

**Der Einfluss von Sevofluran auf das
thalamokortikale Netzwerk –
in vitro Untersuchungen mittels optogenetischer Stimulation**

von Claudia Kopp

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

**Der Einfluss von Sevofluran auf das
thalamokortikale Netzwerk –
in vitro Untersuchungen mittels optogenetischer Stimulation**

von Claudia Kopp

aus München

München 2018

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

**Angefertigt am: Klinikum rechts der Isar der TU München
in der Klinik für Anästhesiologie**

**Mentoren: PD Dr. med. Rainer Haseneder
Dr. med. Stephan Kratzer**

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Prof. Dr. Valeri Zakhartchenko

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	2
1.	Anästhesie	2
	1.1. Definition	2
	1.2. Neuronale Wirkmechanismen.....	2
2.	Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran	3
	2.1. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften	3
	2.2. Klinischer Einsatz	3
	2.3. Die Wirkung von Sevofluran auf Transmittersysteme.....	4
	2.3.1. Die Wirkung auf exzitatorische Neurotransmitter	5
	2.3.2. Die Wirkung auf inhibitorische Neurotransmitter	6
3.	Thalamokortikales Netzwerk.....	8
	3.1. Aufbau des Thalamus.....	8
	3.2. Funktion des Thalamus	9
	3.3. Aufbau des Kortex	11
	3.4. Funktion des Kortex.....	12
	3.5. Synaptische Verbindungen im thalamokortikalen Netzwerk.....	12
	3.6. Anästhesie, Bewusstsein und thalamokortikales Netzwerk	15
4.	Optogenetik.....	17
	4.1. Optische Stimulation zur Untersuchung neuronaler Strukturen	17
	4.2. Channelrhodopsin-2 (ChR2)	18
	4.3. Adenoassoziierter viraler Vektor (AAV)	19
5.	Zielsetzung der Arbeit	20
III.	MATERIAL UND METHODEN	21
1.	Stereotaktische Injektion.....	21
	1.1. Versuchstiere und Haltung.....	21
	1.2. Adenoassoziierter viraler Vektor	21
	1.3. Intrathalamische Injektion.....	22
2.	Herstellung der vitalen Hirnschnittpräparate.....	25
	2.1. Präparation der Hirnschnitte.....	25
	2.2. Fluoreszenzmikroskopie.....	26

2.3. Infrarotvideomikroskopie.....	27
3. Elektrophysiologie.....	28
3.1. Versuchsaufbau	28
3.2. Einzelzellmessungen	29
3.2.1. Pipetten	29
3.2.2. Etablierung der Ganzzelleitung.....	30
3.2.3. Charakterisierung der transduzierten Neurone	31
3.2.4. Optische Stimulation.....	32
3.2.5. Elektrische Stimulation.....	32
3.2.6. Miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme (mEPSC)/ Miniatur inhibitorische postsynaptische Ströme (mIPSC).....	33
4. Applikation des Anästhetikums Sevofluran	33
5. Auswertung und Statistik.....	34
IV. ERGEBNISSE	35
1. Kontrolle der ChR2-Expression in thalamokortikalen Schaltneuronen	35
2. Ganzzelleitungen thalamokortikaler Schaltneurone.....	37
2.1. Elektrophysiologische Charakterisierung thalamokortikaler Schaltneurone	37
2.2. Der Einfluss von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit und passive Membraneigenschaften thalamokortikaler Schaltneurone.....	39
2.3. Der Einfluss von Sevofluran auf optogenetisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (oPSP) in thalamokortikalen Schaltneuronen	41
3. Ganzzelleitungen kortikaler Neurone der Lam. IV.....	42
3.1. Der Einfluss von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV	42
3.2. Optogenetische Stimulation kortikaler Neurone der Lam. IV	44
3.2.1. Der Einfluss von Sevofluran auf optogenetisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (oPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV	44
3.2.2. Der Einfluss von Sevofluran auf optogenetisch-evozierte exzitatorische Summenpotentiale (oEPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV	46
3.2.3. Der Einfluss von Sevofluran auf AMPA-Rezeptor-vermittelte oEPSP kortikaler Neurone der Lam. IV	47
3.2.4. Der Einfluss von Sevofluran auf NMDA-Rezeptor-vermittelte oEPSP kortikaler Neurone der Lam. IV	49
3.3. Elektrische Stimulation kortikaler Neurone der Lam. IV	50

3.3.1.	Der Einfluss von Sevofluran auf elektrisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (ePSP) kortikaler Neurone der Lam. IV	50
3.3.2.	Der Einfluss von Sevofluran auf elektrisch-evozierte exzitatorische intrakortikale postsynaptische Potentiale (eEPSP)	52
3.3.3.	Der Einfluss von Sevofluran auf elektrisch-evozierte inhibitorische intrakortikale postsynaptische Potentiale (eIPSP).....	54
3.4.	Der Einfluss von Sevofluran auf kortikale Miniatur IPSC	55
V.	DISKUSSION	57
1.	Vorteile und Limitationen der Optogenetik	57
2.	Klinische Relevanz der Sevoflurankonzentration	59
3.	Die Wirkung von Sevofluran auf das thalamokortikale Netzwerk	60
3.1.	Elektrophysiologische Charakterisierung ChR2-exprimierender thalamokortikaler Schaltneurone.....	60
3.2.	Die Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone.....	61
3.3.	Die Wirkung von Sevofluran auf die thalamokortikale Signalübertragung.....	62
3.4.	Die Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV	65
3.5.	Die Wirkung von Sevofluran auf die intrakortikale Signalverarbeitung	66
4.	Schlussfolgerung.....	67
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	70
VII.	SUMMARY	71
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	72
IX.	ANHANG	86
X.	DANKSAGUNG	92

Abbildungsverzeichnis:

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors.</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 2: Thalamokortikale Aktivitätsmuster im Wach- und Schlafzustand.</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Netzwerks.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 4: Expression des ChR2 in murinen Neuronen und optische Stimulation transduzierter Neurone.....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 5: Photoisomerisierung von All-trans-Retinal zu 13-cis-Retinal.....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung des viralen Vektors AAV1.hSyn.ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH zur Übertragung der Geninformation für den lichtsensitiven Kanal ChR2.</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 7: Versuchsaufbau des Infrarot (IR)-Videomikroskops.</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 8: Infrarotvideomikroskopiebild eines akuten Hirnschnittpräparats.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 9: Die Injektion des Adenoassozierten viralen Vektors führte zur ChR2-/eYFP-Expression in thalamokortikalen Schaltneuronen und ihren axonalen Projektionen im Kortex.....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 10: Typische elektrophysiologische Eigenschaften thalamokortikaler Schaltneurone nach Injektion des viralen Vektors zur Expression von ChR2.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 11: Sevofluran verringerte die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone bei gleichbleibenden passiven Membraneigenschaften.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 12: Sevofluran reduzierte oPSP in thalamokortikalen Schaltneuronen.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 12: Sevofluran reduzierte die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV bei gleichbleibenden passiven Membraneigenschaften.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 13: Durch Sevofluran wurden optogenetisch-evozierte Summenpotentiale in kortikalen Neuronen der Lam. IV verstärkt.</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 14: Sevofluran bewirkte eine Verkleinerung der relativen Amplitude und relativen AUC der exzitatorischen Komponente des optogenetisch-evozierten Summenpotentials in kortikalen Neuronen der Lam. IV.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 15: Sevofluran bewirkte eine Verkleinerung der relativen AUC der AMPA-oEPSP in kortikalen Neuronen der Lam. IV.</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 16: Sevofluran bewirkte eine Verkleinerung der relativen Amplitude und relativen AUC der NMDA-oEPSP in kortikalen Neuronen der Lam. IV.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 17: Verkleinerung der relativen Amplitude und relativen AUC der elektrisch-evozierten postsynaptischen Summenpotentiale (ePSP) kortikaler Neurone der Lam. IV durch Sevofluran....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 18: Sevofluran führte zu einer Verkleinerung der elektrisch-evozierten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (eEPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 19: Sevofluran führte zu einer Vergrößerung der elektrisch-evozierten inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (eIPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 20: Sevofluran führte zu einer Vergrößerung der Amplitude und Fläche unter der Kurve sowie zu einer Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstante („decay“) der mIPSC.....</i>	<i>56</i>

Tabellenverzeichnis:

<i>Tabelle 1: Zusammensetzung der aCSF zur Präparation des Hirngewebes (pH = 7,4 durch Sättigung mit Carbogengas)</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 2: Zusammensetzung der aCSF zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen (pH = 7,4 durch Sättigung mit Carbogengas)</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 3: Zusammensetzung der „Standard“-IZ, pH = 7,25</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung der IZ zur Messung der Miniatur inhibitorischen postsynaptischen Ströme, pH = 7,25.....</i>	<i>30</i>

Abkürzungsverzeichnis:

AAV	Adenoassoziiertes Virus
aCSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit („artificial cerebrospinal fluid“)
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
AP-5	D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
ARAS	aufsteigendes retikuläres aktivierendes Hirnstammsystem
AUC	Fläche unter der Kurve („area under the curve“)
CC	„Current-Clamp“
ChR2	Channelrhodopsin-2
EEG	Elektroenzephalogramm
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
eEPSP	Elektrisch-evoziertes exzitatorisches postsynaptisches Potential
eIPSP	Elektrisch-evoziertes inhibitorisches postsynaptisches Potential
ePSP	Elektrisch-evoziertes postsynaptisches Summenpotential
GABA	γ -Aminobuttersäure
HCN	„hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated“
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
IR	Infrarot
IZ	Intrazellulärflüssigkeit
KA	Kainat
Lam.	Lamina
MAC	Minimale alveoläre Konzentration („minimum alveolar concentration“)
mEPSC/mIPSC	Miniatur exzitatorischer/inhibitorischer postsynaptischer Strom („miniature excitatory/inhibitory postsynaptic currents“)
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>non</i> -NMDA	nicht n-Methyl-D-Aspartat (AMPA und KA)
nREM	nicht-REM
oPSP	Optogenetisch-evoziertes postsynaptisches Summenpotential
oEPSP	Optogeneisch-evoziertes exzitatorisches Potential
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PSP	Postsynaptisches Summenpotential
REM	„rapid eye movement“
RMP	Ruhemembranpotential

RTN	Retikulärer thalamischer Nukleus
SEM	Standardfehler („standard error of the mean“)
TM	Transmembrandomäne
TTX	Tetrodotoxin
UV	Ultraviolett
VB	ventrobasaler Kernkomplex (des Thalamus)
VPL	Ventroposolateraler (Teil des VB)
VPM	ventropostomedialer (Teil des VB)
VC	„Voltage-Clamp“
VCcCC	„Voltage-Clamp-controlled Current-Clamp“
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Jährlich ermöglicht die Allgemeinanästhesie die sichere Durchführung von Operationen bei Millionen Patienten weltweit. Schon Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Operationen unter Ether-, Stickoxid- oder Chloroformnarkose durchgeführt, bei denen die Patienten, durch das Versetzen in einen schlafähnlichen Zustand, die operationsbedingten Schmerzen nicht mehr bewusst wahrgenommen haben (RUDOLPH & ANTKOWIAK, 2004). Die zum Hervorrufen der Allgemeinanästhesie eingesetzten Medikamente wurden in der Folge stetig weiterentwickelt und verbessert. Für die meisten Substanzen konnten mittlerweile Ionenkanäle als molekulare Zielstrukturen identifiziert werden (CAMPAGNA et al., 2003), jedoch ist nach wie vor unklar, wie genau die Modulation dieser Zielstrukturen zum Zustand der Allgemeinanästhesie führt (UHRIG et al., 2014). Nur dieses Verständnis jedoch kann wertvollen Aufschluss darüber geben, wie die Überwachung der Narkosetiefe verbessert und somit intraoperative Wachheit und postoperative kognitive Störungen verhindert werden können (UHRIG et al., 2014).

Inhalationsanästhetika spielen sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin eine wichtige Rolle. Die am häufigsten verwendeten Substanzen stellen Desfluran, Isofluran und Sevofluran dar (SCHULTE AM ESCH et al., 2000). Sevofluran dient in der vorliegenden Arbeit als Modellsubstanz, anhand derer die Wirkungsweise von Inhalationsanästhetika näher beleuchtet werden soll.

Der Thalamus ist als sog. „Tor zum Bewusstsein“ eine äußerst wichtige neuroanatomische Zielstruktur, über die Anästhetika den Bewusstseinsverlust hervorrufen können. Für die meisten Anästhetika konnte eine Suppression des thalamokortikalen Netzwerks gezeigt werden (ALKIRE & MILLER, 2005).

In vivo Studien mit Sevofluran haben jedoch gezeigt, dass akustisch evozierte Potentiale unter Narkose erhalten bleiben (KERSSENS et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass Sevofluran die synaptische Transmission vom Thalamus zum Kortex zumindest nicht vollständig blockiert. Somit stellt sich die Frage, welche Rolle dem thalamokortikalen Netzwerk beim Erreichen des Anästhesie-Endpunkts Bewusstseinsverlust zukommt.

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf das thalamokortikale Netzwerk, mithilfe eines optogenetischen Ansatzes, untersucht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Anästhesie

1.1. Definition

Das Wort Anästhesie leitet sich aus dem Altgriechischen (ἀναισθησία [anaesthesia]) ab und bedeutet Unempfindlichkeit. Der Begriff Narkose hat ebenfalls eine altgriechische Wortherkunft (ναρκώδης [narkōdēs]) und wird mit Erstarrung übersetzt. Unter dem Begriff Anästhesie, der erstmals 1846 von Oliver Wendell Jones für eine Ethernarkose genannt wurde (ABRAHAM, 2015), wird ein reversibler, medikamentös hervorgerufener Zustand verstanden, der zum Verlust der Empfindungsfähigkeit führt. Neurophysiologisch betrachtet setzt sich Allgemeinanästhesie aus den Endpunkten Ausschaltung der Schmerzempfindung (Analgesie), Ausschaltung des Erinnerungsvermögens (Amnesie), Bewusstseinsverlust (Hypnose) und der Verhinderung von Bewegungen (Immobilität) zusammen (EGER & SONNER, 2006). Man unterscheidet je nach Applikationsart und verwendetem Anästhetikum zwischen Injektions- und Inhalationsanästhesie. Trotz der unterschiedlichen Strukturen der jeweils verwendeten Narkosemittel, die von einfachen Inertgasen, wie Xenon, bis hin zu komplexen Verbindungen, wie Barbituraten, reichen, führen alle Substanzen zum gleichen Effekt, dem reversiblen Bewusstseinsverlust (FRANKS, 2008).

1.2. Neuronale Wirkmechanismen

Trotz ihres etablierten klinischen Einsatzes sind die genauen Zielstrukturen und neuronalen Wirkmechanismen der Inhalationsanästhetika bisher nicht exakt geklärt. Über viele Jahrzehnte galt die Lipidtheorie als Erklärung für die Wirkungsweise von Anästhetika. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieben Hans Meyer und Charles Overton, dass die anästhetische Potenz von Substanzen durch ihre Lipophilie bestimmt wird (MEYER, 1899; OVERTON, 1901). Später konnte gezeigt werden, dass Anästhetika nicht unspezifisch in der Lipidmembran wirken, sondern ihre Wirkungen an zellulären Proteinen entfalten (sog. Proteintheorie (FRANKS & LIEB, 1978, 1981)). Dabei können Anästhetika ihre Wirkung entweder über direkte Bindung an Membranproteine oder indirekt über Beeinflussung der Lipiddoppelschicht der Membran und Ionenkanäle entfalten (KRETZ & TEUFEL, 2006).

Für die meisten Anästhetika wurde mittlerweile eine Modulation membranständiger ligandengesteuerter sowie spannungsabhängiger Ionenkanäle beschrieben (CAMPAGNA et al., 2003; RUDOLPH & ANTKOWIAK, 2004; FRANKS, 2008). Zu welchen Veränderungen es durch diese Modulationen in neuronalen Netzwerken kommt, ist jedoch weiterhin unklar. Bildgebende Verfahren konnten Hinweise auf spezifische Hirnareale liefern, durch deren Modulation Anästhetika den Anästhesie-Endpunkt Bewusstseinsverlust hervorrufen könnten (ALKIRE & MILLER, 2005).

2. Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran

2.1. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften

Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran (1,1,1,3,3,3-hexa fluoro-2-(fluoromethoxy) propane, $C_4H_3F_7O$) ist ein volatiles Anästhetikum und gehört zur Gruppe der Flurane. Bei Raumtemperatur ist Sevofluran eine transparente und mild, leicht fruchtig riechende Flüssigkeit. Der Blut-Gas-Verteilungskoeffizient gibt das Verhältnis der Konzentration im Alveolargasgemisch zur Konzentration im Blut an und liegt bei 0,69 (BEHNE et al., 1999). Durch diese niedrige Blutlöslichkeit ergibt sich eine schnelle An- und Abflutung (STRUM & EGER, 1987). Die minimale alveoläre Konzentration („minimum alveolar concentration“; MAC), also jene alveoläre Konzentration, bei welcher 50 % der Patienten keine motorische Reaktion mehr auf einen Schmerzreiz zeigen, beträgt beim Menschen 2,05 Vol-% (SCHELLER et al., 1988). Der MAC-Wert von Sevofluran bei Hunden liegt bei 2,10 - 2,36 Vol-%, bei Kaninchen bei 3,70 Vol-%, bei Ratten bei 2,50 - 2,99 Vol-% (STEFFEY & MAMA, 2007) und bei Mäusen bei $3,2 \pm 0,38$ Vol-% (ICHINOSE et al., 1998). Lediglich 2 - 5 % des aufgenommenen Sevofluran werden in der Leber zu Hexafluoroisopropanol metabolisiert, im Blut glukuronidiert und durch die Nieren ausgeschieden, der Großteil wird pulmonal eliminiert (BEHNE et al., 1999).

2.2. Klinischer Einsatz

Sevofluran wurde zum ersten Mal in den 1970er Jahren synthetisiert (WALLIN et al., 1975), bis es im klinischen Alltag zum Einsatz kam, vergingen 20 Jahre. Das erste Land, das Sevofluran routinemäßig einsetzte, war Japan (EGER, 1994). Dort hatten bis 1993 mehr als eine Million Patienten Sevofluran erhalten (EGER, 1994), in Deutschland folgte die Zulassung 1995 (BEHNE et al., 1999).

Sevofluran hat gute muskelrelaxierende und hypnotische Eigenschaften, ist dabei schwach analgetisch und gering hirndrucksteigernd (SCHULTE AM ESCH et al., 2000). Es weist einen angenehmen Geruch auf und ist wenig schleimhautreizend (DOI & IKEDA, 1993). Es eignet sich deshalb und aufgrund der positiven Eigenschaften hinsichtlich der Pharmakokinetik, besonders gut für die Maskeneinleitung, vor allem in der Kinderanästhesie (BEHNE et al., 1999). Die schnelle Einleitungs- und Aufwachphase, die damit einhergehende gute Steuerbarkeit der Anästhesie und die niedrige Potenz Nebenwirkungen zu erzeugen (BEHNE et al., 1999), machen es auch in der Tiermedizin zu einer wichtigen Substanz (CLARKE, 1999). Eine Zulassung besteht in der Tiermedizin für Hunde, aus Kostengründen wird bisher jedoch häufiger noch das volatile Anästhetikum Isofluran eingesetzt.

Isofluran ist in der Gruppe der Inhalationsanästhetika die Substanz mit der besten muskelrelaxierenden Wirkung (SCHULTE AM ESCH et al., 2000). Seine schleimhautreizende Wirkung macht es weniger gut geeignet für die Maskeneinleitung wie Sevofluran (DOI & IKEDA, 1993). Außerdem führt Sevofluran bei der Maskeneinleitung von Hunden und Katzen zu einer schnelleren Narkoseinduktion als Isofluran (JOHNSON et al., 1998; LERCHE et al., 2002).

2.3. Die Wirkung von Sevofluran auf Transmittersysteme

Charles Sherrington prägte Anfang des 19. Jahrhunderts den Begriff Synapse für eine Struktur im Gehirn, welche die Informationsweiterleitung von einer Nervenzelle zur anderen oder zu einem anderen Zelltyp vermittelt (BENNETT, 1999).

Nach Art der Erregungsübertragung unterscheidet man zwischen chemischer und elektrischer Transmission (ULFIG, 2008). Bei der elektrischen Synapse, die auch als „gap junction“ bezeichnet wird, wird die Informationsübertragung durch direkten Zellkontakt über Ionenkanäle vermittelt. Dadurch wird eine sehr schnelle Reizweiterleitung ermöglicht. Chemische Synapsen arbeiten mit Neurotransmittern, die aus Vesikeln der präsynaptischen Endigung freigesetzt werden und über den synaptischen Spalt zu den jeweiligen Rezeptoren des postsynaptischen Neurons gelangen. Der synaptische Spalt ist hier größer als bei den „gap junction“-Verbindungen. Die Reizweiterleitung erfolgt langsamer und nur in eine Richtung. Bei den chemischen Synapsen erfolgt die Informationsübertragung zwischen den Zellen über exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter.

Sevofluran hat auf die verschiedenen Neurotransmittersysteme unterschiedliche Wirkungen. So sollen Inhalationsanästhetika allgemein einen verstärkenden Effekt auf inhibitorische Transmittersysteme, wie Glycin und γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren, und einen hemmenden Effekt auf exzitatorische Transmittersysteme mit Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-, N-Methyl D-Aspartat (NMDA)- und Kainat (KA)- Rezeptoren haben (SONNER et al., 2003; RUDOLPH & ANTKOWIAK, 2004; FRANKS, 2008).

2.3.1. Die Wirkung auf exzitatorische Neurotransmitter

Der Großteil der Synapsen des zentralen Nervensystems (ZNS) nutzt den exzitatorischen Neurotransmitter L-Glutamat (MONAGHAN et al., 1989). Entsprechend der Signaltransduktion lassen sich glutamaterge Rezeptoren in ionotrope und metabotrope Rezeptoren einteilen. Metabotrope Glutamatrezeptoren beeinflussen die neuronale Erregbarkeit über die Wirkung von Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen (G-Proteinen) auf Ionenkanäle bzw. sekundäre Botenstoffe, wie Diacylglycerin oder zyklisches Adenosinmonophosphat (MELDRUM, 2000; CAMPAGNA et al., 2003) NMDA-, AMPA- und KA-Rezeptoren bilden, als ligandengesteuerte, nicht-selektive Kationenkanäle, die Gruppe der ionotropen Rezeptoren (MELDRUM, 2000).

NMDA-Rezeptoren weisen eine Permeabilität für Kalzium-, Natrium- und Kaliumionen auf, müssen zur Aktivierung neben Glutamat auch den Koaktivator Glycin bzw. D-Serin binden und sind bei Membranspannungen in Höhe des physiologischen Ruhemembranpotentials (RMP) von Magnesiumionen blockiert (PETRENKO et al., 2014). Nach einer vorhergehenden Depolarisation, z. B. vermittelt durch AMPA-Rezeptoren, kommt es zur Dissoziation des Magnesiumblocks und somit, nach Bindung der Aktivatoren, zum Natrium- und Kalziumeinstrom. Dies führt letztlich zur Depolarisation. NMDA-Rezeptoren zeigen eine langsame Deaktivierungskinetik und die Ionenströme sind dadurch langsamer als beispielsweise durch AMPA-Rezeptoren hervorgerufene Ströme (PETRENKO et al., 2014). Aufgrund ihrer Kalziumpermeabilität spielen NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität, z. B. bei der Generierung der Langzeitpotenzierung (LTP), einer langandauernden Verstärkung der synaptischen Transmission (LUSCHER & MALENKA, 2012).

Zu den *non*-NMDA-Rezeptoren zählen AMPA- und KA-Rezeptoren. *Non*-NMDA-Rezeptoren besitzen eine hohe Permeabilität für monovalente Kationen (Na⁺, K⁺Ionen), für Kalzium sind sie aufgrund der GluR2-Untereinheit nicht bzw. nur in sehr geringem Maße durchlässig (GILBERTSON et al., 1991; MELDRUM, 2000). Im Vergleich zu den NMDA-Rezeptoren haben AMPA-Rezeptoren eine geringere Bindungsaffinität zu Glutamat, allerdings sind sie durch eine schnellere Kinetik und die Vermittlung der schnellen Anfangskomponente des exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) gekennzeichnet (MELDRUM, 2000). KA-Rezeptoren kommen im gesamten ZNS vor und regulieren sowohl die inhibitorische als auch exzitatorische synaptische Transmission (KOGA et al., 2012).

Sevofluran reduziert, über eine Hemmung der präsynaptischen Glutamatfreisetzung, die glutamaterge exzitatorische synaptische Transmission (SCHLAME & HEMMINGS, 1995; STUCKE et al., 2001; MOE et al., 2002; VINJE et al., 2002).

2.3.2. Die Wirkung auf inhibitorische Neurotransmitter

GABA ist der häufigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS (STEPHENSON, 1995). Es existieren drei verschiedene GABA-Rezeptoren, GABA_A, GABA_B und GABA_{A-ρ} (STEPHENSON, 1995). Im Folgenden wird nur der wichtigste Vertreter, der GABA_A-Rezeptor, näher behandelt. GABA_A-Rezeptoren sind im Gehirn weit verbreitet, mit der höchsten Dichte im frontalen Kortex und der Körnerzellschicht des Kleinhirns (BOWERY et al., 1987). GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Chloridionen-Kanalporen, deren Funktion durch eine Vielzahl von pharmakologischen Wirkstoffen moduliert wird. Die Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten, einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne und vier Transmembrandomänen (TM), sowie einer großen intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 (SIEGHART & SPERK, 2002).

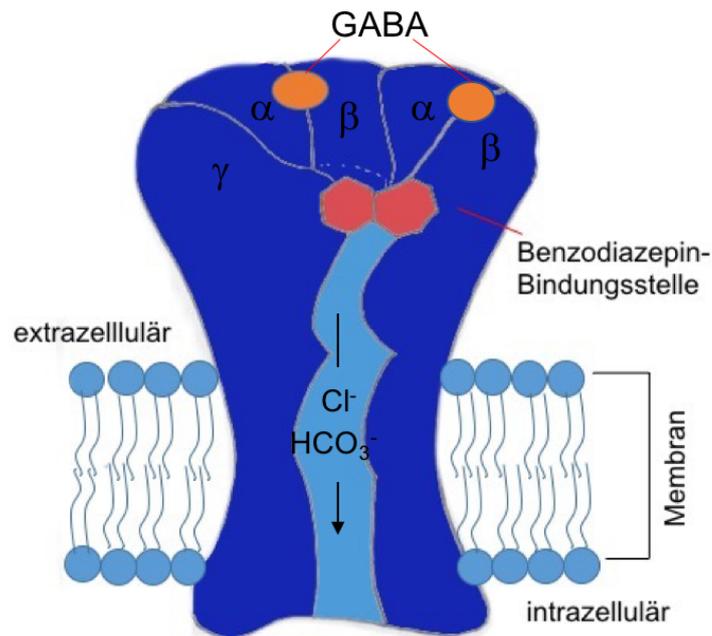


Abbildung 1: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors.

Der GABA_A-Rezeptor besteht aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit. Die α- und β-Untereinheit bilden die Bindungsstellen für GABA. Außerdem gibt es Bindungsstellen für Benzodiazepine (rot) und Ethanol (nicht dargestellt). Durch Bindung des Liganden GABA (orange) kommt es zur Öffnung der Kanalpore, Cl⁻ und HCO₃⁻ Ionen strömen entlang eines elektrochemischen Gradienten in das Zellinnere und führen zur Hyperpolarisation. Abbildung modifiziert nach MIHIC and HARRIS (1997).

19 Gene kodieren für die Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (α1–6, β1–3, γ1–3, δ, ε, θ, π, ρ1–3) (SIMON et al., 2004). Im ZNS von Säugetieren ist die Kombination aus α₁, β₂ und γ₂ die am häufigsten vorkommende Rezeptorkomposition (SIEGHART & SPERK, 2002; FARRANT & KAILA, 2007).

Die α- und β-Untereinheit bilden die Bindungsstelle für GABA, durch Bindung des Transmitters wird der Kanal, durch eine Konformationsänderung, für Cl⁻ und HCO₃⁻ Ionen passierbar. Durch den Anioneneinstrom kommt es zur Hyperpolarisation (STEPHENSON, 1995). Zusätzlich befindet sich am GABA_A-Rezeptor eine Benzodiazepinbindungsstelle, die Bindung von Benzodiazepinen führt an den Rezeptoren zu einer verstärkten Aktivität durch eine erhöhte Bindungsaffinität zu GABA (WALTERS et al., 2000). Als kompetitiver Antagonist bindet auch Bicucullin

an die GABA-Bindungsstelle, ohne selbst einen Effekt auszulösen (KUSAMA et al., 1993). Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau des GABA_A-Rezeptors.

GABA_A-Rezeptoren werden allgemein als Zielstrukturen für Inhalationsanästhetika angesehen, bei klinisch relevanten Konzentrationen werden GABA-vermittelte postsynaptische Ströme verstärkt (MIHIC & HARRIS, 1997; SEBEL et al., 2006; DINIZ et al., 2014).

Ionenströme, die durch extrasynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren hervorgerufen werden, spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit (WALKER & SEMYANOV, 2008). Eine Wirkung von Sevofluran an extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren konnte gezeigt werden (KOTANI & AKAIKE, 2013). Sevofluran bewirkt, über eine Hemmung des GABA-Transporters GAT, eine extrazelluläre Anhäufung von GABA in kortikalen Schnitten (DINIZ et al., 2014). Dies kann eine anhaltende tonische Hemmung des ZNS durch extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren verursachen (DINIZ et al., 2014). Höhere Anästhetikakonzentrationen führen zur direkten Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren in Abwesenheit des Liganden GABA (FRANKS, 2008).

Im thalamokortikalen Netzwerk wird durch Sevofluran die intrinsische Erregbarkeit thalamischer Neurone vermindert und die Hemmung im Thalamus, durch Verstärkung GABA_A-vermittelter postsynaptischer Ströme (SEBEL et al., 2006), verstärkt (CAMPAGNA et al., 2003; RUDOLPH & ANTKOWIAK, 2004).

3. Thalamokortikales Netzwerk

3.1. Aufbau des Thalamus

Der Thalamus (griech. thalamos Schlafgemach) ist der größte Teil des Diencephalons. Er besteht aus einer dorsalen und einer ventralen Hälfte, die über die Adhesio interthalamica miteinander verbunden sind. Medial wird der Thalamus durch den dritten Ventrikel und lateral durch die interne Kapsel begrenzt. Im Detail setzt sich der Thalamus aus einer Vielzahl von Kerngebieten zusammen, die die Verbindung zum Kortex herstellen und in spezifische und unspezifische Thalamuskern und Assoziationskerne eingeteilt werden (SINOWATZ & HESS, 2006).

Der retikuläre thalamische Nukleus (RTN) ist eine schmale netzförmige Zellschicht inhibitorischer GABAerger Neurone, die den wichtigsten inhibitorischen Einfluss auf thalamische Relaisneurone ausüben (FERRARELLI & TONONI, 2011).

Die Zielstruktur dieses Promotionsprojektes bildet der ventrobasale Kernkomplex (VB) des Thalamus, der sich aus dem ventropostomedialen (VPM) und ventropostolateralen (VPL) Kern zusammensetzt. Dieses Kerngebiet erhält Afferenzen aus dem Hirnstamm und Rückenmark und ist zuständig für die Verarbeitung somatosensorischer Informationen aus der Peripherie und die Weiterleitung zu sensiblen Rindengebieten des Kortex (ULFIG, 2008).

3.2. Funktion des Thalamus

Die spezifischen Thalamuskerngebiete leiten über ihre Afferenzen nahezu sämtliche sensorische Informationen aus der Peripherie zu einem spezifischen primären Rindengebiet des Kortex (GRANT et al., 2012). Spezifische Thalamuskerngebiete sind das Corpus geniculatum laterale (Sehbahn), das Corpus geniculatum mediale (Hörbahn), der Nucleus anterior thalami (limbisches System), die Nuclei mediales thalami (kognitive Fähigkeiten), der Nucleus ventralis anterolateralis (Motorik) und der Nucleus ventralis posterior (Tiefensensibilität, Tastsinn) (ULFIG, 2008).

Die unspezifischen Kerne erhalten ihren Input aus der Formatio reticularis, dem Hirnstamm, dem Hypothalamus, dem Globus pallidus und aus anderen Thalamuskerngebieten und sind über diffus im Kortex endende Efferenzen verbunden (SINOWATZ & HESS, 2006). Die unspezifischen Thalamuskerngebiete sind die Nuclei intralaminare (Bewusstseinszustand) und die Nuclei mediani (olfaktorisches und limbisches System) (ULFIG, 2008).

Assoziationskerne stehen mit anderen thalamischen Kerngebieten und über reziproke Fasern mit dem Assoziationskortex in Verbindung (SINOWATZ & HESS, 2006).

Der Thalamus spielt eine Schlüsselrolle im Schlaf-Wach-Rhythmus. Im Wachzustand beziehungsweise in Phasen gesteigerter Aufmerksamkeit zeigen thalamische Neurone durch Depolarisation ein tonisches Entladungsmuster von Aktionspotentialen, wodurch die Weiterleitung peripherer sensorischer Signale zum Kortex gewährleistet wird (MCCORMICK & BAL, 1997). Im schlafenden Zustand hingegen entsteht durch Hyperpolarisation des Membranpotentials ein sog. „Burstmuster“, also eine rhythmisch-oszillatorische Entladung von Aktionspotentialen, wodurch die Reaktion des Gehirns

auf ankommende sensorische Informationen reduziert wird (MCCORMICK & BAL, 1997). Endogene Oszillationen thalamokortikaler Schaltneurone entstehen durch einen spannungsabhängigen Kalziumstrom, der eine Depolarisation und somit den sog. „Burstmodus“ auslöst und einen durch Hyperpolarisation verursachten Kationenstrom, der eine langsame Depolarisation bedingt und dadurch die oszillatorische Aktivität als Schrittmacher reguliert (PAPE et al., 2005). Ausgelöst werden die beiden Entladungsmuster durch unterschiedliche Transmitterfreisetzung des aufsteigenden retikulären aktivierenden Hirnstammsystems (ARAS). Während Wachheit kommt es zu einer verstärkten Transmitterfreisetzung, welche die Depolarisation thalamischer Neurone und die Hemmung der oszillatorischen Aktivität verursacht (PAPE et al., 2005).

Im Elektroenzephalogramm (EEG) schlafender Individuen zeigt sich ein typisches niedrigfrequentes Muster mit Wellen hoher Amplitude, wobei hauptsächlich delta-Wellen während des „non-Rapid eye movement“ (nREM)-Schlafs und alpha- und theta-Wellen während des REM-Schlafs vorkommen (SCAMMELL et al., 2017). Die thalamokortikalen Aktivitätsmuster im Wach- und Schlafzustand sind in Abbildung 2 dargestellt.

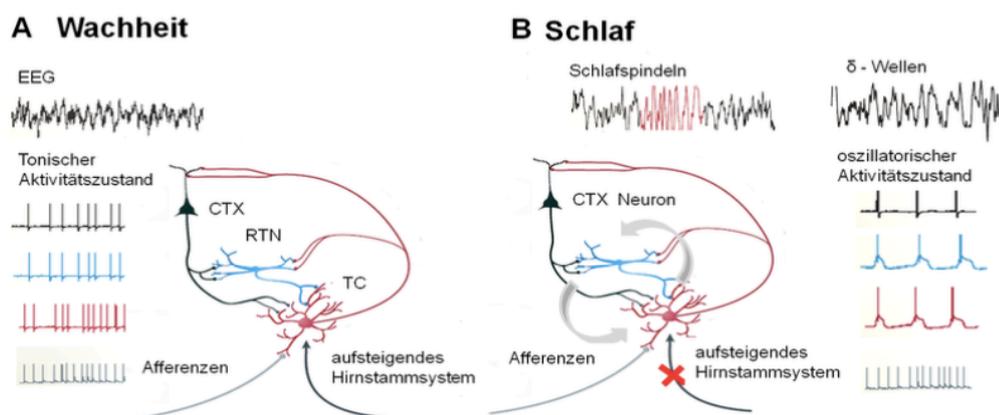


Abbildung 2: Thalamokortikale Aktivitätsmuster im Wach- und Schlafzustand.

A Im Wachzustand erhalten thalamokortikale Neurone (TC, rot) über die Afferenzen aus der Peripherie und über das aufsteigende Hirnstammssystem ein depolarisierendes Signal, welches in thalamokortikalen und RTN-Neuronen (blau) zur Ausbildung einzelner, aufeinanderfolgender Aktionspotentiale führt

(tonisches Feuermuster). Dies stellt die Weiterleitung sensorischer Information in den Kortex (CTX) sicher.

B Während des Schlafs wechseln thalamokortikale Schaltneurone durch Hyperpolarisation in den oszillatorischen Aktivitätszustand („Burstmodus“). Im EEG zeigen sich die für den Schlaf typischen δ -Wellen. In diesem Zustand ist die Signalweiterleitung in den Kortex blockiert. Beim Übergang vom wachen in den schlafenden Zustand zeigen sich im EEG die sog. Schlafspindeln (rot in der linken EEG Kurve dargestellt). Diese entstehen durch die Entladung einer Salve von Aktionspotentialen von einem thalamokortikalen Neuron auf ein RTN-Neuron, dieses wiederum sendet daraufhin ein postsynaptisches inhibitorisches Potential zurück auf das thalamokortikale Neuron. Durch erneute Hyperpolarisation und Entladung weiterer Aktionspotentialsalven entstehen intrathalamische Oszillationen.

Abbildung aus FRANKS (2008), übersetzt durch Verfasserin, mit freundlicher Genehmigung von Nature Publishing Group.

Die oben beschriebenen Mechanismen führten zur Bezeichnung des Thalamus als „Tor zum Bewusstsein“ (STERIADE & MCCARLEY, 2005).

Pathophysiologische Veränderungen dieser Rhythmogenese bedingen z. B. die Absence-Epilepsie, eine generalisierte Epilepsieform mit plötzlich auftretendem Bewusstseinsverlust (PAPE et al., 2005).

3.3. Aufbau des Kortex

Der Neokortex bildet die größte Hirnregion bei allen Säugetierspezies und ist Teil des Telencephalons. Er lässt sich beim Menschen in die sechs Lappen Lobus frontalis, parietalis, occipitalis, temporalis, limbicus und insularis untergliedern, welche sich jeweils in Windungen (Gyri) unterteilen und durch Furchen (Sulci) und Spalten (Fissuren) voneinander abgegrenzt werden (ULFIG, 2008). Histologisch besteht der Kortex aus sechs Schichten, die als Lamina I-VI (Lam. I–VI) bezeichnet werden, darin finden sich jeweils verschiedene Zelltypen (MOUNTCASTLE, 1997).

Mit ungefähr 70-80 % der neokortikalen Zellen bilden die exzitatorischen Pyramiden- und Sternzellen die Mehrheit (SOMOGYI et al., 1998; TOLEDO-RODRIGUEZ et al., 2003). Pyramidenzellen stellen die häufigste Zellart des Kortex dar (SOMOGYI et al., 1998; TOLEDO-RODRIGUEZ et al., 2003). Sie haben ein pyramidenförmiges Perikaryon und kommen hauptsächlich in Lam. II-VI vor. Es bestehen Verbindungen in andere Kortexbereiche und in andere Hirnregionen, somit bilden sie lokale Netzwerke im Kortex und sind ebenso Projektionsneurone (TOLEDO-RODRIGUEZ et al., 2003). Die zweite Gruppe exzitatorischer Zellen bilden die Sternzellen. Sie sind

Hauptbestandteil der Lam. IV (lamina granularis interna, innere Körnerschicht), weshalb sie auch häufig als Körnerzellen bezeichnet werden. Die letzte Gruppe von Neuronen bilden die inhibitorisch wirkenden Interneurone, sie stellen 20-30 % der Gesamtpopulation kortikaler Nervenzellen (TOLEDO-RODRIGUEZ et al., 2003). Es gibt verschiedene Arten von Interneuronen, die in unterschiedlichen Bereichen des Kortex ihre modulierende Wirkung auf die Reizweiterleitung und sensorische Informationsverarbeitung ausüben (MARKRAM et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden Neurone der Lam. IV abgeleitet. In Lam. IV liegen dicht gepackt viele kleine Neurone, die Verbindungen mit Zellen der Lam. III (lamina pyramidalis externa) und Lam. V (lamina pyramidalis interna) aufweisen. Ihre afferenten Eingänge erhalten die Neurone der Lamina IV im somatosensorischen Kortex hauptsächlich von thalamokortikalen Projektionsfasern aus den spezifischen Thalamuskernen (SINOWATZ & HESS, 2006).

3.4. Funktion des Kortex

Die Hauptaufgaben des Kortex sind die Verarbeitung sensorischer Informationen, die Planung und Koordination von Willkürbewegungen und Lautäußerung, sowie die Aufrechterhaltung des Bewusstseins, außerdem ist er Sitz des Gedächtnisses (POULET et al., 2012; ALLEN et al., 2017).

Nach der jeweiligen Funktion lässt sich der Kortex in folgende Bereiche einteilen: primär motorischer Kortex zur Bewegungsausführung, sekundär motorischer Kortex zur Bewegungsplanung, primärer visueller Kortex, Hörrinde bzw. sensorisches Sprachzentrum, motorisches Sprachzentrum, somatosensorischer Kortex und limbisches System (SINOWATZ & HESS, 2006).

Kortikale Hemmung wird über eine Reihe molekular verschiedener Typen GABAerger Neurone, den sogenannten Interneuronen, vermittelt (MOUNTCASTLE, 1997). Interneurone unterhalten wechselseitige Verbindungen zu anderen kortikalen Neuronen und sind somit Teil des kortikalen Netzwerks (ISAACSON & SCANZIANI, 2011).

3.5. Synaptische Verbindungen im thalamokortikalen Netzwerk

Thalamus und Kortex sind wechselseitig miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig. So sendet der Thalamus über thalamokortikale Schaltneurone Informationen zum Kortex und erhält über kortikothalamische Fasern Feedback in seine Kerngebiete (CRANDALL et al., 2015). Die Feedbackmechanismen sind hauptsächlich

verantwortlich für die zeitliche Synchronisation im thalamokortikalen Netzwerk während des Schlafs und führen zur oszillatorischen Aktivität der Neurone (PAPE et al., 2005) (siehe Kapitel II 3.2).

Die Verbindungen zwischen Thalamus und Kortex sind nicht gleichmäßig verteilt, so übersteigen kortikothalamische die Anzahl thalamokortikaler Fasern um das Zehnfache (SHERMAN & KOCH, 1986). Dies zeigt, dass der Kortex einen großen Einfluss auf die thalamische Aktivität und in der Folge auch auf seinen eigenen sensorischen Input hat (CRANDALL et al., 2015).

Die Modulation des thalamokortikalen Netzwerk ist abhängig von den Interaktionen und der Balance zwischen disynaptischer Feedforward-Hemmung und monosynaptischen exzitatorischen Vorgängen (CRANDALL et al., 2015). Der Thalamus sendet eingehende somatosensorische Informationen aus der Peripherie als exzitatorisches Signal weiter an den Kortex. Der Kortex wiederum ist für den Thalamus die Hauptquelle für exzitatorischen Input (CRANDALL et al., 2015), so erhalten thalamokortikale Neurone exzitatorischen Input auch aus den kortikothalamischen Neuronen der Lam. VI (BOURASSA et al., 1995). Doch der Thalamus wird durch den Kortex auch gehemmt, da kortikothalamische Neurone der Lam. VI GABAerge Zellen des RTN erregen (GOLSHANI et al., 2001; LAM & SHERMAN, 2010).

Im Thalamus selbst sind zudem Neurone des RTN zwischengeschaltet, die über kortikothalamische und thalamokortikale Axone mit beiden Hirngebieten verknüpft sind und über ihren Haupttransmitter GABA eine Hemmung der Relaisneurone vermitteln (COX et al., 1997).

Axone des Thalamus haben stärkere und höherfrequenzere Verbindungen zu hemmenden Interneuronen als zu erregenden Zellen (CRUIKSHANK et al., 2007). Dies ist nicht durch intrinsische Eigenschaften bedingt, sondern liegt an synaptischen Mechanismen (CRUIKSHANK et al., 2007).

Entscheidend bei der Generierung exzitatorischer oder inhibitorischer Signale ist die Frequenz der kortikothalamischen Aktivität. Während niedrigfrequenter kortikothalamischer Aktivität kommt es initial zu einer Erregung thalamischer Relaisneurone des VPM, welche von einer längerandauernden Hemmung gefolgt ist. Dies ergibt sich durch die robuste disynaptische Hemmung durch RTN Neurone, welche das relativ schwache monosynaptische exzitatorische kortikothalamische Signal überwiegt (CRANDALL et al., 2015). Bei hochfrequenter kortikothalamischer Aktivität

kommt es zu einer verstärkten, länger andauernden Erregung thalamischer Relaisneurone. Dies begründet sich in der Tatsache, dass bei hohen kortikalen Frequenzen der monosynaptische exzitatorische Input über NMDA-vermittelte Ströme verstärkt und der disynaptische hemmende Input durch die GABAerge Kurzzeitdepression der RTN Neurone reduziert wird (CRANDALL et al., 2015). Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des thalamokortikalen Netzwerks.

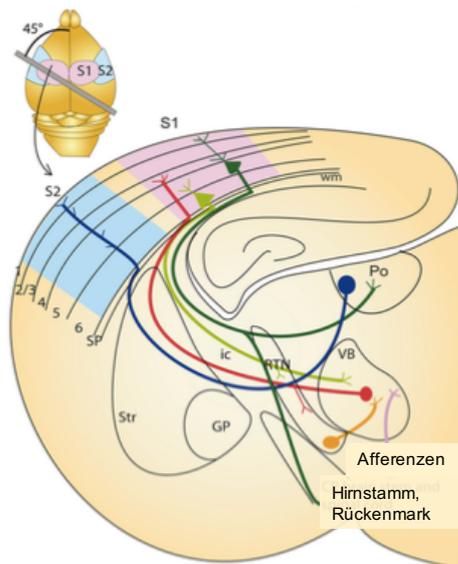


Abbildung 3: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Netzwerks.

S1 und S2 stehen für zwei verschiedene Schnittebenen, die hier zur Vereinfachung an einem Hirnschnitt dargestellt werden. Beispielhaft sind die Verbindungen zwischen Thalamus und Kortex des somatosensorischen Systems dargestellt. Im VB erhalten spezifische Kerne somatosensorische Information aus der Peripherie über aufsteigende Afferenzen (pink), der VB selbst projiziert Axone (rot) auf die Lam. IV des primären somatosensorischen Kortex. Neurone der Lam. VI wirken modulierend zurück (hellgrün) auf Neurone des VB. Neurone der Lam. V sind mit subzerebralen Strukturen und mit unspezifischen Kernen des Thalamus (z. B. posterior thalamic nucleus (Po)) (dunkelgrün) verbunden. Die unspezifischen Kerne projizieren daraufhin zurück auf kortikale Regionen, aus denen sie keinen Input erhalten haben (dunkelblau). Abbildung aus GRANT et al. (2012), übersetzt durch Verfasserin.

Eine Besonderheit des somatosensorischen Kortex der Nagetiere stellt der Barrel-Kortex dar. Dieser verarbeitet Informationen aus den Vibrissen, die den Tieren zur Orientierung und zur Exploration ihrer Umwelt dienen (WOOLSEY & VAN DER LOOS, 1970). Kontakt mit einer Vibrisse führt zu Aktionspotentialen in sensorischen

Neuronen des Trigeminalnerven, wodurch es zur Glutamatfreisetzung an einer ersten Synapse im Hirnstamm kommt (PETERSEN, 2007). Die sensorische Information wird weitergeleitet an den VPM des Thalamus, wo es durch eine zweite glutamaterge Synapse zur Erregung thalamokortikaler Neurone kommt, die auf den primären somatosensorischen Barrel-Kortex projizieren (PETERSEN, 2007). Die Anordnung der Vibrissen gleicht hierbei der Anordnung der Projektionsfelder des Barrel-Kortex in Lam. IV (WOOLSEY & VAN DER LOOS, 1970). Kortikothalamische Neurone der Lam. VI sind reziprok verbunden mit dem VPM und geben so Feedback zu eingehenden sensorischen Informationen aus dem Thalamus (PETERSEN, 2007).

3.6. Anästhesie, Bewusstsein und thalamokortikales Netzwerk

Dem thalamokortikalen Netzwerk wird eine große Rolle im Schlaf-Wach-Rhythmus, sowie allgemein bei der Aufrechterhaltung des Bewusstseins und somit auch dem Anästhetika-bedingten Bewusstseinsverlust zugeschrieben (MASHOUR & PAL, 2012).

Dabei werden zwei unterschiedliche Ansätze beschrieben, wie Anästhetika den Bewusstseinsverlust induzieren (MASHOUR & HUDETZ, 2017). Der sog. „Bottom-up“-Ansatz geht von subkortikalen Mechanismen aus, die, ähnlich wie im Schlaf-Wach-Rhythmus, auch bei der Narkose eine entscheidende Rolle spielen sollen (MASHOUR & HUDETZ, 2017). Beim „Top-Down“-Ansatz werden kortikale Vorgänge als Auslöser für den Bewusstseinsverlust gesehen (MASHOUR & HUDETZ, 2017). Wie die beiden Ansätze beim Anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust einzeln bzw. auch miteinander interagierend eine Rolle spielen, wird im Folgenden erläutert.

Die Hypothese des Thalamus als sog. Schalter des Bewusstseins (ALKIRE et al., 2000) beruht auf der Annahme, dass der Allgemeinanästhesie ähnliche Mechanismen zugrunde liegen wie während des natürlichen Schlafs (BAKER et al., 2014) („Bottom-Up“-Ansatz). Es wurde postuliert, dass Anästhetika eine Hyperpolarisation des Thalamus vermitteln, auf Grund der im „Burstmodus“ feuernden Thalamusneurone kommt es nachfolgend zu eingeschränkter Weiterleitung sensorischer Information in den Kortex (MASHOUR & ALKIRE, 2013).

Andere Studien beweisen die wichtige Rolle des Thalamus beim Wiedererlangen des Bewusstseins. So konnte bei Ratten die anästhesierende Wirkung von Sevofluran durch

intrathalamische cholinerge Stimulation mittels Nikotininjektion aufgehoben werden (ALKIRE et al., 2007). Der zentromediale Thalamus scheint lediglich eine wesentliche Rolle beim Wiedererlangen des Bewusstseins zu haben, da der Nikotinantagonist Mecamylamin nicht zur Veränderung der für den Bewusstseinsverlust notwendigen Sevoflurandosis führte (ALKIRE et al., 2007).

VELLY et al. (2007) kommen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass in erster Linie kortikale Vorgänge den Anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust vermitteln („Top-Down“-Ansatz). Durch die Reduktion der spontanen neuronalen Aktivität kortikaler Neurone kommt es zu einem Wegfall der depolarisierenden Wirkung der ausgeprägten kortikothalamischen Projektionen und in der Folge zu einer Beeinflussung der Hyperpolarisation des Thalamus (VELLY et al., 2007).

Die Tatsache, dass auch athalamische Tiere einen normalen Bewusstseinszustand zeigen, stellt die entscheidende Rolle des Thalamus bei der Aufrechterhaltung des Bewusstseins in Frage (FULLER et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Zusammenspiel aus Thalamus, Kortex und weiterer Hirnstrukturen, wie dem Hypothalamus und dem limbischen System, maßgeblich zur Vermittlung der Anästhesie beitragen und nur durch die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Hirnareale der Bewusstseinsverlust eintreten und aufrechterhalten werden kann.

Außerdem ist auch die Definition des Bewusstseinszustands wichtig für die Interpretation der Vorgänge im thalamokortikalen Netzwerk unter Anästhetika-Einfluss. Es muss zwischen der subjektiven bewussten Wahrnehmung (DEHAENE & CHANGEUX, 2011) und dem Grad der Wachheit unterschieden werden, d. h. wie aufmerksam und ansprechbar man in einem bestimmten Bewusstseinszustand ist, inwieweit z. B. eine zielgerichtete Reaktion auf Befehle oder das Öffnen der Augen möglich ist (MASHOUR & HUDETZ, 2017).

4. Optogenetik

4.1. Optische Stimulation zur Untersuchung neuronaler Strukturen

In der experimentellen Neurowissenschaft ist es üblich, die synaptische Transmission durch artifizielle Stimulation präsynaptischer Fasern mittels Stromimpulsen zu untersuchen. Bei der Messung von rezeptorvermittelten Strom- bzw. Spannungsantworten in größeren neuronalen Netzwerken werden allerdings sehr hohe Stimulationsenergien benötigt. Diese hohen Energien ziehen zum einen eine starke Artefaktbildung nach sich und zum anderen führen sie zu einer elektrothermischen Schädigung des zu untersuchenden Gewebes. Außerdem ist es bei der elektrischen Stimulation kaum möglich, nur bestimmte Hirnareale und spezifische Neurone anzuregen (REIN & DEUSSING, 2012). Demnach eignet sich diese herkömmliche Methode nur bedingt für die Betrachtung der Vorgänge in neuronalen Netzwerken.

Die optische Stimulation von neuronalen Strukturen ermöglicht dagegen eine weitaus höhere zeitliche und räumliche Auflösung. Zu Beginn wurden sogenannte „caged“-Substanzen, die durch eine Veresterung inaktiviert wurden und erst über die Fotostimulation mit einem Ultraviolett (UV)-Laser die aktive Substanz wieder freigeben, für optische Stimulationen verwendet. Dabei wird die Transmitterfreisetzung artifiziell herbeigeführt. Diese ist daher unabhängig von Mechanismen der Präsynapse. Somit können mit dieser Technik keine Rückschlüsse auf eventuelle präsynaptische Effekte eines Pharmakons gezogen werden. Durch die Lichtaktivierung erreicht man eine hohe Konzentration an Neurotransmittern im synaptischen Spalt, doch die räumliche Präzision ist bei dieser Methode sehr begrenzt (ADAMS & TSIEN, 1993).

In der vorliegenden Arbeit kommt die Methode der optogenetischen Stimulation zum Einsatz. Optogenetik bezeichnet die Kombination aus genetischen und optischen Verfahren, bei der genetisch kodierte fotosensitive Proteine gezielt eine spezifische Zelldepolarisation oder -hyperpolarisation erlauben (DEISSEROTH, 2011). Durch das Einbringen des lichtsensitiven Kanals Channelrhodopsin-2 (ChR2), z. B. in spezifische Neuronenpopulationen von Säugetieren, wird die Stimulation neuronaler Aktivität durch Licht ermöglicht. Dieser Kanal kommt in der Natur in der Grünalgenart *Chlamydomonas reinhardtii* vor (NAGEL et al., 2003). Da ChR2 genetisch kodierbar ist, können spezifische Promotoren und Enhancer eingesetzt werden, um den Kanal in bestimmten Zellen zu exprimieren. Durch die lichtsensitive Ionenpumpe Halorhodopsin

besteht die Möglichkeit, Neurone von Säugetieren gezielt zu hyperpolarisieren (ADAMANTIDIS et al., 2010).

Das Prinzip der Optogenetik ist in Abbildung 4 schematisch zusammengefasst.

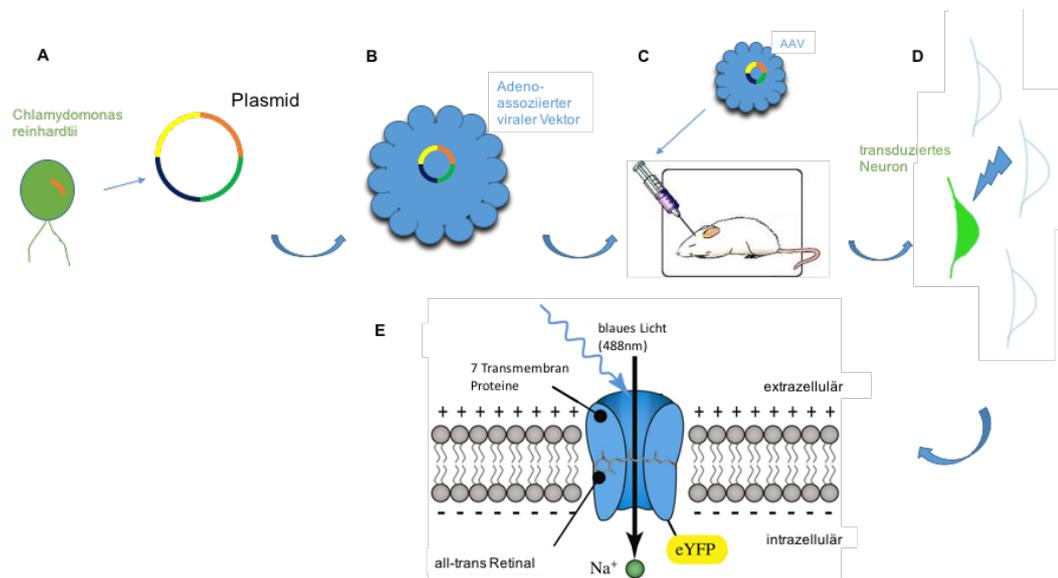


Abbildung 4: Expression des ChR2 in murinen Neuronen und optische Stimulation transduzierter Neurone.

A Die Geninformation für das ChR2 wird aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* in ein Plasmid eingebaut.

B Adenoassoziierter viraler Vektor mit Plasmid.

C Injektion des viralen Vektors in den Thalamus der Maus.

D und E In transduzierten Neuronen kann mithilfe eines blauen Lasers der licht-sensitive Kanal ChR2 aktiviert werden. Abbildung aus WONG et al. (2012), übersetzt durch Verfasserin, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

4.2. Channelrhodopsin-2 (ChR2)

ChR2 gehört zur Gruppe der mikrobiellen Rhodopsine und besteht aus sieben helicalen Transmembrandomänen. Als Chromophor dient Retinal, ein Vitamin-A-Derivat, welches in allen Säugetierzellen vorkommt (LI et al., 2005; ZHANG et al., 2006) und durch Photoisomerisierung von all-trans-Retinal zu 13-cis-Retinal umgewandelt wird (Abb. 5) (FENNO et al., 2011). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, der Kanal öffnet sich und wird für Kationen durchgängig (NAGEL et al., 2003). Durch den Kationeneinstrom kommt es zu einer Depolarisation der Zelle und

somit zur Auslösung eines Aktionspotentials. Die Funktion des ChR2 in Säugetierzellen ist also ohne die Zugabe eines Pharmakons möglich (WONG et al., 2012).

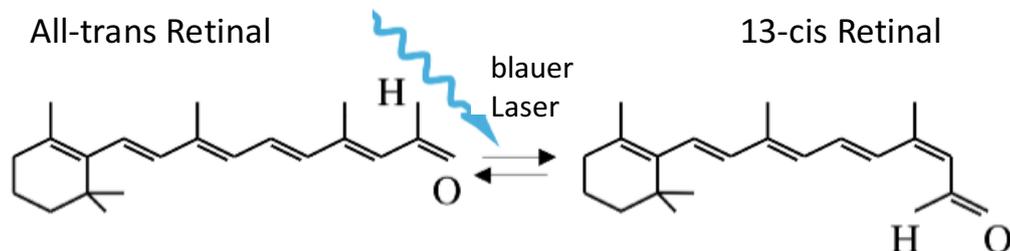


Abbildung 5: Photoisomerisierung von All-trans-Retinal zu 13-cis-Retinal.

Retinal kommt in allen Säugetierzellen vor und fungiert als Chromophor für ChR2.

Durch Stimulation mit Licht wandelt sich All-trans-Retinal zu 13-cis-Retinal um. Dies führt zur Konformationsänderung des Proteins, welche zur Kanalöffnung und einem unspezifischen Kationeneinstrom führt. Bei Dunkelheit wandelt sich das kovalent gebundene Retinal spontan zurück zu All-trans-Retinal um, wodurch sich der Kanal schließt und die Regeneration des Chromophors beginnt. Abbildung aus WONG et al. (2012), übersetzt durch Verfasserin, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

4.3. Adenoassoziierter viraler Vektor (AAV)

Zur Übertragung der genetischen Information für die Expression des ChR2 in murine Neurone dienen virale Vektoren. Viren können von Natur aus genetische Informationen in Wirtszellen integrieren. Diese Fähigkeit kann man sich in der Forschung zunutze machen, indem ein bestimmter Teil des Genoms eines Virus durch das gewünschte Plasmid ausgetauscht wird. Derartig modifizierte Viren werden rekombinante Viren genannt. Die neue DNA bzw. RNA wird in die Wirtszellen eingebracht, führt aber nicht zu Erkrankungen (MOCKENHAUPT & GRIMM, 2011). Neben lentoviralen Vektoren dienen, wie in der vorliegenden Arbeit, hauptsächlich Adenoassoziierte virale Vektoren als Genfähren. Das humane AAV wurde 1965 zufällig als Kontamination bei Adenovirus-Ansätzen entdeckt (ATCHISON et al.). Mit 22 nm ist es eines der kleinsten Viren mit einem nicht gefalteten ikosahedralen Kapsid und einer kristallinen Struktur (XIE et al., 2002). Das Virus wird dem Genus der Parvoviridae und der Familie der Dependoviren zugeordnet (GONCALVES, 2005). Es existieren mehrere Serotypen, die wegen ihrer speziellen Oberflächenproteine nur in bestimmten Zielzellen exprimieren

(WEINBERG et al., 2013). Die Seroprävalenz von AAV in der menschlichen Population ist hoch. So sind 80 % der Menschen seropositiv für AAV2, jedoch steht keine Erkrankung mit AAV in Zusammenhang (GONCALVES, 2005).

Bei intrazerebraler Injektion ruft AAV nur eine geringe Immunantwort hervor, was vor allem an der speziellen Struktur des neuronalen Immunsystems liegt. Dies bedingt sekundär, dass ein viraler Gentransfer in das ZNS über einen langen Zeitraum von 6-18 Monaten bestehen bleibt (PUNTEL et al., 2010).

5. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Sevofluran auf das thalamokortikale Netzwerk untersucht werden. Insbesondere soll geklärt werden, welchen Einfluss Sevofluran auf die synaptische Transmission zwischen den Hirnstrukturen Thalamus und Kortex hat. Das thalamokortikale Netzwerk spielt eine Schlüsselrolle im Schlaf-Wach-Rhythmus und im Rahmen der Anästhesie. Die genauen neuronalen Vorgänge, die im Rahmen der Narkose zu Bewusstseinsverlust führen, sind ungeklärt. Um in Zukunft die Allgemeinanästhesie *per se* und deren Überwachung zu verbessern, sind genaue Kenntnisse über diese Vorgänge essentiell.

Zur Untersuchung des neuronalen Netzwerks wird ein optogenetischer Ansatz verwendet. Diese Methode ermöglicht die räumlich und zeitlich präzise Stimulation bestimmter Neurone und neuronaler Netzwerke und umgeht die Probleme der herkömmlichen elektrischen Stimulation, die durch hohe Stimulationsenergien und große Artefaktbildung gekennzeichnet ist.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Eignet sich ein optogenetischer Ansatz zur Untersuchung neuronaler Netzwerke in Hinblick auf die Untersuchung der Wirkungsweise von Anästhetika und welche Vorteile ergeben sich aus dieser Methodik?
2. Welche Wirkung hat Sevofluran auf die Erregbarkeit ChR2-exprimierender thalamokortikaler Schaltneurone?
3. Welche Wirkung hat Sevofluran auf die thalamokortikale synaptische Transmission?
4. Welche Wirkung hat Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV?
5. Welche Wirkung hat Sevofluran auf die intrakortikale Signalverarbeitung?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Stereotaktische Injektion

Um neuronale Netzwerke durch Lichtpulse stimulieren zu können, müssen die Neurone den lichtsensitiven Kanal ChR2 exprimieren. Dazu wird mittels stereotaktischer Injektion eines viralen Vektors die Geninformation für das Kanal-Protein in das ZNS der Versuchstiere eingebracht.

1.1. Versuchstiere und Haltung

Alle Tierversuche dieses Promotionsvorhabens wurden im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsvorhabens mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-175-15 durchgeführt.

Weibliche Mäuse des Stammes C57Bl6/N wurden in einem Alter von drei Wochen und einem Mindestgewicht von zehn Gramm aus einer spezifisch pathogenfreien Zucht (Charles River Biopharmaceutical Services GmbH, Max-Planck-Straße 15a, 40699 Erkrath, Deutschland) bezogen und in spezifisch pathogenfreier Haltung mit offenen Käfigen (Makrolon Typ 3) untergebracht. Die Haltung erfolgte in Zweier- bis Vierergruppen. Im Raum herrschte eine Umgebungstemperatur von $21 \pm 2^\circ\text{C}$, die Luftfeuchte betrug $55 \pm 10\%$, mit einem Hell-/Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden. Einmal pro Woche erhielten die Tiere neue Käfige mit frischer Einstreu sowie frisches Wasser. Futter (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) stand *ad libitum* zur Verfügung. Zellstoff und Nestlets™ (Ancare, Bellmore, New York, USA), Nagehölzer und autoklaviertes Heu dienten den Tieren als Enrichment. Zusätzlich stand den Tieren pro Käfig ein Unterschlupf aus rotem Polycarbonat (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) zur Verfügung.

1.2. Adenoassoziierter viraler Vektor

Für die neuronale Expression des lichtsensitiven Kanals in Nervenzellen werden Überträger der genetischen Information benötigt. Als virale Vektoren dienten Adenoassozierte Viren, die kommerziell über das „Penn Vector Core“ (Penn Vector Core, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) bezogen wurden. Das mittels des Virus AAV1.hSyn.ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH eingebrachte Plasmid trägt, neben der genetischen Information für das ChR2, die Information für den

Fluoreszenzfarbstoff „enhanced yellow fluorescent protein“ (eYFP), der zur Kontrolle der erfolgreichen Expression dient. Als Promotor dient humanes Synapsin (hSyn), welches eine Transduktion ausschließlich in Neuronen veranlasst (Abb. 6). Die Viruspartikel sind nur zu einer Infektion fähig und nicht replikationsfähig, somit können sie sich nicht selbstständig im Gewebe ausbreiten.

Der virale Vektor wurde in Aliquots abgefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Um eine optimale Expression der Genprodukte zu erzielen, wurde die Substanz vor der Verwendung im Verhältnis 1:2 mit phosphatgepufferter Salzlösung (1 x PBS) verdünnt, für 30 Sekunden mit einem Vortex-Schüttelgerät (D-6012, NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland) gemischt und für fünf Minuten abzentrifugiert (Mikrozentrifuge, MiniStar silverline, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland).

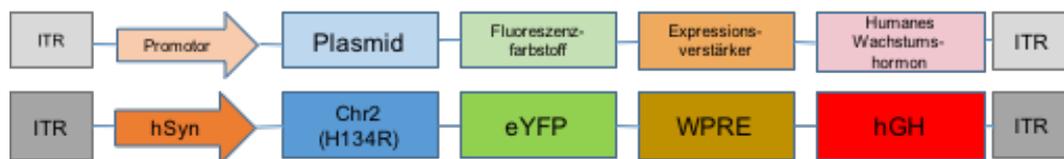


Abbildung 6: Schematische Darstellung des viralen Vektors AAV1.hSyn.ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH zur Übertragung der Geninformation für den lichtsensitiven Kanal ChR2.

Die einzelnen Bestandteile des viralen Vektors sind die „Inverted Terminal Repeat Sequence“ (ITR), eine sich wiederholende Nukleotidsequenz, der Promotor hSyn, der spezifisch für eine Expression in Neuronen ist, das Plasmid mit der Geninformation für Chr2, der Fluoreszenzfarbstoff eYFP, der Expressionsverstärker „Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element“ (WPRE), das humane Wachstumshormon (hGH) und abschließend nochmals eine ITR.

1.3. Intrathalamische Injektion

Als Prämedikation erhielten alle Tiere zehn Minuten vor Beginn der Narkose oral Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm 500mg/ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) in einer Dosis von 1 mg/kg. Zur Verhinderung einer Hypothermie wurde der Käfig seitlich von einer Rotlichtlampe bestrahlt. Zur Anästhesie wurde eine Triple-Anästhesie aus Midazolam (5mg/5ml Injektionslösung, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland; Dosis 0,5 mg/kg), Medetomidin (Sedator® 1mg/ml Injektionslösung, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande; Dosis 5 mg/kg) und Fentanyl

(Fentadon® 50 µg/ml, Eurovet Animal Health B.V, Bladel, Niederlande; Dosis 0,05 mg/kg) verwendet. Nach intraperitonealer Injektion wurde die Maus fünf bis sieben Minuten in einer abgedunkelten Box belassen. Nach Überprüfung der notwendigen Narkosetiefe mittels Reflextestung (Zwischenzehenreflex, Lidreflex) wurde das Operationsfeld geschoren und das Tier in einen stereotaktischen Rahmen (Precision Stereotaxic System for small laboratory animals, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) eingespannt. Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) diente zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur erfolgte die Lagerung während der Operation auf einem Wärmebett (Matte verbunden mit Wasserbad JULABO U3 Thermostatic Waterbath, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland). Ein Temperaturfühler (PL-120-T2, Voltcraft®, Conrad Electronics, Hirschau, Deutschland) diente zur Kontrolle der oberflächlichen Hauttemperatur.

Vor der Injektion des viralen Vektors wurde den Tiere 0,04 ml Mannit (Mannit-Lösung 20 %, SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland) intraperitoneal appliziert. Mannit sorgt für eine verbesserte Ausbreitung des Virus um den Injektionsbereich und somit für ein größeres Expressionsareal (MASTAKOV et al., 2001).

Die Haut am Schädel wurde nach Infiltration mit Lokalanästhetikum (Xylocain® 2 %; AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) durch einen 1-1,5 cm langen Schnitt eröffnet. Am Schädelknochen können die Orientierungspunkte Bregma und Lambda identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Knochennähte, die für die Injektion als Referenzpunkte dienen. Bregma bezeichnet den Schnittpunkt von Sutura sagittalis horizontalis und Sutura coronalis und diente als Nullpunkt für die Einstellung der Koordinaten der Injektionsstelle. Lambda, der Punkt, an dem sich Sutura sagittalis und Sutura lamboidea treffen, muss zur waagrechten Ausrichtung des Kopfes auf einer Höhe mit Bregma liegen. Dafür wurden mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens beide Punkte auf $Z = 0$ (Z: Tiefe) $\pm 0,02$ mm eingestellt.

Die Trepanation des Schädels erfolgte 1,75 mm posterior (X) und 1,2 mm lateral (Y) des Nullpunktes mithilfe eines Handbohrers (Labset-N, PAGOEN Werkzeugtechnik, REWATRONIK®-Products, Starnberg, Deutschland) und eines Hartmetallbohrkopfs (HM 71007, Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Deutschland).

Zur Injektion diente eine Mikroinjektionsspritze (NanofilTM Syringe, 10 µl, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), die mittels eines Mikromanipulators (Scientifica, P Pad Lite, East Sussex, UK) bewegt werden konnte. Um eine gleichmäßige Injektionsmenge und Geschwindigkeit sicherzustellen, erfolgte die Virusinjektion mit Hilfe einer Mikropumpe (UMP3 und Micro Syringe Pump Controller, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Die auf die Mikroinjektionsspritze aufgesetzte Injektionskanüle (NanoFilTM, NF34BV 34 GA. BEVELED NEEDLE, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) wurde durch die Bohrlochtrepanation langsam von der Schädeloberfläche 3,5 mm (Z) in die Tiefe gefahren. Nach einer fünfminütigen Wartezeit am Zielpunkt erfolgte die Injektion von 500 nl über einen Zeitraum von zehn Minuten. Nach der Injektion wurde die Spritze für weitere zehn Minuten an der Position belassen und daraufhin langsam nach oben aus dem Gewebe entfernt.

Die Wunde wurde anschließend mit Histoakrylkleber (Histoacryl®, B.Braun, Melsungen, Deutschland) verschlossen, zur Verminderung des Wundschmerzes erfolgte eine weitere subkutane Infiltration mit Lidocain (Xylocain® 2 %) (ca. 0,1 ml). Zum Erwachen wurde die Triple-Anästhesie durch subkutane Injektion von Atipamezol (Antisedan® 5mg/ml Injektionslösung, Elanco Animal Health, Bad Homburg, Deutschland; Dosis 2,5 mg/kg), Flumazenil (0,1 mg/ml Injektionslösung, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland; Dosis 0,5 mg/kg) und Naloxon (0,4 mg/ml Injektionslösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; Dosis 0,2 mg/kg) antagonisiert. In der Aufwachphase verblieben die Tiere in abgedunkelten und mit Sauerstoff gefluteten durchsichtigen Kunststoffboxen, die durch eine Rotlichtlampe erwärmt wurden.

In der postoperativen Erholungsphase wurde die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere kontrolliert. Nach vollständigem Erwachen wurden die Tiere mit ihren Partnertieren gemeinsam in einem Käfig zurück in den Tierhaltungsraum verbracht. In den ersten drei postoperativen Tagen erfolgte eine Analgesie mittels oraler Gaben von Meloxicam (Metacam® 1,5 mg/ml Suspension zum Eingeben, Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland; Dosis 1 mg/kg) alle zwölf Stunden.

2. Herstellung der vitalen Hirnschnittpräparate

2.1. Präparation der Hirnschnitte

Nach einer Wartezeit von zehn Tagen, die eine ausreichende Expression der Genprodukte gewährleistete, erfolgte die Dekapitation der Versuchstiere mittels einer Guillotine (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) in tiefer Isoflurananästhesie (Isofluran CP®; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland). Im Anschluss wurde das Gehirn atraumatisch in eisgekühlter (~ 4°C) artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) herauspräpariert. Diese wurde zur Schnittoxygenierung sowie zur Gewährleistung eines physiologischen pH-Wertes (pH 7,4) kontinuierlich mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) gesättigt.

Die aCSF ist in Bezug auf die Ionenzusammensetzung (Tab.1) dem physiologischen Liquor nachempfunden und dient als Puffermedium für das Gewebe. Um die Projektionsfasern vom ventrobasalen Kern des Thalamus zum Kortex zu erhalten, wurde eine gewinkelte Schnittführung nach AGMON und CONNORS (1991) angewendet. Das Gehirn wurde auf eine um zehn Grad geneigte Rampe platziert, um 55 Grad in Bezug zur sagittalen Mittellinie unter einer Rasierklinge rotiert und das rostrale Ende abgetrennt. Im Anschluss wurde es mit der Schnittfläche nach unten mit Histoakrylkleber auf einem Metallblock befestigt. Mit einem Vibratom (Microm HM 650V, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurden schließlich 350 µm dicke Schnitte angefertigt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der aCSF zur Präparation des Hirngewebes (pH = 7,4 durch Sättigung mit Carbogengas)

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)
KCl	58,44	2,5
NaHCO ₃	84,01	26
NaH ₂ PO ₄ -Monohydrat	137,99	1,25
Sucrose	342,3	220
D-(+) Glucose-Monohydrat	198,17	11

MgSO₄	120,37	10
CaCl₂-Dihydrat	147,01	0,5

Nach dem Anfertigen der Schnitte wurden diese in einem Aufbewahrungsgefäß, bestehend aus einem Becherglas, einer Haltevorrichtung, einem Netz und einem Deckel mit Filterkerze, 30 Minuten in einem 35°C warmen Wasserbad (JULABO ED Einhängethermostat, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland) aufbewahrt. Danach erfolgte eine Lagerung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Während der gesamten Zeit verblieben die Schnitte in Carbogen gesättigter aCSF, die sich in ihrer Zusammensetzung zur verwendeten Lösung während der Präparation in Bezug auf die Kalzium- sowie Magnesiumkonzentration unterscheidet (Tab.2).

Tabelle 2: Zusammensetzung der aCSF zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen (pH = 7,4 durch Sättigung mit Carbogengas)

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)
NaCl	58,44	126
NaHCO₃	84,01	26
NaH₂PO₄-Monohydrat	137,99	1,25
KCl	342,3	3
D-(+) Glucose-Monohydrat	198,17	10
MgSO₄	120,37	2
CaCl₂-Dihydrat	147,01	2

2.2. Fluoreszenzmikroskopie

Der Adenoassoziierte virale Vektor ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff eYFP gekoppelt. Dadurch kann die erfolgreiche Expression des ChR2 fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert werden.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Injektion wurden Schnitte am Kryotom (Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) (10 - 100 µm dick) und Vibratom (100 - 350 µm dick) angefertigt. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte im

Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z.1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Hierzu wurde der Fluoreszenz-Filtersatz Nr. 46 HE (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) und eine Belichtungszeit von 150 ms verwendet. Die Bilder wurden mit der Panoramafunktion der ZEN Software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) manuell zusammengesetzt, um ein Übersichtsbild des gesamten Hirnschnittes zu erhalten.

Zur Darstellung des fluoreszierenden Bereiches am Patch-Clamp-Messplatz diente ein Kalzium Imaging System mit der Software Live Acquisition (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland), einer Imaging Control Unit (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland), dem Polychrome V (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) als Lichtquelle und dem Fluoreszenzfilter Nr. 46 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Anregungswellenlänge betrug dabei 488 nm.

2.3. Infrarotvideomikroskopie

Die von DODT et al. (2002) erstbeschriebene Methode der Infrarotvideomikroskopie ermöglicht eine Verbesserung der Visualisierung von Neuronen in einem vitalen Hirnschnittpräparat. Durch die große Dichte von Neuronen kommt es zu einer starken Streuung des Lichts, welche durch Erhöhung der Wellenlänge und Kontrastverstärkung verringert werden kann. Um dies zu erreichen, wird zwischen Halogenlampe und Kondensator ein Interferenzfilter ($780 \pm 5\text{nm}$) platziert.

Die Mikroskopie der Hirnschnitte erfolgte im Durchlichtmikroskop (Axioscop FS, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit dem 60fach vergrößernden Wasser-Immersionobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland). Unter Zuhilfenahme einer infrarotsensitiven Videokamera (Digital Camera C11440, ORCA-flash4.0LT, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) konnte das Mikroskopiebild in Echtzeit auf einem Monitor visualisiert werden. In Abbildung 7 ist der Aufbau des Infrarotvideomikroskops schematisch dargestellt.

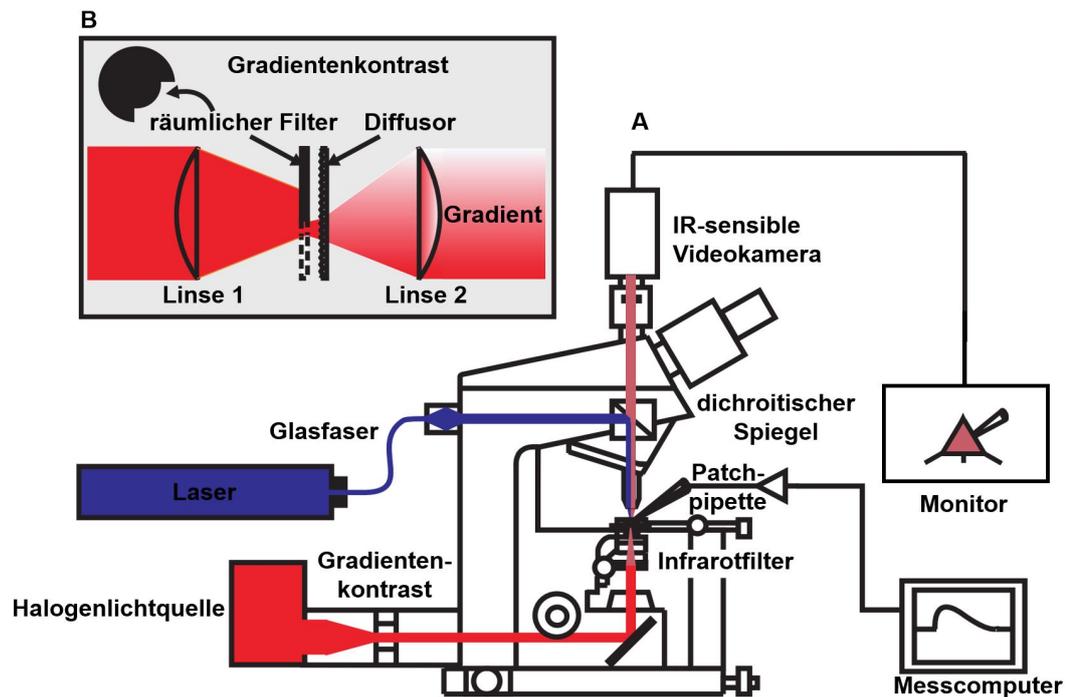


Abbildung 7: Versuchsaufbau des Infrarot (IR)-Videomikroskops.

A Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Zur besseren Visualisierung werden die Neurone mit der Infrarotvideomikroskopie dargestellt. Der Laserimpuls wird über ein Glasfaserkabel in das Mikroskop geleitet und durch einen dichroitischen Spiegel über das Objektiv auf das abgeleitete Neuron fokussiert.

B Prinzip des Gradientenkontrasts. Zur Minimierung des Streulichts dienen eine Viertelfeldbeleuchtung und ein nachgeschalteter Diffusor. Dadurch kann ein höherer Kontrast und eine größere Visualisierungstiefe erreicht werden. Abbildung verändert nach DODT et al. (2002).

3. Elektrophysiologie

3.1. Versuchsaufbau

Die Hirnschnitte wurden in der Ableitkammer mithilfe eines mit Nylonfäden bespannten Platindrahtes fixiert, um Strömungsbewegungen zu verringern, die durch die zirkulierende Perfusionslösung entstehen. Das Mikroskop, die Patch-Pipette sowie die Stimulationselektrode konnten durch motorisierte Mikromanipulatoren (SM7-Remote control system, Luigs & Neumann, Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) gesteuert werden. Zur Vibrationsdämpfung befand sich der elektrophysiologische Messstand auf einem druckluftbetriebenen Vibrations-Isolationstisch. Zur elektrischen Abschirmung diente ein Faradayscher Käfig. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 - 25°C) durchgeführt.

3.2. Einzelzellmessungen

Die elektrophysiologischen Messungen dieses Promotionsvorhabens erfolgten mittels der von NEHER und SAKMANN entwickelten Methode der Patch-Clamp-Technik (1976).

Mit dieser Methode wurden Messungen an thalamokortikalen sowie an kortikalen Neuronen durchgeführt. Da durch den engen Kontakt zwischen Pipette und Zellmembran ein hoher Abdichtungswiderstand, im Bereich von $G\Omega$ („giga-seal“), vorliegt, ergibt sich gegenüber der Messungen mit scharfer Mikroelektrode der Vorteil, auch kleinste Strom- bzw. Spannungsveränderungen darstellen zu können. Durch die sog. „Whole-Cell“-Konfiguration (Ganzzelleableitung) ist es zudem möglich die gesamte elektrische Aktivität einer Zelle zu messen (BLANTON et al., 1989). Über die Pipettenlösung können zudem verschiedene Substanzen intrazellulär eingebracht werden, durch die gezielt Ionenkanäle beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Messungen in der Ganzzelleableitung durchgeführt.

3.2.1. Pipetten

Die Pipetten für die Patch-Clamp-Messungen wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Innendurchmesser 1,17 mm, Außendurchmesser 1,5 mm; GB150EFT-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mithilfe eines Horizontal-Pipettenziehgeräts (DMZ Universal Electrode Puller, Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland) angefertigt und hitzepoliert. Die Pipettenöffnung konnte durch die Einstellung verschiedener Parameter auf circa 1 μm und somit der Gleichstromwiderstand der gefüllten Pipette auf 4 - 7 $M\Omega$ eingestellt werden. Die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung (IZ), mit der die Pipetten befüllt wurden, war an den jeweiligen Versuchsaufbau angepasst (Tab. 3 und 4). Zur Verhinderung von Stromantworten durch spannungsaktivierte Natriumkanäle, wurde der IZ in einigen Versuchsreihen der spezifische Natriumkanalantagonist Lidocain-Natrium-N-Ethylchlorid (5 mM) beigefügt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der „Standard“-IZ, pH = 7,25

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)
K-Glukonat	234,24	130
NaCl	58,44	5
MgCl ₂ -Hexahydrat	203,3	2
HEPES	238,3	10
EGTA	380,35	0,5
ATP-K	619,39	2
GTP Na	523,18	0,3

Tabelle 4: Zusammensetzung der IZ zur Messung der Miniatur inhibitorischen postsynaptischen Ströme, pH = 7,25

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)
Cäsiummethansulfonat	228,0	100
CsCl	168,36	60
EGTA	380,35	0,3
HEPES	238,3	10
Kreatinphosphat	327,14	20
Lidocain	298,85	5
MgCl ₂ -Hexahydrat	203,3	1

3.2.2. Etablierung der Ganzzelleableitung

Die Patch-Pipette war über einen chlorierten Silberdraht mit dem Patch-Clamp-Verstärker (SEC-10L, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) verbunden. Um das Eindringen von Verunreinigungen in die Pipettenspitze zu verhindern, wurde an die mit Intrazellulärlösung gefüllte Pipette Überdruck angelegt. Dies diente außerdem dazu, die Sichtverhältnisse in der Zellschicht des Schnittpräparats zu verbessern, da sich so die Zellen besser von umliegendem Gewebe abgrenzen. Unter Sichtkontrolle wurde die

Pipette vorsichtig dem Zellsoma genähert, kurz vor der Zellmembran wurde der Überdruck verringert (Abb. 8). Zusätzlich wurden vor Herstellung der Ganzzelleableitung evtl. auftretende Offsetpotentiale und das Übergangspotential („liquid junction“ Potential) korrigiert. Wenn die Pipettenspitze die Zellmembran leicht berührte, wurde der Überdruck komplett abgelassen und durch einen langsam ansteigenden Unterdruck die sog. „Cell-attached“-Konfiguration erzeugt. Durch einen kurzen, stärkeren Sog wurde dann die Zellmembran geöffnet und dadurch die Ganzzelleableitung („Whole-Cell“-Konfiguration) hergestellt. In der Ganzzelleableitung war die Pipette leitend mit dem Zellsoma verbunden.

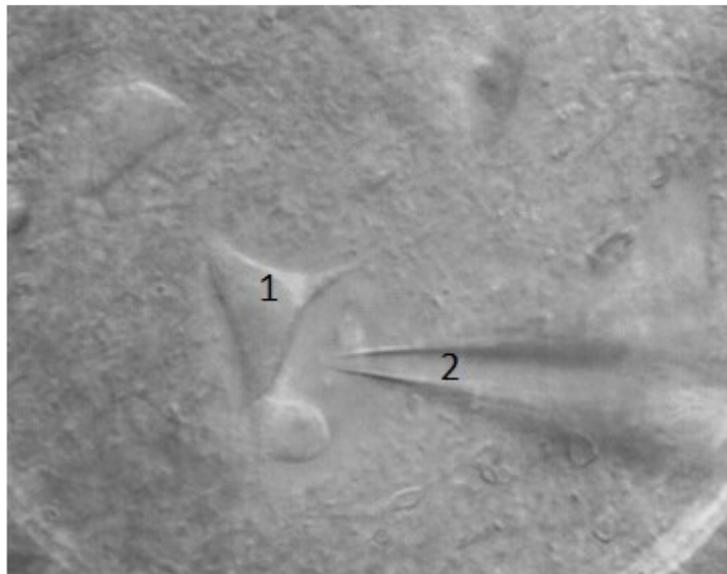


Abbildung 8: Infrarotvideomikroskopiebild eines akuten Hirnschnittpräparats.

Mithilfe des Infrarotvideomikroskops können Neurone in akuten Hirnschnittpräparaten dargestellt werden. Die Ganzzelleableitung wurde unter Sicht etabliert.

Ansicht der Zellebene mit vitalem thalamokortikalem Schaltneuron (1) und Patch-Pipette (2).

3.2.3. Charakterisierung der transduzierten Neurone

Zunächst erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung des abgeleiteten Neurons in der Ganzzelleableitung. Durch Analyse der spezifischen Eigenschaften thalamokortikaler Neurone konnte sichergestellt werden, dass sich durch die Expression des lichtsensitiven Kanals keine Veränderungen der intrinsischen Eigenschaften der Neurone ergeben.

Um die Funktionalität des lichtsensitiven Kanals zu überprüfen, wurden optische Stimulationen an thalamokortikalen Neuronen durchgeführt, die im fluoreszierenden Bereich lagen.

3.2.4. Optische Stimulation

Durch Lichtstimuli über einen continuous wave (CW) Laser (Spectra Physics Excelsior®One™ 488FC-70, Santa Clara, CA, USA), mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Pulslänge von 25 ms, konnte in den ChR2-exprimierenden thalamokortikalen Neuronen ein Kationeneinstrom durch Öffnung des Kanals hervorgerufen werden. Die Laserpulse wurden dabei über eine Glasfaser (FG200LEA, Patch Fiber Optic Cable, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) und das Objektiv des Mikroskops auf den Schnitt geleitet. Der Laser war über einen Computer mit der Steuerungssoftware Excelsior® One™ Controller (Newport Spectra physics GmbH, Stahnsdorf, Deutschland, Version 3.1.1) verbunden, mit der sich die Intensität der Laserpulse regulieren ließ (1 - 70 mW). Die durch den Laserpuls generierte Strom- bzw. Spannungsantwort wurde sowohl im „Current“- als auch im „Voltage-Clamp“-Modus aufgezeichnet. Die Ganzzelleableitungen kortikaler Neurone der Lamina IV erfolgten im „Current-Clamp“-Modus. Dabei wurden durch lichtinduzierte Transmitterfreisetzung aus thalamokortikalen Neuronen evozierte postsynaptische Potentiale (oPSP) abgeleitet.

3.2.5. Elektrische Stimulation

Zur elektrischen Stimulation dienten bipolare, konzentrische Stimulationselektroden aus Wolframdraht (WE2SNEX5-PT, Tungsten Concentric Electrodes, MICROPROBES, Gaithersburg, USA). Die Stimulationselektrode wurde unter Sicht mithilfe der Mikromanipulatoren vorsichtig auf den Schnitt gelegt, wobei sie auf die der Zelle vorgeschalteten Axone ausgerichtet wurde. Dadurch konnten diese überschwellig erregt werden und stimulierten somit über eine präsynaptische Transmitterfreisetzung das postsynaptisch abgeleitete Neuron. Die Stimulationsenergie (0,1 - 100 V) und -dauer (0,05 ms) konnten am Stimulus-Isolator (Stimulus-Isolator, Series-No. 2533, Digitimer Ltd., Hertfordshire, UK) voreingestellt werden. Das Auslösen des Stimulus selbst erfolgte Software-gesteuert über einen Analog-Digital-Wandler mit der Aufzeichnungssoftware HEKA Pulse (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland).

3.2.6. Miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme (mEPSC)/ Miniatur inhibitorische postsynaptische Ströme (mIPSC)

Unter Miniatur exzitatorischen postsynaptischen Strömen („miniature excitatory postsynaptic currents“; mEPSC) bzw. Miniatur inhibitorischen postsynaptischen Strömen („miniature inhibitory postsynaptic currents“; mIPSC) versteht man durch spontane Transmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Terminale hervorgerufene rezeptorvermittelte Ionenströme an der postsynaptischen Zelle. Eine Frequenzänderung der mEPSC/mIPSC würde auf eine veränderte Transmitterfreisetzung und somit auf einen präsynaptischen Effekt der untersuchten Substanz hindeuten, da sie eine reduzierte präsynaptische Transmitterfreisetzung aus den Vesikeln darstellt (QUEENAN et al., 2012). Im Gegensatz dazu würde eine Veränderung der Amplitude, der durch die Transmitterfreisetzung hervorgerufenen postsynaptischen Ströme, auf einen postsynaptischen Mechanismus hinweisen (QUEENAN et al., 2012).

Für die Messung der mIPSC wurde eine IZ mit anderer Zusammensetzung verwendet (Tab.4).

Um die Freisetzung von Transmittern durch spontane Aktionspotentiale zu verhindern wurden die Messungen der mIPSC unter Zugabe des spezifischen Natriumkanalantagonisten Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) aufgezeichnet. Zur Isolierung GABA_A-Rezeptor-vermittelter mIPSC wurden der aCSF außerdem der spezifische NMDA-Rezeptorantagonist AP-5 (50 μ M), der GABA_B-Rezeptorantagonist CGP (5 μ M) sowie der AMPA- und KA-Rezeptorantagonist NBQX (5 μ M) beigefügt. Das Haltepotential wurde bei den Aufzeichnungen auf -70 mV eingestellt. Die Messungen erfolgten im „Voltage-Clamp“-Modus.

4. Applikation des Anästhetikums Sevofluran

Zur Applikation des Anästhetikums Sevofluran wurde das Carbogengas im Sinne eines Trärgases zunächst durch einen für Sevofluran geeichten Vapor (Sevorane® ABBOTT, Sevoflurane Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) geleitet. Somit konnte das Carbogengas mit Sevofluran angereichert werden. Die Konzentration in der Gasphase konnte mittels des Handrades des Vapors eingestellt werden und wurde durch einen Anästhesiegasmonitor (Capnomac Ultima, Datex Ohmeda, Duisburg, Deutschland) überwacht.

Der Sevofluran-Vapor wurde dabei auf 3,2 Vol-% (im Folgenden als 3,2 % bezeichnet) eingestellt, dies entspricht bei der Spezies Maus einer MAC von 1,0 (ICHINOSE et al., 1998).

Um den Verlust von Sevofluran während der Zirkulation niedrig zu halten, wurden Schläuche aus Polytetrafluorethylen (PTFE-Chemieschlauch, RCT Reichelt Chemietechnik GmbH + Co., Heidelberg, Deutschland) verwendet.

5. Auswertung und Statistik

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente wurden die Messdaten der letzten fünf Minuten vor Beginn der Sevofluran-Sättigung auf 1,0 normalisiert und die Änderung der Amplitude bzw. der Fläche unter der Kurve („area under the curve“ (AUC)) zu diesem normalisierten Ausgangsniveau berechnet (relative Amplitude bzw. relative AUC).

Die Aufzeichnung der Stromantworten erfolgte mittels HEKA Pulse (HEKA Pulse, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland), die Auswertung der Daten mit Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA).

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Grafiken wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc, USA) durchgeführt.

Zur statistischen Analyse diente der Wilcoxon-Rangsummentest für nicht normalverteilte, abhängige Daten. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ festgelegt, worauf in den Grafiken durch Asterisken hingewiesen wird (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler („standard error of the mean“; SEM) angegeben.

IV. ERGEBNISSE

In diesem Promotionsprojekt wurde der Einfluss des Inhalationsanästhetikums Sevofluran auf das thalamokortikale Netzwerk untersucht. Die Stimulation des Netzwerks erfolgte mittels optogenetischer Methodik in akuten Hirnschnittpräparaten mit erhaltener thalamokortikaler Konnektivität. Nach stabilen Ausgangsbedingungen über mindestens 15 Minuten wurde bei den Experimenten die aCSF für 20 Minuten mit 3,2 % Sevofluran angereichert.

1. Kontrolle der ChR2-Expression in thalamokortikalen Schaltneuronen

Um zehn bis vierzehn Tage nach der Injektion des viralen Vektors die erfolgreiche Expression des ChR2 zu kontrollieren, wurden fixierte Hirnschnitte zunächst mit einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Zwei Wochen nach intrathalamischer Injektion des viralen Vektors erfolgte die Entnahme des Gehirns zur Herstellung von Gewebeschnitten mit einer Dicke von 100 - 350 μm . Die Schnitte wurden in einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Durch die gleichzeitige Expression von eYFP und ChR2 konnte das Expressionsgebiet des lichtsensitiven Ionenkanals durch Fluoreszenz in den entsprechenden Hirnregionen verifiziert werden (Abb. 9).

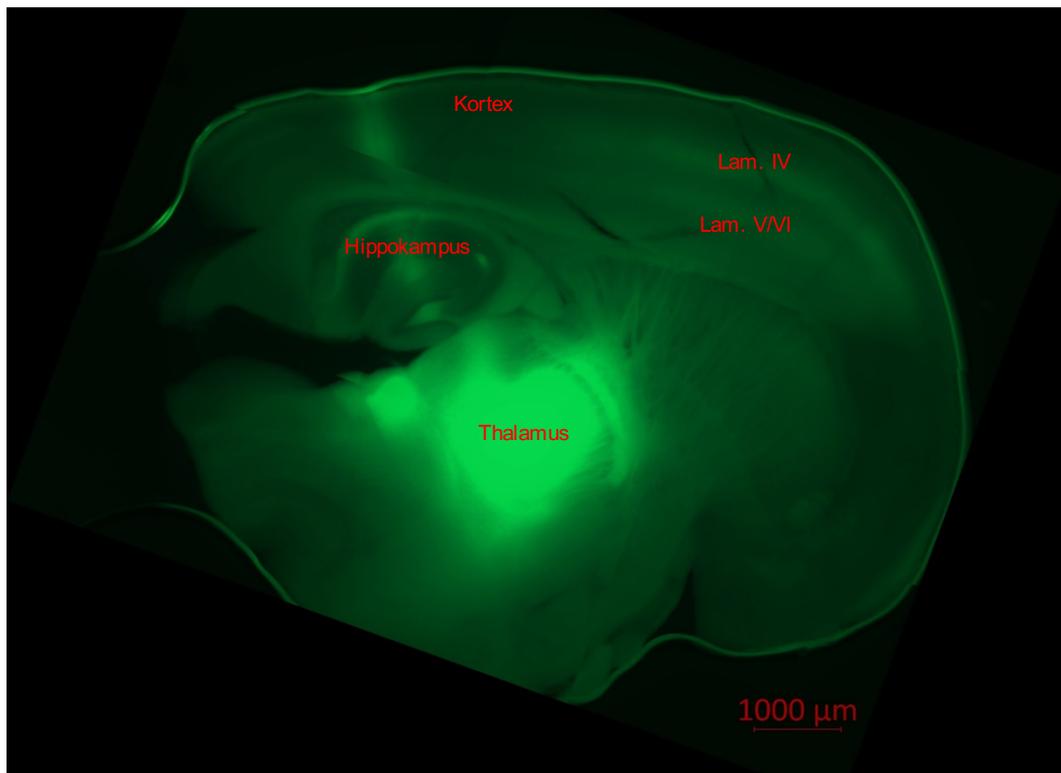


Abbildung 9: Die Injektion des Adenoassoziierten viralen Vektors führte zur ChR2-/eYFP-Expression in thalamokortikalen Schaltneuronen und ihren axonalen Projektionen im Kortex.

Drei Wochen alte C57Bl6/N Mäuse erhielten eine intrazerebrale Injektion von 500 nl AAV1.hSyn.ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH-Lösung in den ventrobasalen Thalamus.

Nach zehn bis vierzehn Tagen wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn entnommen. Mithilfe eines Vibratoms wurden – unter Erhaltung der thalamokortikalen Konnektivität (AGMON & CONNORS, 1991) – 350 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden zur Beurteilung am Mikroskop auf Objektträger aufgezogen. Mittels der Mikroskopiesoftware ZEN wurden Übersichtsaufnahmen des gesamten Hirnschnitts erstellt.

Mithilfe der Fluoreszenz ließ sich die genaue Lokalisation der ChR2-Expression nachvollziehen. Ein deutliches Fluoreszenzsignal mit Expression von ChR2 und eYFP fand sich im VB des Thalamus, in umliegendem Thalamusgewebe, in thalamokortikalen Axonen und in Dendriten der Lam. IV, V und VI des Kortex. Leichte Fluoreszenz zeigte sich im Kortex und Hippokampus im Bereich des Stichkanals. Im Kortex selbst ließen sich keine transduzierten Zellen finden, da der virale Vektor nicht zu einer retrograden Infektion fähig ist. Lediglich die thalamischen Terminale im Kortex zeigten sich ebenfalls fluoreszenzmarkiert.

2. Ganzzelleableitungen thalamokortikaler Schaltneurone

Zunächst erfolgten in thalamokortikalen Schaltneuronen Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzelleableitung. Als Intrazellulärlösung diente die unter Kapitel III 3.2.1 beschriebene „Standard“-IZ, alle Messungen wurden im sog. „Current-clamp“-Modus durchgeführt.

2.1. Elektrophysiologische Charakterisierung thalamokortikaler Schaltneurone

Um die Vitalität der thalamokortikalen Neurone nach Infektion durch den viralen Vektor und Expression des ChR2 zu kontrollieren, wurden zunächst die charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften thalamokortikaler Neurone evaluiert. Dazu wurden Ganzzelleableitungen thalamokortikaler Neurone im fluoreszenzmarkierten Bereich des VB durchgeführt. Die Charakterisierung erfolgte durch Applikation hyperpolarisierender Strompulse. Diese führen zunächst zur Membranhyperpolarisation, anschließend entsteht ein einwärts-gerichteter depolarisierender Strom, der nach Ende der Stromapplikation zu einer Salve von Aktionspotentialen führt. Diese durch „hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated“ (HCN)- Kanäle vermittelten elektrophysiologischen Charakteristika thalamokortikaler Neurone werden als „voltage sag“ (auch „depolarising sag“), und „rebound burst“ bezeichnet, auf die eine Nachdepolarisation folgt (YING & GOLDSTEIN, 2005) (Abb. 10 A).

Wie in Kapitel I 3.2 beschrieben, zeigen thalamokortikale Schaltneurone in Abhängigkeit vom Membranpotential verschiedene Aktivitätszustände. Ein depolarisierender Strompuls löst je nach Ausgangs-Membranpotential der Zelle unterschiedliche Aktivitätszustände aus. Bei eher depolarisierten Membranpotentialen werden einzelne aufeinander folgende Aktionspotentiale generiert (tonischer Modus), bei hyperpolarisierten Membranpotentialen werden Salven von Aktionspotentialen ausgelöst („Burstmodus“) (MCCORMICK & BAL, 1997) (Abb. 10 B & C).

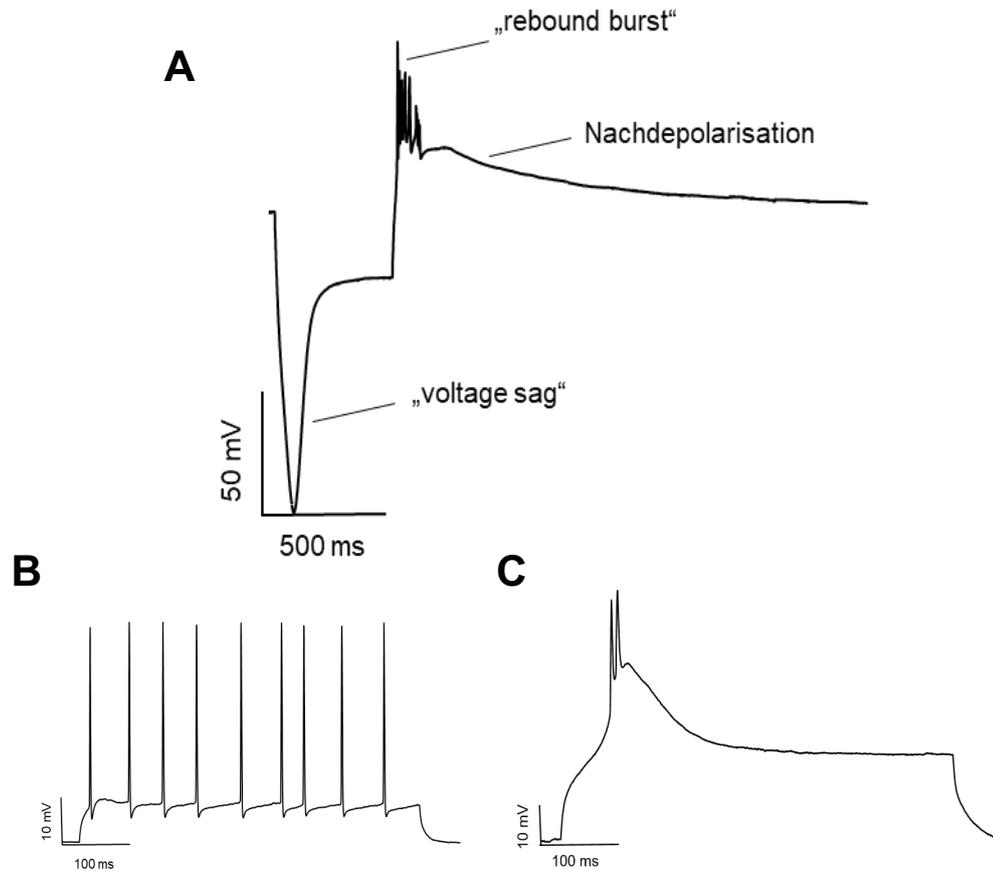


Abbildung 10: Typische elektrophysiologische Eigenschaften thalamokortikaler Schaltneurone nach Injektion des viralen Vektors zur Expression von Chr2.

Zwei Wochen nach Injektion des viralen Vektors erfolgte die atraumatische Organentnahme und Anfertigung 350 μm dicker vitaler Hirnschnitte mit erhaltener thalamokortikaler Konnektivität. Es erfolgten Ganzzelleitungen thalamokortikaler Schaltneurone im Zielgebiet der Injektion (VB), welches durch den Farbstoff eYFP als fluoreszenzmarkierter Bereich des Thalamus zu erkennen war.

Dargestellt sind repräsentative Originalspuren einzelner Messungen.

A Über die Applikation eines hyperpolarisierenden Strompulses erfolgte die Charakterisierung der thalamokortikalen Schaltneurone, typische elektrophysiologische Merkmale sind die Aktivierung eines Kationen-Einwärtsstroms („voltage sag“), der „rebound burst“ und die Nachdepolarisation.

B Depolarisierte Neurone (Membranpotential bei -50 mV) reagieren auf einen depolarisierenden Strompuls mit einzelnen Aktionspotentialen, sie befinden sich im sog. tonischen Aktivitätszustand.

C Hyperpolarisierte Neurone (Membranpotential bei -70 mV) zeigen nach Applikation eines depolarisierenden Strompulses die Entladung von Aktionspotential-Salven und befinden sich im sog. „Burstmodus“.

2.2. Der Einfluss von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit und passive Membraneigenschaften thalamokortikaler Schaltneurone

Zur Beurteilung, welchen Einfluss Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit und passiven Membraneigenschaften thalamokortikaler Neurone hat, wurden Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzelleableitung durchgeführt. Als Parameter für die Erregbarkeit von Neuronen dienten die Potentialschwelle, bei der das erste Aktionspotential auftritt, die Frequenz der hervorgerufenen Aktionspotentiale, die Änderung des Membranpotentials in Abhängigkeit von Strominjektionen und zur Erfassung der passiven Membraneigenschaften das RMP. Sevofluran hatte keinen Einfluss auf die Strom-Spannungsbeziehungen der Neurone (Abb. 11 A) und auf das RMP (Abb. 11 B). Die Potentialschwelle, bei der zum ersten Mal ein Aktionspotential generiert wurde, war durch Sevofluran in stärker depolarisierte Bereiche verschoben (Abb. 11 C). Die Frequenz der evozierten Aktionspotentiale war durch Sevofluran signifikant verringert (Abb. 11 D).

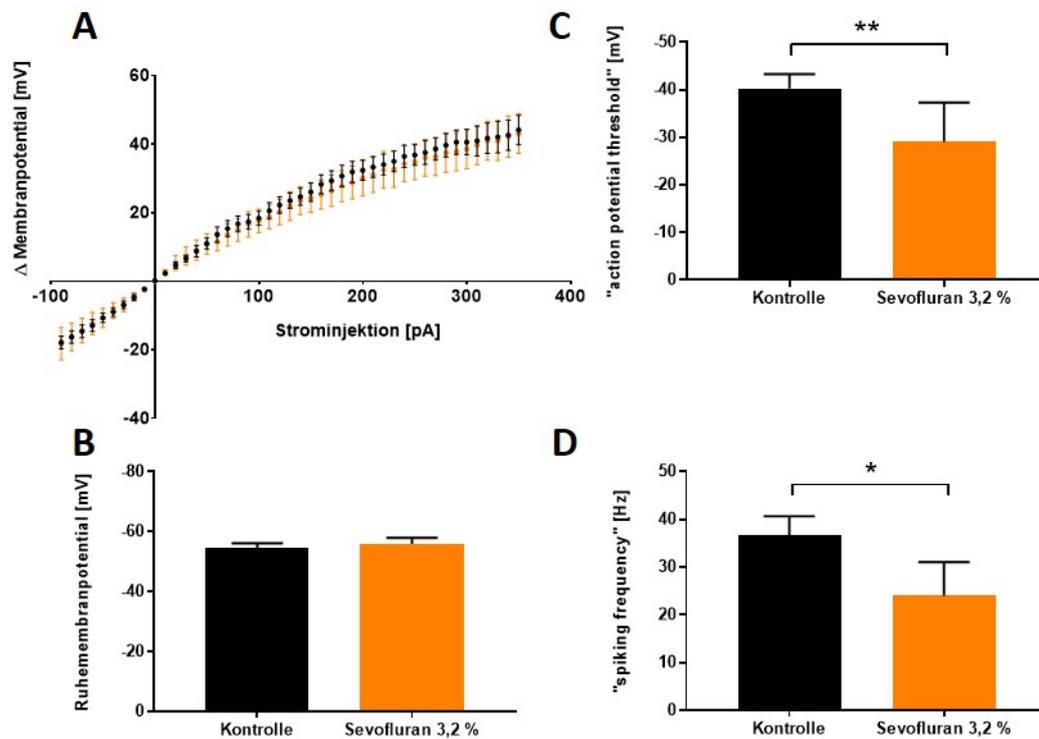


Abbildung 11: Sevofluran verringerte die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone bei gleichbleibenden passiven Membraneigenschaften.

Mithilfe der Messung der Strom-Spannungsbeziehungen wurde der Einfluss von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone erfasst. Dabei wurden in einem Abstand von 2 s Strompulse mit einer Pulslänge von 500 ms und einer Stromstärke von -90 pA bis +350 pA (Δ 10 pA) appliziert.

Die Punkte bzw. Balken in den Grafiken geben die Werte unter Kontrollbedingungen (schwarze Symbole) und nach 20 Minuten Sevofluran-Einwaschphase (3,2 %, orange Symbole) wieder.

A Sevofluran zeigte keinen Einfluss auf die Membranpotential-Änderung (Δ Membranpotential (mV)) in Abhängigkeit von der Strominjektion (pA) (n = 8).

B Sevofluran zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das RMP der abgeleiteten thalamokortikalen Neurone ($-54,7 \pm 1,4$ mV unter Kontrollbedingungen, $-56,0 \pm 2,0$ mV nach Sevofluran-Sättigung; n = 8, p = 0,461).

C Die Schwelle, bei der zum ersten Mal ein Aktionspotential generiert wurde („action potential threshold“), wurde durch Sevofluran von $-40,2 \pm 3,0$ mV auf $-29,1 \pm 8,3$ mV signifikant verschoben (n = 8, p = 0,008).

D Die Frequenz der evozierten Aktionspotentiale („spiking frequency“) wurde durch Sevofluran von $36,7 \pm 4,0$ Hz auf $24,0 \pm 7,0$ Hz (n = 7, p = 0,030) signifikant reduziert.

* bedeutet p < 0,05, ** bedeutet p < 0,01.

2.3. Der Einfluss von Sevofluran auf optogenetisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (oPSP) in thalamokortikalen Schaltneuronen

In dieser Messreihe wurde an thalamokortikalen Schaltneuronen mittels optischer Stimulation die Funktion des exprimierten ChR2 überprüft und im Anschluss der Einfluss von Sevofluran auf die optogenetisch-evozierten Summenpotentiale gemessen. Sevofluran verringerte sowohl die relative Amplitude (Abb.12 A & C), als auch die relative Fläche unter der Kurve (AUC) (Abb. 12 B & C) des oPSP.

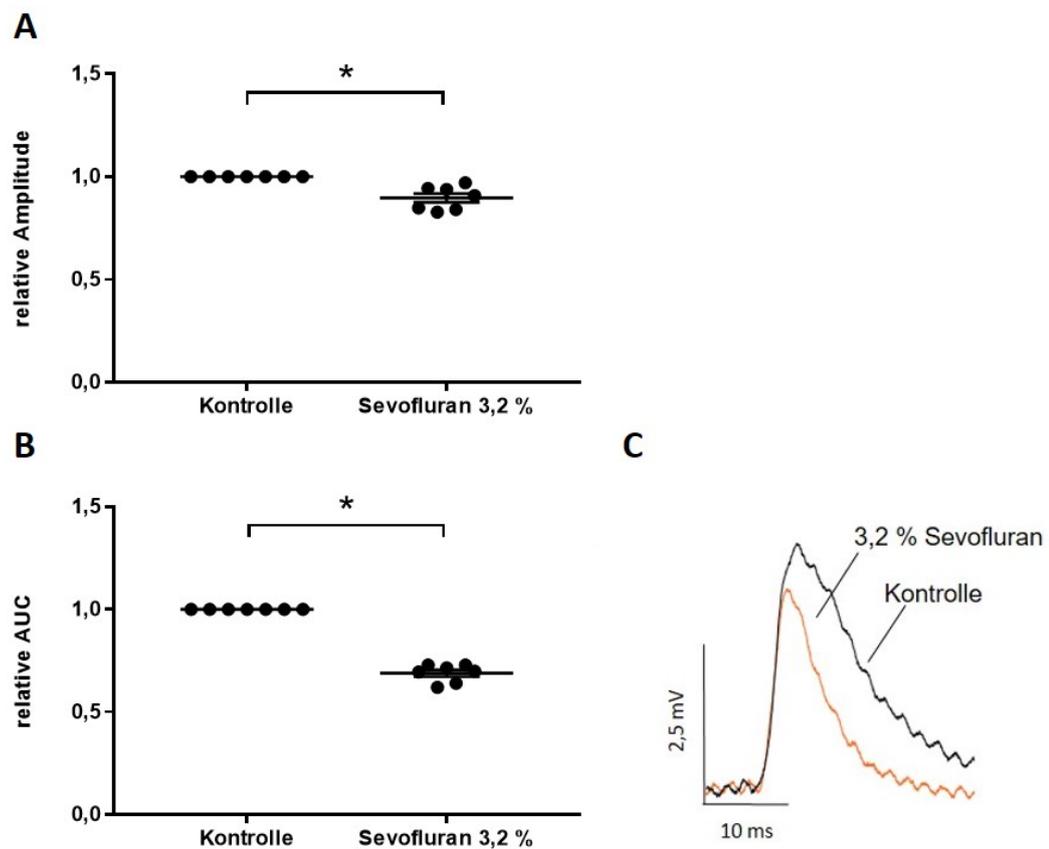


Abbildung 12: Sevofluran reduzierte oPSP in thalamokortikalen Schaltneuronen.

In ChR2-exprimierenden thalamokortikalen Schaltneuronen wurden nach Stimulation mit einem Laser (488 nm Wellenlänge, Pulslänge 25 ms) optogenetisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (oPSP) abgeleitet. * bedeutet $p < 0,05$.

A Die relative Amplitude der oPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $89,7 \pm 2,2 \%$ ($n = 7$, $p = 0,016$) des Ausgangsniveaus reduziert.

B Die relative Fläche unter der Kurve (AUC) der oPSP verkleinerte sich unter Sevofluran signifikant auf $68,2 \pm 1,5 \%$ ($n = 7$, $p = 0,016$).

C Repräsentatives oPSP eines Experiments.

3. Ganzzelleableitungen kortikaler Neurone der Lam. IV

Der Einfluss von Sevofluran auf die thalamokortikale synaptische Transmission sowie die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV erfolgte mittels Patch-Clamp-Messungen.

3.1. Der Einfluss von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV

Zunächst wurde die Auswirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit und die passiven Membraneigenschaften kortikaler Neurone der Lam. IV untersucht. Sevofluran hatte keinen Einfluss auf die Strom-Spannungsbeziehungen kortikaler Neurone (Abb. 12 A) und auf das RMP (Abb. 12 B). Die Potentialschwelle, bei der zum ersten Mal ein Aktionspotential generiert wurde, war durch Sevofluran signifikant in stärker depolarisierte Bereiche verschoben (Abb. 12 C). Die Frequenz der evozierten Aktionspotentiale war durch Sevofluran signifikant reduziert (Abb. 12 D).

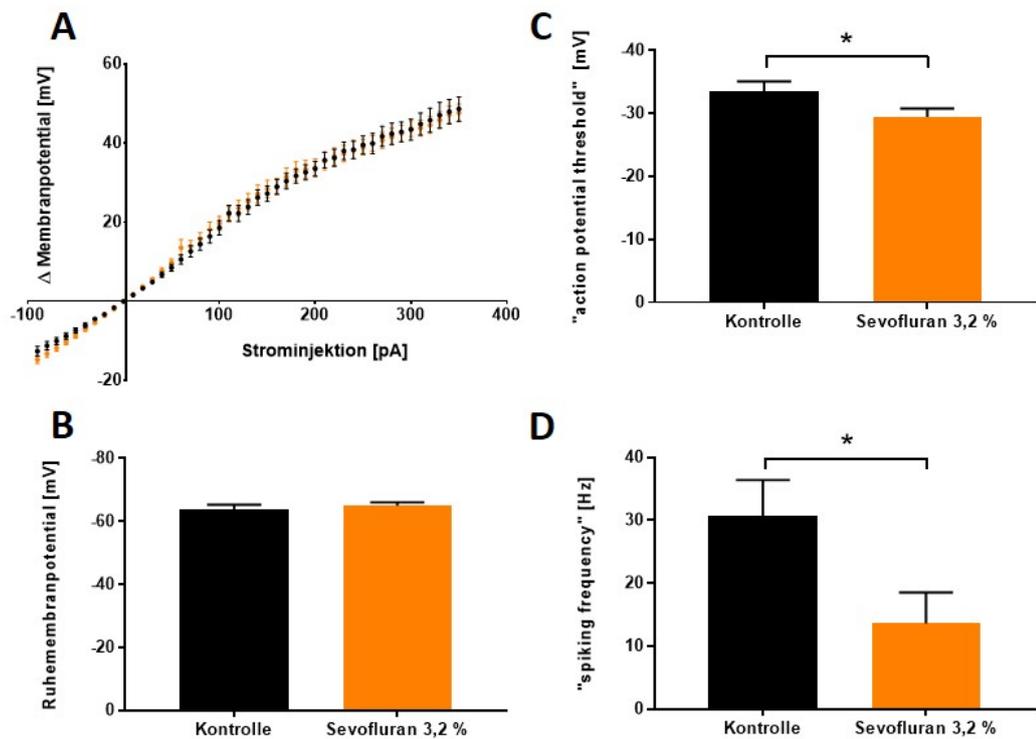


Abbildung 12: Sevofluran reduzierte die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV bei gleichbleibenden passiven Membraneigenschaften.

A Sevofluran hatte keinen Einfluss auf die Membranpotential-Änderung (Δ Membranpotential (mV)) in Abhängigkeit von der Strominjektion (pA) ($n = 13$).

B Sevofluran hatte keinen Einfluss auf das RMP der abgeleiteten kortikalen Neurone ($-63,5 \pm 1,3$ mV unter Kontrollbedingungen, $-65 \pm 0,7$ mV nach Sevofluran-Sättigung; $n = 13$, $p = 0,156$).

C Die Membranpotentialschwelle, bei der zum ersten Mal ein Aktionspotential generiert wurde („action potential threshold“), wurde durch Sevofluran von $-33,6 \pm 1,4$ mV auf $-29,4 \pm 1,4$ mV ($n = 13$, $p = 0,022$) signifikant verschoben.

D Die Frequenz der evozierten Aktionspotentiale („spiking frequency“) wurde durch Sevofluran von $30,5 \pm 5,6$ Hz auf $13,6 \pm 1,1$ Hz ($n = 13$, $p = 0,013$) signifikant reduziert.

* bedeutet $p < 0,05$.

3.2. Optogenetische Stimulation kortikaler Neurone der Lam. IV

3.2.1. Der Einfluss von Sevofluran auf optogenetisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (oPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV

Um die Wirkung von Sevofluran auf die synaptische Transmission des thalamokortikalen Netzwerks zu untersuchen, erfolgte die optische Stimulation ChR2-exprimierender thalamokortikaler Schaltneurone. Dies führte zu optogenetisch-evozierten postsynaptischen Summenpotentialen (oPSP) in Kortexneuronen der Lam. IV. Zunächst wurde die basale synaptische Transmission unter Kontrollbedingungen und unter Sevofluran erfasst, in den weiteren Messreihen wurden der aCSF zur Isolierung der verschiedenen Rezeptor-vermittelten Ströme spezifische Antagonisten zugegeben.

Sevofluran bewirkte eine signifikante Vergrößerung der relativen Amplitude (Abb. 13 A & B) und der relativen AUC (Abb. 13 B & C) der oPSP.

Die Zugabe des spezifischen Natriumkanal-Antagonisten Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) eliminierte die, durch optogenetische Stimulation thalamokortikaler Neurone, in kortikalen Neuronen generierten Summenpotentiale (Abb. 13 D).

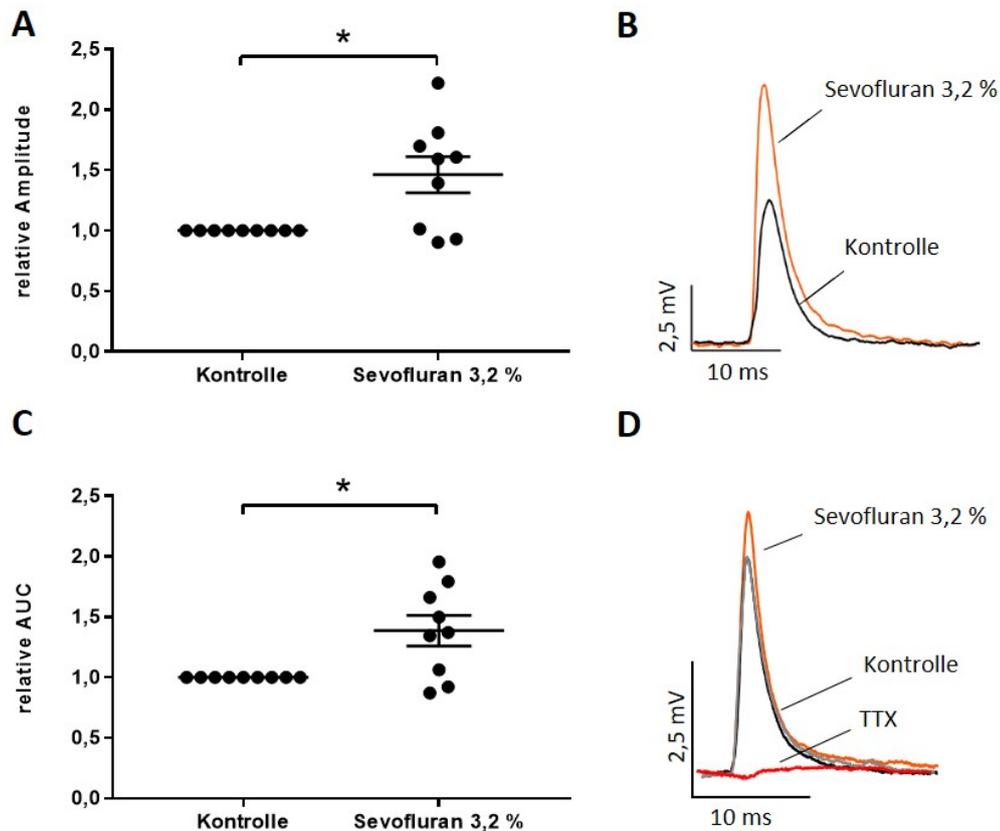


Abbildung 13: Durch Sevofluran wurden optogenetisch-evozierte Summenpotentiale in kortikalen Neuronen der Lam. IV verstärkt.

In kortikalen Neuronen der Lam. IV wurden optogenetisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (oPSP), die durch lichtinduzierte Transmitterfreisetzung ChR2-expressierender thalamokortikaler Schaltneurone generiert wurden, untersucht.

A Die relative Amplitude der oPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $146,3 \pm 14,9 \%$ ($n = 9$, $p = 0,018$) des Ausgangsniveaus erhöht.

B Repräsentatives oPSP eines Experiments.

C Die relative AUC der oPSP zeigte durch Sevofluran eine signifikante Vergrößerung auf $138,7 \pm 12,6 \%$ ($n = 9$, $p = 0,018$).

D Durch Zugabe von TTX (rot) wurde das oPSP eliminiert, dargestellt ist das repräsentative oPSP eines Experiments vor und nach TTX-Zugabe.

* bedeutet $p < 0,05$.

3.2.2. Der Einfluss von Sevofluran auf optogenetisch-evozierte exzitatorische Summenpotentiale (oEPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV

Um die Wirkung von Sevofluran ohne den Einfluss der GABAergen inhibitorischen synaptischen Transmission zu untersuchen, wurden die Messungen aus Kapitel IV 3.2.1 in Anwesenheit des spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μ M) wiederholt. Unter diesen Bedingungen reduzierte Sevofluran die relative Amplitude (Abb. 14 A) und die relative AUC (Abb. 14 B) der oEPSP signifikant.

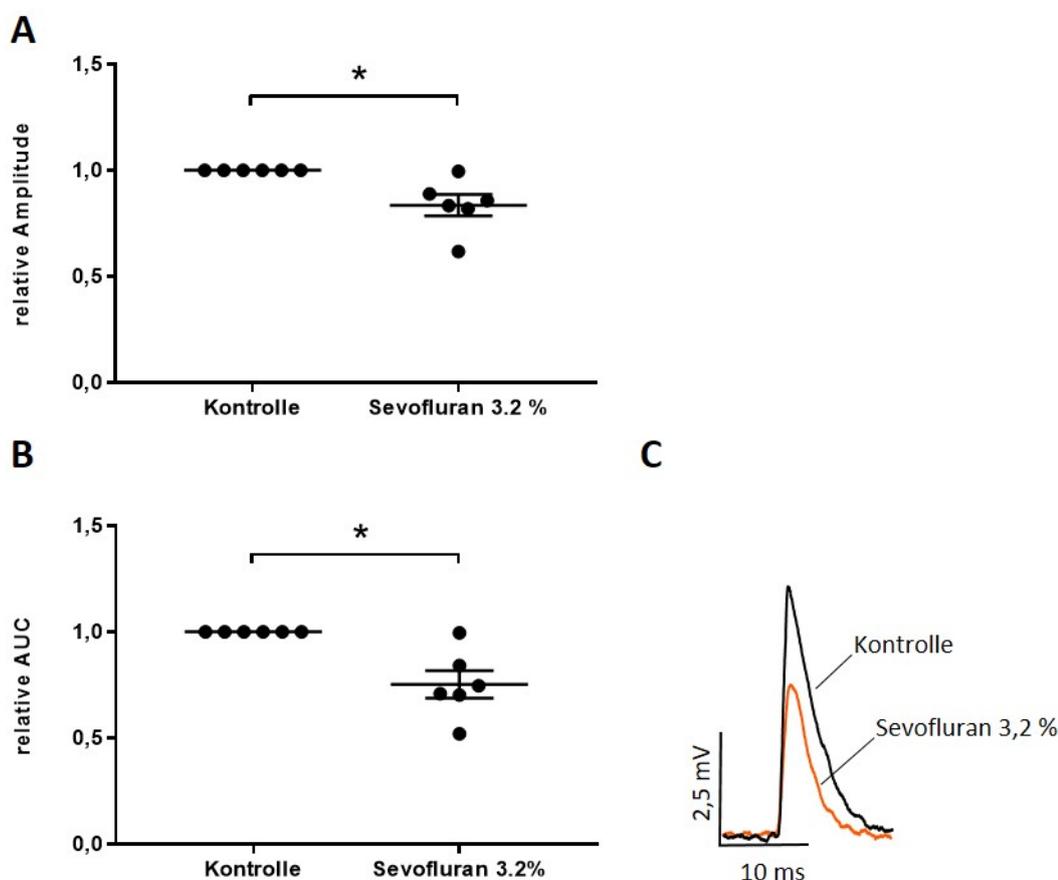


Abbildung 14: Sevofluran bewirkte eine Verkleinerung der relativen Amplitude und relativen AUC der exzitatorischen Komponente des optogenetisch-evozierten Summenpotentials in kortikalen Neuronen der Lam. IV.

Die unter Kapitel IV 3.2.1 beschriebenen Experimente wurden in Anwesenheit des spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μ M) wiederholt, um die inhibitorischen GABAergen Anteile der Potentiale zu blockieren und die exzitatorischen Anteile zu isolieren.

A Die relative Amplitude der oEPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $83,6 \pm 5,1$ % ($n = 6$, $p = 0,030$) reduziert.

B Die relative AUC der oEPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $75,3 \pm 6,5$ % (n=6, p=0,030) reduziert.

C Repräsentatives oEPSP eines Experiments.

* bedeutet $p < 0,05$.

3.2.3. Der Einfluss von Sevofluran auf AMPA-Rezeptor-vermittelte oEPSP kortikaler Neurone der Lam. IV

Um den Einfluss von Sevofluran auf die AMPA-Rezeptor-vermittelte exzitatorische synaptische Transmission isoliert zu untersuchen, wurden die in Kapitel IV 3.2.1 beschriebenen Experimente in Anwesenheit des NMDA-Rezeptorantagonisten AP-5 (50 μM) und des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μM) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen reduzierte Sevofluran die relative AUC (Abb. 15 B & C) der oEPSP, jedoch nicht die relative Amplitude (Abb. 15 A & C) der oEPSP.

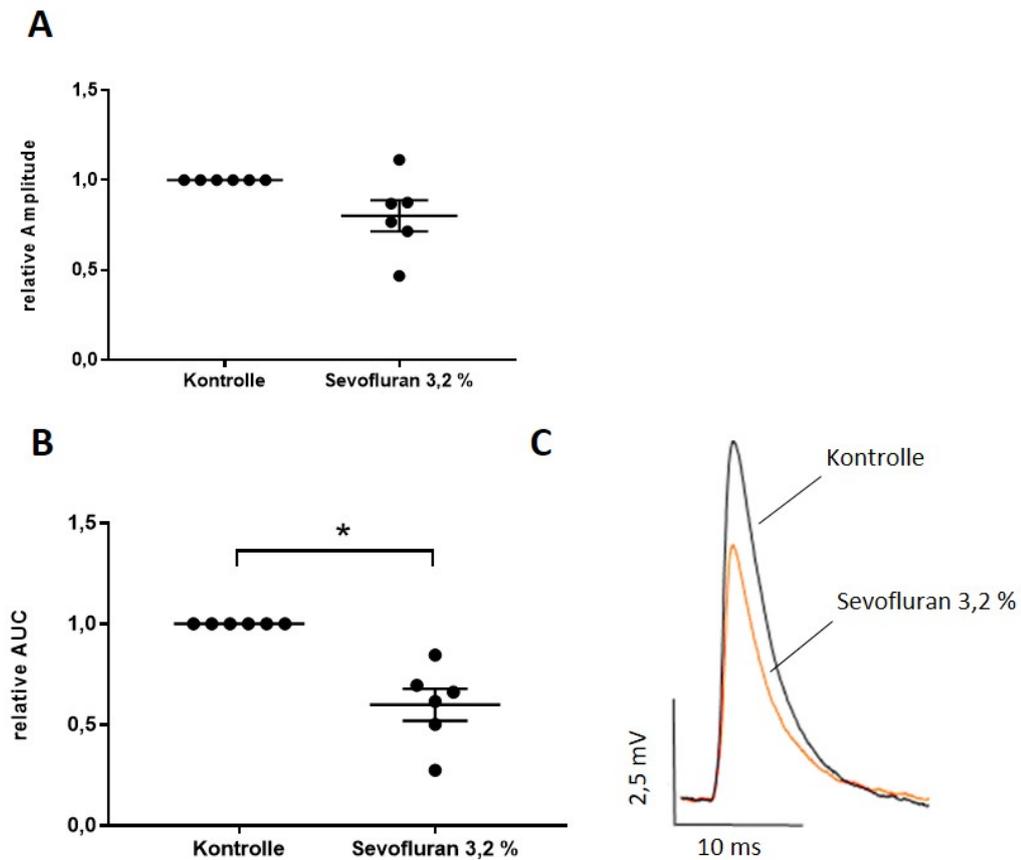


Abbildung 15: Sevofluran bewirkte eine Verkleinerung der relativen AUC der AMPA-oEPSP in kortikalen Neuronen der Lam. IV.

Die unter Kapitel IV 3.2.1 beschriebenen Experimente wurden in Anwesenheit des spezifischen NMDA-Rezeptorantagonisten AP-5 (50 μ M) und des spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μ M) wiederholt, um die AMPA-vermittelten exzitatorischen Potentiale zu isolieren.

A Die relative Amplitude der AMPA-oEPSP wurde durch Sevofluran nicht beeinflusst ($80,0 \pm 8,6$ % nach Sevofluran-Sättigung; $n = 6$, $p = 0,063$).

B Die relative AUC der AMPA-oEPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $59,8 \pm 7,8$ % ($n = 6$, $p = 0,030$) verkleinert.

C Repräsentatives AMPA-oEPSP eines Experiments.

* bedeutet $p < 0,05$.

3.2.4. Der Einfluss von Sevofluran auf NMDA-Rezeptor-vermittelte oEPSP kortikaler Neurone der Lam. IV

Die NMDA-vermittelte Komponente der oEPSP wurde in Anwesenheit des spezifischen AMPA- und KA-Rezeptorantagonisten NBQX (5 μ M) und spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μ M) isoliert. Sevofluran reduzierte die relative Amplitude (Abb. 16 A & C) und relative AUC (Abb. 16 B & C) der NMDA-oEPSP.

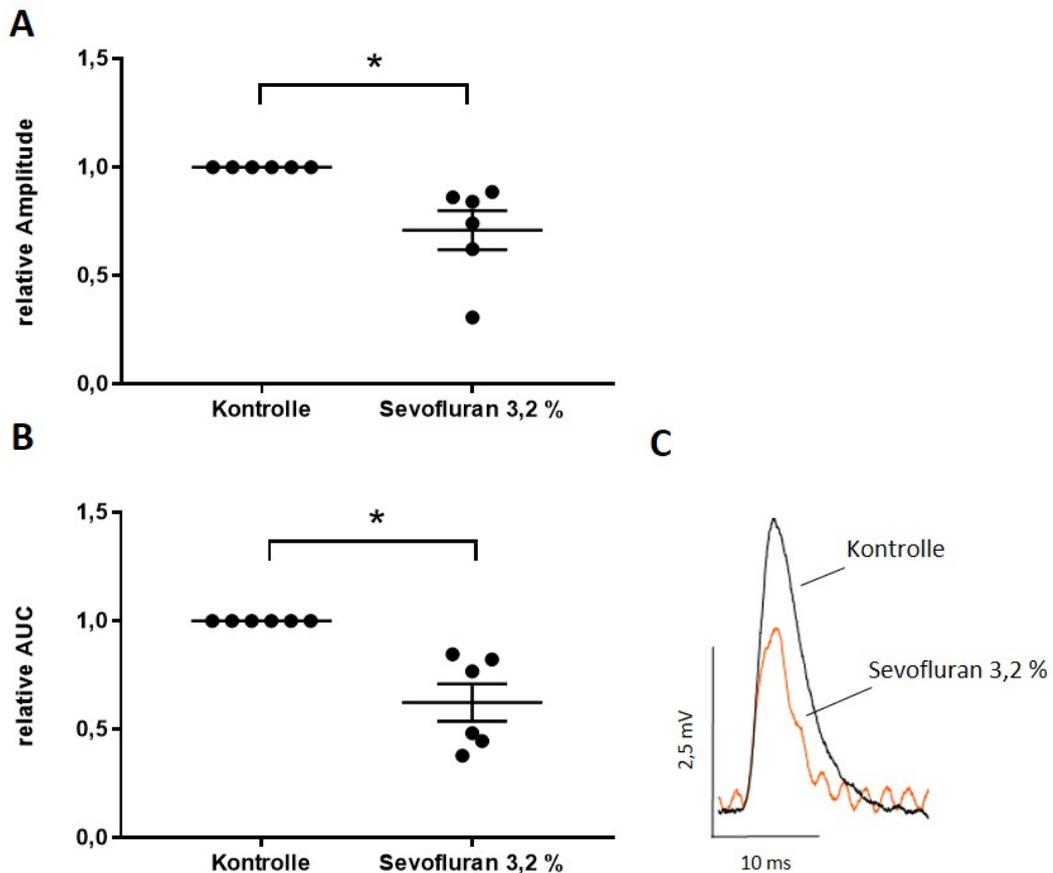


Abbildung 16: Sevofluran bewirkte eine Verkleinerung der relativen Amplitude und relativen AUC der NMDA-oEPSP in kortikalen Neuronen der Lam. IV.

Die unter Kapitel IV 3.2.1 beschriebenen Experimente wurden in Anwesenheit des spezifischen AMPA- und KA-Rezeptorantagonisten NBQX (5 μ M) und spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μ M) wiederholt, um die NMDA-vermittelten exzitatorischen Potentiale zu isolieren.

A Die relative Amplitude der NMDA-oEPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $71,0 \pm 9,1$ % ($n = 6$, $p = 0,030$) reduziert.

B Auch die relative AUC der NMDA-oEPSP wurde durch Sevofluran signifikant auf $62,3 \pm 8,4$ % ($n = 6$, $p = 0,030$) verkleinert. **C** Repräsentatives NMDA-oEPSP eines Experiments. * bedeutet $p < 0,05$.

3.3. Elektrische Stimulation kortikaler Neurone der Lam. IV

Um den Einfluss von Sevofluran auf die intrakortikale synaptische Transmission der Lam. IV zu untersuchen, wurden elektrische Stimulationen im Kortex durchgeführt. Dazu wurde eine bipolare Stimulationselektrode in Lam. II auf den Hirnschnitt aufgelegt, um die vorgeschalteten Axone des Lam. IV Neurons überschwellig zu stimulieren.

3.3.1. Der Einfluss von Sevofluran auf elektrisch-evozierte postsynaptische Summenpotentiale (ePSP) kortikaler Neurone der Lam. IV

Die ePSP in kortikalen Neuronen der Lam. IV wurden durch elektrische Stimulationen mittels einer Stimulationselektrode evoziert. Sevofluran bewirkte eine signifikante Reduktion der relativen Amplitude (Abb. 17 A & C) und der relativen AUC (Abb. 17 B & C) der ePSP.

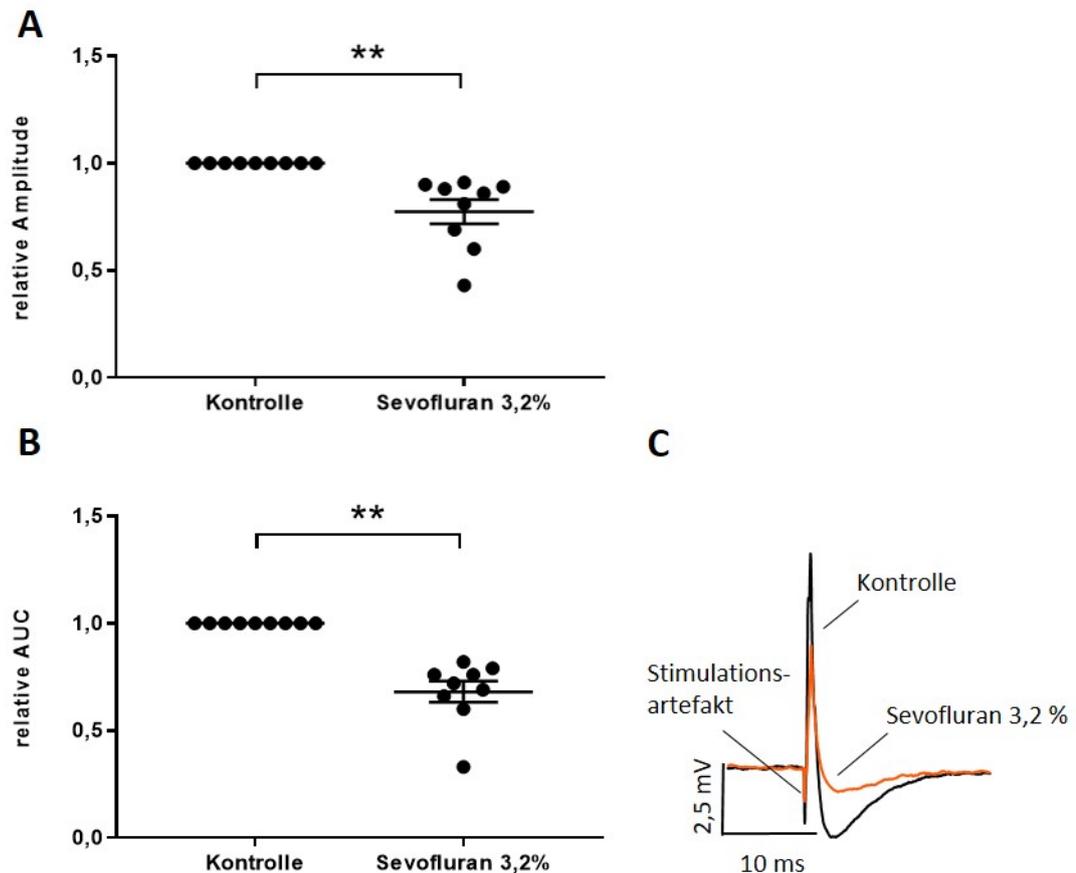


Abbildung 17: Verkleinerung der relativen Amplitude und relativen AUC der elektrisch-evozierten postsynaptischen Summenpotentiale (ePSP) kortikaler Neurone der Lam. IV durch Sevofluran

Die elektrische Stimulation erfolgte mit bipolaren, konzentrischen Wolfram-Stimulationselektroden, welche auf die der Zelle vorgeschalteten Axone ausgerichtet wurden, um über eine präsynaptische Transmitterfreisetzung das postsynaptisch abgeleitete Neuron zu stimulieren. Die Messung wurde zunächst analog zu den vorherigen Experimenten nur unter dem Einfluss von Sevofluran durchgeführt.

A Die relative Amplitude der ePSP wurde durch Sevofluran auf $77,5 \pm 5,6 \%$ ($n = 9$, $p = 0,004$) signifikant reduziert.

B Die relative AUC der ePSP wurde durch Sevofluran auf $68,2 \pm 5,0 \%$ ($n = 9$, $p = 0,004$) signifikant reduziert.

C Repräsentatives ePSP eines Experiments.

** bedeutet $p < 0,01$.

3.3.2. Der Einfluss von Sevofluran auf elektrisch-evozierte exzitatorische intrakortikale postsynaptische Potentiale (eEPSP)

Um die exzitatorischen elektrisch-evozierten Summenpotentiale (eEPSP) zu isolieren wurden die Messungen aus Kapitel IV 3.3.1 in Anwesenheit des spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 µM) wiederholt. Der „Standard“-IZ wurde Lidocain-Natrium-N-Ethylchlorid (5 mM) beigefügt, um die Generierung von Aktionspotentialen zu verhindern. Die Messungen erfolgten im „Voltage-clamp-controlled Current-clamp“-Modus („VCcCC“), um schnelle, transiente Spannungsänderungen erfassen zu können (SUTOR et al., 2003), dabei wurde als Haltepotential das aktuelle RMP der Zelle eingestellt. Unter Sevofluran-Einfluss zeigten die relative Amplitude (Abb. 18 A & C) und die relative AUC (Abb. 18 B & C) der eEPSP eine signifikante Verkleinerung.

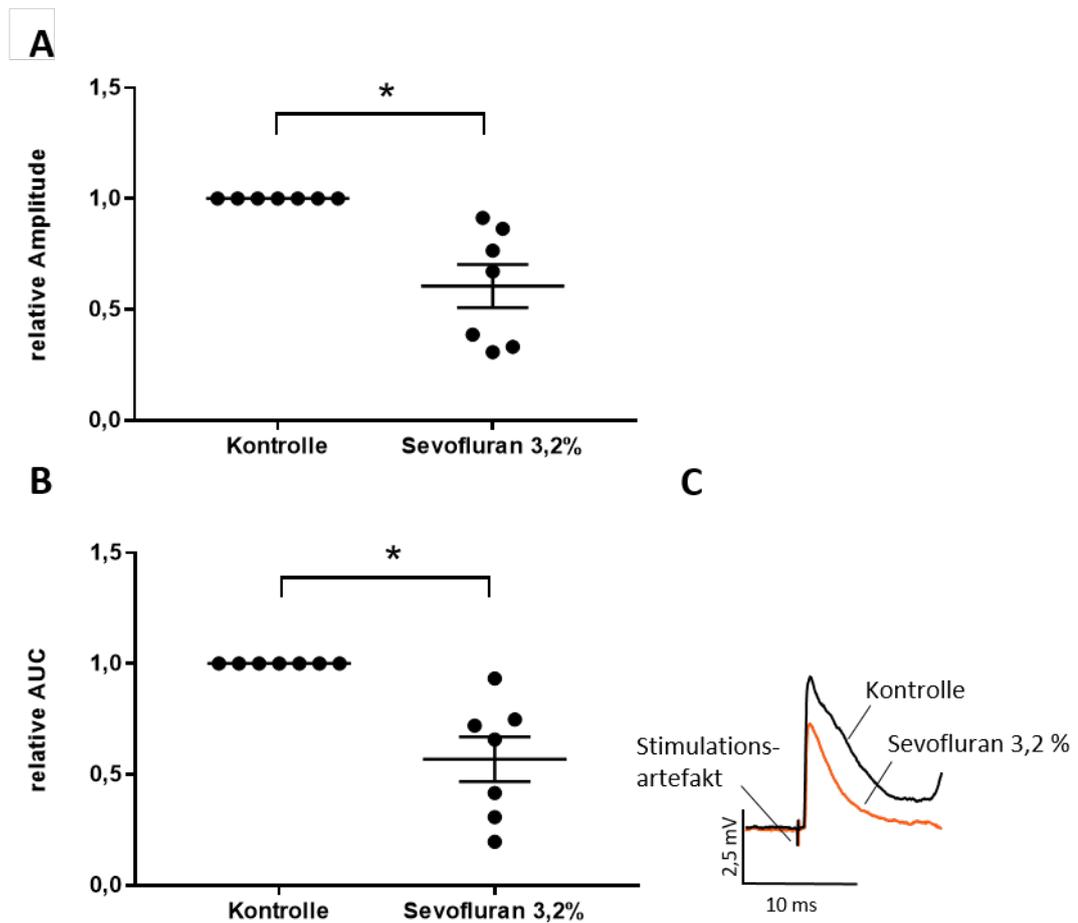


Abbildung 18: Sevofluran führte zu einer Verkleinerung der elektrisch-evozierten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (eEPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV

Die unter Kapitel IV 3.3.1 beschriebenen Experimente wurden in Anwesenheit von Rezeptorantagonisten wiederholt, um die exzitatorische Komponente des Potentials zu isolieren.

A Die relative Amplitude der eEPSP wurde durch Sevofluran auf $77,5 \pm 5,6 \%$ ($n = 9$, $p = 0,016$) signifikant reduziert.

B Die relative AUC der eEPSP wurde durch Sevofluran auf $68,2 \pm 5,0 \%$ ($n = 9$, $p = 0,016$) signifikant reduziert.

C Repräsentatives eEPSP eines Experiments.

* bedeutet $p < 0,05$.

3.3.3. Der Einfluss von Sevofluran auf elektrisch-evozierte inhibitorische intrakortikale postsynaptische Potentiale (eIPSP)

Zur Untersuchung der Wirkung von Sevofluran auf die inhibitorische Komponente der ePSP wurden die unter Kapitel IV 3.3.1 beschriebenen Messungen unter Zugabe des spezifischen NMDA-Rezeptorantagonisten AP-5 (50 μM) und des AMPA- und KA-Rezeptorantagonisten NBQX (5 μM) wiederholt. Der „Standard“-IZ wurde Lidocain-Natrium-N-Ethylchlorid (5 mM) beigelegt. Die Messungen erfolgten im „VCcCC“-Modus, die Zellen wurden bei einem Potential von -40 mV gehalten. Sowohl die relative Amplitude (Abb. 19 A & C), als auch die relative AUC (Abb. 19 B & C) der eIPSP waren durch Sevofluran signifikant vergrößert.

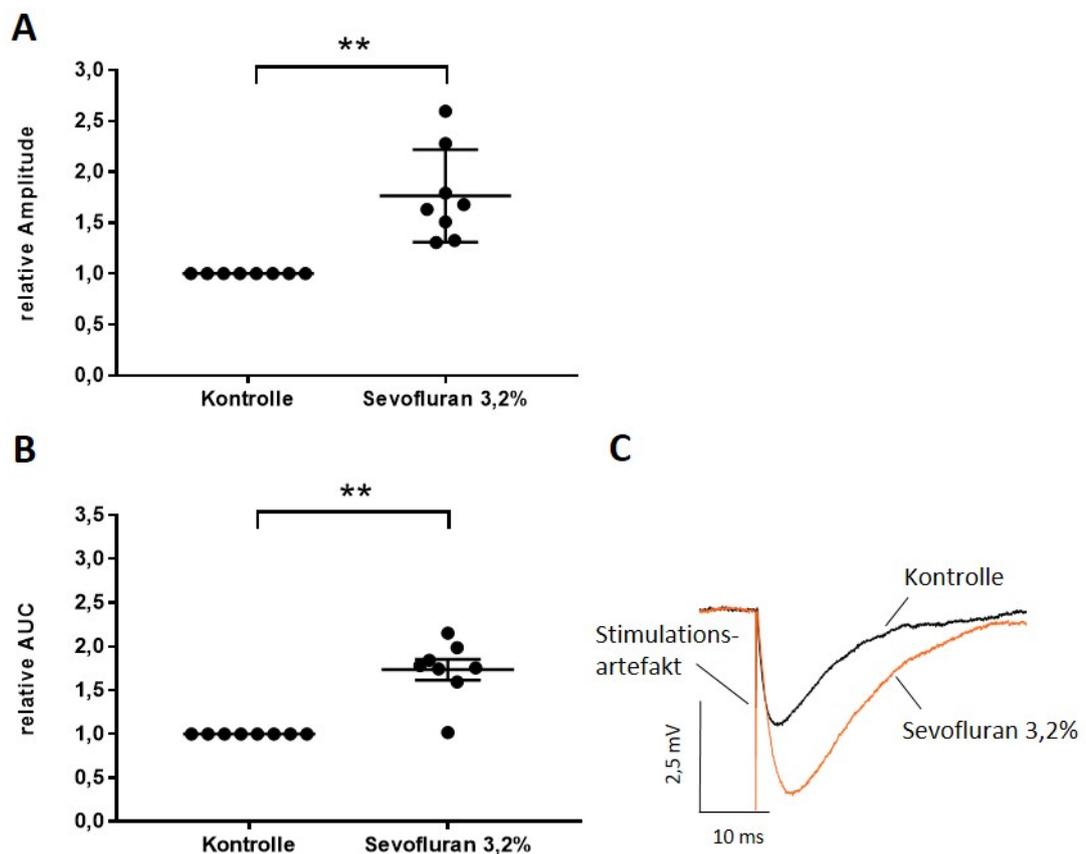


Abbildung 19: Sevofluran führte zu einer Vergrößerung der elektrisch-evozierten inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (eIPSP) kortikaler Neurone der Lam. IV

Die unter Kapitel IV 3.3.1 beschriebenen Experimente wurden in Anwesenheit von Rezeptorantagonisten wiederholt, um die inhibitorische Komponente des Potentials zu isolieren.

A Die relative Amplitude der eIPSP wurde durch Sevofluran auf $170,4 \pm 12,4$ % ($n = 8$, $p = 0,008$) signifikant vergrößert.

B Die relative AUC der eIPSP wurde durch Sevofluran auf $173,2 \pm 11,9$ % ($n = 8$, $p = 0,008$) signifikant vergrößert.

C Repräsentatives eIPSP eines Experiments.

** bedeutet $p < 0,01$.

3.4. Der Einfluss von Sevofluran auf kortikale Miniatur IPSC

Miniatur inhibitorische postsynaptische Ströme bezeichnen durch spontane Transmitterfreisetzung hervorgerufene rezeptorvermittelte Ionenströme an der postsynaptischen Zelle.

Zur Isolierung GABA_A-Rezeptor-vermittelter mIPSC wurden der aCSF neben dem Natriumkanalantagonisten TTX (1 μ M), zusätzlich der NMDA-Rezeptorantagonist AP 5 (50 μ M), der GABA_B-Rezeptorantagonist CGP (5 μ M) sowie der AMPA- und KA-Rezeptorantagonist NBQX (5 μ M), beigefügt. Das Haltepotential wurde bei den Aufzeichnungen auf -70 mV eingestellt. Die Messungen erfolgten im „Voltage-Clamp“-Modus. Sevofluran hatte keine Wirkung auf die Frequenz (Abb. 20 A) der mIPSC, bewirkte jedoch eine signifikante Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstante („decay“, Abb. 20 B) und eine signifikante Vergrößerung von Amplitude (Abb. 20 C) und Fläche unter der Kurve (Abb. 20 D) der mIPSC.

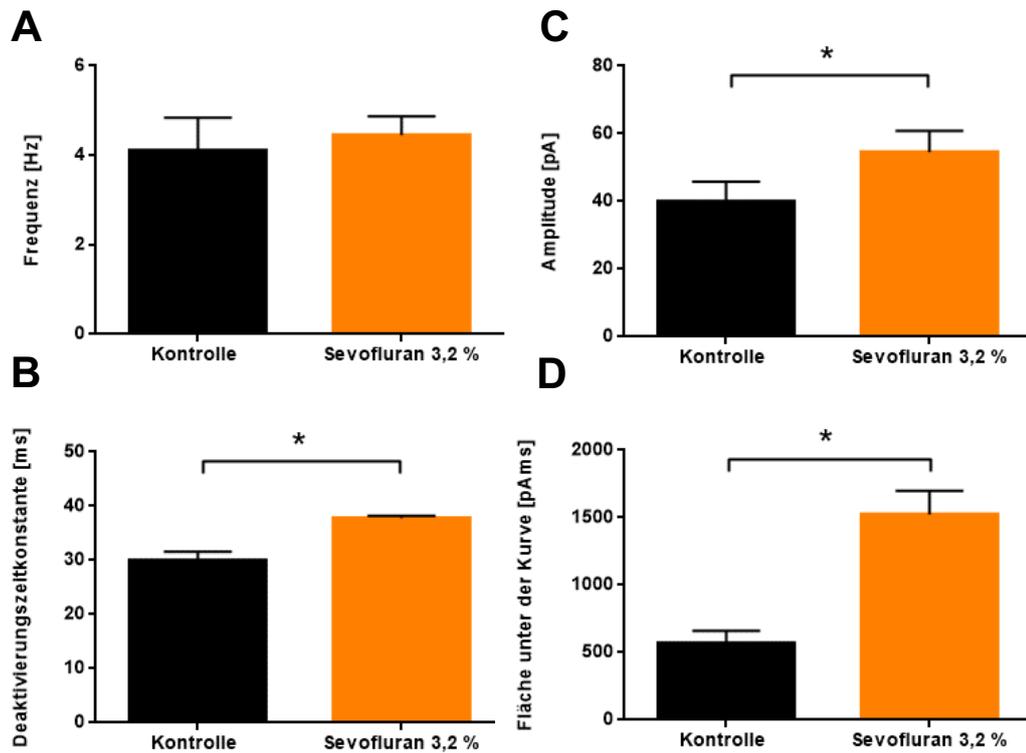


Abbildung 20: Sevofluran führte zu einer Vergrößerung der Amplitude und Fläche unter der Kurve sowie zu einer Verlängerung der Deaktivierungszeitkonstante („decay“) der mIPSC.

A Sevofluran beeinflusste die Frequenz der mIPSC nicht ($4,0 \pm 0,6$ Hz unter Kontrollbedingungen, $4,5 \pm 0,5$ Hz nach Sevofluran-Sättigung; $n = 6$, $p = 0,688$).

B Sevofluran verlängerte die Deaktivierungszeitkonstante der mIPSC von $30,0 \pm 1,6$ ms auf $37,8 \pm 0,3$ ms ($n = 6$, $p = 0,030$) signifikant.

C Durch Sevofluran wurde die Amplitude der mIPSC von $39,9 \pm 5,8$ pA auf $54,5 \pm 6,2$ pA ($n = 6$, $p = 0,030$) signifikant vergrößert.

D Durch Sevofluran wurde die Fläche unter der Kurve der mIPSC von 570 ± 91 pAms auf 1522 ± 173 pAms vergrößert ($n = 6$, $p = 0,030$) signifikant vergrößert.

* bedeutet $p < 0,05$.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Sevofluran auf Teile des thalamokortikalen Netzwerks mittels Patch-Clamp-Technik untersucht. Strom- bzw. Spannungsantworten kortikaler und thalamokortikaler Neurone wurden dabei entweder mittels „klassischer“ elektrischer Stimulation oder der Methode der optogenetischen Stimulation generiert.

Unter unseren experimentellen Bedingungen zeigte sich, dass Sevofluran die Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone sowie kortikaler Pyramidenneurone der Lam. IV reduzierte. Trotz einer zusätzlichen Hemmung der exzitatorischen synaptischen Transmission verstärkte Sevofluran die durch thalamokortikale Neurone hervorgerufene Depolarisation kortikaler Neurone abhängig von der Funktion des GABA_A-Rezeptors. Sevofluran scheint also die GABA_A-Rezeptor-vermittelte thalamokortikale Feed-Forward-Inhibition zu hemmen (sog. Disinhibition) und damit eine verstärkte Weiterleitung von Informationen in den Kortex zu bewirken. Intrakortikal führt Sevofluran in der Lam. IV zu einer verminderten exzitatorischen sowie einer verstärkten inhibitorischen synaptischen Transmission. Dies lässt vermuten, dass Sevofluran die fundamentale kortikale Verarbeitung sensorischer Information beeinflusst. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass unter Allgemeinanästhesie kortikale Potentiale, die durch sensorische Information evoziert werden, bestehen bleiben.

1. Vorteile und Limitationen der Optogenetik

Im Rahmen dieses Promotionsprojekts wurde ein optogenetischer Ansatz zur Untersuchung des thalamokortikalen Netzwerks unter Anästhetika-Einfluss etabliert. Durch die Expression des lichtsensitiven Ionenkanals ChR2 in thalamokortikalen Schaltneuronen konnten thalamokortikale Verbindungen mittels Laserstimulation erregt werden. Die optische Stimulation bietet gegenüber der Stimulation mittels Strompulsen mehrere Vorteile. So wird durch die Wahl spezieller Promotoren die Expression von ChR2 in spezifischen Strukturen möglich. In der vorliegenden Arbeit konnten durch die Injektion in den VB des Thalamus und die Verwendung des Promotors hSyn spezifisch thalamokortikale Schaltneurone transduziert werden. Um größere neuronale Strukturen wie das thalamokortikale Netzwerk zu stimulieren, würden bei der „klassischen“

Elektrophysiologie mit Stimulation über Stromimpulse sehr hohe Stimationsenergien benötigt. Dies führt zu mehreren Nachteilen: Zum einen können die hohen Stimationsenergien zu elektrothermischen Gewebsschädigungen und damit pathophysiologischen Mechanismen führen, die die Validität der Messung beeinflussen können. Zum anderen besteht bei hohen Stimationsenergien die Gefahr einer zusätzlichen Stimulation benachbarter Hirnstrukturen. Die durch eine solche Stimulation hervorgerufenen Antworten wären somit weit weniger spezifisch bzgl. der zu untersuchenden Leitungsbahn. Zudem erzeugen hohe Stimationsenergien in der elektrophysiologischen Aufnahme u. U. prominente Stimationsartefakte, die eine Auswertung der untersuchten Antwort erschweren.

Durch die Optogenetik hingegen lassen sich selektiv die präsynaptischen Terminalen in einer definierten Hirnregion stimulieren und postsynaptische Antworten in einer anderen, konnektierten Hirnregion ableiten. Die Optogenetik gilt daher als Methode der Wahl, um die funktionelle Konnektivität neuronaler Netzwerke zu untersuchen (PETREANU et al., 2007; CRUIKSHANK et al., 2010).

Dies wurde in unseren Experimenten umgesetzt, indem thalamokortikale ChR2-exprimierende Neurone und deren Axone durch Stimulation mit Licht zur Transmitterfreisetzung angeregt wurden und nachfolgend in kortikalen Neuronen der Lam. IV oPSP abgeleitet wurden.

Der wesentliche Nachteil der Optogenetik ist der notwendige, invasive Eingriff am lebenden Tier und das Einbringen von Fremd-DNA in den Organismus. Beides könnte die Validität der erhobenen Messergebnisse beeinflussen. Um sicherzustellen, dass die Narkose und Operation zum Einbringen des viralen Vektors einen möglichst geringen Einfluss auf die später erhobenen Daten am vitalen Hirnschnitt der Tiere haben, wurde eine Ruhephase von mindestens zehn Tagen nach der stereotaktisch navigierten Operation eingehalten. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Anästhetika-Exposition im ZNS zu längerfristigen Veränderungen, z. B. hinsichtlich der Proteinexpression, kommen kann (LU et al., 2015). Insofern wäre es denkbar, dass elektrophysiologische Messergebnisse, die an genetisch modifizierten Tieren erhoben wurden, von solchen, die an Anästhetika-nativen Hirnschnitten vorgenommen wurden, abweichen. Allerdings ist das Ausmaß dieser längerfristigen Veränderungen und v.a. die dafür notwendige Menge und Dauer der Anästhetika-Exposition umstritten. Im vorliegenden Promotionsprojekt befanden sich die Tiere für die Virusinjektion einmalig in Narkose.

Dies macht weitreichende pathophysiologische Veränderungen zumindest unwahrscheinlich. Siehe hierzu auch Kapitel V 3.1.

Der optogenetische Ansatz ist bei der Untersuchung neuronaler Vorgänge seit vielen Jahren etabliert. Die Verwendung kommerziell produzierter viraler Vektoren und ein standardisiertes Injektionsprotokoll für den Thalamus minimierten pathophysiologische Einflüsse durch das Einbringen der optogenetischen Konstrukte. Speziell für die Untersuchung der neuronalen Verbindungen zwischen Kortex und Thalamus konnten CRUIKSHANK et al. (2010) zeigen, dass sich die Optogenetik als Ersatz für die „klassische“ elektrische Stimulation eignet.

2. Klinische Relevanz der Sevoflurankonzentration

Unter Kontrollbedingungen wurde die aCSF, mit der die Hirnschnitte perfundiert wurden, mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂) gesättigt. Zur Untersuchung des Sevofluran-Einflusses wurde das Carbogengas zunächst durch einen Sevofluran-Vapor geleitet. Dieser reicherte das Carbogen mit Sevofluran in einer Konzentration von 3,2 % an. Bei der Spezies Maus entspricht eine Konzentration von 3,2 % Sevofluran bei Körpertemperatur einer MAC von 1,0 (ICHINOSE et al., 1998).

Zur Verbesserung der Ableitbedingungen durch Vergrößerung der Hypoxietoleranz der abgeleiteten Neurone wurden alle Messungen in diesem Promotionsvorhaben bei Raumtemperatur (20-25°C) durchgeführt. Die Kombination aus Messungen bei Raumtemperatur sowie der Applikation eines Dosisäquivalents von 1,0 MAC stellt dabei eine mögliche Limitation der Methodik dar. Der MAC-Wert ist temperaturabhängig, niedrigere Temperaturen führen zu niedrigeren MAC-Werten. Die Applikation von 3,2 % Sevofluran (entspricht 1,0 MAC-Äquivalenten bei Körpertemperatur) könnte daher falsch hoch sein, d. h. die darunter beobachteten Effekte *in vitro* könnten überschätzt werden (FRANKS & LIEB, 1993, 1996). Allerdings kommt es beim verwendeten offenen Applikationssystem auch zu einer Evaporisation des gelösten Sevoflurans.

Die Umrechnung des MAC-Wertes von 3,2 % bei Mäusen unter Körpertemperatur (ICHINOSE et al., 1998) in eine Konzentration in wässriger Lösung (c_{aq}) bei Raumtemperatur, unter Verwendung veröffentlichter Löslichkeitskoeffizienten und notwendiger Temperaturkorrekturen (FRANKS & LIEB, 1993, 1996), ergibt ein MAC-Äquivalent von 0,38 mM. NISHIKAWA et al. (2011) zeigten mit Gaschromatografie,

dass die Applikation von 2,8 % Sevofluran in der Gasphase zu einer Konzentration in wässriger Lösung von 0,23 mM führt. Demgegenüber zeigten Messungen aus dem eigenen Labor eine c_{aq} von 0,42 mM bei Applikation von 2,0 % Sevofluran, sowie eine lineare Löslichkeit (HASENEDER et al., 2009a). Bei dieser Arbeit wurde ein System mit offener Messkammer verwendet, welches ähnlich, aber nicht identisch zu dem in diesem Promotionsprojekt verwendeten System war. Rechnerisch würden sich also bei Applikation von 3,2 % Sevofluran in der Gasphase Konzentrationen in wässriger Lösung von 0,26 bis 0,67 mM ergeben. Diese zu erwartenden Konzentrationen von Sevofluran in wässriger Lösung unter 3,2 % Sevofluran liegen also zumindest im Bereich des MAC-Äquivalents bei Raumtemperatur von 0,38 mM. Somit befindet sich die verwendete Konzentration in klinisch relevanten Bereichen. Vor dem Hintergrund der relativ großen Streubreite der veröffentlichten Konzentrationen von Sevofluran in wässriger Lösung, ist als weiterer wichtiger Schritt die Bestimmung der Konzentration in wässriger Lösung unter den exakten Bedingungen dieses Projekts notwendig. Außerdem sollte dann die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Sevofluran auf die verschiedenen, im Rahmen dieses Promotionsprojektes untersuchten, Parameter evaluiert werden.

3. Die Wirkung von Sevofluran auf das thalamokortikale Netzwerk

3.1. Elektrophysiologische Charakterisierung ChR2-exprimierender thalamokortikaler Schaltneurone

Die Expression des lichtsensitiven Ionenkanals ChR2 in thalamokortikalen Schaltneuronen mittels eines viralen Vektors stellt eine Modifikation der Zellen dar. Um sicherzugehen, dass dieser Eingriff keine Auswirkungen auf die Funktionalität der Zellen darstellt, wurden zunächst die typischen elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone durch verschiedene Messprotokolle erfasst.

In Analogie zu den Ergebnissen von veröffentlichten *in vitro* Studien an nicht genetisch modifizierten thalamokortikalen Schaltneuronen verursachte bei den vorliegenden Untersuchungen ein hyperpolarisierender Strompuls in thalamokortikalen Schaltneuronen einen charakteristischen, depolarisierenden Kationen-Einwärtsstrom („voltage sag“) und eine langsame Nach-Depolarisation (YING & GOLDSTEIN,

2005). Der Kationen-Einwärtsstrom wird dabei vermittelt über HCN-Kanäle, welche in thalamokortikalen Schaltneuronen stark exprimiert werden (BIEL et al., 2009). Zudem zeigte sich, dass auch Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand, Art, Frequenz und Auslöseschwelle von Aktionspotentialen der hier verwendeten modifizierten thalamokortikalen Neuronen vergleichbar waren mit publizierten Werten von nicht-modifizierten thalamokortikalen Neuronen (MATTUSCH et al., 2015).

Es zeigte sich also, dass durch die virale Transduktion sowie die Expression des Chr2 in der Zellmembran thalamokortikaler Schaltneurone keine Veränderungen bezüglich der charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften verursacht wurden.

3.2. Die Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone

Der Thalamus wird neben dem Kortex als eine Hauptzielregion für die Vermittlung des Bewusstseinsverlusts genannt (ALKIRE et al., 2000; MASHOUR, 2015). Eine Hypothese besagt, dass verschiedene Anästhetika den Bewusstseinsverlust über eine Hyperpolarisation thalamokortikaler Neurone und den Wechsel der thalamokortikalen Aktivität vom tonischen in den „Burstmodus“ vermitteln (FRANKS, 2008).

In der vorliegenden Arbeit zeigten thalamokortikale Schaltneurone eine verminderte intrinsische Erregbarkeit unter dem Einfluss von Sevofluran. Dies zeigte sich als reduzierte Aktionspotentialfrequenz und eine Verschiebung der Aktionspotentialschwelle in stärker depolarisierte Bereiche. Das Ruhemembranpotential wurde durch Sevofluran nicht beeinflusst. Auch für andere Anästhetika, wie Isofluran (RIES & PUIL, 1999), Propofol (YING & GOLDSTEIN, 2005) und Xenon (MATTUSCH et al., 2015), konnte gezeigt werden, dass sie zu einer verminderten Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone führen. Zu den charakteristischen elektrophysiologischen Merkmalen thalamokortikaler Schaltneurone zählen „voltage sag“ und „rebound delay“. Diese elektrophysiologischen Charakteristika werden über HCN-Kanäle vermittelt (BIEL et al., 2009). In mehreren Arbeiten wurde eine Modulation der HCN-Kanäle durch Anästhetika als ursächlich für eine verminderte neuronale Aktivität thalamokortikaler Schaltneurone postuliert (YING et al., 2006; MATTUSCH et al., 2015). Eine Modulation der HCN-Kanäle durch Sevofluran könnte die beobachtete Reduktion der Aktionspotentialfrequenz erklären. Diese Wirkung könnte jedoch auch durch eine Wirkung von Sevofluran an

spannungsabhängigen Natrium- oder Kaliumkanälen erklärt werden. YOKOYAMA et al. (2011) zeigten in ihren Untersuchungen eine hemmende Wirkung von Sevofluran auf die Funktion spannungsabhängiger Natriumkanäle in *Xenopus*-Oozyten. Auch für das Inhalationsanästhetikum Halothan konnte eine Inhibition des Natriumeinstroms über eine Wirkung auf Natriumkanäle nachgewiesen werden (RATNAKUMARI & HEMMINGS, 1998). Ebenso wurde eine Beeinflussung von Natriumkanälen, die zur veränderten Glutamatfreisetzung und Verminderung Natriumkanal-vermittelter Ströme führt, für verschiedene Inhalationsanästhetika (HEMMINGS, 2009) und auch für Propofol gezeigt (OUYANG et al., 2003).

Verschiedene Inhalations- und Injektionsanästhetika zeigen eine Wirkung auf spannungsabhängige Kaliumkanäle (HAYDON & URBAN, 1986; FRIEDERICH & URBAN, 1999). Diese Kanäle sind wichtig für verschiedene zelluläre Funktionen. So vermitteln sie die Repolarisation nach Aktionspotentialen, verursachen die Nachdepolarisation und sind entscheidend für die postsynaptische Integration neuronaler Signale (BREW & FORSYTHE, 1995; SAFRONOV et al., 1996; FRIEDERICH & URBAN, 1999). Eine durch Sevofluran hervorgerufene Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle könnte somit ebenfalls die unter Sevofluran beobachtete niedrige Aktionspotentialfrequenz erklären.

3.3. Die Wirkung von Sevofluran auf die thalamokortikale Signalübertragung

Es wird vermutet, dass die neurophysiologischen Mechanismen des Schlafs auch bei der Anästhetika-induzierten Bewusstlosigkeit eine Rolle spielen könnten (siehe auch Kapitel II 3.6) (MASHOUR & PAL, 2012; VAN SWINDEREN & KOTTLER, 2014). Vor diesem Hintergrund könnte eine Reduktion oder gar Blockade der thalamokortikalen Informationsübertragung durch Anästhetika eine wesentliche Rolle spielen (ALKIRE et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit führte Sevofluran jedoch unter experimentellen Bedingungen, bei denen keine der möglicherweise beteiligten Transmittersysteme blockiert waren, zu einer verstärkten Signalübertragung von thalamokortikalen Schaltneuronen zu kortikalen Neuronen der Lam. IV. Diese neuronale Verbindung vermittelt die Weiterleitung und Verarbeitung somatosensorischer Information aus der Körperperipherie (GRANT et al., 2012). Die Stimulation des ChR2 über Licht simuliert

in unserem Modell eine solche eingehende Sinnesinformation. Da die Efferenzen der ventrobasalen Thalamuskern exzitatorisch in die kortikale Lam. IV projizieren (FELDMEYER, 2012), spiegelt die, durch optogenetische Erregung thalamischer Neurone in kortikalen Neuronen, hervorgerufene Depolarisation die Weiterleitung dieser Information wieder.

Vor o. g. Hintergrund überraschen die unter experimentellen Bedingungen erhobenen Daten. Sie stehen jedoch im Einklang bzw. erklären Arbeiten, in denen *in vivo* gezeigt wurde, dass somatosensorisch evozierte Potentiale unter Allgemeinanästhesie durchaus weitergeleitet werden (KERSSENS et al., 2005; MARTUZZI et al., 2010).

Um diesen Befund weiter zu charakterisieren bzw. möglicherweise zu Grunde liegende Mechanismen auf Rezeptor- oder Ionenkanalebene zu detektieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die beschriebenen Experimente unter pharmakologischer Blockade verschiedener Transmittersysteme wiederholt.

So wurde durch die Zugabe spezifischer Antagonisten der Einfluss von Sevofluran auf die exzitatorische glutamaterge synaptische Transmission nachvollzogen. Sevofluran reduzierte sowohl die AMPA- als auch die NMDA-Rezeptor-vermittelte glutamaterge, exzitatorische synaptische Transmission im thalamokortikalen Netzwerk. Die Projektion thalamokortikaler Schaltneurone zur kortikalen Lam. IV ist rein glutamaterg (GRANT et al., 2012). Sevofluran führte unter diesen experimentellen Bedingungen zu einer Hemmung. Eine Wirkung auf glutamaterge Transmittersysteme ist vereinbar mit anderen Untersuchungen, die zeigten, dass andere volatile sowie intravenöse Anästhetika eine Verminderung der glutamatergen Neurotransmission in verschiedenen Hirnregionen (beispielsweise Hippokampus und Kortex) bewirkten (HUDSPITH, 1997; ARHEM et al., 2003). Das Inhalationsanästhetikum Xenon scheint seine Wirkung sogar hauptsächlich über eine Hemmung der exzitatorischen AMPA- und NMDA-Rezeptoren hervorzurufen (HASENEDER et al., 2008; HASENEDER et al., 2009b; KRATZER et al., 2012). Die Verminderung der AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelten exzitatorischen synaptischen Transmission erklärt jedoch zunächst nicht die in dieser Arbeit gezeigte Verstärkung der thalamokortikalen Signalübertragung unter Sevofluran. Die hemmende Wirkung von Sevofluran auf die AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelte exzitatorische synaptische Transmission scheint also nur einen Teilaspekt der Wirkung auf das thalamokortikale Netzwerk darzustellen.

Viele elektrophysiologische Studien haben GABA-Rezeptoren als Haupt-Zielstrukturen für Anästhetika identifiziert (RUDOLPH & ANTKOWIAK, 2004). Der Anästhetika-induzierte Bewusstseinsverlust soll über eine Verstärkung der inhibitorischen synaptischen Transmission vermittelt werden (CAMPAGNA et al., 2003; FRANKS & LIEB, 1994; RUDOLPH & ANTKOWIAK, 2004). Inhalationsanästhetika verstärken dabei die Hyperpolarisation der Zellen über einen vermehrten GABA-vermittelten Chloridioneneinstrom und verhindern so die Bildung von Aktionspotentialen (CAMPAGNA et al., 2003). Für Isofluran konnte neben diesem Effekt auf die phasische Inhibition zusätzlich eine Wirkung auf die tonische GABAerge Inhibition gezeigt werden (CARAISCOS et al., 2004).

Da in der Gegenwart des spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin die Verstärkung der thalamokortikalen Signalübertragung durch Sevofluran nicht mehr feststellbar war, scheint Sevofluran diese Verstärkung über eine Interaktion mit GABA_A-Rezeptoren zu vermitteln.

Monosynaptische thalamokortikale inhibitorische Verbindungen zum somatosensorischen Kortex wurden bisher nicht beschrieben. Im VB des Thalamus von Mäusen und Ratten kommen nur wenige Interneurone vor (HARRIS & HENDRICKSON, 1987; MUNSCH et al., 2005). Lokale kortikale GABAerge Interneurone spielen jedoch eine entscheidende Rolle in der Regulation der Informationsweiterleitung von den sensorischen Kernen des Thalamus in den Kortex (ERRINGTON et al., 2011). So werden sensorische Informationen im Kortex über lokale inhibitorische GABAerge Interneurone moduliert (SUN et al., 2006; YU et al., 2016). Die Interneurone selbst werden von monosynaptischem exzitatorischem thalamokortikalem Input gesteuert und kontrollieren somit die Aktivität exzitatorischer Neurone im Sinne einer Feed-Forward-Modulation (ERRINGTON et al., 2011). Neben dieser Feed-Forward-Inhibition wurden weitere Wege beschrieben, die zur Inhibition kortikaler Pyramidenneurone der Lam. IV führen. Kortikale Pyramidenneurone besitzen exzitatorische synaptische Verbindungen zu kortikalen Interneuronen, die somit über eine Feedback-Inhibition die Aktivität der Kortexneurone modulieren (ISAACSON & SCANZIANI, 2011). Interneurone können somit über zwei verschiedene Mechanismen die Hemmung in neuronalen Netzwerken vermitteln: Zum einen über die Feed-Forward-Inhibition, bei der afferente glutamaterge Axone gleichzeitig Projektionsneurone und Interneurone aktivieren. Zum anderen über die Feedback-Hemmung, bei welcher

afferente glutamaterge Axone Projektionsneurone aktivieren, die nachfolgend Interneurone aktivieren (HU et al., 2014).

Ein Einfluss der Feedback-Inhibition auf die mittels optogenetischer Stimulation erzielten Ergebnisse dieser Arbeit erscheint eher unwahrscheinlich, da das ChR2 lokal in den Thalamus injiziert wurde und somit lediglich in thalamokortikalen Schaltneuronen exprimiert wird. Die optische Stimulation führt daher ausschließlich zur Erregung thalamokortikaler Neurone, die wiederum lediglich die Feed-Forward Inhibition direkt aktivieren können.

Die Freisetzung von GABA aus Interneuronen aktiviert synaptische GABA_A-Rezeptoren und führt somit zur phasischen Inhibition (HEMMINGS et al., 2005; FOGERSON & HUGUENARD, 2016). Darüber hinaus wurde eine andauernde GABA_A-Rezeptor-vermittelte tonische Inhibition, die durch extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren generiert wird (HEMMINGS et al., 2005; WALKER & SEMYANOV, 2008), auch im VB des Thalamus nachgewiesen (COPE et al., 2005; JIA et al., 2005; ZHOU et al., 2012; FOGERSON & HUGUENARD, 2016).

Die in dieser Arbeit beschriebene Verstärkung der thalamokortikalen Signalübertragung durch Sevofluran lässt sich somit gut durch eine Sevofluran-vermittelte Hemmung der exzitatorischen synaptischen Transmission zu inhibitorischen Feed-Forward-Interneuronen, also über eine sog. Disinhibition erklären.

3.4. Die Wirkung von Sevofluran auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lam. IV

Als ein weiterer wichtiger Mechanismus, der die Anästhetika-vermittelte Bewusstlosigkeit vermittelt, wird die Hemmung bzw. Modulation intrakortikaler Signalübertragung postuliert (HUDETZ, 2010).

In der vorliegenden Arbeit zeigte Sevofluran eine hemmende Wirkung auf die Erregbarkeit der kortikalen Pyramidenneurone der Lam. IV. Die kortikale Lam. IV im somatosensorischen Kortex erhält die meisten afferenten synaptischen Verbindungen und ist somit die Haupt-Eingangsschicht des Kortex (HELMSTAEDTER et al., 2008). Die verringerte Erregbarkeit kortikaler Neurone dieser Schicht könnte daher zu einer Veränderung der intrakortikalen Informationsverarbeitung führen und daher zum Sevofluran-induzierten Bewusstseinsverlust mechanistisch beitragen. Eine solche

intrakortikale vermittelte direkte Hemmung der neuronalen Erregbarkeit konnte für etliche Inhalationsanästhetika gezeigt werden (HENTSCHKE et al., 2005)

3.5. Die Wirkung von Sevofluran auf die intrakortikale Signalverarbeitung

Unter unseren experimentellen Bedingungen zeigte sich eine verstärkte Weiterleitung von Signalen vom Thalamus in den zerebralen Kortex. Die Befunde aus den Experimenten der intrakortikalen Stimulation legen jedoch nahe, dass die sekundäre Verarbeitung dieser Information unter Sevofluran blockiert wird.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit optogenetischer Stimulation thalamokortikaler Neurone, wurden durch die intrakortikale elektrische Stimulation hauptsächlich lokale intrakortikale Projektionsfasern erregt. Dabei wurden dünne, konzentrische bipolare Stimulationselektroden eingesetzt, um spezifisch und möglichst regional neuronales Gewebe zu erregen. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrische Stimulation der kortikalen Lam. 2/3 im akuten Hirnschnittpräparat mittels einer solchen Elektrode abhängig von der Stimulationsintensität zu einem Stimulationsradius von maximal 250 μm führt (TAKIMORI et al., 1999). Somit erscheint es als unwahrscheinlich, dass die bei den vorliegenden Experimenten auf Lam. 2/3 aufgesetzte Stimulationselektrode zur Stimulation thalamokortikaler Fasern führte.

Sowohl die Summenpotentiale als auch die exzitatorische, glutamaterge Komponente der intrakortikalen synaptischen Transmission wurde durch Sevofluran reduziert. Dagegen zeigte sich eine Verstärkung der GABA_A-Rezeptor-vermittelten, inhibitorischen, intrakortikalen synaptischen Transmission. Zusätzlich zur evozierten synaptischen Transmission wurde der Effekt von Sevofluran auf spontane Transmitterfreisetzung mittels Messungen von mIPSC untersucht. Die Beeinflussung der Frequenz von mIPSC würde auf eine veränderte Transmitterfreisetzung aus präsynaptischen Vesikeln hinweisen (QUEENAN et al., 2012). Eine Veränderung der Amplitude der mIPSC spricht für eine höhere Dichte und/oder Leitfähigkeit postsynaptischer Rezeptoren (QUEENAN et al., 2012). Die Tatsache, dass in unseren Untersuchungen im Kortex unter Sevofluran die Amplitude, aber nicht die Frequenz der mIPSC vermindert war, spricht somit für einen postsynaptischen Effekt von Sevofluran. Das volatile Anästhetikum hemmt also die intrakortikale exzitatorische synaptische Transmission und verstärkt die intrakortikale inhibitorische synaptische Transmission

wahrscheinlich über postsynaptische Mechanismen. Dies könnte zu einer Modulation der kortikalen Integration thalamokortikaler Information führen.

Evozierte Potentiale im sensorischen Kortex bleiben auch unter Narkose unverändert bestehen (ALKIRE et al., 2008b). Der Bewusstseinsverlust scheint also nicht durch die komplette Inaktivierung kortikaler Neurone, sondern vielmehr über eine veränderte neuronale Aktivität und damit funktioneller Unterbrechung zwischen den einzelnen Subregionen des thalamokortikalen Netzwerks vermittelt zu werden (ALKIRE et al., 2008b).

4. Schlussfolgerung

Obwohl unter Allgemeinanästhesie der globale zerebrale Blutfluss verringert ist, geht man davon aus, dass der Anästhetika-induzierte Bewusstseinsverlust gezielt nur durch bestimmte Hirnstrukturen vermittelt wird (HUDETZ, 2010). Als Hauptzielstrukturen gelten bisher neben dem Kortex auch einige subkortikale Strukturen, wie z. B. Thalamus, Hypothalamus und das limbische System (HUDETZ, 2010). Im Thalamus kommt es unter Narkose zum verminderten Stoffwechsel und Blutfluss, weshalb dieser Hirnregion eine entscheidende Rolle in der Vermittlung des Bewusstseinsverlusts zugesprochen wird (ALKIRE & MILLER, 2005). Thalamische Aktivität wird durch Sevofluran bereits unter sedativen Dosierungen, unter denen die Patienten noch erweckbar sind, vermindert (ALKIRE et al., 2008a). Allerdings wurde postuliert, dass anästhetische Effekte auf den Thalamus eher sekundär, über eine Hemmung depolarisierender Fasern aus dem Kortex, auftreten (ALKIRE et al., 2008b). Andere Hypothesen besagen, dass vor allem die kortikale Integration sensorischer Informationen einen Schlüsselprozess in der Unterdrückung bewusster Wahrnehmung unter Anästhesie darstellt (HUDETZ, 2010).

Die in dieser Promotionsarbeit erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sevofluran im Thalamus zu einer verringerten neuronalen Erregbarkeit führt, die exzitatorische glutamaterge thalamokortikale Neurotransmission hemmt, jedoch die generelle thalamokortikale Signaltransduktion verstärkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Sevofluran auf kortikaler Ebene die neuronale Erregbarkeit in der Lam. IV des Kortex reduziert, die lokale exzitatorische Neurotransmission hemmt und die lokale inhibitorische synaptische Transmission verstärkt. Die letztgenannte Veränderung kommt dabei wahrscheinlich über postsynaptische Mechanismen zustande.

Bezüglich der thalamokortikalen Signalübertragung bewirkte Sevofluran über eine Disinhibition letztlich eine Hemmung der GABAergen Inhibition, wohingegen im Kortex eine Verstärkung der GABAergen Inhibition zu beobachten war. GABA-Rezeptoren sind aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt, die in Säugetierzellen am häufigsten vorkommende Zusammensetzung ist α_1 , β_2 und γ (SIEGHART & SPERK, 2002; FARRANT & KAILA, 2007). Die genannten Untereinheiten kommen hauptsächlich in allen Schichten des humanen Kortex vor, außerdem ist in Lam. IV häufig die α_5 Untereinheit vertreten (AKBARIAN et al., 1995). Auch innerhalb des Thalamus zeigen sich in den verschiedenen Kerngebieten GABA-Rezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheiten-Zusammensetzungen (SIEGHART & SPERK, 2002). Diese ist dabei auch von hoher pharmakologischer Relevanz: So lassen sich z. B. die unterschiedlichen Wirkungen von Benzodiazepinen nicht nur durch die Beeinflussung verschiedener Hirnregionen erklären, sondern auch durch die Modulation von GABA-Rezeptoren verschiedener Untereinheitenkompositionen (SIEGHART & SPERK, 2002). Die Wirkung von Sevofluran auf die intrakortikale GABAerge Inhibition einerseits, und die thalamokortikale Disinhibition andererseits, ließe sich somit auch durch jeweiligen Unterschiede in der GABA-Rezeptor Untereinheiten-Zusammensetzung im Thalamus und Kortex erklären.

Die Ergebnisse dieses Promotionsvorhabens unterstützen die Hypothese, dass das thalamokortikale Netzwerk ein wesentliches neuronales Zielgebiet ist, in dem Anästhetika den Bewusstseinsverlust hervorrufen. Jedoch scheint hier die Wirkung auch multifaktoriell zu sein. Einerseits hemmt Sevofluran die Erregbarkeit des Kortex, führt aber zu einer verstärkten Depolarisation kortikaler Neurone nach thalamischer Stimulation. Dieses Ergebnis stützt die These, dass es nicht zu einer kompletten Blockade der Transmission sensorischer Signale durch den Thalamus kommt (MASHOUR, 2014). Es bietet somit eine Erklärung, warum somatosensorisch evozierte Potentiale unter Allgemeinanästhesie erhalten bleiben. Darüber hinaus gibt es Hinweise, warum bei sehr hoher Anästhetietiefe sensorische Informationen weiterhin Zustände hoher neuronaler Aktivität hervorrufen können (HARTIKAINEN et al., 1995). Neben diesen thalamokortikalen Effekten liefern die Experimente dieses Promotionsvorhabens Hinweise, dass Sevofluran direkte kortikale Effekte vermittelt. In Analogie zu anderen Anästhetika hemmt es die Erregbarkeit des Kortex und moduliert die intrakortikale Signalverarbeitung (VELLY et al., 2007; LEE et al., 2013).

Der methodische Ansatz der Experimente dieses Promotionsvorhabens erlaubt eine spezifische Unterscheidung zwischen den Effekten von Sevofluran auf thalamokortikaler und intrakortikaler Ebene. Jedoch lässt sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen nicht ableiten, welcher Signalweg (thalamokortikal oder intrakortikal) die höhere Sensitivität gegenüber Sevofluran zeigt. Dies muss über Untersuchungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen des Anästhetikums in den zwei Signalwegen erfolgen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Sevofluran stellt eines der wichtigsten Inhalationsanästhetika dar. Trotz des routinemäßigen Einsatzes sind die genauen Mechanismen, über die Sevofluran zum Anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust führt, weiter ungeklärt.

Das thalamokortikale Netzwerk ist eine äußerst wichtige neuronale Struktur, über deren Modulation Anästhetika den Bewusstseinsverlust hervorrufen. In diesem Promotionsvorhaben wurde der Einfluss von Sevofluran auf Teile des thalamokortikalen Netzwerks in vitalen Hirnschnitten von Mäusen untersucht. Um die Wirkungen von Sevofluran möglichst detailliert zu erfassen, wurde nicht nur die „klassische“ elektrische Stimulation vitaler Hirnschnitte eingesetzt, sondern auch die Methode der optogenetischen Stimulation etabliert.

Sevofluran verminderte die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone sowie kortikaler Neurone der Lam. IV. Sevofluran hemmte die exzitatorische, glutamaterge synaptische Transmission von thalamokortikalen Projektionsfasern zum Kortex. Darüber hinaus verminderte das Anästhetikum auf intrakortikaler Ebene die exzitatorische Signalübertragung und verstärkte die inhibitorische Neurotransmission.

Trotz dieser Effekte verstärkte Sevofluran die, durch einen thalamischen Stimulus hervorgerufene, Depolarisation kortikaler Neurone. Dies wird wahrscheinlich über eine Hemmung der Feed-Forward-Inhibition, also eine kortikale Disinhibition, vermittelt.

Die Wirkungen von Sevofluran auf das thalamokortikale Netzwerk sind multifaktoriell. Entgegen vorbestehender Annahmen, sprechen die Ergebnisse dieses Promotionsvorhabens für eine durch Sevofluran hervorgerufene Verstärkung der Weiterleitung von Informationen aus dem Thalamus in den Kortex. Die sekundäre intrakortikale Weiterleitung dieser Informationen scheint durch Sevofluran allerdings gehemmt zu werden. Dies steht im Einklang mit *in vivo* erhobenen Daten, die ein Fortbestehen kortikaler evozierter Potentiale unter Narkose zeigen konnten.

Somit leisten die vorliegenden Ergebnisse einen Beitrag zum Verständnis der neuronalen Mechanismen, über die Sevofluran den Bewusstseinsverlust hervorruft.

VII. SUMMARY

Sevoflurane is one of the major volatile anesthetics. Despite the routine use the exact mechanisms leading to sevoflurane-induced loss of consciousness still remain unclear. The thalamocortical network is an extremely important neuronal structure. Anesthetics cause modulation of this network, which lead to anesthetic-induced loss of consciousness. In this doctoral thesis acute brain slices of mice were used to study the influence of sevoflurane on parts of the thalamocortical network. To record the effects of sevoflurane in detail, an optogenetic approach was established in addition to electrical stimulation of acute brain slices.

Sevoflurane reduced intrinsic excitability of thalamocortical relay neurons and cortical layer IV neurons. Sevoflurane also diminished excitatory glutamatergic synaptic transmission from thalamocortical projection fibres to cortex. Furthermore, it attenuated excitatory intracortical signal propagation and enhanced inhibitory intracortical transmission. Despite these effects, sevoflurane increased the depolarisation of cortical neurons caused by a thalamic stimulus. This may be mediated by inhibition of feedforward inhibition, therefore cortical disinhibition.

The effects of sevoflurane on the thalamocortical network are multifactorial. Contrary to previous assumption the results of this dissertation suggest, that sevoflurane causes enhancement of signal propagation from thalamus to cortex. However, the secondary cortical computation seems to be affected by sevoflurane. This is in accordance with data from *in vivo* studies, which showed persistence of evoked cortical potentials under anesthesia.

Therefore, the present data contribute to the knowledge of neuronal mechanisms leading to sevoflurane-induced loss of consciousness.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham AA. Who named it in anaesthesia? *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia* 2015; 21: 5-7.

Adamantidis A, Carter MC, de Lecea L. Optogenetic deconstruction of sleep-wake circuitry in the brain. *Front Mol Neurosci* 2010; 2: 31.

Adams SR, Tsien RY. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 755-84.

Agmon A, Connors BW. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience* 1991; 41: 365-79.

Akbarian S, Huntsman MM, Kim JJ, Tafazzoli A, Potkin SG, Bunney WE, Jr., Jones EG. GABAA receptor subunit gene expression in human prefrontal cortex: comparison of schizophrenics and controls. *Cereb Cortex* 1995; 5: 550-60.

Alkire MT, Haier RJ, Fallon JH. Toward a unified theory of narcosis: brain imaging evidence for a thalamocortical switch as the neurophysiologic basis of anesthetic-induced unconsciousness. *Conscious Cogn* 2000; 9: 370-86.

Alkire MT, Miller J. General anesthesia and the neural correlates of consciousness. *Prog Brain Res* 2005; 150: 229-44.

Alkire MT, McReynolds JR, Hahn EL, Trivedi AN. Thalamic microinjection of nicotine reverses sevoflurane-induced loss of righting reflex in the rat. *Anesthesiology* 2007; 107: 264-72.

Alkire MT, Gruver R, Miller J, McReynolds JR, Hahn EL, Cahill L. Neuroimaging analysis of an anesthetic gas that blocks human emotional memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008a; 105: 1722-7.

Alkire MT, Hudetz AG, Tononi G. Consciousness and anesthesia. *Science* 2008b; 322: 876-80.

Allen WE, Kauvar IV, Chen MZ, Richman EB, Yang SJ, Chan K, Gradinaru V, Deverman BE, Luo L, Deisseroth K. Global Representations of Goal-Directed Behavior in Distinct Cell Types of Mouse Neocortex. *Neuron* 2017; 94: 891-907.e6.

-
- Arhem P, Klement G, Nilsson J. Mechanisms of anesthesia: towards integrating network, cellular, and molecular level modeling. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28 Suppl 1: S40-7.
- Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 1965; 149: 754-5.
- Baker R, Gent TC, Yang Q, Parker S, Vyssotski AL, Wisden W, Brickley SG, Franks NP. Altered activity in the central medial thalamus precedes changes in the neocortex during transitions into both sleep and propofol anesthesia. *J Neurosci* 2014; 34: 13326-35.
- Behne M, Wilke HJ, Harder S. Clinical pharmacokinetics of sevoflurane. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36: 13-26.
- Bennett MR. The early history of the synapse: from Plato to Sherrington. *Brain Res Bull* 1999; 50: 95-118.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 2009; 89: 847-85.
- Blanton MG, Lo Turco JJ, Kriegstein AR. Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 1989; 30: 203-10.
- Bourassa J, Pinault D, Deschenes M. Corticothalamic projections from the cortical barrel field to the somatosensory thalamus in rats: a single-fibre study using biocytin as an anterograde tracer. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 19-30.
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1987; 20: 365-83.
- Brew HM, Forsythe ID. Two voltage-dependent K⁺ conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *J Neurosci* 1995; 15: 8011-22.
- Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003; 348: 2110-24.
- Caraiscos VB, Newell JG, You-Ten KE, Elliott EM, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA. Selective enhancement of tonic GABAergic inhibition in

-
- murine hippocampal neurons by low concentrations of the volatile anesthetic isoflurane. *J Neurosci* 2004; 24: 8454-8.
- Clarke KW. Desflurane and sevoflurane. New volatile anesthetic agents. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29: 793-810, viii.
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V. GABA_A Receptor-Mediated Tonic Inhibition in Thalamic Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 11553-63.
- Cox CL, Huguenard JR, Prince DA. Nucleus reticularis neurons mediate diverse inhibitory effects in thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8854-9.
- Crandall SR, Cruikshank SJ, Connors BW. A corticothalamic switch: controlling the thalamus with dynamic synapses. *Neuron* 2015; 86: 768-82.
- Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW. Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci* 2007; 10: 462-8.
- Cruikshank SJ, Urabe H, Nurmikko AV, Connors BW. Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron* 2010; 65: 230-45.
- Dehaene S, Changeux JP. Experimental and theoretical approaches to conscious processing. *Neuron* 2011; 70: 200-27.
- Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Meth* 2011; 8: 26-9.
- Diniz PH, Guatimosim C, Binda NS, Costa FL, Gomez MV, Gomez RS. The effects of volatile anesthetics on the extracellular accumulation of [(3)H]GABA in rat brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol* 2014; 34: 71-81.
- Dodt HU, Eder M, Schierloh A, Zieglgansberger W. Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices. *Sci STKE* 2002; 2002: pl2.
- Doi M, Ikeda K. Airway irritation produced by volatile anaesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane. *Can J Anaesth* 1993; 40: 122-6.
- Eger EI, 2nd. New inhaled anesthetics. *Anesthesiology* 1994; 80: 906-22.

-
- Eger EI, 2nd, Sonner JM. Anaesthesia defined (gentlemen, this is no humbug). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2006; 20: 23-9.
- Errington AC, Di Giovanni G, Crunelli V, Cope DW. mGluR control of interneuron output regulates feedforward tonic GABAA inhibition in the visual thalamus. *J Neurosci* 2011; 31: 8669-80.
- Farrant M, Kaila K. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog Brain Res* 2007; 160: 59-87.
- Feldmeyer D. Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat* 2012; 6: 24.
- Fenko L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 389-412.
- Ferrarelli F, Tononi G. The thalamic reticular nucleus and schizophrenia. *Schizophr Bull* 2011; 37: 306-15.
- Fogerson PM, Huguenard JR. Tapping the Brakes: Cellular and Synaptic Mechanisms that Regulate Thalamic Oscillations. *Neuron* 2016; 92: 687-704.
- Franks NP, Lieb WR. Where do general anaesthetics act? *Nature* 1978; 274: 339-42.
- Franks NP, Lieb WR. Is membrane expansion relevant to anaesthesia? *Nature* 1981; 292: 248-51.
- Franks NP, Lieb WR. Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels. *Br J Anaesth* 1993; 71: 65-76.
- Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-14.
- Franks NP, Lieb WR. Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments. *Anesthesiology* 1996; 84: 716-20.
- Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 370-86.

-
- Friederich P, Urban BW. Interaction of intravenous anesthetics with human neuronal potassium currents in relation to clinical concentrations. *Anesthesiology* 1999; 91: 1853-60.
- Fuller PM, Sherman D, Pedersen NP, Saper CB, Lu J. Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J Comp Neurol* 2011; 519: 933-56.
- Gilbertson TA, Scobey R, Wilson M. Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science* 1991; 251: 1613-5.
- Golshani P, Liu XB, Jones EG. Differences in quantal amplitude reflect GluR4- subunit number at corticothalamic synapses on two populations of thalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4172-7.
- Goncalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* 2005; 2: 43.
- Grant E, Hoerder-Suabedissen A, Molnar Z. Development of the Corticothalamic Projections. *Frontiers in Neuroscience* 2012; 6
- Harris RM, Hendrickson AE. Local circuit neurons in the rat ventrobasal thalamus--a GABA immunocytochemical study. *Neuroscience* 1987; 21: 229-36.
- Hartikainen KM, Rorarius M, Perakyla JJ, Laippala PJ, Jantti V. Cortical reactivity during isoflurane burst-suppression anesthesia. *Anesth Analg* 1995; 81: 1223-8.
- Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Eckle VS, Zieglgansberger W, Rammes G. Xenon reduces N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Anesthesiology* 2008; 109: 998-1006.
- Haseneder R, Kratzer S, von Meyer L, Eder M, Kochs E, Rammes G. Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 2009a; 623: 47-51.
- Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Mattusch C, Eder M, Rammes G. Xenon attenuates excitatory synaptic transmission in the rodent prefrontal cortex and spinal cord dorsal horn. *Anesthesiology* 2009b; 111: 1297-307.

-
- Haydon DA, Urban BW. The actions of some general anaesthetics on the potassium current of the squid giant axon. *J Physiol* 1986; 373: 311-27.
- Helmstaedter M, Staiger JF, Sakmann B, Feldmeyer D. Efficient recruitment of layer 2/3 interneurons by layer 4 input in single columns of rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 8273-84.
- Hemmings HC, Jr., Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, Harrison NL. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 503-10.
- Hemmings HC, Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth* 2009; 103: 61-9.
- Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B. Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABAA receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 93-102.
- Hu H, Gan J, Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 2014; 345: 1255-263.
- Hudetz A. Cortical Disintegration Mechanism of Anesthetic-Induced Unconsciousness. In: *Suppressing the Mind: Anesthetic Modulation of Memory and Consciousness*. Hudetz A, Pearce R, eds. Totowa, NJ: Humana Press 2010: 99-125.
- Hudspith MJ. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. *Br J Anaesth* 1997; 78: 731-47.
- Ichinose F, Mi WD, Miyazaki M, Onouchi T, Goto T, Morita S. Lack of correlation between the reduction of sevoflurane MAC and the cerebellar cyclic GMP concentrations in mice treated with 7-nitroindazole. *Anesthesiology* 1998; 89: 143-8.
- Isaacson JS, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* 2011; 72: 231-43.
- Jia F, Pignataro L, Schofield CM, Yue M, Harrison NL, Goldstein PA. An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *J Neurophysiol* 2005; 94: 4491-501.

Johnson RA, Striler E, Sawyer DC, Brunson DB. Comparison of isoflurane with sevoflurane for anesthesia induction and recovery in adult dogs. *Am J Vet Res* 1998; 59: 478-81.

Kerssens C, Hamann S, Peltier S, Hu XP, Byas-Smith MG, Sebel PS. Attenuated brain response to auditory word stimulation with sevoflurane: a functional magnetic resonance imaging study in humans. *Anesthesiology* 2005; 103: 11-9.

Koga K, Sim SE, Chen T, Wu LJ, Kaang BK, Zhuo M. Kainate receptor-mediated synaptic transmissions in the adult rodent insular cortex. *J Neurophysiol* 2012; 108: 1988-98.

Kotani N, Akaike N. The effects of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission. *Brain Res Bull* 2013; 93: 69-79.

Kratzer S, Mattusch C, Kochs E, Eder M, Haseneder R, Rammes G. Xenon attenuates hippocampal long-term potentiation by diminishing synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor currents. *Anesthesiology* 2012; 116: 673-82.

Kretz F-J, Teufel F (2006) *Anästhesie und Intensivmedizin*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Heidelberg

Kusama T, Spivak CE, Whiting P, Dawson VL, Schaeffer JC, Uhl GR. Pharmacology of GABA rho 1 and GABA alpha/beta receptors expressed in *Xenopus* oocytes and COS cells. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 200-6.

Lam YW, Sherman SM. Functional organization of the somatosensory cortical layer 6 feedback to the thalamus. *Cereb Cortex* 2010; 20: 13-24.

Lee U, Ku S, Noh G, Baek S, Choi B, Mashour GA. Disruption of frontal-parietal communication by ketamine, propofol, and sevoflurane. *Anesthesiology* 2013; 118: 1264-75.

Lerche P, Muir WW, Grubb TL. Mask induction of anaesthesia with isoflurane or sevoflurane in premedicated cats. *J Small Anim Pract* 2002; 43: 12-5.

Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, Hegemann P, Landmesser LT, Herlitze S. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity

by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17816-21.

Lu Y, Jian MY, Ouyang YB, Han RQ. Changes in Rat Brain MicroRNA Expression Profiles Following Sevoflurane and Propofol Anesthesia. *Chin Med J (Engl)* 2015; 128: 1510-5.

Luscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 793-807.

Martuzzi R, Ramani R, Qiu M, Rajeevan N, Constable RT. Functional connectivity and alterations in baseline brain state in humans. *Neuroimage* 2010; 49: 823-34.

Mashour GA, Pal D. Interfaces of sleep and anesthesia. *Anesthesiol Clin* 2012; 30: 385-98.

Mashour GA, Alkire MT. Consciousness, anesthesia, and the thalamocortical system. *Anesthesiology* 2013; 118: 13-5.

Mashour GA. Top-down mechanisms of anesthetic-induced unconsciousness. *Front Syst Neurosci* 2014; 8: 115.

Mashour GA. Noble path to oblivion: molecular and neurophysiological mechanisms of xenon. *Anesthesiology* 2015; 122: 971-3.

Mashour GA, Hudetz AG. Bottom-Up and Top-Down Mechanisms of General Anesthetics Modulate Different Dimensions of Consciousness. *Front Neural Circuits* 2017; 11: 44.

Mastakov MY, Baer K, Xu R, Fitzsimons H, During MJ. Combined injection of rAAV with mannitol enhances gene expression in the rat brain. *Mol Ther* 2001; 3: 225-32.

Mattusch C, Kratzer S, Buerge M, Kreuzer M, Engel T, Kopp C, Biel M, Hammelmann V, Ying SW, Goldstein PA, Kochs E, Haseneder R, Rammes G. Impact of Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated Cation Channel Type 2 for the Xenon-mediated Anesthetic Effect: Evidence from In Vitro and In Vivo Experiments. *Anesthesiology* 2015; 122: 1047-59.

-
- McCormick DA, Bal T. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 185-215.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000; 130: 1007s-15s.
- Meyer H. Studien über die Narkose. *Archiv. Exptl. Pathol. Pharmakol. Naunyn-Schiedeberg's* 1899; 42: 109.
- Mihic SJ, Harris RA. GABA and the GABAA receptor. *Alcohol Health Res World* 1997; 21: 127-31.
- Mockenhaupt S, Grimm D. Adeno-assoziierte Viren für effizientes Gene Targeting in humanen Zellen. *BIOspektrum* 2011; 17: 533.
- Moe MC, Berg-Johnsen J, Larsen GA, Roste GK, Vinje ML. Sevoflurane reduces synaptic glutamate release in human synaptosomes. *J Neurosurg Anesthesiol* 2002; 14: 180-6.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29: 365-402.
- Mountcastle VB. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 1997; 120 (Pt 4): 701-22.
- Munsch T, Yanagawa Y, Obata K, Pape HC. Dopaminergic control of local interneuron activity in the thalamus. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 290-4.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13940-5.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260: 799-802.
- Nishikawa K, Kubo K, Obata H, Yanagawa Y, Saito S. The influence of manipulations to alter ambient GABA concentrations on the hypnotic and immobilizing actions produced by sevoflurane, propofol, and midazolam. *Neuropharmacology* 2011; 61: 172-80.

-
- Ouyang W, Wang G, Hemmings HC, Jr. Isoflurane and propofol inhibit voltage-gated sodium channels in isolated rat neurohypophysial nerve terminals. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 373-81.
- Overton CE (1901) Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Fischer, Jena
- Pape H-C, Meuth Sven G, Seidenbecher T, Munsch T, Budde T (2005) Der Thalamus: Tor zum Bewusstsein und Rhythmusgenerator im Gehirn. In: *e-Neuroforum*. 44
- Petersen CC. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 2007; 56: 339-55.
- Petreaanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* 2007; 10: 663-8.
- Petrenko AB, Yamakura T, Sakimura K, Baba H. Defining the role of NMDA receptors in anesthesia: are we there yet? *Eur J Pharmacol* 2014; 723: 29-37.
- Poulet JF, Fernandez LM, Crochet S, Petersen CC. Thalamic control of cortical states. *Nat Neurosci* 2012; 15: 370-2.
- Puntel M, Kroeger KM, Sanderson NS, Thomas CE, Castro MG, Lowenstein PR. Gene transfer into rat brain using adenoviral vectors. *Curr Protoc Neurosci* 2010; Chapter 4: Unit 4.24.
- Queenan BN, Lee KJ, Pak DT. Wherefore art thou, homeo(stasis)? Functional diversity in homeostatic synaptic plasticity. *Neural Plast* 2012; 2012: 718203.
- Ratnakumari L, Hemmings HC, Jr. Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane. *Anesthesiology* 1998; 88: 1043-54.
- Rein ML, Deussing JM. The optogenetic (r)evolution. *Mol Genet Genomics* 2012; 287: 95-109.
- Ries CR, Puil E. Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1802-9.
- Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 709-20.

-
- Safronov BV, Bischoff U, Vogel W. Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J Physiol* 1996; 493 (Pt 2): 393-408.
- Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* 2017; 93: 747-65.
- Scheller MS, Saidman LJ, Partridge BL. MAC of sevoflurane in humans and the New Zealand white rabbit. *Can J Anaesth* 1988; 35: 153-6.
- Schlame M, Hemmings HC, Jr. Inhibition by volatile anesthetics of endogenous glutamate release from synaptosomes by a presynaptic mechanism. *Anesthesiology* 1995; 82: 1406-16.
- Schulte am Esch J, Kochs E, Bause H (2000) *Anästhesie und Intensivmedizin*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Sebel LE, Richardson JE, Singh SP, Bell SV, Jenkins A. Additive effects of sevoflurane and propofol on gamma-aminobutyric acid receptor function. *Anesthesiology* 2006; 104: 1176-83.
- Sherman SM, Koch C. The control of retinogeniculate transmission in the mammalian lateral geniculate nucleus. *Exp Brain Res* 1986; 63: 1-20.
- Sieghart W, Sperk G. Subunit Composition, Distribution and Function of GABA-A Receptor Subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002; 2: 795-816.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* 2004; 279: 41422-35.
- Sinowatz F, Hess H. Zentrales und Autonomes Nervensystem. In: *Kurzlehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie* München: 2006: 346-55.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 26: 113-35.
- Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, Homanics GE, Kendig J, Orser B, Raines DE, Rampil IJ, Trudell J, Vissel B, Eger EI, 2nd. Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003; 97: 718-40.

Steffey EP, Mama KR. Inhalation Anesthetics. In: Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia, 4 edn. Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, eds. Iowa, USA: Blackwell Publishing 2007: 355-94.

Stephenson FA. The GABAA receptors. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 1): 1-9.

Steriade M, McCarley R (2005) *Brain Control of Wakefulness and Sleep*, 2 edn. Springer US. 728

Strum DP, Eger EI, 2nd. Partition coefficients for sevoflurane in human blood, saline, and olive oil. *Anesth Analg* 1987; 66: 654-6.

Stucke AG, Stuth EA, Tonkovic-Capin V, Tonkovic-Capin M, Hopp FA, Kampine JP, Zuperku EJ. Effects of sevoflurane on excitatory neurotransmission to medullary expiratory neurons and on phrenic nerve activity in a decerebrate dog model. *Anesthesiology* 2001; 95: 485-91.

Sun QQ, Huguenard JR, Prince DA. Barrel cortex microcircuits: thalamocortical feedforward inhibition in spiny stellate cells is mediated by a small number of fast-spiking interneurons. *J Neurosci* 2006; 26: 1219-30.

Sutor B, Grimm C, Polder HR. Voltage-clamp-controlled current-clamp recordings from neurons: an electrophysiological technique enabling the detection of fast potential changes at preset holding potentials. *Pflugers Arch* 2003; 446: 133-41.

Takimori T, Ogawa T, Nishida M. Effective range of electrical stimulation in brain slice preparations. *Electrical Engineering in Japan* 1999; 127: 56-63.

Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wang Y, Zhi Wu C, Markram H (2003) Neocortex: Basic Neuron Types. In: *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*, second edn. Ed Arbib MA. Bradford Book. 719-25

Uhrig L, Dehaene S, Jarraya B. Cerebral mechanisms of general anesthesia. *Ann Fr Anesth Reanim* 2014; 33: 72-82.

Ulfig N (2008) *Kurzlehrbuch Neuroanatomie*, Stuttgart

van Swinderen B, Kottler B. Explaining general anesthesia: a two-step hypothesis linking sleep circuits and the synaptic release machinery. *Bioessays* 2014; 36: 372-81.

Velly LJ, Rey MF, Bruder NJ, Gouvitsos FA, Witjas T, Regis JM, Peragut JC, Gouin FM. Differential dynamic of action on cortical and subcortical structures of anesthetic agents during induction of anesthesia. *Anesthesiology* 2007; 107: 202-12.

Vinje ML, Moe MC, Valo ET, Berg-Johnsen J. The effect of sevoflurane on glutamate release and uptake in rat cerebrocortical presynaptic terminals. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 103-8.

Walker MC, Semyanov A. Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results Probl Cell Differ* 2008; 44: 29-48.

Wallin RF, Regan BM, Napoli MD, Stern IJ. Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent. *Anesth Analg* 1975; 54: 758-66.

Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1274-81.

Weinberg MS, Samulski RJ, McCown TJ. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology* 2013; 69: 82-8.

Wong J, Abilez OJ, Kuhl E. Computational Optogenetics: A Novel Continuum Framework for the Photoelectrochemistry of Living Systems. *J Mech Phys Solids* 2012; 60: 1158-78.

Woolsey TA, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 1970; 17: 205-42.

Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99: 10405-10.

Ying SW, Goldstein PA. Propofol-block of SK channels in reticular thalamic neurons enhances GABAergic inhibition in relay neurons. *J Neurophysiol* 2005; 93: 1935-48.

Ying SW, Abbas SY, Harrison NL, Goldstein PA. Propofol block of I(h) contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 465-80.

Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, Ogata J, Yanagita T, Uezono Y. Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Na(v)1.8, Na(v)1.7, and Na(v)1.4 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Anesth* 2011; 25: 609-13.

Yu J, Gutnisky DA, Hires SA, Svoboda K. Layer 4 fast-spiking interneurons filter thalamocortical signals during active somatosensation. *Nat Neurosci* 2016; 19: 1647-57.

Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 2006; 3: 785-92.

Zhou C, Liu J, Chen XD. General anesthesia mediated by effects on ion channels. *World J Crit Care Med* 2012; 1: 80-93.

IX. ANHANG

Verwendete Materialien, Geräte und Software

Materialien, Geräte, Software	Genau Bezeichnung, Hersteller
Analysewaage	LA 164i, VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aufzeichnungssoftware HEKA Pulse	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland
Auswertesoftware Igor Pro 5	Igor Pro 5, Wave Metrics, Lake Oswego, USA
Auswertesoftware GraphPad Prism 7.03	GraphPad Prism 7.03, GraphPad Software, Inc, USA
Borosilikatglaskapillaren	Innendurchmesser 1,17 mm, Außendurchmesser 1,5 mm; GB150EFT-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Continous Wave Laser	Spectra Physics Excelsior®One™ 488FC-70, Santa Clara, CA, USA
Einmalskalpell	Disposable Scalpel, Stainless Steel Blade with Plastic Handle, No.15, FEATHER® Safety Razor Co. Ltd, pfm medical AG, Köln, Deutschland
Fluoreszenzfilter	BP 500/20, FT 515, BP 535/30, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z.1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Glasfaser	FG200LEA, Patch Fiber Cable, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland
Guillotine	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Handbohrer	Labset-N, PAGOEN Werkzeugtechnik, REWATRONIK®-Products, Starnberg, Deutschland
Hartmetallbohrkopf	HM 71007, Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Deutschland
Imaging Control Unit	Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Injektionskanülen Mikroinjektionsspritze	NanoFil™, NF34BV 34 GA. BEVELED NEEDLE, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA

Irisschere zur Gehirnpräparation	14094-11, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Kamera Patch-Clamp-Messplatz	Digital Camera C11440, ORCA-flash4.0LT, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Kryotom	Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Live Acquisition	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Microsoft Office für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikroinjektionsspritze	Nanofil TM Syringe, 10 µl, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA
Mikromanipulatoren Patch-Clamp-Messplatz	SM7-Remote control system, Luigs & Neumann, Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland
Mikromanipulatoren Stereotakt	Scientifica, P Pad Lite, East Sussex, UK
Mikropumpe	UMP3 und Micro Syringe Pump Controller, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Mikroskop Patch-Clamp-Messplatz	Axioskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	MiniStar silverline, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus, 25 x 75 x 1,0 mm, Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Ohrlochzange	24212-02, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Patch-Clamp-Verstärker	SEC-10L, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland
Pinzetten	5/45, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland 11271-30, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenziehgerät	DMZ Universal Electrode Puller, Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried
Polychrome V	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Rasierklingen für das Vibratom	Einweg-Rasierklingen, Wilkinson Sword, UK
Schermaschine	Exacta GT451, Aesculap, Suhl, Deutschland

Schlauchpumpe	REGLO Analog MS-4/12, ISMATEC®, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Sevofluran Vapor	Sevoflurane Vapor 19.3, Sevorane® ABBOTT, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Stereotakt	Precision Stereotaxic System for small laboratory animals, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland
Steuerungssoftware Laser	Excelsior® One™ Controller Version 3.1.1, Newport Spectra physics GmbH, Stahnsdorf, Deutschland
Stimulationselektrode	WE2SNEX5-PT, Tungsten Concentric Electrodes, MICROPROBES, Gaithersburg, USA
Stimulus-Isolator	Stimulus-Isolator, Series-No. 2533, Digitimer Ltd., Hertfordshire, UK
Temperaturfühler	PL-120-T2, Voltcraft®, Conrad Electronics, Hirschau, Deutschland
Vibrator	Microm HM 650V, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Vortex-Schüttelgerät	D-6012, NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	JULABO ED Einhängethermostat, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad mit Wärmematte Maus-OP	JULABO U3 Thermostatic Waterbath, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
ZEN Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Verwendete Substanzen

Chemikalien:

Substanz	Hersteller
AP-5	Tocris Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
ATP-K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bicucullinmethiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CaCl ₂ -Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Cäsiummethansulfonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CGP 55845 Hydrochlorid	Abcam plc, Cambridge, UK
CsCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
D-(+) Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GTP Na	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
K-Glukonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lidocain-Natrium-N-Ethylchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mannit-Lösung 20 %	SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland
MgCl ₂ -Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MgSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ -Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NBQX	Tocris Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

PBS	AppliChem Pancreac GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sevofluran Sevorane® 100 % (V/V)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TTX	Tocris Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Viraler Vektor:

Bezeichnung	Hersteller
AAV1.hSyn.ChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH	Penn Vector Core, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP (Plasmid)	Addgene, Cambridge, USA

Medikamente:

Substanz	Hersteller
Atipamezol, Antisedan® 5 mg/ml Injektionslösung	Elanco Animal Health, Bad Homburg, Deutschland
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Fentanyl, Fentadon® 50 µg/ml	Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande
Flumazenil 0,1 mg/ml Injektionslösung	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Isofluran CP®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Medetomidin, Sedator® 1mg/ml Injektionslösung	Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande
Meloxicam, Metacam® 1,5 mg/ml Suspension zum Eingeben	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Metamizol Novaminsulfon-ratiopharm 500 mg/ml	Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland
Midazolam 5 mg/5 ml Injektionslösung	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Naloxon 0,4 mg/ml, Injektionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Xylocain® 2 %	AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich meiner Doktormutter Frau Univ.-Prof. Dr. H. Potschka für die Übernahme des Themas an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die unkomplizierte Form der externen Betreuung und für die hilfreiche Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. E. Kochs und Herrn Univ.-Prof. Dr. G. Schneider für die Möglichkeit die Dissertation an der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums rechts der Isar der TU München durchführen zu können.

Dabei auch vielen Dank allen Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie und des Zentrums für präklinische Forschung, die mich auf dem Weg begleitet und unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern dieser Dissertation Herrn PD Dr. R. Haseneder und Herrn Dr. S. Kratzer für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die geduldige Betreuung und Hilfestellung in allen Belangen der Doktorarbeit.

Elisabeth Koch, Dr. Sebastian Schmid und Dr. Kristine Kellermann möchte ich für die wertvolle Unterstützung während der Methodenetablierung und für die Einarbeitung und Hilfe in allen labortechnischen Fragen danken.

Danke auch an Nina Bayer und Andreas Blaschke für die Unterstützung in allen Laborangelegenheiten.

Allen Mitdoktoranden vielen Dank für die gemeinsame Zeit und den Zusammenhalt, v.a. Stefan und Konrad für die angenehme Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe. Besonderer Dank geht an Tanja für die gegenseitige Motivation und Aufmunterung. Vielen Dank für deine unermüdliche Hilfe beim Korrekturlesen und für die Freundschaft!

Für die großartige mentale Unterstützung möchte ich meiner Familie danken, durch euch war es mir möglich Tiermedizin zu studieren und diese Promotion anzufertigen. Vielen lieben Dank auch an Barbara, dass du mir seit der Schulzeit in allen Lebenslagen zur Seite stehst und für die nötige Abwechslung neben den oft nervenaufreibenden Zeiten im Studium und während der Erstellung dieser Arbeit gesorgt hast.