mäuse in einer mit Sauerstoff reich gesättigten Plexiglasbox. Sobald die Tiere ihr Koordinations- und Orientierungsvermögen wiedererlangt haben, setzt man sie zurück in ihre Käfige und transportiert die Mäuse wieder in den Versuchsterraum.

Alle Tiere der Kontrollgruppe werden ebenfalls für einen Zeitraum von zwei Stunden mit dem Käfig in die Narkosekammer eingesetzt. Der Narkosekammer wird über die gesamte Dauer der „Schein-Narkose“ 50 % Sauerstoff ( $FiO_2 = 0,5$ ) zugeleitet.

### 3.2.5 Extrazelluläre elektrophysiologische Untersuchung

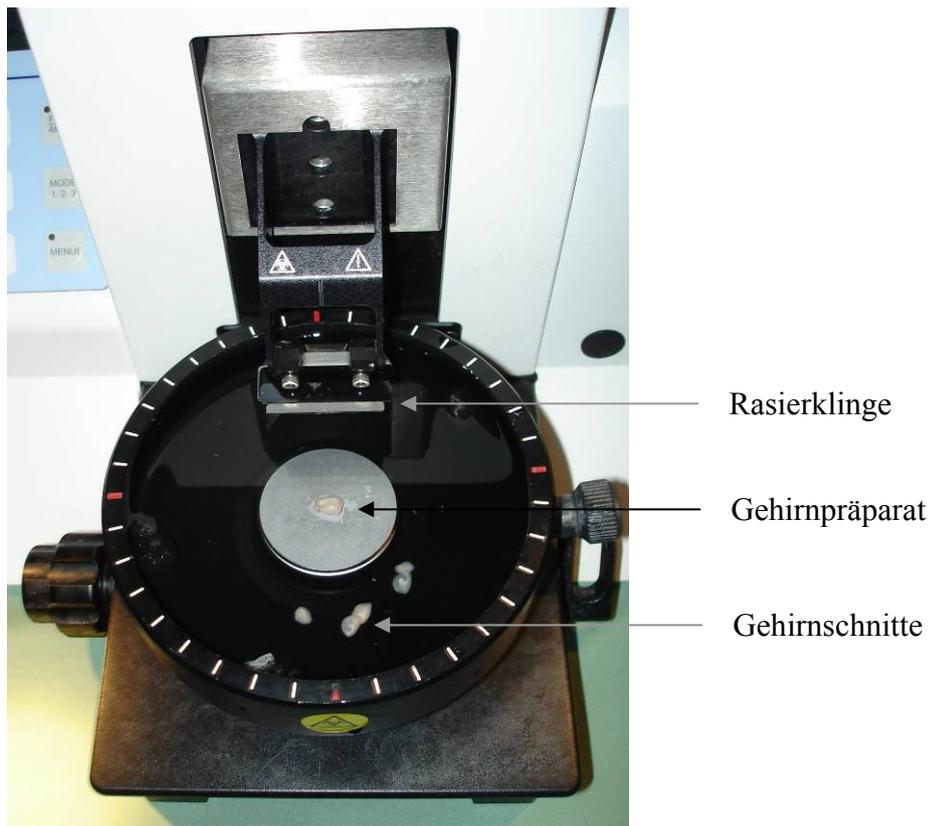
#### 3.2.5.1 Präparation der Gehirnschnitte

24 Stunden nach der Narkose erfolgt die schmerzlose Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation. Aus dem entnommenen Gehirnmateriale gewinnt man sagittale Hippokampus-schnitte. Fast alle Schritte der Präparation erfolgen in einer mit Eiswasser gekühlten (2 °C bis 4 °C) künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid, ACSF (Merck, Darmstadt), Zusammensetzung: 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM D-Glukose und 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3), die mit Carbogen (Linde AG, Höllriegelskreuth) gesättigt ist. Mit einem sagittal geführten Schnitt durch die Kopfhaut wird der Schädelknochen freigelegt, und mit Hilfe eines auf beiden Seiten durchgeführten Transversalschnittes in Höhe des Kleinhirns eröffnet. Der nächste Präparationsschritt umfasst einen vom Rückenmarkskanal her flach nach rostral geführten Schnitt entlang der Sagittalnaht, und eine Entfernung der beiden Kalottenhälften bis zum Bregma. Eine Durchtrennung der Nervi Optici und des verlängerten Rückenmarkes ermöglicht die Entnahme des Gehirns aus der Schädelgrube. Das entnommene Gehirn wird mit der Basis nach unten auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier (Schleicher und Schuell Micro Science<sup>®</sup> Rundfilter / Filter Paper Circles, Dassel) gelegt und mit ACSF Lösung gespült (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Entnommenes Zerebrum auf ACSF-getränktem Filterpapier (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).

Man trennt das für die Untersuchung nicht relevante Zerebellum ab. Das Großhirn wird mit einer entfetteten Rasierklinge (Dreaging Men<sup>®</sup>, Goldhand Vertriebsgesellschaft mbh, Düsseldorf) entlang der Hemisphärenlinie in zwei Teile geschnitten. Die Fixation einer Gehirnhälfte mit ihrer Schnittfläche auf einer Metallplatte ermöglicht ein spezifischer Histoacrylkleber (Histoacryl<sup>®</sup>, Braun-Aesculap AG und CO, Tuttlingen). Man stellt die Schnitte (350 µm Dicke) mithilfe eines Vibratoms (FTB, Villingen) und folgenden Einstellungen her: Frequenz: 66; Amplitude: 0,9; Geschwindigkeit: 8 bis 9 (Abbildung 9).

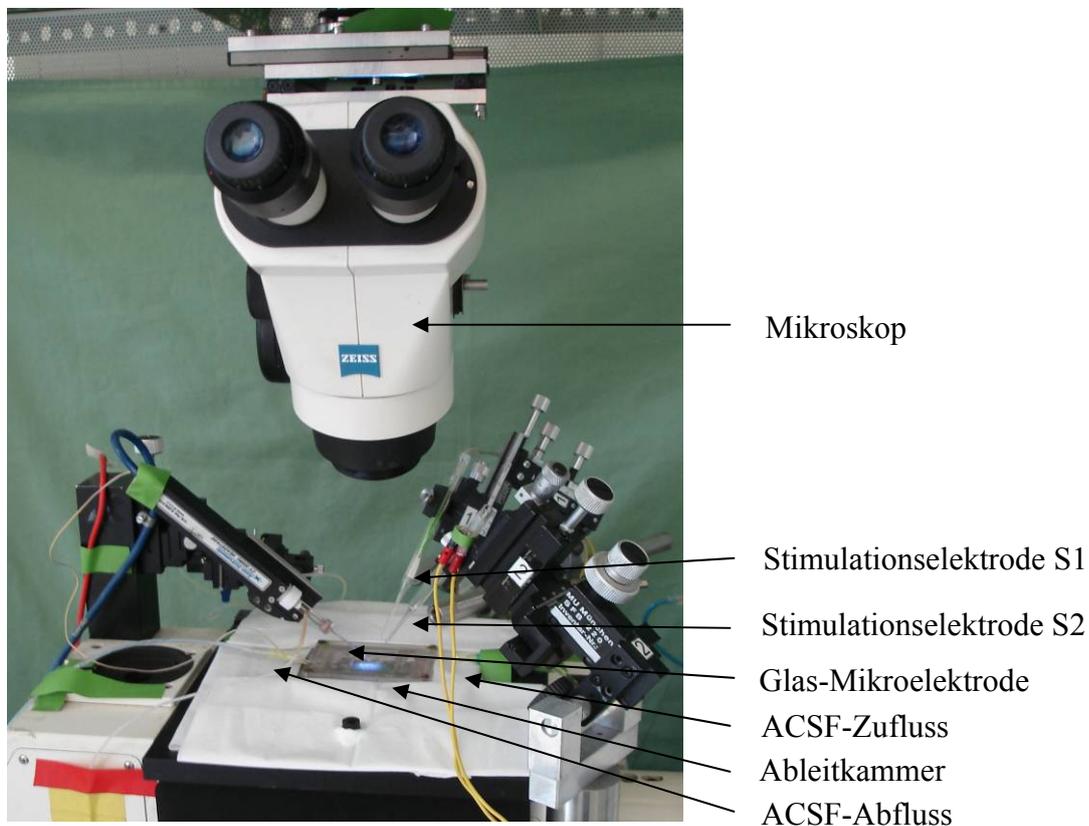


**Abbildung 9: Vibratom mit Gehirnpräparat** (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).

Diese Proben werden mittels einer Pasteurpipette auf ein Teflon-Netz gelegt, welches in einem mit Carbogen gesättigter ACSF-Lösung gefülltem Behältnis fixiert ist. Die Gehirnschnitte verbleiben in diesem Gefäß bei Raumtemperatur (22 °C bis 24 °C) bis sie nach einer Ruhephase von mindestens einer Stunde in die Ableitkammer (Luigs und Neumann GmbH, Ratingen) überführt werden.

### 3.2.5.2 Elektrophysiologische Ableitungen

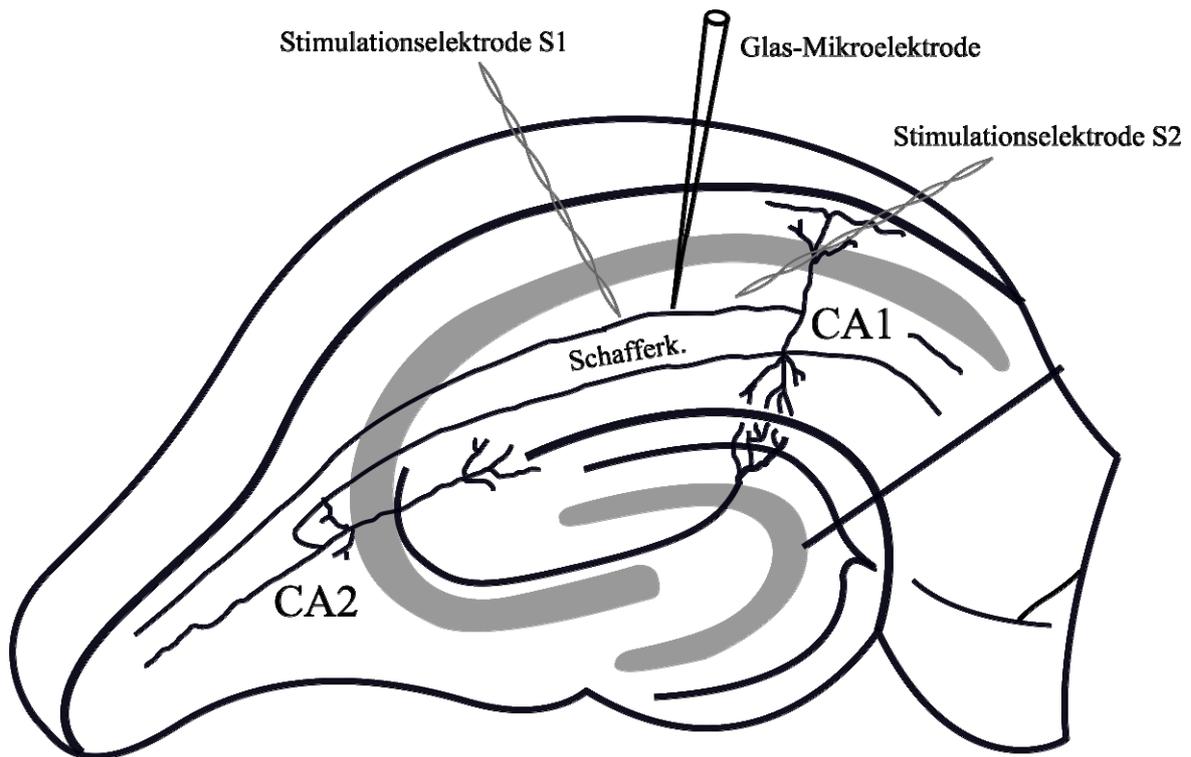
Im Anschluss an die Präparation der Gehirnschnitte wird die Versuchsvorbereitung für die extrazelluläre elektrophysiologische Ableitung mit der Befüllung der Ableitkammer mit ACSF und der Positionierung des Präparats fortgesetzt. Während des gesamten Versuches ist ein kontinuierlicher Fluss der ACSF gewährleistet, da innerhalb der Ableitkammer ein Zu- beziehungsweise Abfluss für die ACSF installiert ist (Abbildung 10). Die Flussrate der Lösung beläuft sich dabei auf 1,5 ml / min. Die Gehirnschnitte werden nach der einstündigen Ruhephase in die Ableitkammer verbracht. Die Fixation der Gehirnschnitte am Grund der Ableitkammer ist durch die Verwendung eines mit dünnen Nylonfäden bespannten Platinrahmens gewährleistet.



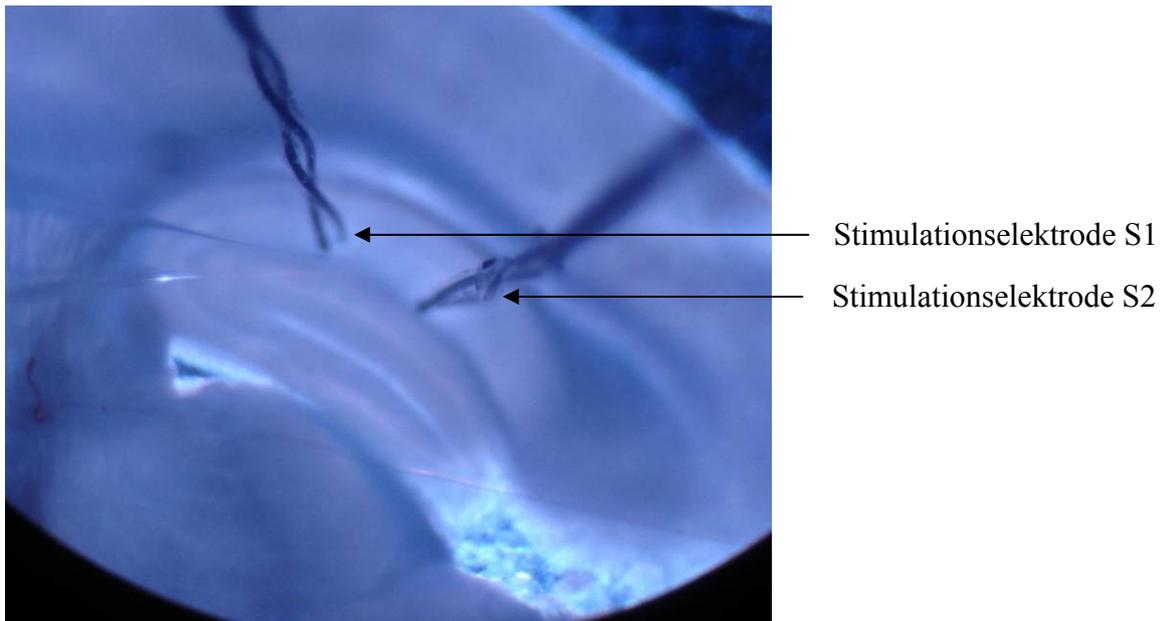
**Abbildung 10: Versuchsaufbau für die extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen** (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum Rechts der Isar, München).

Der nächste Schritt umfasst die Präparation der Glas-Mikroelektrode (Borosilikat-Kapillaren, Reading, England) die für die Aufzeichnung des fEPSP essenziell ist. Jede Glas-Mikroelektrode wird nur einmalig verwendet, mit ACSF luftblasenfrei gefüllt, und unter mikroskopischer Kontrolle vor dem Start der Messung mechanisch so gebrochen, dass sie einen Öffnungsdurchmesser von etwa 3  $\mu\text{m}$  aufweisen. Dadurch erhält man einen

Elektrodenwiderstand von 1 bis 2 M $\Omega$ . Die so präparierte Elektrode lässt sich unmittelbar vor Versuchsbeginn mithilfe eines Manipulators unter mikroskopischer Sichtkontrolle in der dendritischen CA1-Region des hippocampalen Gehirnschnittes positionieren und dient als Ableitelektrode für die fEPSPs. Im Anschluss erfolgt die Positionierung der beiden Stimulationselektroden im Bereich der Schaffer-Kollateralen. Diese bestehen aus zwei, für die neurophysiologischen Experimente besonders gut geeigneten, Wolframdrähten mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$ . Die Ableitelektrode wird unter mikroskopischer Kontrolle zwischen den beiden Stimulationselektroden platziert (Abbildungen 11 und 12).



**Abbildung 11:** Schematische Zeichnung des Hippokampus und der Ableit- und Stimulationselektroden, modifiziert nach AMARAL und WITTER (1995).



**Abbildung 12: Mikroskopische Ansicht des Hippokampus und der Stimulationselektroden** (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).

Die Auslösung der Stimulationsimpulse, welche alle 15 Sekunden erfolgen, resultiert in Antwortamplituden der Feldpotenziale. Nach Erreichen konstanter Antworten (Baseline) für 20 Minuten werden die Schaffer-Kollateral-Kommissuren durch eine TBS, durch einen  $2 * 100$  Hz / 1 s-Stimulus beziehungsweise durch einen  $1 * 100$  Hz / 1 s-Stimulus gereizt, um so LTP auszulösen. Die Steigung des fEPSP wird zwischen 20 % und 80 % der Antwort-Amplitude gemessen. Diese dient als Maß für die fEPSP-Größe.

Alle Signale werden aufgezeichnet, gefiltert (3 kHz Low-Pass) und digitalisiert (9 kHz Digitalisierungs-Frequenz). Eine Speicherung der Daten erfolgt mithilfe der Aufzeichnungs-Software EPC-9 (EPC-9<sup>®</sup>, HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) auf einem Power-MacIntosh-G3 Computer. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm IGOR Pro (IGOR Pro<sup>®</sup>, WaveMetrics, New York, USA).

Der gesamte Versuchsablauf findet bei Raumtemperatur statt.

### **3.2.6 Western-Blot Verfahren**

#### **3.2.6.1 Entnahme des Gehirns**

24 Stunden nach der Narkose werden die Mäuse durch zervikale Dislokation schmerzlos getötet. Die Schädeldecke wird durch das Abpräparieren der Kopfhaut und Resektion der Muskulatur freigelegt. Anschließend wird die Schädeldecke mit Hilfe einer Hohlmeißelzange entfernt. Das Gehirn wird *in toto* entnommen und mit der Unterseite auf einer Metallplatte auf Trockeneis tiefgefroren. Eine Lagerung des Präparats bei -70 °C ist bis zur weiteren Verarbeitung möglich.

#### **3.2.6.2 Isolierung der Gehirnareale**

Das tiefgefrorene Gehirn wird mit Hilfe von Tissue Freezing Medium<sup>®</sup> (Jung, Leica Instruments, Nussloch) auf den Objektisch des Kryostat Mikrotoms (Microtom, HM 500-OM, Microm-Laborgeräte, Walldorf) aufgebracht. Nach einer Äquilibrationszeit von etwa 30 Minuten bei einer Kammertemperatur von -20 °C werden von rostral beginnend jeweils 20 µm dicke Scheiben entfernt, um die Ausrichtung des Gewebes zum Messer zu prüfen und gegebenenfalls zu korrigieren. Die Isolierung der Gehirnareale erfolgt unter adspektorischer Kontrolle und Orientierung an den Schnittebenen und dem Dissektionschema nach PAXINOS und Franklin (2001).

##### *Medialer präfrontaler Kortex:*

Ist die richtige Schnittebene für die Präparation des medialen präfrontalen Kortex erreicht, fertigt man einen Schnitt mit einer Schnittdicke von 400 µm bei einer Objekttemperatur zwischen -18 °C und -20 °C an. Der Schnitt wird auf einen Objektträger (Super Frost<sup>®</sup> Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Anschließend isoliert man den medialen präfrontalen Kortex und verbringt das Präparat in ein Eppendorf-Gefäß.

#### *Sensomotorischer Kortex:*

Für die Isolierung des sensomotorischen Kortex werden zwei Schnitte mit einer Schnittdicke von einem Millimeter angefertigt und jeweils auf einen Objektträger aufgezogen. Im Anschluß wird der sensomotorische Kortex isoliert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

#### *Amygdala:*

Ist die korrekte Schnittebene für die Darstellung der Amygdala erreicht, wird ein Schnitt mit einer Schnittdicke von einem Millimeter angefertigt und auf einen Objektträger aufgenommen. Die Amygdala wird unter adspektorischer Kontrolle aus dem Präparat gelöst und ebenfalls in ein Eppendorf-Gefäß verbracht.

#### *Hippokampus und Zerebellum:*

Es wird pro zu untersuchender Gehirnregion jeweils ein Schnitt mit einer Schnittdicke von einem Millimeter angefertigt, wenn die korrekte Schnittebene erreicht ist. Die Präparate werden auf einen Objektträger aufgezogen, und das Hippokampusgewebe beziehungsweise die Gewebestrukturen des Zerebellums isoliert. Die Präparate werden zur Aufbewahrung in ein Eppendorf-Gefäß verbracht.

Alle Präparate werden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### **3.2.6.3 Homogenisierung der Membranproteine**

#### *Homogenisierung von Membranproteinen des Hippokampus, des sensomotorischen Kortex sowie des Zerebellums:*

Die herauspräparierten, noch gefrorenen Gewebeprobe werden in  $500\ \mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer (A) (Zusammensetzung des Puffers 3.2.6.9) mittels einer 1-Milliliter-Omnifix-Spritze<sup>®</sup> (Fa. Braun, Melsungen) mit verschiedenen Kanülen ( $0,9 \times 40\text{ mm}$ ;  $0,6 \times 25\text{ mm}$ ;  $0,4 \times 19\text{ mm}$ ; Microlance<sup>™</sup> 3, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) homogenisiert und in einem ersten Zentrifugationsschritt bei  $4\text{ °C}$  mit  $3800\text{ U / min}$  für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend verbringt man den Überstand 1 in ein Ultrazentrifugenröhrchen. Die Pellets werden mit einem Milliliter Puffer gewaschen und in einem zweiten Zentrifugationsschritt bei  $4\text{ °C}$  mit  $7000\text{ U / min}$  für 10 Minuten zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand 2 wird ebenfalls in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt.

Überstand 1 und 2 werden dann auf ein Probenvolumen von insgesamt 3 Millilitern mit Homogenisierungspuffer (A) aufgefüllt. Im dritten Zentrifugationsschritt wird die Probe ein weiteres Mal in der Ultrazentrifuge bei 4 °C mit 20.000 U / min für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets je nach Größe mit 200 bis 600 µl Homogenisierungspuffer (A) ohne Sukrose resuspendiert. Danach schließt sich die Proteinbestimmung der Proben an, die anschließend bei –80 °C aufbewahrt werden können.

#### *Homogenisierung von Membranproteinen der Amygdala und des medialen präfrontalen Kortex:*

Die gefrorenen und präparierten Gewebeproben werden in Eppendorf-Gefäßen mit je einem Milliliter Homogenisierungspuffer (B) (Pufferzusammensetzung 3.2.6.9) versetzt, und sorgfältig mit Hilfe einer 1-Milliliter-Omnifix-Spritze<sup>®</sup> (Fa.Braun, Melsungen) sowie verschiedenen Kanülen (0,9 x 40 mm; 0,6 x 25 mm; 0,4 x 19 mm; Microlance<sup>™</sup> 3, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) homogenisiert. Anschließend werden die Proben in Ultrazentrifugenröhrchen überführt, mit je 2 Millilitern Pufferlösung versetzt und bei 4 °C mit 18.000 U / min für 18 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit einem Milliliter Homogenisierungspuffer (B) resuspendiert und das Probenvolumen durch Zugabe von zusätzlichen 2 Millilitern Pufferlösung erhöht. Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgt analog der ersten Zentrifugation bei 4 °C mit 18.000 U / min für 18 Minuten. Der Überstand wird erneut verworfen, und das Pellet mit 300 bis 600 µl Membranpuffer resuspendiert. Im Anschluss bestimmt man die Proteinkonzentration der Probe und friert sie auch hier bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung ein.

#### **3.2.6.4 Proteinbestimmung nach Lowry und Denaturierung der homogenisierten Gewebeproben**

Diese Analysemethode ist ein Verfahren, um Proteinmengen quantitativ zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Methode basieren auf der Ausbildung eines Kupfer-Protein Komplexes in alkalischer Lösung und dessen Oxidation durch ein Folin-Reagenz. Die in der Probe vorhandene Proteinmenge kann mittels der entstandenen Blaufärbung photometrisch bestimmt und der Wert anhand der erstellten Eichkurve abgelesen werden (LOWRY et al., 1951).

Als Standard zur Erstellung der Proteineichkurve wird bovines Serumalbumin verwendet, welches in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Phosphate-Buffered-Saline) gelöst ist. Die Proteinkonzentrationen der Proben werden mit dem Bio-Rad Dc Protein Assay<sup>®</sup> (Bio-Rad, München) bestimmt. Der Ansatz der Probe setzt sich aus 5 µl der Lösung A, alkalische Lösung, sowie 200 µl der Lösung B, ein Folin-Reagenz, nach den Angaben des Herstellers zusammen.

Die Komponenten werden kurz durchmischt und 15 bis 30 Minuten inkubiert. Anschließend bestimmt man die Extinktion der Proben mithilfe eines Photometers und der Wert der unbekannt Proteinkonzentration wird an der Eichkurve abgelesen.

Anschließend werden die homogenisierten Gewebeproben mit SDS-Puffer (Zusammensetzung 3.2.6.9) gemischt und im Anschluss für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und somit denaturiert. Nachdem die Probe abgekühlt ist kann diese bei -20 °C aufbewahrt werden.

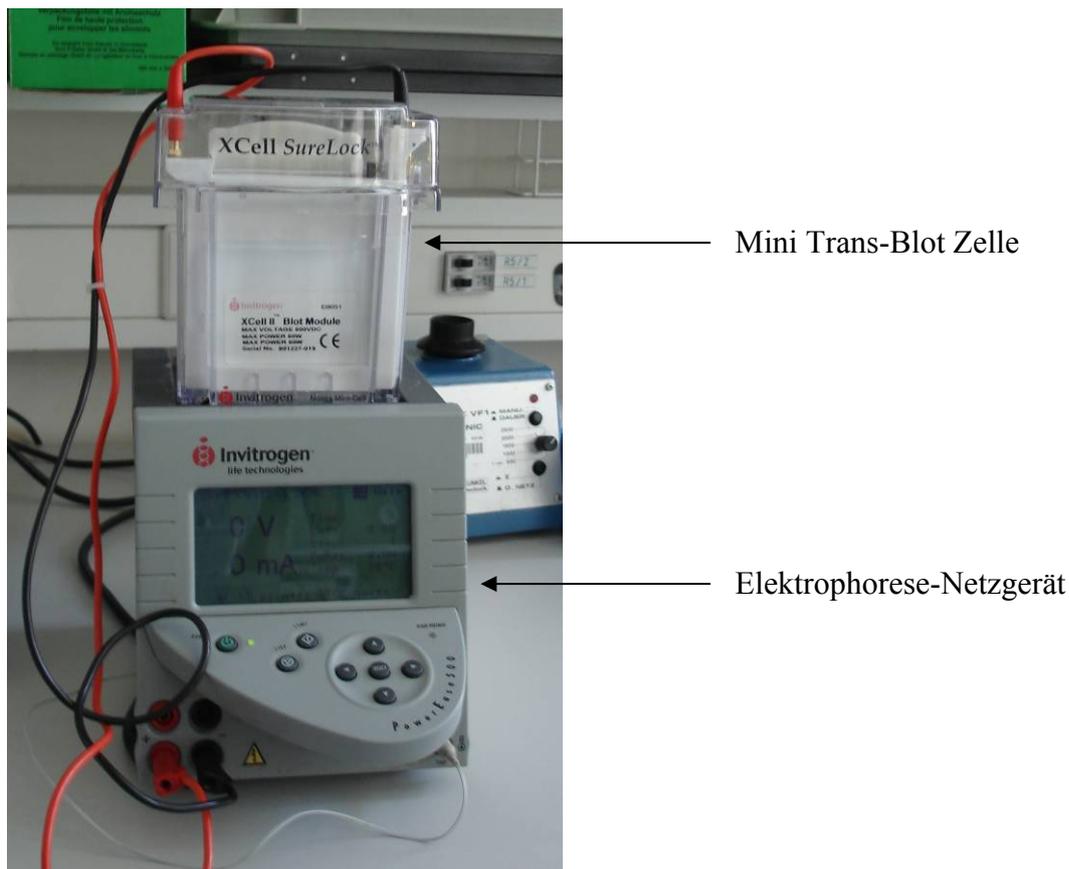
### **3.2.6.5 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese System**

Im Anschluss an die Probengewinnung führt man die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) durch. Das Gel besteht aus zwei verschiedenen Gelen (Trenn- und Sammelgel). Diese unterscheiden sich in der Ionenstärke, dem pH-Wert und in der Porengröße und differieren somit in Bezug auf ihre Funktionalität. Das Sammelgel, über das Trenngel gegossen, bewirkt eine schärfere Bandentrennung. Die Proteine durchwandern das Sammelgel rasch und ohne Auftrennung bevor sie an der Grenze zum Trenngel abgebremst werden. Das Trenngel bewirkt dann eine Auftrennung der Proteine rein der Größe nach. Das Gießen der Gele kann bereits am Vortag erfolgen. Im Anschluss befüllt man die innere und äußere Elektrophoresekammer mit dem SDS-Laufpuffer (Zusammensetzung 3.2.6.9), pipettiert die einzelnen Proben in die Geltaschen und spannt die Gele ein. Zusätzlich pipettiert man 5 µl Marker (Bio-Rad Precision Plus<sup>®</sup>, Bio-Rad, München) als Längenstandard mit auf das Gel. Sind alle Proben aufgetragen, lässt man die Proteine bei 200 V über 50 Minuten auftrennen.

### 3.2.6.6 Transfer der Proteine

Das Gel wird nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA85<sup>®</sup>, Schleicher und Schüll, Dassel) unter Verwendung des „Tank-Blot“-Verfahrens (Mini Trans-Blot Cell<sup>®</sup>, Bio-Rad, München) transferiert (Abbildung 13).

Der Blot-Vorgang erfolgt bei 30 V für 60 Minuten.



**Abbildung 13: MiniTrans-Blot Zelle und Elektrophorese-Netzgerät** (Aufnahme: Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München).

### 3.2.6.7 Blockieren der Membran und Inkubation mit den Antikörpern

Dem Transferprozess schließt sich eine dreimalige Waschung des Blots in Tris-Buffered-Saline Tween-20<sup>®</sup> (TBS-T) 0,1 % an. Dann wird der Blot für 24 Stunden bei 4 °C mit 5 % bovinem Serum Albumin (BSA) in TBS-T Lösung geblockt und anschließend über Nacht, ebenfalls bei 4 °C auf dem Schüttler mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die benötigten Antikörper sind für jedes gesuchte Protein spezifisch (Tabelle 2).

**Table 2: Proteine und Antikörper**

<b>Protein</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Speziesreaktivität</b>
<i>NMDAR2A</i>	<i>Rabbit Anti-NMDAR2A</i> (polyclonal antibody); (Chemicon International, Hofheim)	1: 1500	Mensch, Ratte, Maus, Fisch
<i>NMDAR2B</i>	<i>Rabbit Anti-NMDAR2B</i> (affinity purified polyclonal antibody); (Chemicon International, Hofheim)	1: 2000	Mensch, Ratte, Maus, Fisch
<i>GluR1</i>	<i>Anti-Rat GluR1</i> (rabbit affinity purified IgG); (Upstate biotechnology, Lake Placid, USA)	1: 2000	Mensch, Maus, Affe, Huhn
<i>GABA<sub>A</sub>α1</i>	<i>Anti-GABA<sub>A</sub>α1</i> (rabbit polyclonal IgG); (Upstate biotechnology, Lake Placid, USA)	1: 1000	Mensch, Ratte, Maus, Huhn, Rind
<i>GluR6/7</i>	<i>Anti-Rat GluR6/7</i> (rabbit polyclonal IgG); (Upstate biotechnology, Lake Placid, USA)	1: 2000	Mensch, Ratte, Maus, Affe, Huhn, Hase, Rind
<i>nAChβ<sub>2</sub></i>	<i>Rabbit Anti-Nicotinic Acetylcholine beta 2</i> (polyclonal antibody) (Chemicon International, Hofheim)	1: 2000	Mensch, Maus

*Auflistung der Rezeptorproteine mit ihren jeweiligen Antikörpern, Verdünnungsstufen sowie Speziesreaktivität*

Am nächsten Tag wird die Membran in TBS-T gewaschen und danach mit dem Sekundärintikörper anti-rabbit (Anti-rabbit antibody, Amersham Buchler, Braunschweig; Verdünnung 1: 10.000) für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wäscht man die Membran ein weiteres Mal in TBS-T.

### **3.2.6.8 Entwicklung und Auswertung des Western-Blots**

Die Analyse der Expression der Proteine erfolgt mit dem ECL-Western-Blot Detektionssystem<sup>®</sup> (Amersham Buchler, Braunschweig) gemäß Herstellerprotokoll. So pipettiert man je 2 Milliliter der ECL-Lösung I (Zusammensetzung: 1 % Luminol; 0,44 % Coumarinsäure; 10 % Tris-HCl (pH 8,5) und ECL-Lösung II (10 % Tris-HCl (pH 8,5)), in eine Schale und inkubiert darin den abgetropften Blot für eine Minute. Dann legt man den Blot auf eine Folie und legt diese in eine Filmkassette ein. In der Dunkelkammer wird der Film (Hyperfilm ECL<sup>®</sup>, Amersham Buchler, Braunschweig) für eine Minute belichtet und in einem Automaten entwickelt. Der belichtete Blot wird eingescannt und die Banden über ein Computerprogramm (Quantity One<sup>®</sup>, Bio-Rad, München) ausgewertet.

### 3.2.7 Zusammensetzung der Puffer und der Gele für die Elektrophoresekammer

- **Verwendete Puffer:**

- a) Homogenisierungspuffer:**

*Homogenisierungspuffer (A) 50 ml:*

1 mol Tris-HCL pH 7,4	1 ml
Sukrose	5,1 g
100 x Tris-EDTA	500 µl
100 mmol / l PMSF	100 µl
Complete <sup>TM</sup> Protease Inhibitor	1 Tablette
H <sub>2</sub> O dest ad 50 ml	

*Homogenisierungspuffer (B) 50 ml:*

1 mol Tris-HCL pH 7,4	2,5 ml
1 mol MgCl	150 µl
100 x Tris-EDTA	250 µl
100 mmol / l PMSF	250 µl
Complete <sup>TM</sup> Protease Inhibitor	1 Tablette
H <sub>2</sub> O dest ad 50 ml	

**b) Probenpuffer für SDS-Page (100 ml):**

1 mol Tris-HCl pH 6,0	20 ml
10 % SDS	60 ml
20 % Glycerol	20 ml
DTT	10 g
Bromphenolblau	10 mg
Orange G	10 mg

**c) Trenngelpuffer:**

1,5 mol Tris pH 8,8

**d) Sammelgelpuffer:**

0,5 mol Tris pH 6,8

**e) 5 x SDS-Laufpuffer:**

Tris	15,1 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
H <sub>2</sub> O dest ad 1 l	

**f) 1 x Transferpuffer:**

Tris	6 g
Glycin	28,8 g
Methanol	400 ml
H <sub>2</sub> O dest ad 2 l	

• **Gele für die Elektrophoresekammer:**

**a) 4 x Trenngel 10 %:**

Acrylamid 30 %	3,3 ml
4 x Trenngelpuffer	2,5 ml
destilliertes Wasser	4 ml
SDS 10 %	100 µl
Temed	5 ml
APS 10 %	175 ml

**b) 4 x Sammelgel 5 %:**

Acrylamid 30 %	1,7 ml
4 x Trenngelpuffer	2,5 ml
destilliertes Wasser	5,8 ml
SDS 10 %	100 µl
Temed	5 ml
APS 10 %	175 ml

### 3.3 Statistik

Die Parameter der extrazellulären elektrophysiologischen Untersuchungen werden mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse untersucht, dem einseitigen t-Test für unabhängige Stichproben. Es werden die 40-Minuten-LTP-Werte und die 60-Minuten-LTP-Werte der Isofluran- und der Kontrollgruppe für Amplitude und Steigung miteinander verglichen, um zu analysieren, ob nach dem Reizstimulus ein persistenter LTP-Level auf einem vergleichbaren Niveau fortbesteht. Hierzu werden die errechneten Mittelwerte der elektrophysiologischen Parameter von Minute 31 bis Minute 40 nach dem Stimulus addiert. Diese Summe bildet die Basis für die statistische Analyse der 40-Minuten-LTP-Werte, analog bildet eine Summierung der Mittelwerte, von Minute 51 bis Minute 60 nach dem Stimulus die Basis für die statistische Auswertung der 60-Minuten-LTP-Werte.

Mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens wird eine potenzielle Modifikation der relativen Rezeptorexpression in den für die kognitiven Prozesse besonders relevanten Gehirnregionen untersucht. Ebenso wie die Parameter der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitung werden die Variablen des Western-Blot Verfahrens mit einem einseitigen t-Test für unabhängige Stichproben analysiert.

Als Signifikanzniveau wird  $p < 0,05$  festgelegt.

Alle Variablen werden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM) in den Tabellen präsentiert. Die Abbildungen stellen die Mittelwerte (MW) und die Standardfehler (SEM) grafisch dar.

### 3.4 Ergebnisse

Bei der vorliegenden Studie gehen insgesamt 54 Tiere in die Bewertung mit ein. Die Einteilung der Tiere für die extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen umfasst eine Größe der Kohorte von  $n = 7$  sowohl für die am Vortag narkotisierten Tiere als auch für die Kontrollgruppe. Für die drei Induktionsparadigmen Theta-Burst Stimulation (TBS, impliziert 7 aufeinander folgende Viererreize von 100 Hz mit einem Interstimulusintervall von jeweils 200 ms),  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus und  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus werden demzufolge jeweils 14 Tiere verwendet. Von insgesamt 12 Tieren (je sechs Kontroll- und je sechs anästhesierte Tiere) werden in den verschiedenen Gehirnregionen (Hippokampus, sensomotorischer Kortex (S/M Kortex), medialer präfrontaler Kortex (mPFC) sowie Zerebellum und Amygdala) die relative Rezeptorexpression von NMDAR2A, NMDAR2B, GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1, GluR1, GluR 6/7 und nACh $\beta$ <sub>2</sub> analysiert.

Insgesamt vier Tiere konnten bei der Auswertung der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitung nicht berücksichtigt werden. Diese Tiere aus der Isoflurangruppe werden aufgrund einer schweren Schädigung des Gehirnpräparates im Zuge der Eröffnung des Schädelknochens und den anschließenden Präparationschritten von der Auswertung ausgeschlossen. Um eine Gruppengröße von jeweils 7 Mäusen zu erreichen, werden die ausgefallenen Tiere ersetzt. Im Rahmen der Western-Blot Analyse waren keine Ausfälle zu beobachten.

## 3.5 Erhobene Parameter der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen

### 3.5.1.1 Reizmuster der Theta-Burst Stimulation

In den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen sind Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SEM) der Steigung und der Amplitudenhöhe der Ausgangswerte (Minute 1 bis 20) bis 60 Minuten nach der TBS (LTP, Minute 21 bis 80) dargestellt. Die 40-Minuten-LTP-Werte sowie die 60-Minuten-LTP-Werte von Steigung und Amplitude der Kontroll- und Isoflurangruppe werden tabellarisch jeweils gesondert dargestellt.

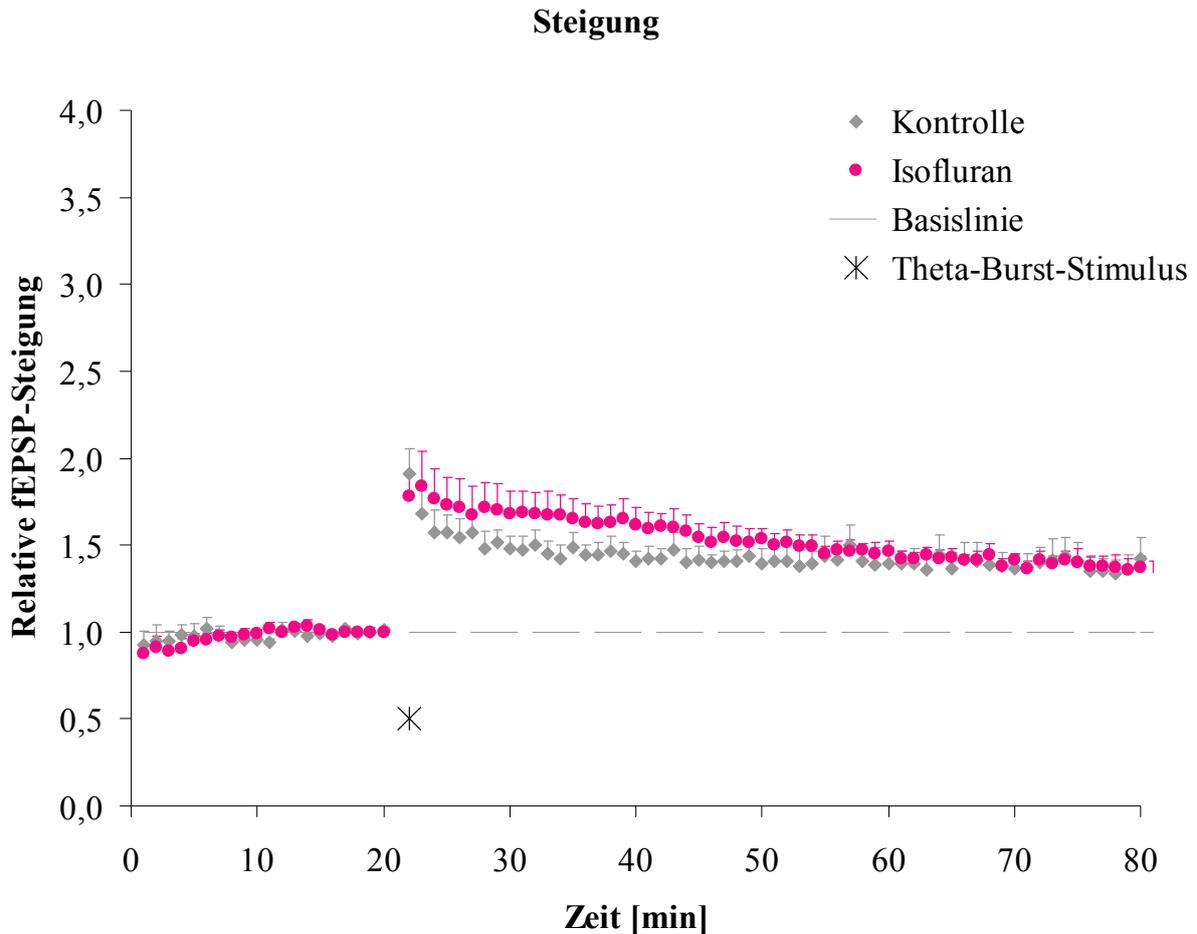
## Messung des Grades der relativen Steigung der fEPSPs

**Tabelle 3: Grad der relativen Steigung der fEPSPs vor (Ausgangswert) bis 60 Minuten nach einer TBS**

	Min.	Kontrolle	Isofluran		Min.	Kontrolle	Isofluran
A U S G A N G S W E R T E	1	0,93 ± 0,08	0,87 ± 0,05	L T P	41	1,42 ± 0,06	1,61 ± 0,07
	2	0,95 ± 0,10	0,91 ± 0,07		42	1,47 ± 0,10	1,60 ± 0,11
	3	0,95 ± 0,05	0,89 ± 0,05		43	1,40 ± 0,08	1,58 ± 0,10
	4	0,98 ± 0,06	0,90 ± 0,06		44	1,41 ± 0,08	1,54 ± 0,08
	5	0,98 ± 0,07	0,95 ± 0,05		45	1,40 ± 0,05	1,52 ± 0,08
	6	1,02 ± 0,06	0,95 ± 0,04		46	1,41 ± 0,06	1,54 ± 0,09
	7	0,98 ± 0,05	0,98 ± 0,03		47	1,40 ± 0,07	1,52 ± 0,09
	8	0,94 ± 0,03	0,97 ± 0,03		48	1,44 ± 0,09	1,52 ± 0,08
	9	0,95 ± 0,01	0,98 ± 0,04		49	1,39 ± 0,09	1,53 ± 0,06
	10	0,95 ± 0,01	0,99 ± 0,03		50	1,41 ± 0,09	1,50 ± 0,07
	11	0,94 ± 0,02	1,02 ± 0,04		51	1,40 ± 0,10	1,51 ± 0,07
	12	1,01 ± 0,04	1,00 ± 0,02		52	1,38 ± 0,09	1,49 ± 0,06
	13	1,01 ± 0,04	1,02 ± 0,03		53	1,39 ± 0,08	1,49 ± 0,06
	14	0,98 ± 0,01	1,03 ± 0,04		54	1,44 ± 0,11	1,45 ± 0,04
	15	0,99 ± 0,03	1,01 ± 0,02		55	1,42 ± 0,05	1,48 ± 0,05
	16	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,01		56	1,50 ± 0,11	1,47 ± 0,06
	17	1,02 ± 0,01	1,00 ± 0,01		57	1,41 ± 0,09	1,47 ± 0,04
	18	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,02		58	1,39 ± 0,10	1,45 ± 0,07
	19	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,01		59	1,42 ± 0,09	1,46 ± 0,06
	20	1,02 ± 0,01	1,00 ± 0,01		60	1,39 ± 0,09	1,42 ± 0,04
※			61	1,40 ± 0,07	1,42 ± 0,04		
21	1,91 ± 0,14	1,78 ± 0,14	62	1,39 ± 0,09	1,45 ± 0,04		
22	1,68 ± 0,14	1,84 ± 0,20	63	1,36 ± 0,07	1,42 ± 0,05		
23	1,57 ± 0,13	1,77 ± 0,17	64	1,45 ± 0,12	1,43 ± 0,05		
24	1,57 ± 0,11	1,73 ± 0,16	65	1,37 ± 0,09	1,42 ± 0,03		
25	1,54 ± 0,11	1,72 ± 0,16	66	1,41 ± 0,10	1,42 ± 0,05		
26	1,57 ± 0,11	1,67 ± 0,17	67	1,41 ± 0,11	1,44 ± 0,07		
27	1,48 ± 0,10	1,71 ± 0,14	68	1,38 ± 0,07	1,38 ± 0,04		
28	1,51 ± 0,08	1,70 ± 0,15	69	1,38 ± 0,08	1,41 ± 0,04		
29	1,48 ± 0,08	1,68 ± 0,13	70	1,37 ± 0,08	1,36 ± 0,04		
30	1,48 ± 0,08	1,69 ± 0,13	71	1,37 ± 0,08	1,41 ± 0,05		
31	1,50 ± 0,09	1,68 ± 0,12	72	1,40 ± 0,09	1,39 ± 0,04		
32	1,45 ± 0,08	1,68 ± 0,13	73	1,42 ± 0,12	1,41 ± 0,06		
33	1,42 ± 0,08	1,68 ± 0,11	74	1,43 ± 0,11	1,40 ± 0,08		
34	1,48 ± 0,09	1,65 ± 0,11	75	1,41 ± 0,10	1,38 ± 0,06		
35	1,44 ± 0,06	1,63 ± 0,11	76	1,35 ± 0,08	1,38 ± 0,06		
36	1,44 ± 0,07	1,62 ± 0,10	77	1,35 ± 0,07	1,37 ± 0,07		
37	1,46 ± 0,09	1,63 ± 0,10	78	1,34 ± 0,08	1,36 ± 0,06		
38	1,45 ± 0,07	1,65 ± 0,11	79	1,36 ± 0,08	1,37 ± 0,06		
39	1,41 ± 0,06	1,61 ± 0,10	80	1,42 ± 0,12	1,34 ± 0,06		
40	1,42 ± 0,07	1,59 ± 0,09					

*MW ± SEM des Ausmaßes der relativen Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einer TBS (※) (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

Die Isofluran- und die Kontrollgruppe zeigen stabile Ausgangswerte mit in etwa konstanten fEPSP-Antworten. Die Theta-Burst Stimulation induziert die Zunahme der Größe der fEPSP-Antworten. Es besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die relative Steigung der fEPSPs zwischen den Tieren, die am Vortag einem Narkoseregime unterzogen wurden und jenen der Kontrollgruppe (Tabelle 3, Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Grafische Darstellung der  $MW \pm SEM$  des Ausmaßes der Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einer TBS ( $n = je\ 7\ Tiere / Gruppe$ ).

Die Auswertung der Daten der 40-Minuten-LTP-Werte sowie der 60-Minuten-LTP-Werte der relativen Steigung nach einer TBS resultiert in keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe (Tabelle 4).

***Tabelle 4: Relative Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einer TBS***

	Kontrolle	Isofluran
40-Minuten-LTP-Werte	1,41 ± 0,08	1,46 ± 0,05
60-Minuten-LTP-Werte	1,39 ± 0,23	1,38 ± 0,06

*MW ± SEM der relativen Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

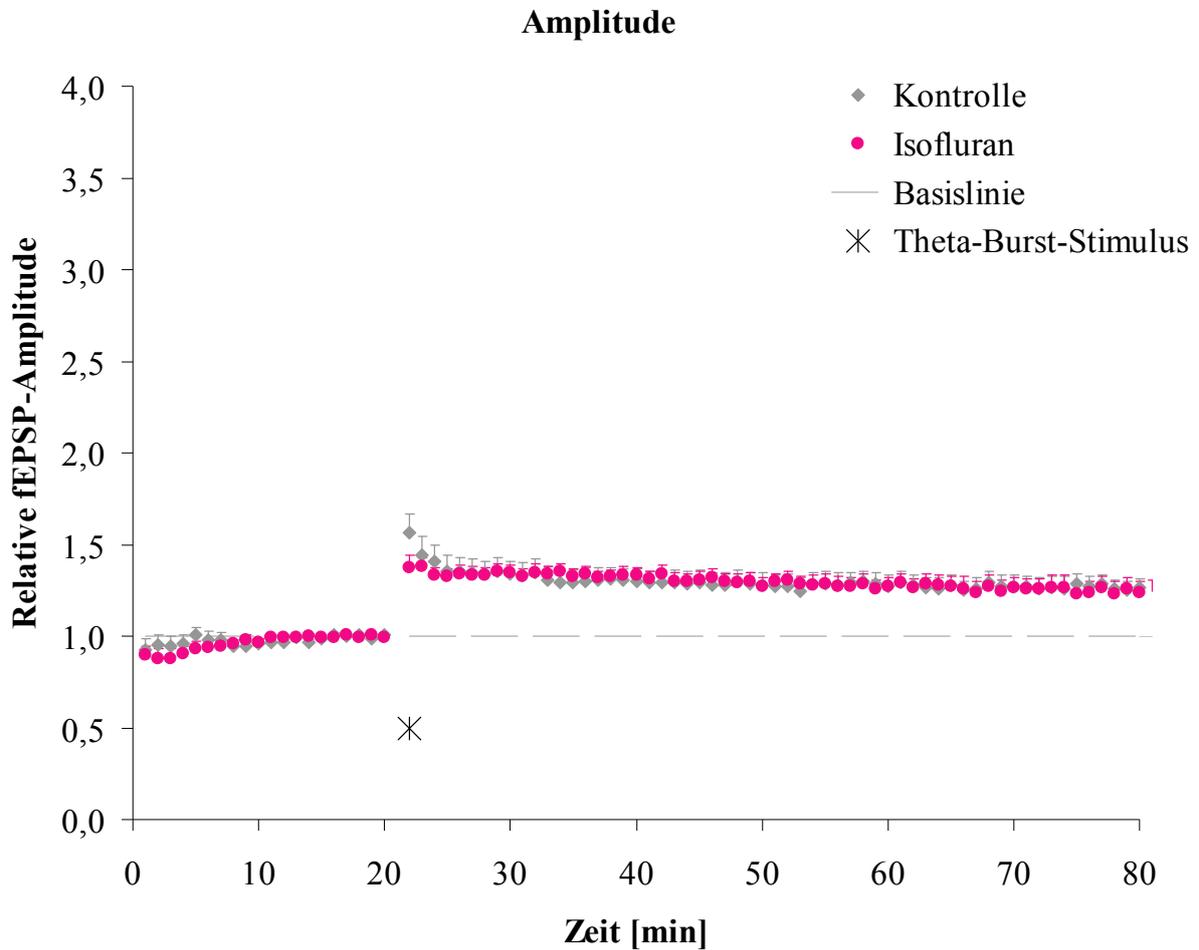
## Messung der Werte der relativen Amplitude

**Tabelle 5: Höhe der relativen Amplitude vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einer TBS**

	Min.	Kontrolle	Isofluran		Min.	Kontrolle	Isofluran
A U S G A N G S W E R T E	1	0,93 ± 0,06	0,90 ± 0,05	L T P	41	1,29 ± 0,06	1,34 ± 0,05
	2	0,95 ± 0,06	0,88 ± 0,05		42	1,29 ± 0,06	1,30 ± 0,05
	3	0,95 ± 0,05	0,88 ± 0,06		43	1,29 ± 0,07	1,30 ± 0,04
	4	0,96 ± 0,05	0,90 ± 0,04		44	1,29 ± 0,06	1,31 ± 0,05
	5	1,00 ± 0,05	0,93 ± 0,04		45	1,28 ± 0,07	1,32 ± 0,05
	6	0,98 ± 0,05	0,94 ± 0,04		46	1,28 ± 0,07	1,30 ± 0,04
	7	0,98 ± 0,04	0,95 ± 0,03		47	1,30 ± 0,07	1,29 ± 0,05
	8	0,95 ± 0,01	0,96 ± 0,02		48	1,29 ± 0,06	1,30 ± 0,04
	9	0,95 ± 0,02	0,98 ± 0,02		49	1,28 ± 0,07	1,27 ± 0,05
	10	0,96 ± 0,02	0,97 ± 0,02		50	1,27 ± 0,07	1,30 ± 0,04
	11	0,97 ± 0,01	0,99 ± 0,02		51	1,27 ± 0,07	1,30 ± 0,05
	12	0,97 ± 0,01	1,00 ± 0,01		52	1,25 ± 0,07	1,28 ± 0,04
	13	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,01		53	1,28 ± 0,06	1,28 ± 0,05
	14	0,96 ± 0,02	1,00 ± 0,01		54	1,29 ± 0,06	1,29 ± 0,05
	15	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01		55	1,28 ± 0,06	1,27 ± 0,05
	16	1,01 ± 0,01	0,99 ± 0,01		56	1,29 ± 0,05	1,27 ± 0,05
	17	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,01		57	1,30 ± 0,06	1,29 ± 0,05
	18	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,00		58	1,29 ± 0,06	1,26 ± 0,05
	19	0,99 ± 0,00	1,01 ± 0,00		59	1,29 ± 0,06	1,27 ± 0,05
	20	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01		60	1,27 ± 0,06	1,29 ± 0,05
※				61	1,30 ± 0,06	1,26 ± 0,05	
21	1,56 ± 0,11	1,37 ± 0,07		62	1,28 ± 0,06	1,29 ± 0,05	
22	1,44 ± 0,10	1,38 ± 0,05		63	1,26 ± 0,06	1,28 ± 0,05	
23	1,41 ± 0,09	1,33 ± 0,04		64	1,26 ± 0,06	1,27 ± 0,05	
24	1,36 ± 0,08	1,33 ± 0,04		65	1,28 ± 0,05	1,26 ± 0,06	
25	1,35 ± 0,08	1,34 ± 0,05		66	1,25 ± 0,05	1,24 ± 0,06	
26	1,35 ± 0,08	1,34 ± 0,05		67	1,26 ± 0,06	1,27 ± 0,06	
27	1,34 ± 0,07	1,33 ± 0,04		68	1,29 ± 0,06	1,25 ± 0,06	
28	1,35 ± 0,08	1,35 ± 0,05		69	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,05	
29	1,34 ± 0,07	1,35 ± 0,04		70	1,27 ± 0,06	1,26 ± 0,05	
30	1,33 ± 0,07	1,33 ± 0,04		71	1,27 ± 0,06	1,26 ± 0,06	
31	1,35 ± 0,07	1,35 ± 0,05		72	1,26 ± 0,06	1,27 ± 0,06	
32	1,31 ± 0,08	1,34 ± 0,04		73	1,27 ± 0,06	1,27 ± 0,06	
33	1,29 ± 0,07	1,36 ± 0,04		74	1,26 ± 0,06	1,23 ± 0,06	
34	1,29 ± 0,07	1,33 ± 0,04		75	1,28 ± 0,06	1,24 ± 0,06	
35	1,30 ± 0,07	1,34 ± 0,04		76	1,27 ± 0,05	1,26 ± 0,06	
36	1,31 ± 0,07	1,32 ± 0,04		77	1,28 ± 0,05	1,23 ± 0,07	
37	1,31 ± 0,07	1,32 ± 0,04		78	1,26 ± 0,05	1,26 ± 0,06	
38	1,30 ± 0,06	1,33 ± 0,05		79	1,25 ± 0,05	1,24 ± 0,06	
39	1,30 ± 0,06	1,33 ± 0,04		80	1,27 ± 0,05	1,24 ± 0,06	
40	1,29 ± 0,06	1,31 ± 0,04					

*MW ± SEM der relativen Amplitudenhöhe der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einer TBS (※) (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

Der gemessene Unterschied in Bezug auf das Ausmaß der LTP-Antwort nach der TBS zwischen den Kontrolltieren und den am Vortag anästhesierten Tieren ist für die Antwortamplitude nicht signifikant (Tabelle 5, Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Grafische Darstellung der  $MW \pm SEM$  des Ausmaßes der Amplitude der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einer TBS ( $n = je\ 7\ Tiere / Gruppe$ ).

Die Datenanalyse der 40-Minuten-LTP-Werte sowie der 60-Minuten-LTP-Werte der relativen Amplitude nach der TBS resultiert in keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Relative Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einer TBS**

	Kontrolle	Isofluran
40-Minuten-LTP-Werte	1,28 ± 0,06	1,28 ± 0,05
60-Minuten-LTP-Werte	1,27 ± 0,05	1,25 ± 0,06

*MW ± SEM der relativen Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

### 3.5.1.2 Reizmuster des 2 \* 100 Hertz / 1 Sekunde-Stimulus

Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SEM) der Steigung und der Amplitudenhöhe der Ausgangswerte (Minute 1 bis 20) bis 60 Minuten nach einem 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus (LTP, Minute 21 bis 80) sind in den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen aufgeführt. Die 40-Minuten-LTP-Werte sowie die 60-Minuten-LTP-Werte von Steigung und Amplitude der Kontroll- und Isoflurangruppe werden jeweils gesondert dargestellt.

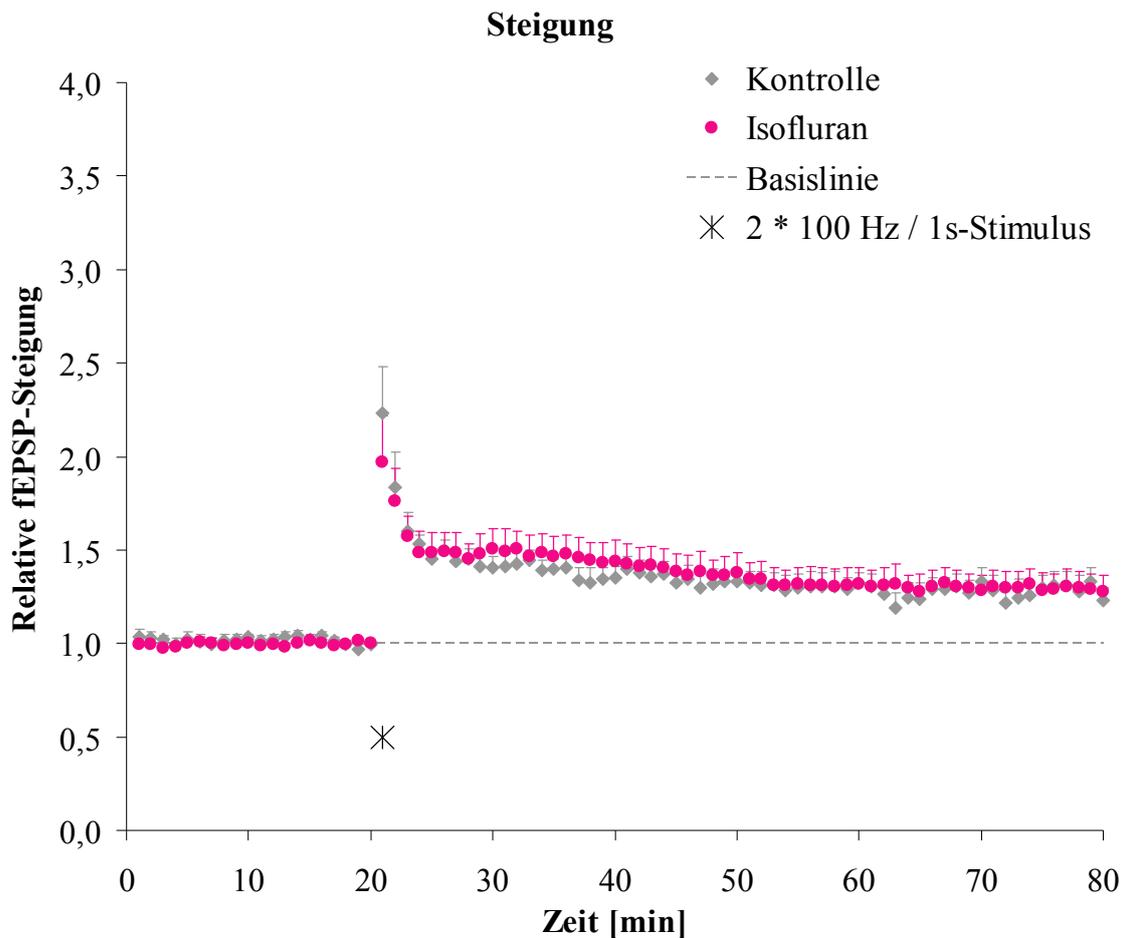
## Messung des Grades der relativen Steigung der fEPSPs

**Tabelle 7: Grad der relativen Steigung der fEPSPs Werte vor (Ausgangswerte) beziehungsweise nach einem 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus**

	Min.	Kontrolle	Isofluran		Min.	Kontrolle	Isofluran
A U S G A N G S W E R T E	1	1,04 ± 0,03	0,99 ± 0,03	L T P	41	1,40 ± 0,07	1,43 ± 0,10
	2	1,03 ± 0,03	1,00 ± 0,03		42	1,38 ± 0,06	1,41 ± 0,10
	3	1,02 ± 0,02	0,98 ± 0,04		43	1,36 ± 0,06	1,42 ± 0,11
	4	1,00 ± 0,03	0,98 ± 0,03		44	1,37 ± 0,07	1,41 ± 0,10
	5	1,02 ± 0,04	1,00 ± 0,02		45	1,32 ± 0,07	1,38 ± 0,10
	6	1,01 ± 0,04	1,01 ± 0,03		46	1,35 ± 0,07	1,37 ± 0,10
	7	0,99 ± 0,03	1,00 ± 0,03		47	1,29 ± 0,09	1,39 ± 0,11
	8	1,02 ± 0,03	0,99 ± 0,03		48	1,32 ± 0,08	1,36 ± 0,08
	9	1,02 ± 0,02	1,00 ± 0,03		49	1,33 ± 0,05	1,37 ± 0,10
	10	1,03 ± 0,01	1,00 ± 0,02		50	1,33 ± 0,06	1,38 ± 0,11
	11	1,01 ± 0,03	0,99 ± 0,02		51	1,32 ± 0,06	1,35 ± 0,09
	12	1,02 ± 0,03	0,99 ± 0,02		52	1,31 ± 0,07	1,35 ± 0,09
	13	1,04 ± 0,02	0,98 ± 0,02		53	1,31 ± 0,07	1,31 ± 0,09
	14	1,04 ± 0,03	1,00 ± 0,03		54	1,28 ± 0,08	1,31 ± 0,08
	15	1,02 ± 0,02	1,01 ± 0,01		55	1,30 ± 0,07	1,32 ± 0,09
	16	1,04 ± 0,02	1,00 ± 0,02		56	1,30 ± 0,08	1,31 ± 0,10
	17	1,02 ± 0,02	0,99 ± 0,02		57	1,30 ± 0,08	1,31 ± 0,09
	18	1,00 ± 0,02	0,99 ± 0,01		58	1,31 ± 0,08	1,31 ± 0,09
	19	0,97 ± 0,03	1,01 ± 0,01		59	1,29 ± 0,06	1,31 ± 0,10
	20	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,00		60	1,32 ± 0,06	1,32 ± 0,08
⊗				61	1,30 ± 0,07	1,30 ± 0,09	
21	2,23 ± 0,25	1,97 ± 0,25		62	1,26 ± 0,07	1,31 ± 0,10	
22	1,84 ± 0,19	1,76 ± 0,17		63	1,19 ± 0,08	1,32 ± 0,11	
23	1,60 ± 0,10	1,57 ± 0,11		64	1,24 ± 0,08	1,29 ± 0,07	
24	1,53 ± 0,05	1,49 ± 0,11		65	1,24 ± 0,08	1,28 ± 0,09	
25	1,45 ± 0,05	1,49 ± 0,11		66	1,29 ± 0,06	1,31 ± 0,08	
26	1,50 ± 0,05	1,49 ± 0,10		67	1,29 ± 0,07	1,32 ± 0,08	
27	1,44 ± 0,05	1,49 ± 0,11		68	1,30 ± 0,07	1,31 ± 0,08	
28	1,45 ± 0,06	1,45 ± 0,08		69	1,27 ± 0,07	1,30 ± 0,08	
29	1,41 ± 0,06	1,48 ± 0,11		70	1,33 ± 0,07	1,29 ± 0,08	
30	1,41 ± 0,06	1,50 ± 0,11		71	1,29 ± 0,08	1,30 ± 0,09	
31	1,41 ± 0,07	1,49 ± 0,12		72	1,22 ± 0,07	1,30 ± 0,09	
32	1,42 ± 0,07	1,50 ± 0,10		73	1,24 ± 0,10	1,29 ± 0,09	
33	1,44 ± 0,06	1,47 ± 0,11		74	1,26 ± 0,06	1,32 ± 0,08	
34	1,39 ± 0,06	1,49 ± 0,10		75	1,30 ± 0,07	1,28 ± 0,09	
35	1,40 ± 0,05	1,46 ± 0,11		76	1,31 ± 0,07	1,29 ± 0,09	
36	1,41 ± 0,07	1,48 ± 0,10		77	1,31 ± 0,07	1,30 ± 0,09	
37	1,34 ± 0,07	1,46 ± 0,11		78	1,28 ± 0,08	1,29 ± 0,09	
38	1,33 ± 0,08	1,44 ± 0,10		79	1,33 ± 0,07	1,29 ± 0,08	
39	1,34 ± 0,06	1,43 ± 0,10		80	1,23 ± 0,07	1,27 ± 0,09	
40	1,35 ± 0,06	1,44 ± 0,11					

*MW ± SEM des Ausmaßes der relativen Steigung der fEPSPs beider Gruppen, vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von 2 \* 100 Hz / 1 s (⊗) (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

Die Ausgangswerte der Kontrollgruppe sowie der am Vortag narkotisierten Tiere sind stabil und auf einem vergleichbaren Niveau. Nach einem Stimulus von  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$  nimmt die Größe der fEPSP-Antworten zu. Es besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die relative Steigung der fEPSPs zwischen den Tieren, die am Vortag einem Narkoseregime unterzogen wurden und jenen der Kontrollgruppe (Tabelle 7, Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Grafische Darstellung der  $MW \pm SEM$  des Ausmaßes der Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus ( $n = \text{je } 7 \text{ Tiere} / \text{Gruppe}$ ).

Die Auswertung der Daten der 40-Minuten-LTP-Werte sowie der 60-Minuten-LTP-Werte der relativen Steigung nach einem  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus resultiert in keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe (Tabelle 8).

***Tabelle 8: Relative Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ - Stimulus***

	Kontrolle	Isofluran
40-Minuten-LTP-Werte	1,36 $\pm$ 0,06	1,38 $\pm$ 0,06
60-Minuten-LTP-Werte	1,33 $\pm$ 0,06	1,34 $\pm$ 0,06

*MW  $\pm$  SEM der relativen Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

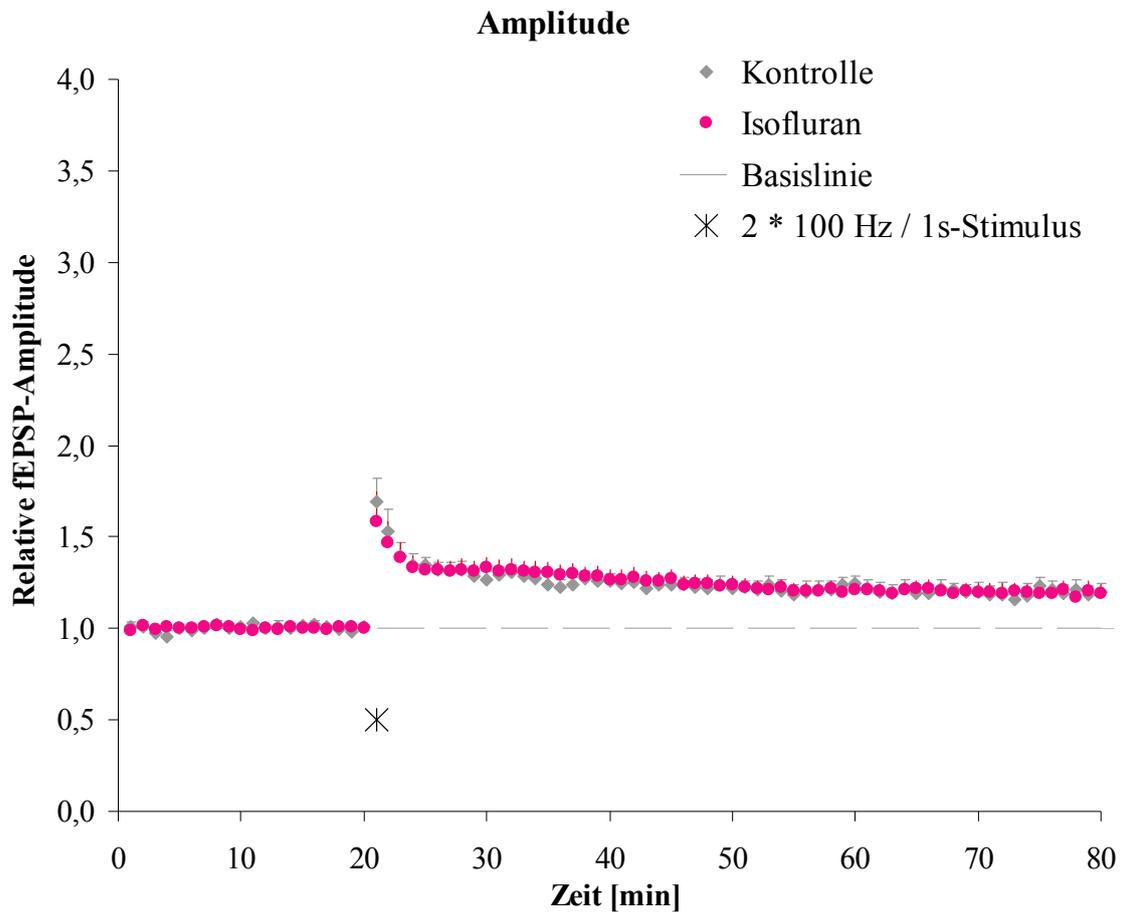
## Messung der Werte der relativen Amplitude

**Tabelle 9: Höhe der relativen Amplitude vor (Ausgangswerte) beziehungsweise nach einem 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus**

	Min.	Kontrolle	Isofluran		Min.	Kontrolle	Isofluran
A U S G A N G S W E R T E	1	1,01 ± 0,03	0,99 ± 0,02	L T P	41	1,25 ± 0,04	1,27 ± 0,05
	2	1,01 ± 0,03	1,01 ± 0,02		42	1,25 ± 0,04	1,28 ± 0,05
	3	0,98 ± 0,03	0,99 ± 0,02		43	1,22 ± 0,05	1,26 ± 0,05
	4	0,96 ± 0,03	1,01 ± 0,02		44	1,24 ± 0,04	1,26 ± 0,05
	5	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02		45	1,24 ± 0,05	1,27 ± 0,05
	6	0,99 ± 0,03	1,00 ± 0,02		46	1,24 ± 0,04	1,24 ± 0,05
	7	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,01		47	1,22 ± 0,05	1,24 ± 0,05
	8	1,02 ± 0,02	1,01 ± 0,02		48	1,22 ± 0,05	1,24 ± 0,05
	9	1,00 ± 0,02	1,01 ± 0,02		49	1,24 ± 0,05	1,23 ± 0,04
	10	1,01 ± 0,01	0,99 ± 0,02		50	1,22 ± 0,04	1,24 ± 0,04
	11	1,03 ± 0,01	0,99 ± 0,01		51	1,22 ± 0,04	1,22 ± 0,05
	12	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,01		52	1,21 ± 0,05	1,22 ± 0,04
	13	1,01 ± 0,03	0,99 ± 0,02		53	1,24 ± 0,05	1,21 ± 0,04
	14	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,01		54	1,20 ± 0,06	1,22 ± 0,04
	15	1,02 ± 0,01	1,00 ± 0,01		55	1,19 ± 0,05	1,20 ± 0,04
	16	1,02 ± 0,02	1,00 ± 0,01		56	1,20 ± 0,06	1,20 ± 0,04
	17	1,01 ± 0,01	0,99 ± 0,01		57	1,21 ± 0,04	1,21 ± 0,05
	18	0,99 ± 0,01	1,01 ± 0,01		58	1,21 ± 0,05	1,22 ± 0,04
	19	0,98 ± 0,02	1,01 ± 0,01		59	1,24 ± 0,04	1,20 ± 0,04
	20	1,01 ± 0,01	1,00 ± 0,01		60	1,24 ± 0,04	1,21 ± 0,05
⊗				61	1,22 ± 0,05	1,21 ± 0,04	
21	1,69 ± 0,13	1,59 ± 0,16	62	1,20 ± 0,05	1,20 ± 0,04		
22	1,53 ± 0,12	1,47 ± 0,12	63	1,19 ± 0,05	1,19 ± 0,04		
23	1,40 ± 0,08	1,39 ± 0,08	64	1,22 ± 0,04	1,21 ± 0,04		
24	1,35 ± 0,06	1,33 ± 0,06	65	1,19 ± 0,04	1,22 ± 0,04		
25	1,34 ± 0,04	1,32 ± 0,05	66	1,19 ± 0,05	1,22 ± 0,05		
26	1,32 ± 0,04	1,32 ± 0,05	67	1,22 ± 0,05	1,21 ± 0,05		
27	1,32 ± 0,04	1,31 ± 0,06	68	1,21 ± 0,04	1,19 ± 0,04		
28	1,32 ± 0,05	1,32 ± 0,06	69	1,20 ± 0,04	1,20 ± 0,04		
29	1,29 ± 0,04	1,32 ± 0,05	70	1,20 ± 0,05	1,20 ± 0,05		
30	1,27 ± 0,05	1,33 ± 0,06	71	1,18 ± 0,05	1,20 ± 0,04		
31	1,29 ± 0,04	1,31 ± 0,06	72	1,18 ± 0,07	1,19 ± 0,05		
32	1,31 ± 0,04	1,32 ± 0,06	73	1,16 ± 0,06	1,20 ± 0,04		
33	1,29 ± 0,05	1,31 ± 0,06	74	1,18 ± 0,07	1,20 ± 0,04		
34	1,28 ± 0,04	1,31 ± 0,06	75	1,23 ± 0,05	1,19 ± 0,04		
35	1,24 ± 0,05	1,30 ± 0,06	76	1,21 ± 0,05	1,19 ± 0,05		
36	1,22 ± 0,04	1,29 ± 0,06	77	1,19 ± 0,05	1,21 ± 0,05		
37	1,24 ± 0,04	1,30 ± 0,06	78	1,21 ± 0,05	1,17 ± 0,04		
38	1,27 ± 0,04	1,28 ± 0,05	79	1,19 ± 0,05	1,21 ± 0,05		
39	1,26 ± 0,05	1,29 ± 0,06	80	1,20 ± 0,05	1,19 ± 0,05		
40	1,26 ± 0,04	1,27 ± 0,05					

*MW ± SEM der relativen Amplitudenhöhe der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von 2 \* 100 Hz / 1 s (⊗) (n = je 7 Tiere / Gruppe).*

Der aufgetretene Unterschied in Bezug auf die Höhe der LTP-Induktion und Expression nach einem  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus zwischen der Kontrollgruppe und den am Vortag anästhesierten Tieren ist für die Antwortamplitude nicht signifikant (Tabelle 9, Abbildung 17).



**Abbildung 17: Grafische Darstellung der  $MW \pm SEM$  des Ausmaßes der Amplitude der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus ( $n = \text{je } 7 \text{ Tiere} / \text{Gruppe}$ ).**

Die Auswertung der Daten der 40-Minuten-LTP-Werte sowie der 60-Minuten-LTP-Werte der relativen Amplitude nach einem 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus resultiert in keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe (Tabelle 10).

***Tabelle 10: Relative Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus***

	Kontrolle	Isofluran
40-Minuten-LTP-Werte	1,23 ± 0,03	1,21 ± 0,04
60-Minuten-LTP-Werte	1,21 ± 0,04	1,19 ± 0,03

*MW ± SEM der relativen Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

### **3.5.1.3 Reizmuster des 1 \* 100 Hertz / 1 Sekunde-Stimulus**

In den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen sind Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SEM) der Amplitudenhöhe und Steigung der Ausgangswerte (Minute 1 bis 20) bis 60 Minuten nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus (LTP, Minute 21 bis 80) dargestellt. Die 40-Minuten-LTP-Werte sowie die 60-Minuten-LTP-Werte von Steigung und Amplitude der Kontroll- und Isoflurangruppe werden tabellarisch jeweils gesondert dargestellt.

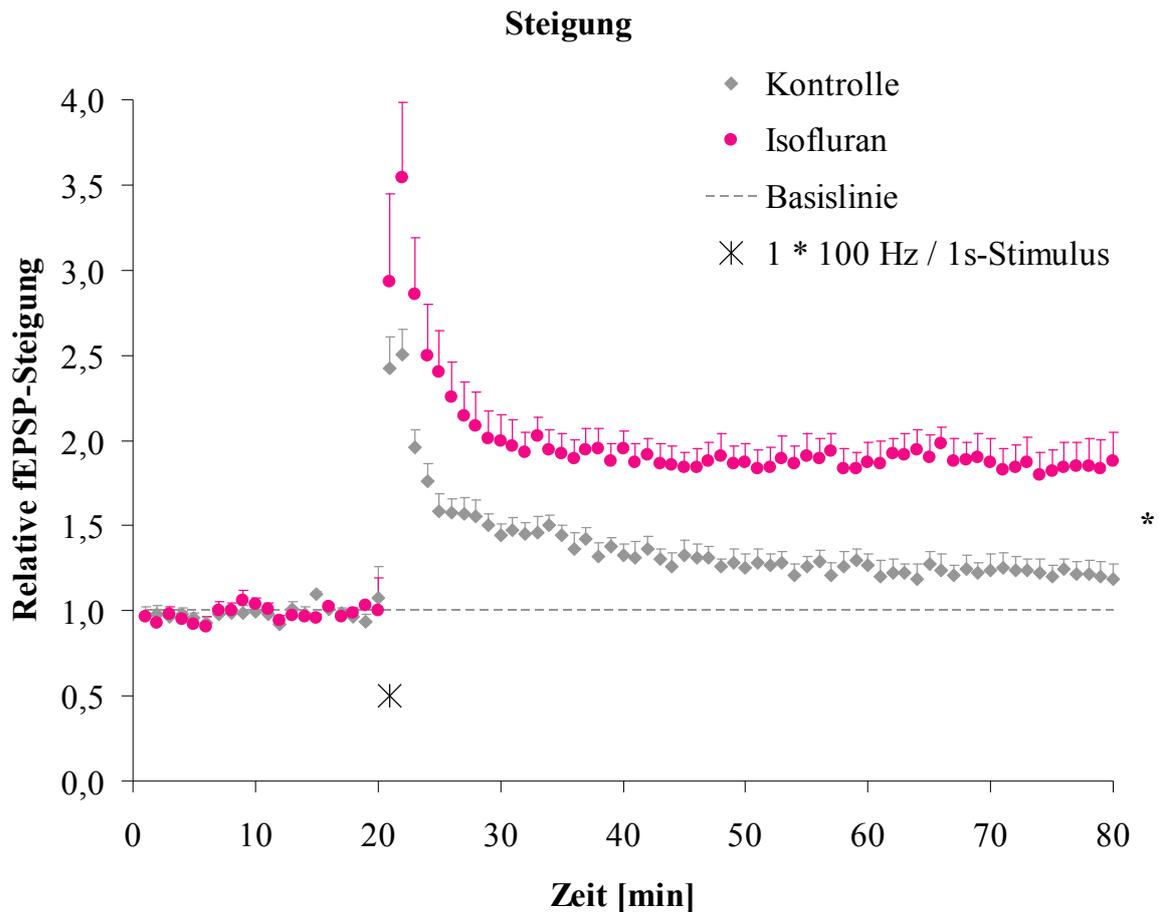
## Messung des Grades der relativen Steigung der fEPSPs

**Tabelle 11: Grad der relativen Steigung der fEPSPs vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$**

	Min.	Kontrolle	Isofluran		Min.	Kontrolle	Isofluran
A U S G A N G S W E R T E	1	0,98 ± 0,04	0,97 ± 0,03	L T P	41	1,31 ± 0,06	1,87 ± 0,11
	2	0,98 ± 0,05	0,93 ± 0,02		42	1,36 ± 0,09	1,92 ± 0,11
	3	0,97 ± 0,05	0,98 ± 0,04		43	1,31 ± 0,07	1,87 ± 0,09
	4	0,98 ± 0,03	0,95 ± 0,04		44	1,26 ± 0,05	1,85 ± 0,12
	5	0,96 ± 0,04	0,92 ± 0,05		45	1,32 ± 0,08	1,84 ± 0,11
	6	0,93 ± 0,02	0,91 ± 0,03		46	1,31 ± 0,09	1,84 ± 0,09
	7	0,98 ± 0,04	1,00 ± 0,05		47	1,31 ± 0,08	1,88 ± 0,11
	8	0,99 ± 0,04	1,00 ± 0,06		48	1,26 ± 0,07	1,90 ± 0,11
	9	0,99 ± 0,03	1,06 ± 0,05		49	1,28 ± 0,05	1,86 ± 0,13
	10	0,99 ± 0,04	1,04 ± 0,06		50	1,26 ± 0,08	1,87 ± 0,10
	11	0,98 ± 0,03	1,01 ± 0,04		51	1,28 ± 0,08	1,84 ± 0,12
	12	0,92 ± 0,02	0,94 ± 0,04		52	1,27 ± 0,08	1,84 ± 0,11
	13	1,01 ± 0,02	0,97 ± 0,03		53	1,28 ± 0,06	1,89 ± 0,12
	14	0,98 ± 0,04	0,97 ± 0,03		54	1,20 ± 0,07	1,86 ± 0,13
	15	1,10 ± 0,05	0,96 ± 0,02		55	1,26 ± 0,07	1,91 ± 0,11
	16	1,01 ± 0,01	1,02 ± 0,02		56	1,29 ± 0,06	1,89 ± 0,13
	17	0,98 ± 0,02	0,96 ± 0,02		57	1,21 ± 0,07	1,94 ± 0,12
	18	0,97 ± 0,03	0,99 ± 0,02		58	1,26 ± 0,07	1,84 ± 0,11
	19	0,94 ± 0,02	1,03 ± 0,03		59	1,29 ± 0,09	1,83 ± 0,11
	20	1,07 ± 0,04	1,00 ± 0,01		60	1,26 ± 0,07	1,87 ± 0,10
⊗			61	1,20 ± 0,07	1,86 ± 0,12		
21	2,42 ± 0,18	2,93 ± 0,20	62	1,22 ± 0,09	1,92 ± 0,13		
22	2,50 ± 0,18	3,54 ± 0,52	63	1,22 ± 0,08	1,92 ± 0,09		
23	1,96 ± 0,15	2,86 ± 0,45	64	1,18 ± 0,06	1,94 ± 0,13		
24	1,76 ± 0,11	2,50 ± 0,33	65	1,27 ± 0,09	1,90 ± 0,12		
25	1,58 ± 0,10	2,40 ± 0,30	66	1,24 ± 0,08	1,98 ± 0,13		
26	1,58 ± 0,10	2,25 ± 0,24	67	1,21 ± 0,10	1,88 ± 0,10		
27	1,57 ± 0,08	2,15 ± 0,21	68	1,25 ± 0,06	1,89 ± 0,13		
28	1,55 ± 0,09	2,09 ± 0,20	69	1,22 ± 0,08	1,90 ± 0,11		
29	1,50 ± 0,10	2,01 ± 0,19	70	1,24 ± 0,06	1,87 ± 0,14		
30	1,44 ± 0,07	1,99 ± 0,16	71	1,25 ± 0,09	1,83 ± 0,14		
31	1,47 ± 0,07	1,97 ± 0,16	72	1,24 ± 0,09	1,84 ± 0,13		
32	1,45 ± 0,07	1,93 ± 0,15	73	1,23 ± 0,08	1,87 ± 0,14		
33	1,46 ± 0,07	2,02 ± 0,12	74	1,23 ± 0,07	1,80 ± 0,15		
34	1,51 ± 0,10	1,94 ± 0,12	75	1,20 ± 0,08	1,82 ± 0,13		
35	1,44 ± 0,05	1,92 ± 0,12	76	1,24 ± 0,06	1,84 ± 0,12		
36	1,37 ± 0,06	1,89 ± 0,12	77	1,22 ± 0,06	1,85 ± 0,15		
37	1,42 ± 0,09	1,94 ± 0,11	78	1,22 ± 0,08	1,85 ± 0,14		
38	1,32 ± 0,07	1,95 ± 0,12	79	1,20 ± 0,08	1,84 ± 0,16		
39	1,37 ± 0,08	1,88 ± 0,11	80	1,19 ± 0,08	1,88 ± 0,17		
40	1,33 ± 0,05	1,95 ± 0,10					

*MW ± SEM des Ausmaßes der relativen Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$  (⊗) (n = je 7 Tiere / Gruppe)*

Sowohl die Kontroll- als auch die Isoflurangruppe zeigen stabile Ausgangswerte mit in etwa konstant großen fEPSPs. Die Stimulation mit 1 \* 100 Hz / 1 s induziert die Zunahme der Größe der fEPSP-Antworten. Die Tiere, die am Vortag einem Narkoseregime unterzogen wurden, reagieren mit größeren fEPSPs als die Kontrollgruppe. Der analysierte Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist mit einem  $p < 0,001$  für die Steigung der fEPSPs signifikant (Tabelle 11, Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Grafische Darstellung der  $MW \pm SEM$  des Ausmaßes der Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus ( $n = je 7 Tiere / Gruppe$ ).

\*  $p < 0,001$

Die Datenanalyse der 40-Minuten-LTP-Werte sowie der 60-Minuten-LTP-Werte der relativen Steigung nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus resultiert in einem statistisch signifikanten Unterschied von  $p < 0,001$  zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Relative Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus**

	Kontrolle	Isofluran	
40-Minuten-LTP-Werte	1,25 ± 0,06	1,87 ± 0,11	*
60-Minuten-LTP-Werte	1,21 ± 0,07	1,84 ± 0,14	*

*MW ± SEM der relativen Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der*

*60-Minuten-LTP-Werte (n = je 7 Tiere / Gruppe) \* p < 0,001*

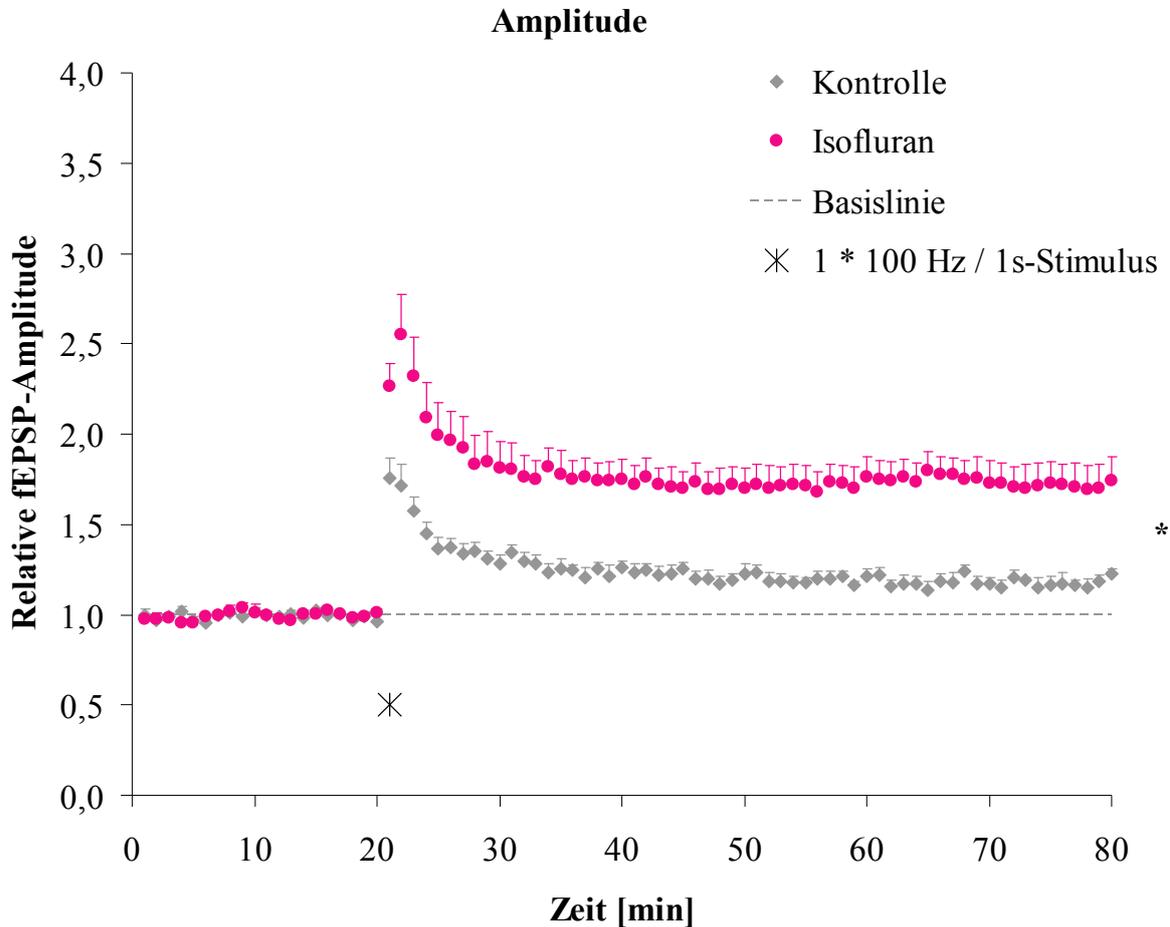
## Messung der Werte der relativen Amplitude

**Tabelle 13: Höhe der relativen Amplitude vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von 1 \* 100 Hz / 1 s**

	Min.	Kontrolle	Isofluran		Min.	Kontrolle	Isofluran
A U S G A N G S W E R T E	1	1.00 ± 0.04	0.98 ± 0.01	L T P	41	1.24 ± 0.04	1.72 ± 0.11
	2	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.04		42	1.25 ± 0.03	1.76 ± 0.10
	3	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.02		43	1.22 ± 0.05	1.72 ± 0.09
	4	1.02 ± 0.03	0.96 ± 0.02		44	1.23 ± 0.05	1.71 ± 0.11
	5	0.97 ± 0.03	0.95 ± 0.02		45	1.26 ± 0.03	1.70 ± 0.09
	6	0.96 ± 0.01	0.99 ± 0.01		46	1.20 ± 0.04	1.73 ± 0.11
	7	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.02		47	1.20 ± 0.05	1.69 ± 0.10
	8	1.01 ± 0.02	1.02 ± 0.03		48	1.17 ± 0.04	1.69 ± 0.12
	9	0.99 ± 0.01	1.04 ± 0.03		49	1.19 ± 0.04	1.72 ± 0.10
	10	1.02 ± 0.02	1.01 ± 0.05		50	1.23 ± 0.05	1.70 ± 0.11
	11	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02		51	1.23 ± 0.04	1.72 ± 0.11
	12	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.01		52	1.19 ± 0.05	1.70 ± 0.12
	13	1.00 ± 0.02	0.97 ± 0.01		53	1.18 ± 0.04	1.71 ± 0.10
	14	0.98 ± 0.03	1.00 ± 0.02		54	1.17 ± 0.04	1.72 ± 0.11
	15	1.02 ± 0.01	1.00 ± 0.01		55	1.18 ± 0.03	1.71 ± 0.11
	16	1.00 ± 0.02	1.02 ± 0.01		56	1.20 ± 0.04	1.68 ± 0.11
	17	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01		57	1.20 ± 0.04	1.73 ± 0.10
	18	0.97 ± 0.02	0.98 ± 0.01		58	1.21 ± 0.03	1.73 ± 0.10
	19	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.02		59	1.16 ± 0.03	1.70 ± 0.12
	20	0.96 ± 0.07	1.01 ± 0.01		60	1.21 ± 0.04	1.76 ± 0.11
⊗			61	1.22 ± 0.04	1.75 ± 0.11		
21	1.76 ± 0.11	2.27 ± 0.13	62	1.16 ± 0.03	1.74 ± 0.11		
22	1.71 ± 0.12	2.55 ± 0.22	63	1.17 ± 0.05	1.76 ± 0.10		
23	1.57 ± 0.08	2.32 ± 0.21	64	1.17 ± 0.04	1.74 ± 0.10		
24	1.45 ± 0.06	2.09 ± 0.20	65	1.14 ± 0.05	1.80 ± 0.11		
25	1.37 ± 0.06	1.99 ± 0.18	66	1.19 ± 0.04	1.78 ± 0.10		
26	1.37 ± 0.05	1.97 ± 0.16	67	1.18 ± 0.05	1.77 ± 0.09		
27	1.34 ± 0.05	1.92 ± 0.17	68	1.24 ± 0.03	1.75 ± 0.10		
28	1.35 ± 0.05	1.84 ± 0.16	69	1.17 ± 0.04	1.76 ± 0.12		
29	1.31 ± 0.04	1.85 ± 0.16	70	1.17 ± 0.04	1.73 ± 0.12		
30	1.28 ± 0.05	1.81 ± 0.15	71	1.15 ± 0.04	1.73 ± 0.11		
31	1.34 ± 0.04	1.80 ± 0.15	72	1.21 ± 0.04	1.70 ± 0.12		
32	1.30 ± 0.05	1.76 ± 0.12	73	1.19 ± 0.02	1.70 ± 0.13		
33	1.28 ± 0.05	1.75 ± 0.11	74	1.15 ± 0.06	1.71 ± 0.13		
34	1.23 ± 0.05	1.82 ± 0.11	75	1.16 ± 0.05	1.73 ± 0.12		
35	1.26 ± 0.05	1.78 ± 0.13	76	1.17 ± 0.06	1.72 ± 0.11		
36	1.25 ± 0.03	1.75 ± 0.10	77	1.16 ± 0.03	1.71 ± 0.13		
37	1.20 ± 0.06	1.77 ± 0.10	78	1.15 ± 0.05	1.69 ± 0.13		
38	1.26 ± 0.03	1.74 ± 0.09	79	1.18 ± 0.03	1.70 ± 0.13		
39	1.21 ± 0.06	1.74 ± 0.10	80	1.23 ± 0.03	1.74 ± 0.13		
40	1.26 ± 0.03	1.75 ± 0.11					

*MW ± SEM der relativen Amplitudenhöhe der fEPSPs beider Gruppen, vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von 1 \* 100 Hz / 1 s (⊗) (n = je 7 Tiere / Gruppe).*

Der Unterschied in Bezug auf das Ausmaß der LTP-Antwort zwischen den Kontroll- und den am Vortag narkotisierten Tieren ist mit einem  $p < 0,001$  für die Antwortamplitude signifikant (Tabelle 13; Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Grafische Darstellung der  $MW \pm SEM$  der relativen Amplitudenhöhe der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus ( $n = je 7 Tiere / Gruppe$ ).

\*  $p < 0,001$

Die Datenanalyse der 40-Minuten-LTP-Werte sowie der 60-Minuten-LTP-Werte der relativen Amplitude nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus resultiert in einem statistisch signifikanten Unterschied von  $p < 0,001$  zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Relative Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus**

	Kontrolle	Isofluran
40-Minuten-LTP-Werte	1,19 ± 0,03	1,72 ± 0,11 *
60-Minuten-LTP-Werte	1,18 ± 0,03	1,71 ± 0,13 *

*MW ± SEM der relativen Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte (n = je 7 Tiere / Gruppe) \* p < 0,001*

### 3.5.2 Werte der Western-Blot Analyse

In den nachfolgenden Tabellen und Balkendiagrammen sind Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SEM) der relativen Rezeptorexpression der jeweiligen Rezeptoren in den analysierten Gehirnarealen dargestellt. Die Ausgangswerte der Kontrollgruppe wurden auf den Wert 100 normalisiert.

## NR2A-Rezeptor

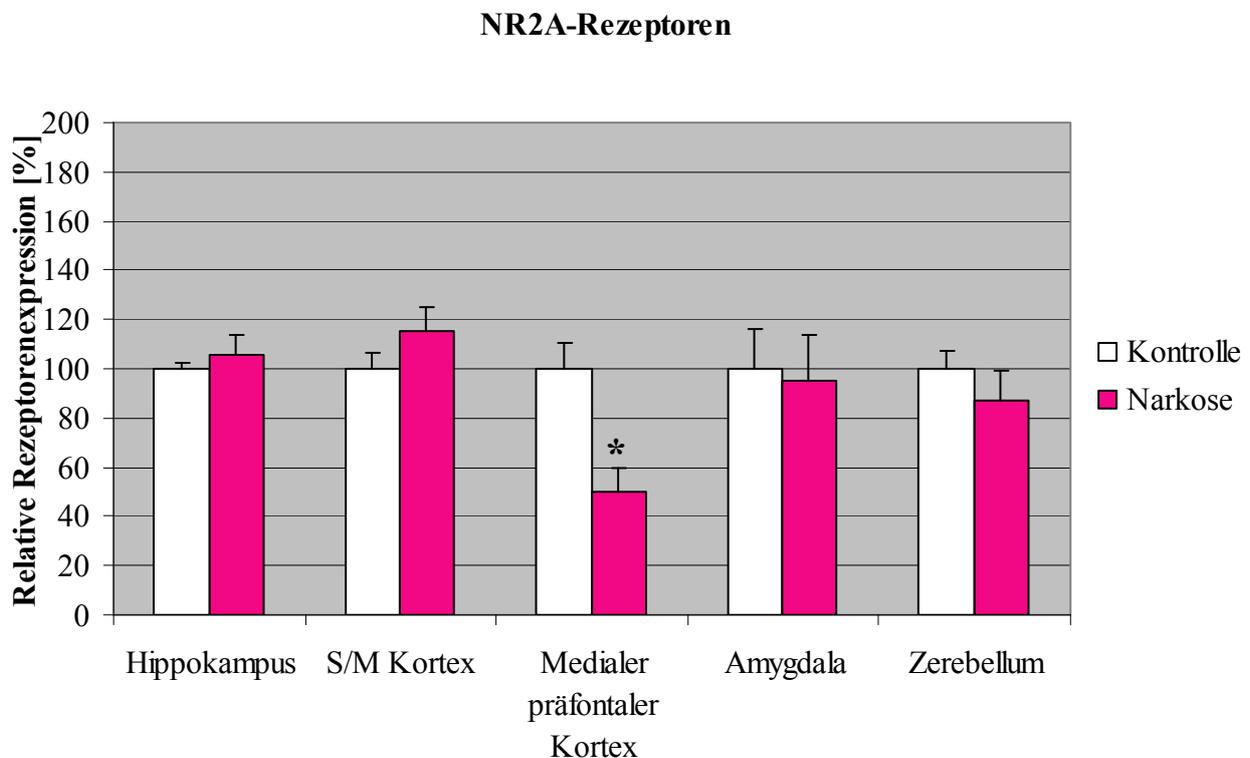
In den analysierten Gehirnregionen besteht, mit Ausnahme des mPFC, in Bezug auf die relative Expression des NR2A-Rezeptorsubtyps kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Im mPFC wurde eine signifikant ( $p = 0,013$ ) niedrigere Expression der NR2A-Rezeptoruntereinheit der Isofluran- versus der Kontrollgruppe ( $n = je 6 Tiere / Gruppe$ ) bestimmt (Tabelle 15, Abbildung 20 und 21).

**Tabelle 15: Relative NR2A-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen**

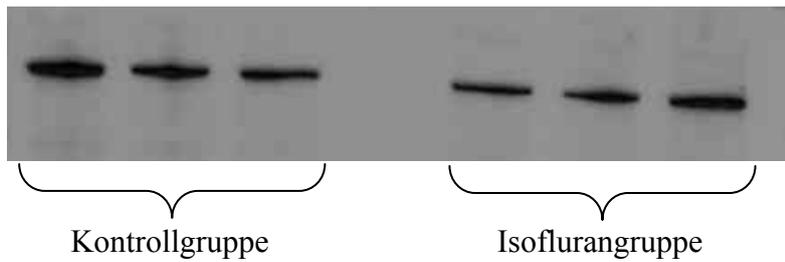
	Region	Kontrolle		Isofluran	
NR2A- Rezeptor	Hippokampus	100,0 ±	2,7	106,0 ±	7,7
	Kortex	100,0 ±	6,6	115,0 ±	9,8
	mPFC	100,0 ±	10,1	50,0 ±	10,0 *
	Amygdala	100,0 ±	15,9	95,0 ±	18,9
	Zerebellum	100,0 ±	7,0	87,0 ±	12,0

*MW ± SEM der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen*

*(n = je 6 Tiere / Gruppe) \* p < 0,05*



**Abbildung 20: MW ± SEM der relativen NR2A-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen (n = je 6 Tiere / Gruppe). \* p < 0,05**



**Abbildung 21: Illustration der spezifischen Proteinbanden des NR2A-Rezeptorsubtyps im medialen präfrontalen Kortex nach der Western-Blot Analyse. Die geschweiften Klammern markieren die Kontrollgruppe respektive die Isoflurangruppe (n = je 6 Tiere / Gruppe).**

### **NR2B-Rezeptor**

Die Analyse der Werte der am Vortag mit Isofluran narkotisierten Tiere zeigt eine selektive Hochregulation der NR2B-Rezeptoruntereinheit im Bereich des Hippokampus auf. Der Unterschied zur Kontrollgruppe (n = je 6 Tiere / Gruppe) ist mit  $p = 0,014$  signifikant (Tabelle 16, Abbildung 22 und 23).

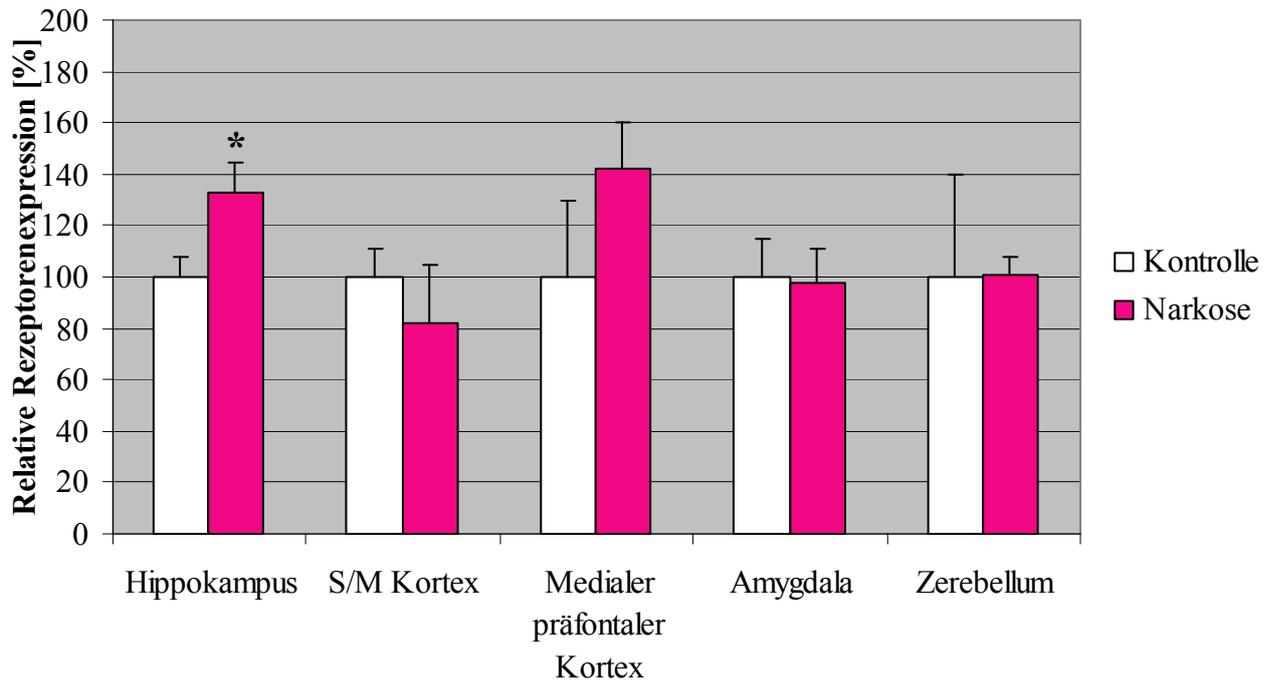
**Tabelle 16: Relative NR2B-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnavenen**

	Region	Kontrolle		Isofluran	
NR2B-Rezeptor	Hippokampus	100,0 ±	7,7	133,1 ±	11,0 *
	Kortex	100,0 ±	11,2	82,0 ±	23
	mPFC	100,0 ±	29,7	142,0 ±	18
	Amygdala	100,0 ±	14,9	98,0 ±	12,6
	Zerebellum	100,0 ±	39,7	100,4 ±	7,6

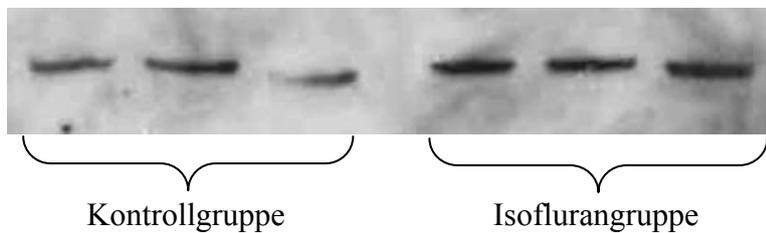
*MW ± SEM der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnavenen*

*(n = je 6 Tiere / Gruppe) \*  $p < 0,05$*

### NR2B-Rezeptoren



**Abbildung 22:** *MW ± SEM der relativen NR2B-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen (n = je 6 Tiere / Gruppe). \* p < 0,05*



**Abbildung 23:** *Illustration der spezifischen Proteinbanden des NR2B-Rezeptorsubtyps im Hippokampus nach der Western-Blot Analyse. Die geschweiften Klammern markieren die Kontrollgruppe respektive die Isoflurangruppe (n = je 6 Tiere / Gruppe).*

## GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptoruntereinheit

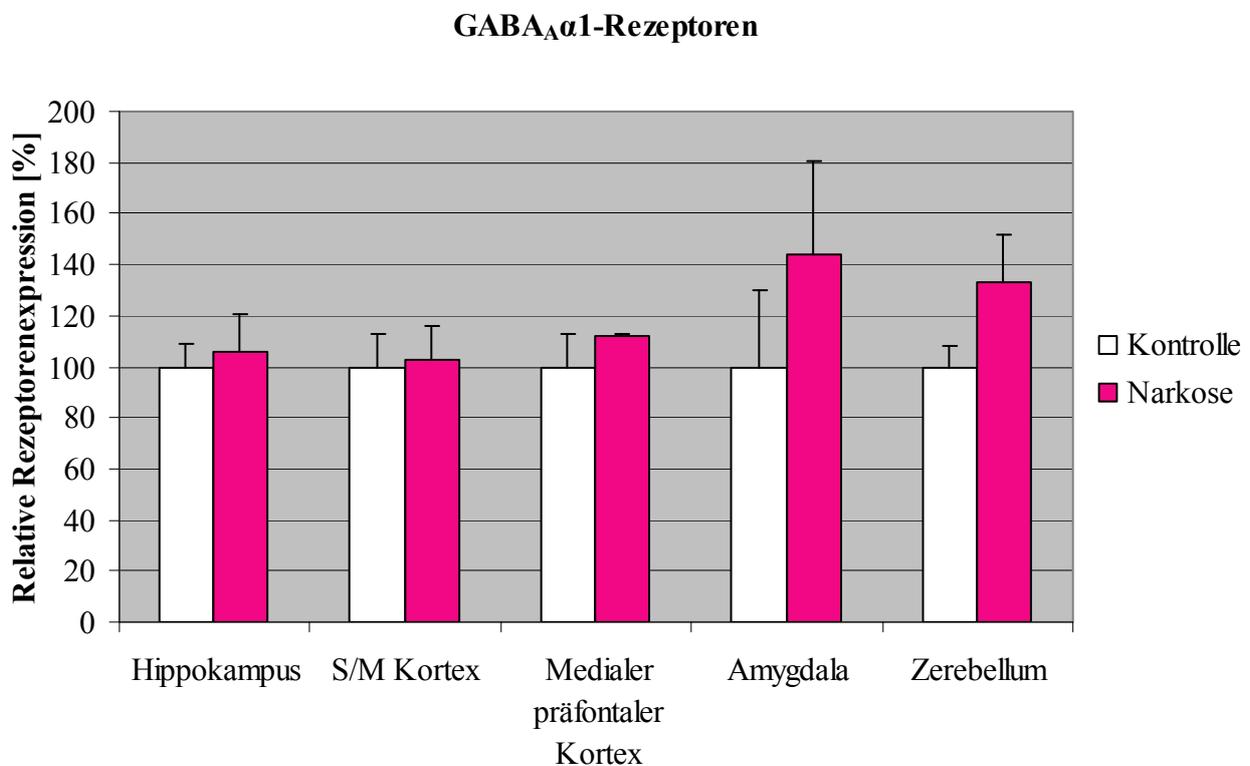
Die Auswertung der Analyseergebnisse der relativen Expression des GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptors in den verschiedenen Gehirnregionen resultiert in keinen signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen (n = je 6 Tiere / Gruppe) (Tabelle 17, Abbildung 24).

**Tabelle 17: Relative GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen**

	Region	Kontrolle		Isofluran	
GABA <sub>A</sub> α1- Rezeptor	Hippokampus	100,0 ±	9,0	105,8 ±	15,1
	Kortex	100,0 ±	13,0	103,0 ±	12,7
	mPFC	100,0 ±	13,2	112,0 ±	1,0
	Amygdala	100,0 ±	29,7	144,0 ±	36,2
	Zerebellum	100,0 ±	8,0	133,0 ±	19,0

*MW ± SEM der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen*

*(n = je 6 Tiere / Gruppe)*



**Abbildung 24: MW ± SEM der relativen GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen (n = je 6 Tiere / Gruppe).**

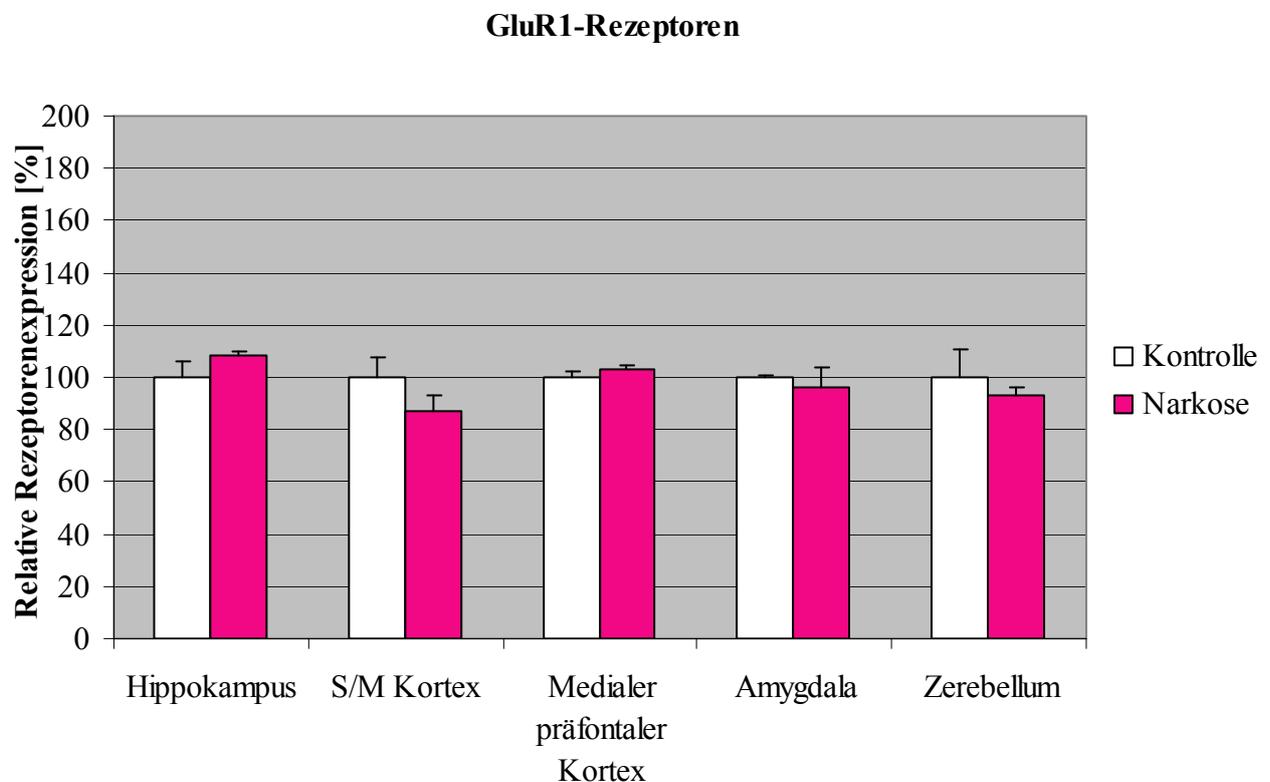
## GluR1-Rezeptor

Ein statistisch relevanter Unterschied in Bezug auf die Regulation der GluR1-Rezeptoruntereinheit besteht zwischen der Isoflurangruppe und den Kontrolltieren nicht ( $n =$  je 6 Tiere / Gruppe) (Tabelle 18, Abbildung 25).

**Tabelle 18: Relative GluR1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen**

	Region	Kontrolle		Isofluran	
GluR1- Rezeptor	Hippokampus	100,0 ±	5,8	108,2 ±	1,7
	Kortex	100,0 ±	7,4	87,0 ±	5,8
	mPfc	100,0 ±	2,2	103,0 ±	1,2
	Amygdala	100,0 ±	0,5	96,0 ±	7,6
	Zerebellum	100,0 ±	11,0	93,0 ±	3,0

*MW ± SEM der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen*  
( $n =$  je 6 Tiere / Gruppe)



**Abbildung 25: MW ± SEM der relativen GluR1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen ( $n =$  je 6 Tiere / Gruppe).**

## GluR6/7-Rezeptor

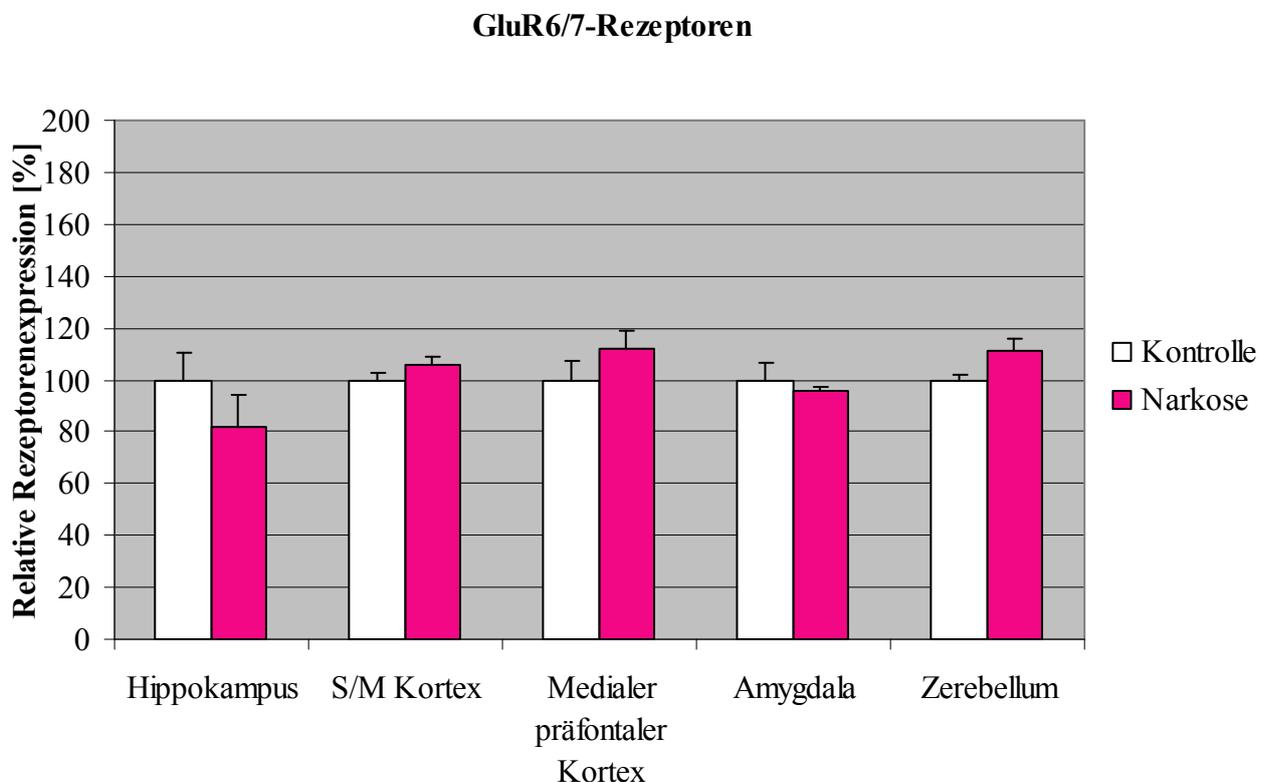
Es kann kein signifikanter Unterschied bezüglich der Regulation der Rezeptoruntereinheit GluR6/7 in den verschiedenen Gehirnarealen, zwischen den im Vorfeld anästhesierten und den naiven Tieren verifiziert werden ( $n = \text{je } 6 \text{ Tiere / Gruppe}$ ) (Tabelle 19, Abbildung 26).

**Tabelle 19: Relative GluR6/7-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen**

	Region	Kontrolle		Isofluran	
GluR6/7-Rezeptor	Hippokampus	100,0 ±	10,1	81,5 ±	12,5
	Kortex	100,0 ±	2,6	106,0 ±	3,0
	mPfc	100,0 ±	7,0	112,0 ±	6,6
	Amygdala	100,0 ±	6,9	96,0 ±	1,3
	Zerebellum	100,0 ±	2,0	111,0 ±	5,0

*MW ± SEM der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen*

*(n = je 6 Tiere / Gruppe)*



**Abbildung 26: MW ± SEM der relativen GluR6/7-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen (n = je 6 Tiere / Gruppe).**

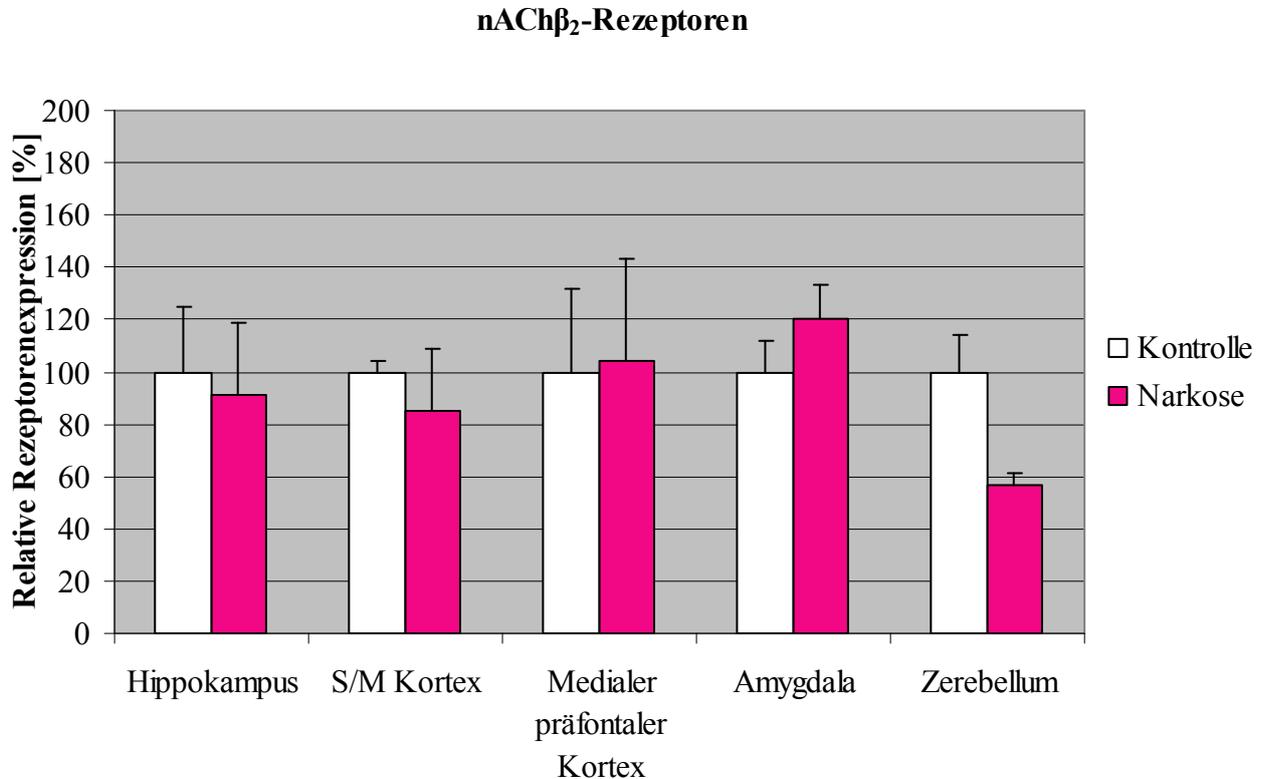
## nACh $\beta_2$ -Rezeptor

Die Auswertung der Messergebnisse der Western-Blot Analyse resultiert in einem statistisch nicht signifikanten Unterschied für die relative Rezeptorexpression der nACh $\beta_2$ -Rezeptoruntereinheit in allen analysierten Gehirnarealen ( $n =$  je 6 Tiere / Gruppe) (Tabelle 20, Abbildung 27).

**Tabelle 20: Relative nACh $\beta_2$  Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen**

	Region	Kontrolle		Isofluran	
nACh $\beta_2$ - Rezeptor	Hippokampus	100,0	$\pm 24,7$	91,4	$\pm 27,6$
	Kortex	100,0	$\pm 4,1$	85,0	$\pm 24,0$
	mPFC	100,0	$\pm 31,8$	104,0	$\pm 39,2$
	Amygdala	100,0	$\pm 11,7$	120,0	$\pm 13,4$
	Zerebellum	100,0	$\pm 14,0$	57,0	$\pm 4,0$

*MW  $\pm$  SEM der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen  
( $n =$  je 6 Tiere / Gruppe)*



**Abbildung 27: MW  $\pm$  SEM der relativen nACh $\beta_2$ -Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen ( $n =$  je 6 Tiere / Gruppe).**

### 3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Theta-Burst Stimulation und der  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus katalysieren eine Induktion der LTP. Es existiert jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe in Bezug auf die LTP-Expression. Im Rahmen der extrazellulären elektrophysiologischen Untersuchung ist nur das Induktionsparadigma des  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus geeignet, um ein persistentes LTP-Niveau zu etablieren, und gleichzeitig die Erhöhung des LTP-Levels der Isofluran- versus der Kontrollgruppe zu detektieren. Die Analyseergebnisse dieses Reizmusters sind sowohl für die relative Amplitude als auch für die relative Steigung mit  $p < 0,001$  signifikant.

24 Stunden nach einer Isofluran-Narkose beziehungsweise „Schein-Narkose“ können mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens Modifikationen der relativen Rezeptorexpression in verschiedenen Arealen des Gehirns untersucht werden. Die Analysen der Werte der Isofluran- und Kontrollgruppe belegen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, in Bezug auf die relative Rezeptorexpression in den für die kognitiven Prozesse besonders relevanten Gehirnregionen, nur im Hippokampus sowie dem medialen präfrontalem Kortex eruiert werden kann. Die Auswertung der Daten der am Vortag mit Isofluran anästhesierten Mäuse zeigt eine selektive Hochregulation der NR2B-Untereinheit im Bereich des Hippokampus. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit  $p = 0,014$  signifikant. In der Region des medialen präfrontalen Kortex ist eine signifikant niedrigere Expression ( $p = 0,013$ ) des NR2A-Rezeptors der Isofluran- versus der Kontrollgruppe bestimmt worden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### Allgemein

In der eigenen Studie ist erstmals der Einfluss einer Isofluran-Narkose auf die neuronalen Netzwerke 24 Stunden nach der Anästhesie analysiert worden. Das Narkoseregime, die extrazellulären elektrophysiologischen Untersuchungen an Gehirnschnitten von Mäusen, sowie das Western-Blot Verfahren sind in der eigenen Arbeitsgruppe etablierte und erfolgreich angewendete Analysemethoden und daher geeignet, die genannten Zielvorstellungen zu realisieren. Der Analysezeitpunkt 24 Stunden nach der Narkose ist festgelegt worden, um die Auswirkungen des volatilen Anästhetikums Isofluran auf die LTP-Induktion und Expression über die „akute Phase“ hinaus zu analysieren. Ferner impliziert dieser Zeitraum eine klinische Relevanz, da in der anästhesiologischen Intensivmedizin der Zeitpunkt 24 Stunden nach der Narkose und der Operation gewählt wird, um mit der Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit der Patienten mit Hilfe von spezifischen Tests wie dem „concept shifting“-Test zu beginnen.

#### **4.1.1 Narkosemanagement**

Alle in dieser Studie verwendeten Tiere werden vor der Schein- beziehungsweise Isofluran-Narkose möglichst den gleichen Stressfaktoren, wie Ortswechsel, Manipulation durch den Untersucher und Umsetzen in die Narkosekammer, im Falle der „scheinnarkotisierten“ Tiere in Einheit mit dem Käfig, ausgesetzt. Durch diese Prozedere soll gewährleistet werden, dass ähnliche Rahmenbedingungen für beide Tiergruppen geschaffen werden, und eine mögliche Divergenz der Analyseergebnisse zwischen den beiden Gruppen maßgeblich auf einer Beeinflussung durch das Anästhetikum basiert. Auf eine Überwachung der Vitalparameter (Temperaturkontrolle, Atem- und Herzfrequenz) ist im Falle der „scheinnarkotisierten“ Tiere verzichtet worden. Die Temperatursonde sowie das EKG-Gerät würden von den vitalen Mäusen nicht toleriert werden. Eine adspektorische Kontrolle der Atemfrequenz war nur eingeschränkt möglich, da die Tiere mitsamt ihrem Käfig in die Narkosekammer verbracht

worden sind, um die Stressexposition zu minimieren.

Eine Kontrolle der Vitalfunktionen der anästhesierten Mäuse ist hingegen während der gesamten Narkose essenziell. Die Temperaturkontrolle nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da die Mäuse aufgrund der hohen Metabolisierungsrate und der großen Körperoberfläche im Verhältnis zum geringen Gewicht für Narkose bedingte Komplikationen, wie zum Beispiel Hypothermie prädestiniert sind. Die in diesem Versuch verwendete Rektalsonde ist eine etablierte Methode zur Messung der Körpertemperatur bei diesen Tieren. Ebenso ist die Analyse der Herzfrequenz mithilfe eines entsprechenden EKG-Gerätes ein gängiges und etabliertes Verfahren zur Überwachung des Narkoseregimes (RAO und VERKMAN, 2000). Die Versuchstiere atmen während der gesamten Narkose spontan über eine Nasenkammer ein Isofluran-Luft / Sauerstoffgemisch ( $FiO_2 = 0,5$ ). Die Atemfrequenz liegt im Mittel bei 103 / min und demnach trotz der pulmonal depressiven Wirkung des Anästhetikums innerhalb der physiologischen Grenzen (Atemfrequenz: 84 bis 230 / min). Eine nicht invasive Narkosetechnik, die selbst bei neonatalen Mäusen eingesetzt werden kann, ist die Narkose mit einer speziell angefertigten Atemmaske (DAZERT et al., 2000). In der eigenen Arbeitsgruppe ist jedoch die Aufrechterhaltung der Anästhesie über ein Nasenkammersystem eine etablierte Methode, und bietet durch die erhöhte Dichtigkeit des Systems gegenüber der Maskeninhalation den Vorteil einer reduzierten Belastung des Untersuchers durch austretendes Narkosegasgemisch. Die Mäuse sind mit 1,5 bis 1,7 Vol.-% Isofluran betäubt, was einem MAC-Wert von 1 entspricht. Der MAC-Wert von 1 ist gewählt worden, um eine adäquate Narkosetiefe zu gewährleisten. Eine flachere Anästhesie könnte Stressreaktionen bei den Tieren induzieren und die LTP-Expression beeinflussen. Eine Erhöhung der Isoflurankonzentration über den in der eigenen Studie gewählten MAC-Wert hinaus würde in einem erhöhten Risiko des Auftretens einer kardio-pulmonalen Depression sowie Hypoxie und Hyperkapnie resultieren. Die Kontrolle der Atemfrequenz ist essenziell, wird in diesem Versuch aber rein adspektorisch vorgenommen. Auf invasive Intubationsmaßnahmen ist verzichtet worden. Die Intubation würde zwar eine kontrollierte Beatmung der Tiere ermöglichen, aber von den Mäusen, die nur mit 1 MAC Isofluran betäubt worden sind, als reizend bis schmerzhaft empfunden werden, und Abwehrbewegungen provozieren. Es gilt als erwiesen, dass Schmerzreize und Aversionen die LTP-Expression und damit die kognitiven Leistungen beeinflussen können. Die zusätzliche Applikation eines Analgetikums ist obsolet, da eine Beeinflussung der synaptischen neuronalen Transmission durch das Schmerzmittel nicht ausgeschlossen werden könnte. In dieser Studie ist während des gesamten Narkoseregimes auch auf invasive Techniken, wie zum Beispiel Blutgasanalysen, verzichtet

worden. Die in dieser Studie gewählte Narkosegaskonzentration von 1 MAC Isofluran ist nicht geeignet zu gewährleisten, dass bei allen Versuchstieren eine für invasive Techniken ausreichende Narkosetiefe erzielt, und damit zweifelsfrei sichergestellt werden kann, dass bei allen Nagern die Blutentnahme absolut ohne Schmerzreize durchführbar ist. Eine nicht invasive Möglichkeit zur Detektion der Blutgase ist die Verwendung eines Pulsoxymeters, das auch bei Mäusen eingesetzt werden kann, aber in dieser Studie nicht verwendet worden ist. Der in der eigenen Untersuchung genutzte Inzuchtstamm C57BL/6 eignet sich aufgrund der starken Pigmentierung der Haut nicht für die Detektion der Sauerstoffsättigung mithilfe des Pulsoxymeters. Es sind bislang keine standardisierten Verfahren zur direkten Sauerstoffmessung im Gehirn bei Mäusen etabliert worden.

#### **4.1.2 Extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen**

Das in dieser Untersuchung angewandte Verfahren der Organentnahme und Präparation der Gewebeproben ermöglicht es, die Hippokampusschnitte in einer artifiziellen Umgebung zu untersuchen, die eng mit der Situation *in vivo* korreliert, da die fortwährende Begasung mit Carbogen und der kontinuierliche Fluss von ACSF die *in situ* Verhältnisse nachahmt. Initialstudien haben den Beweis erbracht, dass Variationen in Bezug auf den Modus der Sektionsmethode (Vibratom versus Gewebescheider) keinen Einfluss auf die elektrophysiologische Stabilität besitzen (WATSON et al., 1997). Die fortwährende Kühlung der ACSF mit Eiswasser während der Gehirnpräparation ist zwar eine etablierte Methode, wird jedoch, insbesondere in Bezug auf die Modifikationen der morphologischen Strukturen, kontrovers diskutiert. Aktuelle Studien zeigen, dass eine Präparation der Hippokampusschnitte bei Raumtemperatur (25 °C) die Ultrastruktur und die Dichte der Synapsen nahezu konserviert. Demzufolge eignet sich eine Herstellung von *in vitro* Gewebeproben bei Raumtemperatur besonders, um Veränderungen von Anzahl und Morphologie der Synapsen in nachfolgenden elektrophysiologischen Experimenten zu detektieren (BOURNE et al., 2007). Die entscheidenden Vorteile der Manipulation der Schnitte in eiskalter ACSF bestehen jedoch in einer Verlangsamung des zellulären Metabolismus und einer bedeutenden Minimierung der neuronalen Störung während der Gehirnpräparation (NEWMAN et al., 1992). Die Wahrscheinlichkeit, dass die in eisgekühlter ACSF gewonnenen Präparate im nachfolgenden Experiment auf einen definierten Stimulus mit der Ausbildung der LTP reagieren, ist demzufolge im Vergleich zu dem von BOURNE et al. (2007) beschriebenen Verfahren erhöht.

Die Detektion von extrazellulären elektrophysiologischen Strömen ist äußerst störanfällig. Insbesondere Einflüsse von äußeren elektrischen Feldern sind in der Lage die Funktionalität der Messinstrumente zu beeinträchtigen. Eine Ummantelung der elektrischen Leiter mit einer dünnen metallischen Folie aus Aluminium und eine Abschirmung des Messplatzes mit einem Faraday-Käfig ermöglichen es, die Versuchsapparatur weitgehend vor äußeren elektrischen Feldern und elektromagnetischen Wellen abzuschirmen. Ein weiterer Nachteil des Analyseverfahrens der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitung im Vergleich zu anderen Techniken ist die geringere Auflösung der gemessenen Signale gegenüber dem so genannten Grundrauschen. Dies entsteht durch Schwankungen des Leckstromes, der vor allem durch den Spalt zwischen Pipette und Zellmembran fließt. Die Notwendigkeit der Minimierung des „Rauschens“ ist jedoch vorwiegend für die Detektion sehr kleiner Ströme relevant. Im Rahmen der vorliegenden Studie ist dieser Nachteil der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitung von nicht allzu großer Bedeutung, da die gemessenen Werte aus synchronisierten Entladungen von mehreren Nervenzellen resultieren, und eine Potenzierung der Stromantwort bedingen. Des Weiteren wird die Ausbildung des Grundrauschens durch die Verwendung eines schwingungsgedämpften Tisches, auf dem die Versuchsapparatur aufgebaut ist, minimiert.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sind insgesamt drei verschiedene etablierte Reizmuster (TBS,  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus,  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus) getestet worden, um zu analysieren, welche Reizintensität am besten geeignet ist, potenziell persistente Unterschiede des LTP-Niveaus zwischen den Tieren, die am Vortag einem Narkoseregime unterzogen worden sind, und der Kontrollgruppe zu detektieren.

In dieser Studie sind alle *in vitro* Versuche mit konventionellen Glasmikroelektroden und Stimulationselektroden aus Wolframdraht durchgeführt worden. Die Entwicklung neuer dreidimensionaler „Multi-Elektroden“ Anordnungen (3D-MEAs) ermöglicht prinzipiell die Detektion von elektrischen Signalen ausgehend von verschiedenen Messpunkten und tieferen Regionen des Hippokampusschnittes als mit der herkömmlichen Versuchsanordnung. Die Ergebnisse dieses neuen Analyseverfahrens variieren jedoch in Bezug auf die grundlegenden Elemente der LTP-Induktion und Expression nur geringfügig gegenüber dem etabliertem Verfahren (KOPANITSA et al., 2006). Bei der vorliegenden Fragestellung besteht kein signifikanter Vorteil der 3D-MEA-Analysemethode gegenüber dem in dieser Studie angewandtem Verfahren.

### **4.1.3 Western-Blot Analyse**

Die Western-Blot Analyse ist ein etabliertes Verfahren zur Identifikation und semiquantitativen Analyse bestimmter Proteine in komplexen Proteingemischen. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, wird zum einen von jeder Probe die gleiche Menge an Protein in die Geltasche pipettiert (25µg), zum anderen trägt man Proben der Kontroll- sowie der Isoflurangruppe in gleicher Zahl auf ein gemeinsames Gel auf. Um die Spezifität des Primärantikörpers zu kontrollieren, werden Positivkontrollen zu den gesuchten Proteinen mit aufgetragen. Die Quantifizierung der Banden erfolgt in der vorliegenden Studie nach Exposition der Membranen und Entwickeln des Röntgenfilms mit Hilfe eines Computerprogramms (Quantity One<sup>®</sup>, Bio-Rad, München). Dieses Verfahren ist im eigenen Labor etabliert und bereits in anderen Studien erfolgreich eingesetzt worden. Der Längenstandard (Bio-Rad Precision Plus<sup>®</sup>, Bio-Rad, München) dient bei diesem Verfahren als Referenz.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Parameter der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen**

In der vorliegenden Studie ist eine spontane neuronale Aktivität auf einem vergleichbaren Niveau und einem stabilen Entladungsverhalten für 20 Minuten sowohl bei der Isofluran- als auch bei der Kontrollgruppe gemessen worden. Dies lässt Rückschlüsse auf die Vitalität des Gehirnschnittes, eine korrekte Position der Elektroden und eine geringe Varianz der Anzahl der afferenten Fasern, die durch die Präparation zerstört worden sind, zu. Die in der Literatur beschriebene rasche An- und Abflutung und die geringe Metabolisierungsrate < 0,2 % des volatilen Anästhetikums Isofluran (STEFFEY, 1997), werden durch die Ergebnisse der eigenen Studie verifiziert, da der Grundumsatz der neuronalen Zellen 24 Stunden nach der Isofluran-Narkose offensichtlich nicht beeinflusst wird. Die stabilen Ausgangswerte bilden eine solide Grundlage für die Vergleichbarkeit der Werte dieser beiden Gruppen nach einer Theta-Burst Stimulation beziehungsweise nach einem Stimulus von 2 \* 100 Hz / 1 s und 1 \* 100 Hz / 1 s. Die Beeinflussung des artifiziellen neuronalen Netzwerkes durch einen elektrischen Stimulus mit den drei Reizintensitäten TBS, 2 \* 100 Hz / 1 s und 1 \* 100 Hz / 1 s induziert bei beiden Versuchsgruppen die Auslösung der LTP.

Die Induktionsparadigmen TBS und  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$  führen nicht zu einem signifikanten Unterschied bezüglich des LTP-Niveaus der Kontrollgruppe versus der Isoflurangruppe. Die Ursachen für diese Analyseergebnisse sind nicht eindeutig geklärt. Die TBS mit dem in der vorliegenden Studie angewandtem Stimulationsprotokoll (7 aufeinander folgende Viererreize von 100 Hz mit einem Interstimulusintervall von jeweils 200 ms) ist vermutlich zu schwach, als dass ein persistentes LTP detektiert werden könnte, welches über das lokale dendritische Kompartiment hinausgeht. Im Rahmen der Versuchsreihe, die mit dem starken, hochfrequenten  $2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus durchgeführt worden ist, ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied des LTP-Levels zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe detektiert worden. Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch die wiederholte hochfrequente Reizung das LTP-Niveau gesättigt worden ist. Die moderate Reizstärke des Stimulationsparadigma des  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus induziert hingegen einerseits ein persistentes LTP-Level und ist andererseits geeignet das signifikant höhere LTP-Niveau der Isoflurangruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu detektieren. Diese Steigerung der LTP-Antwort nach dem  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus ist kontrovers zu den Auswertungen von SIMON et al. (2001), die ebenfalls den Einfluss von Isofluran auf die synaptische Plastizität analysieren, und eine Hemmung der LTP-Induktion durch Isofluran konstatieren. Die Divergenz der Ergebnisse der beiden Studien, liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Wahl der Methodik begründet. In der eigenen Arbeit wurden die Tiere anästhesiert und 24 Stunden später die potenziellen Isofluraneffekte auf das LTP-Niveau analysiert. Die Ergebnisse der bislang veröffentlichten in vitro Studien, welche die Korrelation zwischen der Wirkung von Isofluran (SIMON et al., 2001) beziehungsweise Methoxyfluran und Halothan (MAC IVER et al., 1989) und der Ausbildung der LTP thematisieren, basieren auf einer sukzessiven Zugabe einer bestimmten Konzentration der volatilen Anästhetika zu dem Perfusionssystem. Dieses Verfahren ist jedoch nur geeignet, die unmittelbare Wirkung von Isofluran auf die synaptische Plastizität zu untersuchen. Die Tötung der Mäuse 24 Stunden nach der Anästhesie ermöglicht es hingegen, Modifikationen der Induktion und Aufrechterhaltung der LTP durch die Wirkung des volatilen Anästhetikums Isofluran über die „akute Phase“ hinaus zu analysieren und zu untersuchen, welche Langzeiteffekte Isofluran auf das ZNS besitzt.

Eine potenzielle Ursache für das höhere LTP-Niveau der am Vortag narkotisierten Tiere ist eine durch Isofluran katalysierte Variation der Genexpression. Das volatile Anästhetikum induziert im Gehirn von Nagern 30 Minuten nach Einleitung der Anästhesie eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von c-Fos (HAMAYA et al., 2000). C-Fos zählt zu den so

genannten „immediate-early genes“ (IEGs). Eine potenzierte Expression dieser Gene resultiert unter anderem in einem Anstieg der Transkriptionsaktivität und der Neusynthese von Proteinen, die essenziell für die dauerhafte Änderung der neuronalen Plastizität sind. Aktuelle Studien an Hippokampusschnitten von Ratten belegen, dass Variationen der Genexpression nach einer Isofluran-Narkose auch noch 48 Stunden nach der Anästhesie der Tiere nachgewiesen werden können (CULLEY et al., 2006). Möglicherweise besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen dem gesteigerten LTP-Niveau der Mäuse 24 Stunden nach der Narkose und einer erhöhten Expression von c-Fos sowie weiterer IEGs wie beispielsweise jun-B oder auch zif/268.

Entsprechend der Versuchskonzeption werden die Mäuse, welche für die „Schein-Anästhesie“ vorgesehen sind, in Einheit mit ihrem Käfig für den Zeitraum von zwei Stunden in die Narkosekammer eingesetzt und auf weitere Manipulationen verzichtet, um den Stress für die Tiere möglichst zu minimieren. Demzufolge korreliert die zweistündige Isofluran-Anästhesie vermutlich mit einem erhöhten Stress-Niveau für die Isoflurangruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es wird postuliert, dass Stress-Belastungen in einer Aktivierung von Enzymkaskaden resultieren, die auch für die Induktion der LTP essenziell sind. Die molekularbiologischen Grundlagen für dieses Phänomen sind nicht eindeutig geklärt und werden kontrovers diskutiert. Man vermutet, dass ein akuter Stress-Stimulus den Level des zirkulierenden Kortikosterons erhöht und zu einer Aktivierung spezifischer Glukokortikoid-Rezeptoren führt. Dies wiederum erhöht die Synthese und Freisetzung des BDNF. BDNF interagiert mit dem Protein-Tyrosin-KinaseB-Rezeptor resultierend in einer Aktivierung der ERK1/2 MAPK Signalkaskade. Im Falle einer anhaltenden Stress-induzierten Aktivierung der ERK1/2 MAPK beeinträchtigt diese die LTP-Induktion (YANG et al., 2004). Aber gemäß einer in vitro Studie an Hippokampusschnitten von Mäusen ist die LTP-Expression 24 Stunden nach einer akuten Stress-Belastung nur noch geringradig reduziert (GARCIA et al., 1997). Des Weiteren ist die Stress-Belastung für die narkotisierten Tiere in der eigenen Studie akut sowie transient. Ein Verzicht auf invasive Techniken, wie zum Beispiel Intubationsmaßnahmen und Blutgasanalysen, ermöglicht es, den Stress für die narkotisierten Mäuse signifikant zu reduzieren. Das Stress-Niveau der anästhesierten Tiere ist vermutlich im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur geringradig potenziert und resultiert 24 Stunden nach der Stress-Exposition wahrscheinlich nicht in einer Hemmung der LTP-Induktion sowie Expression und demzufolge in keiner negativen Beeinflussung der kognitiven Funktionen.

Die Parameter Alter und Geschlecht können ebenfalls Einfluss auf die LTP-Expression nehmen. In dieser Studie sind jedoch in der Kontroll- und Isoflurangruppe Tiere gleichen Alters und Geschlechts getestet worden, demzufolge sind diese Faktoren nicht für die divergierende LTP-Expression zwischen den beiden Gruppen relevant. Prinzipiell können weitere Mechanismen als Ursache für das gesteigerte LTP-Niveau bei den am Vortag anästhesierten Tieren nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.2.2 Parameter der Western-Blot Analyse**

##### Relative Expression der NR2A-Rezeptoruntereinheit und des NR2B-Rezeptorsubtyps

Die Bedeutung der NMDA-Rezeptorsubtypen NR2A und NR2B im Hippokampus von naiven Tieren in Bezug auf die Induktion und Aufrechterhaltung der LTP wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass ohne pharmakologische Intervention sowohl die NR2A- als auch die NR2B-Rezeptoruntereinheit an der Expression der LTP im Hippokampus beteiligt ist (BARTLETT et al., 2007; BERBERICH et al., 2007). In der eigenen Studie hingegen ist eruiert worden, dass die relative Expression der hippokampalen NR2A-Rezeptoruntereinheit der Isofluran- versus der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht ist. Dieses Analyseergebnis ist ein Hinweis darauf, dass der NR2A-Subtyp in der hippokampalen Region eine geringfügigere Bedeutung für die verstärkte neuronale Transmission 24 Stunden nach der Narkose als die NR2B-Rezeptoruntereinheit zu besitzen scheint. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Analyseergebnis auf den Messzeitraum, 24 Stunden nach dem Narkoseregime mit Isofluran, beschränkt und für eine langfristige Variation der kognitiven Fähigkeiten nicht maßgeblich ist.

In vitro Studien an Zellkulturen kortikaler Neurone von Nagern zeigen, dass die NR2B-Rezeptoruntereinheit deutlich sensitiver auf die akuten durch Isofluran vermittelten Effekte reagiert als der NR2A-Rezeptorsubtyp (MING et al., 2002). Diese potenzierte Sensitivität der NR2B-Rezeptoruntereinheit gegenüber Isofluran ist vermutlich über die „akute Phase“ hinaus von Relevanz. Neben den bereits analysierten akuten Effekten auf die NMDA-Rezeptoruntereinheiten interagiert das Anästhetikum möglicherweise mit spezifischen Ligandenbindungsstellen sowie Transkriptionsfaktoren des NR2B-Rezeptorsubtyps resultierend in einer Potenzierung der Expression dieser Rezeptoruntereinheit. Die entscheidende Funktion des NR2B-Rezeptorsubtyps für die Etablierung von Lern- und Gedächtnisprozessen ist durch die Züchtung von transgenen Tieren, die sich durch eine erhöhte Expression der NR2B-

Rezeptoruntereinheit im Hippokampus auszeichnen, nachgewiesen worden. Die Mäuse zeigen eine signifikant bessere Lern- und Gedächtnisleistung in Objekterkennungstests als die Kontrollgruppe (TANG et al., 1999; WHITE und YOUNGENTOB, 2004). Eine gesteigerte Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit 24 Stunden nach der Narkose, vermutlich katalysiert durch direkte Isofluraneffekte, deutet auf eine mögliche positive Modifikation der synaptischen Plastizität und demzufolge auf eine Verbesserung der kognitiven Parameter hin. Es gilt als erwiesen, dass die Expression der Proteine der NR2B-Rezeptoruntereinheit bei Nagern altersabhängig ist. Im Vergleich mit einer jüngeren Tiergruppe unter 6 Monaten wurden bei älteren Ratten über 16 Monaten Defizite in der Proteinexpression des NR2B-Rezeptorsubtyps diagnostiziert, die mit schlechteren Leistungen in Verhaltenstests, wie dem Morris-Water-Maze, korrelierten (CLAYTON et al., 2002). Diese Studienergebnisse bestätigen die Bedeutung der NR2B-Rezeptoruntereinheit für kognitive Prozesse. Die in der eigenen Studie diagnostizierte Divergenz der Analyseergebnisse in Bezug auf das Expressions-Profil der NR2B-Rezeptoruntereinheit zwischen den Isofluran- und den Kontrolltieren ist nicht auf eine altersbedingte Modifikationen der Rezeptordichte zurückzuführen, da alle Tiere derselben Altersklasse angehören.

Die Divergenz der Ergebnisse zwischen der Isofluran- und Kontrollgruppe in Bezug auf die NR2A- sowie NR2B-Rezeptoruntereinheit im S/M Kortex ist nicht signifikant. Eine bedeutende Funktionalität der analysierten NMDA-Rezeptorsubtypen des S/M Kortex für die potenzierte LTP-Antwort nach der Narkose ist unwahrscheinlich.

In dieser Studie ist eine signifikante Erniedrigung der Expression der NR2A-Rezeptoruntereinheit ausschließlich im mPFC nach der Isofluran-Narkose bestimmt worden. Die pharmakologischen und molekularbiologischen Grundlagen dieser vermutlich durch die direkte Wirkung von Isofluran katalysierten Modifikationen der Rezeptorexpression im mPFC sind nicht eindeutig geklärt. Die Modifikation der glutamatergen Transmission wird unter anderem über neuroaktive Peptide, wie dem Orexin A, vermittelt. Die Funktionalität dieses Peptids wird kontrovers diskutiert. Im medialen präfrontalen Kortex potenziert es die glutamaterge Transmission (LAMBE et al., 2005). Gemäß einer experimentellen Studie ist die Wirkung von Orexin A auf die NR2A-Rezeptoruntereinheit beschränkt und induziert eine erhöhte Expression, während die Aktivität des NR2B-Rezeptorsubtyps nicht signifikant beeinflusst wird (BORGLAND et al., 2006). Eine potenzielle Interaktion des Isoflurans mit Ligandenbindungsstellen des Orexin A, wodurch Funktionalität und Exocytose des Peptids eingeschränkt werden, sind mögliche Mechanismen, die eine signifikante Erniedrigung der

Expression des NR2A-Rezeptorsubtyps im mPFC bedingen. Es sind jedoch weitere Forschungsprojekte notwendig, um diese These zu prüfen. Die Auswertung der Analyseergebnisse der eigenen Studie lassen Rückschlüsse auf eine untergeordnete Rolle der NR2A-Rezeptoruntereinheit im mPFC für das signifikant erhöhte LTP-Niveau nach der Narkose und demzufolge für die Potenzierung von Lern- und Gedächtnisinhalten zu.

Die Amygdala ist in verschiedene Kernbereiche untergliedert. Eine herausragende Rolle für die LTP-Expression nimmt der laterale Nukleus der Amygdala ein. In der eigenen Studie ist keine signifikante Potenzierung der Aktivität der NR2A- und NR2B-Rezeptoruntereinheit in den Kernbereichen der Amygdala bei den am Vortag narkotisierten Tieren eruiert worden. Demzufolge sind die NMDA-Rezeptoren in diesem Bereich des Gehirns vermutlich nur geringfügig an der Potenzierung der LTP-Antwort der Isoflurangruppe beteiligt, zumal in vitro Untersuchungen an Gehirnschnitten von Ratten belegen, dass durch eine tetanische Stimulation des lateralen Sektors der zentralen Amygdala die Induktion der LTP auch ohne die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren möglich ist (DE ARMENTIA und SAH, 2007). Eine potenzielle Interaktion des Isoflurans mit den Enzymkaskaden, die den von DE ARMENTIA und SAH (2007) postulierten Effekt bedingen, ist bislang nicht nachgewiesen worden.

Die Funktionalität des Zerebellums umfasst neben der Etablierung prozeduraler Gedächtnisinhalte auch die Beteiligung an kognitiven Prozessen. Im Zerebellum des adulten Tieres wird ein Großteil der synaptischen Ströme über die NR2C-Rezeptoruntereinheit vermittelt. Diese anatomische und funktionale Besonderheit des Kleinhirns ist konform mit den Analyseergebnissen der eigenen Untersuchungen. In der vorliegenden Studie resultiert die Auswertung der Western-Blot Analyse in Bezug auf die Expression des NR2A- und NR2B-Rezeptorsubtyps im Zerebellum zwischen den Isofluran- und Kontrolltieren in keinem statistisch signifikanten Unterschied.

Es sind weitere Studien notwendig, um die Wirkung von Isofluran auf molekularbiologischer Ebene zu erfassen.

#### Relative Expression des GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptorsubtyps

In allen analysierten Gehirnarealen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der relativen Rezeptorexpression des GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptorsubtyps ermittelt worden. Der Effekt des volatilen Anästhetikums Isofluran auf das GABAerge Transmittersystem und demzufolge auch die Modifikation der synaptischen Transmission scheint auf die unmittelbare Wirkung

des Anästhetikums beschränkt zu sein. Die Nutzung transgener Mäuse, deren genetische Modifikation in einer selektiv fehlenden Sensitivität der GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptoruntereinheit gegenüber Isofluran resultiert, erscheint geeignet, die gewichtige Rolle dieser Rezeptoruntereinheit für die unmittelbar durch das Anästhetikum induzierten Effekte zu eruieren. Isofluran potenziert inhibitorische Ströme sowohl bei den transgenen Mäusen als auch bei den Wildtypen. Die Miniatur inhibitorischen postsynaptischen Ströme in der CA1-Region der Pyramidenzellen und den Interneuronen des Hippokampus nehmen aber bei den genetisch modifizierten Tiere deutlich rascher ab, als dies bei den Wildtypen der Fall ist. Dieses Phänomen liegt in der selektiv fehlenden Sensitivität der GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptoruntereinheit der Mutanten gegenüber Isofluran begründet (SONNER et al., 2007). Die Resultate der eigenen Untersuchungen an genetisch unveränderten Tieren des Stammes C57BL/6 deuten jedoch darauf hin, dass die GABA<sub>A</sub>α1-Rezeptoruntereinheit 24 Stunden nach der Isofluran-Narkose nicht modifiziert wird und demnach diese Rezeptoruntereinheit in den analysierten Gehirnarealen wahrscheinlich keine Rolle für die signifikante Erhöhung der LTP und demzufolge für die Ausbildung von Lern- und Gedächtnisinhalten hat.

#### Relative Expression des GluR1-Rezeptorsubtyps

Die rasche Rekrutierung der AMPA GluR1-Rezeptoruntereinheit nach der LTP- Induktion und die essenzielle Bedeutung dieses Subtyps für die synaptische Transmission in kortikalen Arealen ist bereits nachgewiesen worden (TOYODA et al., 2007). Inwiefern die PDZ-Domäne der GluR1-Untereinheit im Hippokampus für die Ausbildung der LTP von Bedeutung ist, wird kontrovers diskutiert. Es wird einerseits postuliert, dass diese Domäne essenziell für die LTP-Expression ist (HAYASHI et al., 2000). Aktuelle Studien, die Auswirkungen eines selektiven Fehlens der PDZ-Domäne an transgenen Mäusen analysieren, zeigen jedoch, dass bei diesen Tieren keine Beeinträchtigung der LTP-Expression verifiziert werden kann (KIM et al., 2005). Gemäß den eigenen Untersuchungsergebnissen der Western-Blot Analyse besteht 24 Stunden nach der Narkose in Bezug auf die Höhe der GluR1-Expression in allen analysierten Gehirnarealen kein signifikanter Unterschied zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe. Die Analyseergebnisse der eigenen Studie lassen lediglich Rückschlüsse darauf zu, dass die GluR1-Rezeptoruntereinheit in den analysierten Gehirnarealen 24 Stunden nach der Isofluran-Narkose durch das Pharmakon nicht selektiv hochreguliert wird. Es sind weitere Forschungsprojekte notwendig, um einerseits die Bedeutung der AMPA GluR1-Rezeptoruntereinheit im Hippokampus für die LTP-Induktion zu verifizieren, und andererseits eine durch die Applikation von Isofluran katalysierte

potenziell erhöhte Sensitivität des GluR1-Rezeptorsubtyps, resultierend in einer gesteigerten LTP-Antwort nach dem Stimulus zu eruieren.

#### Relative Expression der Rezeptoruntereinheiten GluR6 und GluR7

Die Kainat-Rezeptorsubtypen GluR6 und GluR7 sind bedeutend für die Regulation der raschen exzitatorischen synaptischen Transmission. In vitro Studien an *Xenopus* Oozyten belegen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Applikation des volatilen Anästhetikums Isofluran und einer selektiv verstärkten Expression der GluR6-Rezeptoruntereinheit besteht (DILDY-MAYFIELD et al., 1996). Die Resultate der eigenen Western-Blot Analyse verifizieren diesen Effekt nicht, da in keinem der untersuchten Gehirnareale, ein signifikanter Unterschied zwischen der Isofluran- und Kontrollgruppe analysiert worden ist. Die Tatsache, dass 24 Stunden nach der Isofluran-Narkose keine signifikant erhöhte Regulation der GluR6/7-Rezeptoruntereinheiten festgestellt werden kann, lässt Rückschlüsse darauf zu, dass die Wirkung von Isofluran auf die GluR6/7-Rezeptorsubtypen der Neurone auf die „akute Phase“ beschränkt ist, und nicht in einem signifikant bedeutendem Ausmaß an der Modifikation kognitiver Prozesse 24 Stunden nach der Anästhesie beteiligt ist.

#### Relative Expression der nACh $\beta_2$ -Rezeptoruntereinheit

24 Stunden nach der Isofluran-Narkose kann keine signifikante Variation der Genexpression der nACh $\beta_2$ -Rezeptoruntereinheit der Isofluran- versus der Kontrollgruppe ermittelt werden. Die inhibitorische Wirkung des Isoflurans ist vermutlich auf die Zeitspanne unmittelbar während beziehungsweise kurz nach der Applikation beschränkt und resultiert nicht in einer andauernden Herabregulation der Rezeptoraktivität. Eine prominente Rolle der nACh $\beta_2$ -Rezeptoruntereinheit für das gesteigerte LTP-Niveau kann gemäß den eigenen Studienergebnissen nicht bestätigt werden.

### **4.2.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick**

Die eigene Studie beschreibt erstmalig den Effekt von Isofluran auf die neuronale synaptische Transmission 24 Stunden nach der Isofluran-Narkose bei Mäusen. Das gesteigerte LTP-Niveau wird wahrscheinlich maßgeblich von einer selektiven Potenzierung der NR2B-Rezeptoruntereinheit im Hippokampus katalysiert. Die prominente Rolle der NR2B-Rezeptoruntereinheit für die Induktion und Expression der LTP sollte in weiteren Studien bestätigt werden. Für diesen Zweck ist der Einsatz selektiver NR2B-Rezeptorantagonisten geeignet, wie zum Beispiel Ifenprodil und R-(R, S)-alpha-(4-hydroxyphenyl)-beta-methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidine propranol (R025-6981). Eine Kombination des eigenen Studiendesigns mit der Applikation von Ifenprodil beziehungsweise R025-6981 dreißig Minuten vor der LTP-Induktion durch einen  $1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}$ -Stimulus ist geeignet, um zu prüfen, ob die pharmakologische Beeinflussung des NR2B-Rezeptorsubtyps in einer Variation der LTP-Antwort nach dem Stimulus resultiert. Eine reduzierte oder sogar ausbleibende Potenzierung der LTP-Antwort bei den am Vortag anästhesierten Tieren im Anschluss an die Applikation des selektiven NR2B-Rezeptorantagonisten wäre ein Indiz dafür, dass ein NR2B-abhängiger Mechanismus das gesteigerte LTP-Niveau nach der Isoflurananästhesie modifiziert.

## 5 Zusammenfassung

### **„Langzeitpotenzierung im Hippokampus und Rezeptorexpression in den für die Kognition besonders relevanten Gehirnregionen 24 Stunden nach der Isofluran-Narkose bei Mäusen“**

Variationen der synaptischen Übertragungsstärke gelten innerhalb neuronaler Netzwerke als die Grundlage für Lern- und Gedächtnisleistungen. Inwieweit Pharmaka die synaptische Transmission beeinflussen, wird kontrovers diskutiert. Ziel dieser Studie ist es, zu analysieren, in welchem Ausmaß eine Narkose mit Isofluran die Induktion und Expression der Langzeitpotenzierung (LTP) bei Mäusen beeinflusst. Ebenso sollen auf molekularbiologischer Ebene die Expression der Rezeptoruntereinheiten (NR2A, NR2B, GluR1, GluR6/7, GABA<sub>A</sub>α1, nAChβ<sub>2</sub>) in Gehirnregionen die für die kognitive Leistungsfähigkeit besonders relevant sind (Hippokampus, sensomotorischer Kortex (S / M Kortex), medialer präfrontaler Kortex (mPFC), Zerebellum und Amygdala) untersucht werden.

54 männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 wurden untersucht und gemäß der Versuchskonzeption randomisiert in zwei Hauptgruppen von je 27 Tieren und je zwei weiteren Untergruppen aufgeteilt. 27 Tiere wurden einer zweistündigen Narkose mit 1 MAC Isofluran in einem Sauerstoff- / Luftgemisch (FiO<sub>2</sub> = 0,5) unterzogen. Der andere Teil diente als Kontrollgruppe und wurde lediglich „Schein“-anästhesiert. Am darauf folgenden Tag erfolgten die Euthanasie der Tiere und die Präparation der Gehirnschnitte für die extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen beziehungsweise die Aufbereitung des Probenmaterials für die Western-Blot Analyse (n = 6 Tiere / Gruppe). Im Rahmen der extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen wurden drei verschiedene Induktionsparadigmen getestet (Theta-Burst Stimulation, 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus, 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus). Die Anzahl der Tiere für die elektrophysiologischen Untersuchungen umfasste 7 Mäuse pro Gruppe und Reizstimulus.

Die Induktionsparadigmen Theta-Burst Stimulation und 2 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus induzieren keinen signifikanten Unterschied des LTP-Levels zwischen der Isofluran- und der Kontrollgruppe. Diese Studie zeigt jedoch, dass 24 Stunden nach einer zweistündigen Anästhesie mit 1 MAC Isofluran das auf den 1 \* 100 Hz / 1 s-Stimulus folgende LTP-Niveau über den gesamten Messzeitraum (60 Minuten) hinweg signifikant höher ist als das LTP-

Niveau 24 Stunden nach der Schein-Narkose. Die Auswertung der Daten der Western-Blot Analyse resultiert in einer signifikant reduzierten Ausbildung des NR2A-Rezeptorsubtyps im mPFC und einer signifikant erhöhten Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit im Hippokampus der am Vortag anästhesierten Tiere. Die Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen der Isofluran-Narkose und der erhöhten Expression der NR2B-Rezeptoruntereinheit, welche vermutlich für das gesteigerte LTP-Niveau verantwortlich ist.

Die Forschungsergebnisse der eigenen Studie deuten darauf hin, dass das volatile Anästhetikum Isofluran die synaptische neuronale Transmission 24 Stunden nach der Narkose positiv beeinflusst. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um potenzielle Langzeiteffekte der Isofluran-Narkose auf die neuronale Transmission zu eruieren, und einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Narkose mit volatilen Anästhetika und dem Auftreten einer Beeinträchtigung der neurokognitiven Leistungsfähigkeit bei humanmedizinischen Patienten zu widerlegen.

## 6 Summary

### **“Long Term Potention in the hippocampus and receptor expression in brain regions particularly important for cognition 24 hours after the isoflurane anaesthesia of mice”**

Within neuronal networks, variations of the synaptic transmission intensity are presumed to be the basis for learning and memory efforts. It is controversially discussed to which extent anaesthetics have an effect on synaptic transmission. The aim of this in vitro study is to analyze if isoflurane has an effect on the induction of the Long-Term Potention (LTP) in mice. Furthermore, analysis of the expression of the receptor subtypes NR2A, NR2B, GluR1, GluR6/7, GABA<sub>A</sub>α1 and nAChβ<sub>2</sub> in different brain regions which are relevant for the establishment of cognitive processes (hippocampus, sensomotoric cortex, medial prefrontal cortex, cerebellum and amygdala) is carried out.

54 male C57BL/6 mice were tested and randomly distributed into two main groups of 27 animals. 27 animals were anaesthetized for two hours with 1 MAC isoflurane in a mixture of oxygen and air (FiO<sub>2</sub> = 0.5). The other part served as control group and was sham anaesthetized. On the following day the animals were euthanized and sample material was prepared for the Western-Blot analysis (n = 6 mice / group), as well as brain slices for the extracellular electrophysiological recordings. Within the extracellular electrophysiological recordings three different types of stimulus patterns were tested (theta burst stimulation, 2 \* 100 Hz / 1 s stimulus, 1 \* 100 Hz / 1 s stimulus). The number of animals for the extracellular electrophysiological recordings included 7 mice per group and stimulus pattern.

The stimulus patterns theta burst stimulation and 2 \* 100 Hz / 1 s stimulus do not induce a significant difference in the LTP levels between the isoflurane and the sham group. However, this study shows that the LTP level following the 1 \* 100 Hz / 1 s stimulus 24 hours after an anaesthesia of two hours with 1 MAC isoflurane is significantly higher throughout the measurement period (60 minutes) than the LTP level 24 hours after a sham anaesthesia. The evaluation of the data of the Western-Blot analysis results in an explicit decreased formation of the NR2A receptor subunit in the mPFC and a considerably increased expression of the NR2B receptor subunit in the hippocampus and of the isoflurane anaesthetized animals. The results show a relationship between the isoflurane anaesthesia and the increased expression of the NR2B receptor subtype, which is probably responsible for the raised LTP level.

The results of this study indicate that the volatile anaesthetic isoflurane has a positive influence on the synaptic neuronal transmission 24 hours after the anaesthesia. Further examinations are needed to investigate potential long term effects of the isoflurane anaesthesia on the neuronal transmission and to disprove a potential relationship between the usage of volatile anaesthetics and an impairment of neurocognitive abilities in humans.

## 7 Literaturverzeichnis

AMARAL DG, WITTER MP

The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data

Neuroscience 1989; 31:571-91

AMARAL DG, WITTER MP

Hippocampal Formation; In: The rat nervous system

Academic Press 1995; 443-93

APPLEGATE MD, KERR DS, LANDFIELD PW

Redistribution of synaptic vesicles during long-term potentiation in the hippocampus

Brain Res 1987; 401:401-6

BARNARD EA, SKOLNICK P, OLSEN RW, MOHLER H, SIEGHART W, BIGGIO G, BRAESTRUP C, BATESON AN, LANGER SZ

International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function

Pharmacol Rev 1998; 50:291-313

BARTLETT TE, BANNISTER NJ, COLLETT VJ, DARGAN SL, MASSEY PV, BORTOLOTO ZA, FITZJOHN SM, BASHIR ZI, COLLINGRIDGE GL, LODGE D

Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus

Neuropharmacology 2007; 52:60-70

BEAR MF, ABRAHAM WC

Long-term depression in hippocampus

Annu Rev Neurosci 1996; 19:437-62

BERBERICH S, JENSEN V, HVALBY O, SEEBURG PH, KOHR G

The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction

Neuropharmacology 2007; 52:77-86

BETTLER B, MULLE C

Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors

Neuropharmacology 1995; 34:123-39

BLAIR LA, BENICE KK, MARSHALL J

Jellyfish green fluorescent protein: a tool for studying ion channels and second-messenger signaling in neurons

Methods Enzymol 1999; 302:213-25

BLISS TV, COLLINGRIDGE GL

A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus

Nature 1993; 361:31-9

- BORGLAND SL, TAHA SA, SARTI F, FIELDS HL, BONCI A  
Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine  
*Neuron* 2006; 49:589-601
- BORTOLOTTA ZA, CLARKE VR, DELANY CM, PARRY MC, SMOLDERS I, VIGNES M, HO KH, MIU P, BRINTON BT, FANTASKE R, OGDEN A, GATES M, ORNSTEIN PL, LODGE D, BLEAKMAN D, COLLINGRIDGE GL  
Kainate receptors are involved in synaptic plasticity  
*Nature* 1999; 402:297-301
- BORTOLOTTA ZA, NISTICO R, MORE JC, JANE DE, COLLINGRIDGE GL  
Kainate receptors and mossy fiber LTP  
*Neurotoxicology* 2005; 26:769-77
- BOURNE JN, KIROV SA, SORRA KE, HARRIS KM  
Warmer preparation of hippocampal slices prevents synapse proliferation that might obscure LTP-related structural plasticity  
*Neuropharmacology* 2007; 52:55-9
- BOURTCHULADZE R, FRENGUELLI B, BLENDY J, CIOFFI D, SCHUTZ G, SILVA AJ  
Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein  
*Cell* 1994; 79:59-68
- CLAYTON DA, MESCHES MH, ALVAREZ E, BICKFORD PC, BROWNING MD  
A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat  
*J Neurosci* 2002; 22:3628-37
- COLLINGRIDGE GL  
The induction of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation  
*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358:635-41
- COOGAN AN, O'LEARY DM, O'CONNOR JJ  
P42/44 MAP kinase inhibitor PD98059 attenuates multiple forms of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vitro  
*J Neurophysiol* 1999; 81:103-10
- CRACCO JB, SERRANO P, MOSKOWITZ SI, BERGOLD PJ, SACKTOR TC  
Protein synthesis-dependent LTP in isolated dendrites of CA1 pyramidal cells  
*Hippocampus* 2005; 15:551-6
- CRICK F  
Memory and molecular turnover  
*Nature* 1984; 312:101
- CULLEY DJ, YUKHANANOV RY, XIE Z, GALI RR, TANZI RE, CROSBY G  
Altered hippocampal gene expression 2 days after general anesthesia in rats  
*Eur J Pharmacol* 2006; 549:71-8

DAVIES CH, STARKEY SJ, POZZA MF, COLLINGRIDGE GL  
GABA autoreceptors regulate the induction of LTP  
Nature 1991; 349:609-11

DAZERT S, SCHOMIG P, SHEHATA-DIELER WE, ALETSEE C, DIELER R  
An anesthesia technique for experimental studies and microsurgical ear interventions in newborn rodents  
Laryngorhinootologie 2000; 79:26-9

DE ARMENTIA ML, SAH P  
Bidirectional synaptic plasticity at nociceptive afferents in the rat central amygdala  
J Physiol 2007; 581:961-70

DE SOUSA SL, DICKINSON R, LIEB WR, FRANKS NP  
Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon  
Anesthesiology 2000; 92:1055-66

DILDY-MAYFIELD JE, EGER EI II, HARRIS RA  
Anesthetics produce subunit-selective actions on glutamate receptors  
J Pharmacol Exp Ther 1996; 276:1058-65

DO SH, KAMATCHI GL, DURIEUX ME  
The effects of isoflurane on native and chimeric muscarinic acetylcholine receptors: the role of protein kinase C  
Anesth Analg 2001; 93:375-81

DREW CA, JOHNSTON GA, WEATHERBY RP  
Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes  
Neurosci Lett 1984; 52:317-21

DUDEK SM, BEAR MF  
Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus  
J Neurosci 1993; 13:2910-8

EGER EI II, SAIDMAN LJ, BRANDSTÄTER B  
Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency  
Anesthesiology 1965; 26:756-63

FARR SA, FLOOD JF, MORLEY JE  
The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus  
Neurobiol Learn Mem 2000; 73:150-67

FRANKS NP, LIEB WR  
Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia  
Nature 1994; 367:607-14

FREY U, MORRIS RG

Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation  
Trends Neurosci 1998; 21:181-8

GARCIA R, MUSLEH W, TOCCO G, THOMPSON RF, BAUDRY M

Time-dependent blockade of STP and LTP in hippocampal slices following acute stress in mice

Neurosci Lett 1997; 233:41-4

GINTY DD, BONNI A, GREENBERG ME

Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB

Cell 1994; 77:713-25

GOLDSTEIN SA, BOCKENHAUER D, O'KELLY I, ZILBERBERG N

Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits

Nat Rev Neurosci 2001; 2:175-84

HALL AC, LIEB WR, FRANKS NP

Insensitivity of P-type calcium channels to inhalational and intravenous general anesthetics

Anesthesiology 1994; 81:117-23

HAMAYA Y, TAKEDA T, DOHI S, NAKASHIMA S, NOZAWA Y

The effects of pentobarbital, isoflurane, and propofol on immediate-early gene expression in the vital organs of the rat

Anesth Analg 2000; 90:1177-83

HAPFELMEIER G, HASENER R, EDER M, ADELSBERGER H, KOCHS E, RAMMES G, ZIEGLGÄNSBERGER W

Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA(A) receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block

Neurosci Lett 2001; 307:97-100

HARDINGHAM N, FOX K

The role of nitric oxide and GluR1 in presynaptic and postsynaptic components of neocortical potentiation

J Neurosci 2006; 26:7395-404

HAYASHI Y, SHI SH, ESTEBAN JA, PICCINI A, PONCER JC, MALINOW R

Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction

Science 2000; 287:2262-7

HEBB DO

The organization of behavior. A neuropsychological theory

Wiley & Sons 1949; 60-78

HENZE DA, URBAN NN, BARRIONUEVO G

The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review

Neuroscience 2000; 98:407-27

HEURTEAUX C, GUY N, LAIGLE C, BLONDEAU N, DUPRAT F, MAZZUCA M, LANG-LAZDUNSKI L, WIDMANN C, ZANZOURI M, ROMEY G, LAZDUNSKI M  
TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia  
Embo J 2004; 23:2684-95

HOLLMANN M, HEINEMANN S  
Cloned glutamate receptors  
Annu Rev Neurosci 1994; 17:31-108

HÖLSCHER C  
Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity  
Trends Neurosci 1997; 20:298-303

HUANG Y, FENG X, SANDO JJ, ZUO Z  
Critical role of serine 465 in isoflurane-induced increase of cell-surface redistribution and activity of glutamate transporter type 3  
J Biol Chem 2006; 281:38133-8

HUANG YY, KANDEL ER  
Theta frequency stimulation induces a local form of late phase LTP in the CA1 region of the hippocampus  
Learn Mem 2005; 12:587-93

HUANG YY, ZAKHARENKO SS, SCHOCH S, KAESER PS, JANZ R, SÜDHOF TC, SIEGELBAUM SA, KANDEL ER  
Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation  
Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:9365-70

HUBBARD JI, LLINAS RR, QUASTEL DMJ  
Electrophysiological analysis of synaptic transmission  
Williams and Wilkins 1969

JOB C, EBERWINE J  
Localization and translation of mRNA in dendrites and axons  
Nat Rev Neurosci 2001; 2:889-98

JONES MV, BROOKS PA, HARRISON NL  
Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics  
J Physiol 1992; 449:279-93

KAMEYAMA K, AONO K, KITAMURA K  
Isoflurane inhibits neuronal Ca<sup>2+</sup> channels through enhancement of current inactivation  
Br J Anaesth 1999; 82:402-11

KESHAVAPRASAD B, LIU C, AU JD, KINDLER CH, COTTEN JF, YOST CS  
Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K<sub>2</sub>P channel TREK  
Anesth Analg 2005; 101:1042-9

KIM CH, TAKAMIYA K, PETRALIA RS, SATTLER R, YU S, ZHOU W, KALB R, WENTHOLD R, HUGANIR R  
Persistent hippocampal CA1 LTP in mice lacking the C-terminal PDZ ligand of GluR1  
Nat Neurosci 2005; 8:985-7

KLANN E, CHEN SJ, SWEATT JD  
Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate  
Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:8337-41

KOMATSU H, NOGAYA J, ANABUKI D, YOKONO S, KINOSHITA H, SHIRAKAWA Y, OGLI K  
Memory facilitation by posttraining exposure to halothane, enflurane, and isoflurane in ddN mice  
Anesth Analg 1993; 76:609-12

KOPANITSA MV, AFINOWI NO, GRANT SG  
Recording long-term potentiation of synaptic transmission by three-dimensional multi-electrode arrays  
BMC Neurosci 2006; 7:61

KUKLEY M, CAPETILLO-ZARATE E, DIETRICH D  
Vesicular glutamate release from axons in white matter  
Nat Neurosci 2007; 10:311-20

LAEMMLI, UK  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 1970; 227:680-5

LAMBE EK, OLAUSSON P, HORST NK, TAYLOR JR, AGHAJANIAN GK  
Hypocretin and nicotine excite the same thalamocortical synapses in prefrontal cortex: correlation with improved attention in rat  
J Neurosci 2005; 25:5225-9

LANGER G, KARAZMAN R, NEUMARK J, SALETU B, SCHÖNBECK G, GRÜNBERGER J, DITTRICH R, PETRICEK W, HOFFMANN P, LINZMAYER L.  
Isoflurane narcotherapy in depressive patients refractory to conventional antidepressant drug treatment. A double-blind comparison with electroconvulsive treatment  
Neuropsychobiology 1995; 31:182-94

LARSEN M, LANGMOEN IA  
The effect of volatile anaesthetics on synaptic release and uptake of glutamate  
Toxicol Lett 1998; 100-101:59-64

LAURI SE, BORTOLOTTO ZA, BLEAKMAN D, ORNSTEIN PL, LODGE D, ISAAC JT, COLLINGRIDGE GL  
A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP  
Neuron 2001; 32:697-709

- LENGYEL I, VOSS K, CAMMAROTA M, BRADSHAW K, BRENT V, MURPHY KP, GIESE KP, ROSTAS JA, BLISS TV  
Autonomous activity of CaMKII is only transiently increased following the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus  
Eur J Neurosci 2004; 20:3063-72
- LEVENSON JM, ROTH TL, LUBIN FD, MILLER CA, HUANG IC, DESAI P, MALONE LM, SWEATT JD  
Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus  
J Biol Chem 2006; 281:15763-73
- LISMAN J, SCHULMAN H, CLINE H  
The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory  
Nat Rev Neurosci 2002; 3:175-90
- LIU C, AU JD, ZOU HL, COTTEN JF, YOST CS  
Potent activation of the human tandem pore domain K channel TREK1 with clinical concentrations of volatile anesthetics  
Anesth Analg 2004; 99:1715-22
- LLEDO PM, HJELMSTAD GO, MUKHERJI S, SODERLING TR, MALENKA RC, NICOLL RA  
Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism  
Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:11175-9
- LONART G, SÜDHOF TC  
Region-specific phosphorylation of rabphilin in mossy fiber nerve terminals of the hippocampus  
J Neurosci 1998; 18:634-40
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ  
Protein measurement with the Folin phenol reagent  
J Biol Chem 1951; 193:265-75
- MA Y, HOF PR, GRANT SC, BLACKBAND SJ, BENNETT R, SLATEST L, MC GUIGAN MD, BENVENISTE H  
A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy  
Neuroscience 2005; 135:1203-15
- MAC IVER MB, TAUCK DL, KENDIG JJ  
General anaesthetic modification of synaptic facilitation and long-term potentiation in hippocampus  
Br J Anaesth 1989; 62:301-1
- MAC IVER MB, MIKULEC AA, AMAGASU SM, MONROE FA  
Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions  
Anesthesiology 1996; 85:823-34

MANABE T

Two forms of hippocampal long-term depression, the counterpart of long-term potentiation  
Rev Neurosci 1997; 8:179-93

MARK LP, DANIELS DL, NAIDICH TP, HENDRIX LE

Limbic connections

AJNR Am J Neuroradiol 1995; 16:1303-6

MARK LP, DANIELS DL, NAIDICH TP, YETKIN Z, BORNE JA

The hippocampus

AJNR Am J Neuroradiol 1993; 14:709-12

MARTIN KC, CASADIO A, ZHU H, YAPING E, ROSE JC, CHEN M, BAILEY CH, KANDEL ER

Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage

Cell 1997; 91:927-38

MARTIN KC, KOSIK KS

Synaptic tagging -- who's it?

Nat Rev Neurosci 2002; 3:813-20

MASSEY PV, BASHIR ZI

Long-term depression: multiple forms and implications for brain function

Trends Neurosci 2007; 30:176-84

MELLOR JR

Synaptic plasticity of kainate receptors

Biochem Soc Trans 2006; 34:949-51

MILLER CA, SWEATT JD

Covalent modification of DNA regulates memory formation

Neuron 2007; 53:857-69

MING Z, GRIFFITH BL, BREESE GR, MUELLER RA, CRISWELL HE

Changes in the effect of isoflurane on N-methyl-D-aspartic acid-gated currents in cultured cerebral cortical neurons with time in culture: evidence for subunit specificity

Anesthesiology 2002; 97:856-67

MIYAMOTO E

Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus

J Pharmacol Sci 2006; 100:433-42

MOLLER JT, CLUITMANS P, RASMUSSEN LS, HOUX P, RASMUSSEN H, CANET J, RABBITT P, JOLLES J, LARSEN K, HANNING CD, LANGERON O, JOHNSON T, LAUVEN PM, KRISTENSEN PA, BIEDLER A, VAN BEEM H, FRAIDAKIS O, SILVERSTEIN JH, BENEKEN JE, GRAVENSTEIN JS

Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction

Lancet 1998; 351:857-61

MORI H, MISHINA M

Structure and function of the NMDA receptor channel

Neuropharmacology 1995; 34:1219-37

NARUO H, ONIZUKA S, PRINCE D, TAKASAKI M, SYED NI

Sevoflurane blocks cholinergic synaptic transmission postsynaptically but does not affect short-term potentiation

Anesthesiology 2005; 102:920-8

NEUMAHR S, HAPFELMEIER G, SCHELLER M, SCHNECK H, FRANKE C, KOCHS E

Dual action of isoflurane on the gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated currents through recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2L)-GABA(A)-receptor channels

Anesth Analg 2000; 90:1184-90

NEWMAN GC, QI H, HOSPOD FE, GRUNDMANN K

Preservation of hippocampal brain slices with in vivo or in vitro hypothermia

Brain Res 1992; 575:159-63

NICOLL RA, MALENKA RC

Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation

Ann N Y Acad Sci 1999; 868:515-25

NIETGEN GW, HÖNEMANN CW, CHAN CK, KAMATCHI GL, DURIEUX ME

Volatile anaesthetics have differential effects on recombinant m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptor function

Br J Anaesth 1998; 81:569-77

NISHIKAWA K, MAC IVER MB

Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses

Anesthesiology 2000; 92:228-36

O'MARA S

The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us

J Anat 2005; 207:271-82

PALMER MJ, ISAAC JT, COLLINGRIDGE GL

Multiple, developmentally regulated expression mechanisms of long-term potentiation at CA1 synapses

J Neurosci 2004; 24:4903-11

PANG PT, LU B

Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF

Ageing Res Rev 2004; 3:407-30

PAXINOS G, FRANKLIN KBJ

The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates

Academic Press 2001

- PIN JP, DUVOISIN R  
The metabotropic glutamate receptors: structure and functions  
*Neuropharmacology* 1995; 34:1-26
- RADA EM, THARAKAN EC, FLOOD P  
Volatile anesthetics reduce agonist affinity at nicotinic acetylcholine receptors in the brain  
*Anesth Analg* 2003; 96:108-11
- RAMPIL IJ, MOLLER DH, BELL AH  
Isoflurane modulates genomic expression in rat amygdala  
*Anesth Analg* 2006; 102:1431-8
- RAO S, VERKMAN AS  
Analysis of organ physiology in transgenic mice  
*Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C1-C18
- RAYMOND LA, BLACKSTONE CD, HUGANIR RL  
Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase  
*Nature* 1993; 361:637-41
- REHBERG B, XIAO YH, DUCH DS  
Central nervous system sodium channels are significantly suppressed at clinical concentrations of volatile anesthetics  
*Anesthesiology* 1996; 84:1223-33
- REYMANN KG, FREY JU  
The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications  
*Neuropharmacology* 2007; 52:24-40
- RIES CR, PUIL E  
Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons  
*J Neurophysiol* 1999; 81:1802-9
- SAJIKUMAR S, FREY JU  
Resetting of 'synaptic tags' is time- and activity-dependent in rat hippocampal CA1 in vitro  
*Neuroscience* 2004; 129:503-7
- SHELLER M, BUFLER J, SCHNECK H, KOCHS E, FRANKE C  
Isoflurane and sevoflurane interact with the nicotinic acetylcholine receptor channels in micromolar concentrations  
*Anesthesiology* 1997; 86:118-27
- SHIMIZU E, TANG YP, RAMPON C, TSIEN JZ  
NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation  
*Science* 2000; 290:1170-4

SIMON W, HAPFELMEIER G, KOCHS E, ZIEGLGÄNSBERGER W, RAMMES G  
Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus  
Anesthesiology 2001; 94:1058-65

SITOH YY, TIEN RD  
The limbic system. An overview of the anatomy and its development  
Neuroimaging Clin N Am 1997; 7:1-10

SODERLING TR, DERKACH VA  
Postsynaptic protein phosphorylation and LTP  
Trends Neurosci 2000; 23:75-80

SONNER JM, GONG D, EGER EI, 2ND  
Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains  
Anesth Analg 2000; 91:720-6

SONNER JM, WERNER DF, ELSENFELT FP, XING Y, LIAO M, HARRIS RA, HARRISON  
NL, FANSELOW MS, EGER EI, 2ND, HOMANICS GE  
Effect of isoflurane and other potent inhaled anesthetics on minimum alveolar concentration,  
learning, and the righting reflex in mice engineered to express alpha1 gamma-aminobutyric  
acid type A receptors unresponsive to isoflurane  
Anesthesiology 2007; 106:107-13

STARK H, GRASSMANN S, REICHERT U  
Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors 1. Architecture  
and modulation of receptors  
Pharm Unserer Zeit 2000; 29:159-66

STEFFEY EP  
Inhalational anesthetics; In: Veterinary anesthesia  
Williams and Wilkins 1996; 297-323

STEWART O, SCHUMAN EM  
Protein synthesis at synaptic sites on dendrites  
Annu Rev Neurosci 2001; 24:299-325

STUDY RE  
Isoflurane inhibits multiple voltage-gated calcium currents in hippocampal pyramidal neurons  
Anesthesiology 1994; 81:104-16

SWEATT JD  
The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving  
synaptic plasticity and memory  
J Neurochem 2001; 76:1-10

TANELIAN DL, KOSEK P, MODY I, MAC IVER MB  
The role of the GABAA receptor/chloride channel complex in anesthesia  
Anesthesiology 1993; 78:757-76

TANG YP, SHIMIZU E, DUBE GR, RAMPON C, KERCHNER GA, ZHUO M, LIU G, TSIEN JZ

Genetic enhancement of learning and memory in mice  
Nature 1999; 401:63-9

TOYODA H, WU LJ, ZHAO MG, XU H, ZHUO M

Time-dependent postsynaptic AMPA GluR1 receptor recruitment in the cingulate synaptic potentiation  
Dev Neurobiol 2007; 67:498-509

VOLGUSHEV M, BALABAN P, CHISTIANKOVA M, EYSEL UT

Retrograde signalling with nitric oxide at neocortical synapses  
Eur J Neurosci 2000; 12:4255-67

WATSON PL, WEINER JL, CARLEN PL

Effects of variations in hippocampal slice preparation protocol on the electrophysiological stability, epileptogenicity and graded hypoxia responses of CA1 neurons  
Brain Res 1997; 775:134-43

WHITE TL, YOUNGENTOB SL

The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse  
Brain Res 2004; 1021:1-7

WITTER MP, WOUTERLOOD FG, NABER PA, VAN HAEFTEN T

Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network  
Ann N Y Acad Sci 2000; 911:1-24

WU SP, LU KT, CHANG WC, GEAN PW

Involvement of mitogen-activated protein kinase in hippocampal long-term potentiation  
J Biomed Sci 1999; 6:409-17

WU XS, SUN JY, EVERS AS, CROWDER M, WU LG

Isoflurane inhibits transmitter release and the presynaptic action potential  
Anesthesiology 2004; 100:663-70

YAMASHITA M, MORI T, NAGATA K, YEH JZ, NARAHASHI T

Isoflurane modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in human embryonic kidney cells  
Anesthesiology 2005; 102:76-84

YANG CH, HUANG CC, HSU KS

Behavioral stress modifies hippocampal synaptic plasticity through corticosterone-induced sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase activation  
J Neurosci 2004; 24:11029-34

ZALUTSKY RA, NICOLL RA

Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons  
Science 1990; 248:1619-24

ZISKIN JL, NISHIYAMA A, RUBIO M, FUKAYA M, BERGLES DE  
Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter  
Nat Neurosci 2007; 10:321-30

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Physikalische und chemische Eigenschaften von Isofluran, modifiziert nach STEFFEY (1997) .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 2: Proteine und Antikörper .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 3: Grad der relativen Steigung der fEPSPs vor (Ausgangswert) bis 60 Minuten nach einer TBS .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 4: Relative Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einer TBS.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 5: Höhe der relativen Amplitude vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einer TBS .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 6: Relative Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einer TBS.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 7: Grad der relativen Steigung der fEPSPs Werte vor (Ausgangswerte) beziehungsweise nach einem <math>2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>-Stimulus .....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 8: Relative Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem <math>2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>- Stimulus.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabelle 9: Höhe der relativen Amplitude vor (Ausgangswerte) beziehungsweise nach einem <math>2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>-Stimulus.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabelle 10: Relative Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem <math>2 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>-Stimulus.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 11: Grad der relativen Steigung der fEPSPs vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von <math>1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabelle 12: Relative Steigung der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem <math>1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>-Stimulus.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 13: Höhe der relativen Amplitude vor (Ausgangswerte) bis 60 Minuten nach einem Stimulus von <math>1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabelle 14: Relative Amplitude der 40-Minuten-LTP-Werte und der 60-Minuten-LTP-Werte nach einem <math>1 * 100 \text{ Hz} / 1 \text{ s}</math>-Stimulus.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabelle 15: Relative NR2A-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 16: Relative NR2B-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 17: Relative GABA<sub>A</sub><math>\alpha</math>1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen...</b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 18: Relative GluR1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabelle 19: Relative GluR6/7-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>71</b>
<b>Tabelle 20: Relative nACh<math>\beta</math><sub>2</sub> Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>72</b>

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Dreidimensionale Darstellung des Gehirns einer adulten C57BL/6 Maus nach der Resektion von Neokortex, Bulbus olfaktorius und der externen Kapsel, modifiziert nach MA et al. (2005).</b> .....	<b>2</b>
<b>Abbildung 2: Schematische Abbildung der Verbindungen zwischen dem Hippokampus und dem Kortex, modifiziert nach AMARAL und WITTER (1995).</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildung 3: Skizze des Aufbaus des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors, modifiziert nach STARK et al. (2000).</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus und der Funktionalität des GABA-Rezeptors, modifiziert nach TANELIAN et al. (1993).</b> .....	<b>10</b>
<b>Abbildung 5: Schemata der Verhältnisse an der Präsynapse und Postsynapse vor dem Stimulus (A) bzw. nach der Reizung (B), modifiziert nach COLLINGRIDGE (2003).</b> ..	<b>15</b>
<b>Abbildung 6: Skizze des Versuchsaufbaus für die Anästhesie der Mäuse.</b> .....	<b>28</b>
<b>Abbildung 7: Anästhesie einer Maus mit Hilfe eines Nasenkammersystems</b> .....	<b>29</b>
<b>Abbildung 8: Entnommenes Zerebrum auf ACSF-getränktem Filterpapier.</b> .....	<b>30</b>
<b>Abbildung 9: Vibratom mit Gehirnpräparat</b> .....	<b>31</b>
<b>Abbildung 10: Versuchsaufbau für die extrazellulären elektrophysiologischen Ableitungen</b> .....	<b>32</b>
<b>Abbildung 11: Schematische Zeichnung des Hippokampus und der Ableit- und Stimulationselektroden, modifiziert nach AMARAL und WITTER (1995).</b> .....	<b>33</b>
<b>Abbildung 12: Mikroskopische Ansicht des Hippokampus und der Stimulationselektroden</b> .....	<b>34</b>
<b>Abbildung 13: MiniTrans-Blot Zelle und Elektrophorese-Netzgerät</b> .....	<b>39</b>
<b>Abbildung 14: Grafische Darstellung der MW <math>\pm</math> SEM des Ausmaßes der Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einer TBS.</b> .....	<b>49</b>
<b>Abbildung 15: Grafische Darstellung der MW <math>\pm</math> SEM des Ausmaßes der Amplitude der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einer TBS.</b> .....	<b>52</b>
<b>Abbildung 16: Grafische Darstellung der MW <math>\pm</math> SEM des Ausmaßes der Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem 2 * 100 Hz / 1 s-Stimulus.</b> .....	<b>55</b>
<b>Abbildung 17: Grafische Darstellung der MW <math>\pm</math> SEM des Ausmaßes der Amplitude der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem 2 * 100 Hz / 1 s-Stimulus.</b> .....	<b>58</b>
<b>Abbildung 18: Grafische Darstellung der MW <math>\pm</math> SEM des Ausmaßes der Steigung der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem 1 * 100 Hz / 1 s-Stimulus.</b> .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 19: Grafische Darstellung der MW <math>\pm</math> SEM der relativen Amplitudenhöhe der fEPSPs beider Gruppen vor (Ausgangswerte) beziehungsweise bis 60 Minuten nach einem 1 * 100 Hz / 1 s-Stimulus.</b> .....	<b>64</b>
<b>Abbildung 20: MW <math>\pm</math> SEM der relativen NR2A-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen</b> .....	<b>66</b>
<b>Abbildung 21: Illustration der spezifischen Proteinbanden des NR2A-Rezeptorsubtyps im medialen präfrontalen Kortex nach der Western-Blot Analyse.</b> .....	<b>67</b>

<b>Abbildung 22: MW <math>\pm</math> SEM der relativen NR2B-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 23: Illustration der spezifischen Proteinbanden des NR2B-Rezeptorsubtyps im Hippokampus nach der Western-Blot Analyse.....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 24: MW <math>\pm</math> SEM der relativen GABA<sub>A</sub><math>\alpha</math>1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen.....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 25: MW <math>\pm</math> SEM der relativen GluR1-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 26: MW <math>\pm</math> SEM der relativen GluR6/7-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 27: MW <math>\pm</math> SEM der relativen nACh<math>\beta</math>2-Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnarealen .....</b>	<b>72</b>

## 10 Abkürzungsverzeichnis

ZNS	zentrales Nervensystem
POCD	postoperative kognitive Defizite
GABAR	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor
iGluR	ionotroper Glutamat-Rezeptor
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptor
AP	Aktionspotenzial
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotide-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
STD	Kurzzeitdepression
LTD	Langzeitdepression
STP	Kurzzeitpotenzierung
LTP	Langzeitpotenzierung
E-LTP	frühe Phase der Langzeitpotenzierung
L-LTP	späte Phase der Langzeitpotenzierung
CA	Cornu Ammonis
cAMKII	Kalzium/ Kalmodulin abhängige Proteinkinase II
PKC	Proteinkinase C
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
erk	extrazellulär-Signal regulierte Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
PKA	Proteinkinase A
engl.	Englisch
BDNF	<i>engl. brain derived neurotrophic factor</i>
CREB	<i>engl. cyclic Adenosinmonophosphat – Response Element Binding Protein</i>
IEGs	<i>engl. immediat- early genes</i>
NO	Stickstoffmonoxid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
MAC	minimale alveoläre Konzentration
2P-	Zweiporen-Domäne-
TRESK	<i>engl. TWIK [tandem pore domain weak inward rectifying channel]-related spinal cord K channel</i>
EAATS	Transporter für exzitatorische Aminosäuren
fESP	exzitatorisches Feldpotenzial
MOhm	MegaOhm
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
KCC2	Neuron-spezifischer-Kalium-Chlorid-Kotransporter
Vol.-%	Volumenprozent
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoff Konzentration
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
l/min	Liter/Minute
PEEP	positiv endexpiratorischer Druck
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

°C	Grad Celsius
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ACSF	artifizielle Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit
mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
NAHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
PH	Wasserstoffionenwert
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz
TBS	Theta-Burst Stimulation
µm	Mikrometer
s	Sekunde
µl	Mikroliter
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
µg	Mikrogramm
V	Volt
mV	Millivolt
DTT	Dithiotreitol
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween ® 20
HCl	Chlorwasserstoff
MgCl	Magnesiumchlorid
Tris-EDTA	<i>engl. Ethylenediamine Tetraacetic Acid; buffered solution</i>
TEMED	N,N, N',N'- Tetramethyl-Ethylendiamine
APS	Amoniumpersulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
BSA	Bovines Serum Albumin
ml	Milliliter
n	Gesamtheit
MW	Mittelwert
SEM	Standardfehler
S/M	sensomotorisch
mPfc	medialer präfrontaler Kortex
MEAS	Multi-Elektroden Anordnung
R025-6981	R-(R, S)-alpha-(4-hydroxyphenyl)- beta-methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidine propranolol

## 11 Danksagung

Nach Abschluss dieser Doktorarbeit möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. vet. B. Aigner für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken.

Vielmals möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs, Direktor des Instituts für Anästhesiologie der TU München und Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie der TU München für die Überlassung des Themas bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. W. Zieglgänsberger möchte ich für die Möglichkeit danken, die tierexperimentellen Studien am Max-Planck-Institut für Psychiatrie durchführen zu können.

Dank auch an Herrn PD Dr. G. Rammes für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und die Hilfsbereitschaft in Bezug auf alle praktischen Probleme und theoretischen Fragen.

Mein großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. vet. J. Henke für die Vermittlung der Dissertation, die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung und die rasche Korrektur.

Frau Dr. med. vet. J. Berkmann danke ich für ihre fachliche Kritik und Betreuung.

Frau Dr. med. vet. K. Kellermann, Frau Dr. med. vet. L. Starker, Frau Dr. med. L. Gordon, Herrn W. Waldeyer, Frau M. Osl und Frau M. Käser bin ich für ihre jederzeit zur Verfügung stehende Hilfsbereitschaft und große Unterstützung dankbar.

Dankbar bin ich auch Frau B. Hauger, Frau C. Hilf, Frau D. Droese und Frau A. Frye für die freundliche Unterstützung im Labor.

Zudem bedanke ich mich bei allen Tierpflegern und Tierpflegerinnen für die problemlose und stets erfolgreiche Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie, Freunden und ganz besonders meinem Freund Jens bedanken, ohne deren liebevolle Unterstützung und Geduld diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.