Neuronale Wirkung von Ketamin

Pharmakologische Untersuchung an spinalen Hinterhornneuronen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schnöbel, Rose, geb. Ehehalt
aus Gießen

Gießen, 2002

Aus dem Physiologischen Institut

Leiter: Prof. Dr. Dr. M. Piper
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. Vogel
Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 24. Juni 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung ... 1

2. Spinale Hinterhornneurone ... 4

3. Mechanismus der neuronalen Erregbarkeit ... 7

4. Ketamin als Wirkstoff ... 9

5. Materialien und Arbeitsweisen ... 13

5.1 Patch-Clamp-Technik ... 13
5.2 Präparation des Rückenmarks ... 18
5.3 Methode der Soma-Isolierung ... 20
5.4 Lösungen ... 22
5.5 Elektrophysiologische Technik ... 25
5.6 Aufzeichnungs-, Darstellungs- und Auswertungsverfahren ... 28

6. Ergebnisse ... 29

6.1 Ketamineffekte an Natrium-Kanälen ... 29

6.1.1 Wirkung von Ketamin im Gewebeschnitt ... 30
6.1.2 Untersuchungen am isolierten Soma ... 31
6.1.3 Blockierung der Natriumstromkomponenten ... 38
6.1.4 Bindungsstelle der Ketaminmoleküle ... 39

6.2 Ketamineffekte an Kalium-Kanälen ... 42

6.2.1 Trennungsmethode der Kalium-Ströme ... 42
6.2.2 Wirkung auf Kalium-Kanäle im Gewebeschnitt ... 43
6.2.3 Effekte von Ketamin am isolierten Soma ... 45

6.3 Auswirkungen von Ketamin auf die neuronale Erregbarkeit ... 50

7. Diskussion ... 54

8. Schlussfolgerung und Ausblick ... 63

9. Anhang ... 65

9.1 Literaturverzeichnis ... 65
9.2 Abbildungsverzeichnis ... 76
9.3 Tabellenverzeichnis ... 77
9.4 Gleichungsverzeichnis ... 78

Zusammenfassung

Lebenslauf

Danksagung

1. Einleitung und Fragestellung

Auf der Suche nach einem kurz wirkenden Narkotikum berichteten Greifenstein et al. (GREIFENSTEIN et al., 1959) zum ersten Mal im Jahr 1959 über das Pharmakon Sernyl (Phencyclidin). Dieser Wirkstoff besaß sehr gute analgetische Eigenschaften und war mit geringen Kreislaufwirkungen verbunden. Trotzdem wurde seine Anwendung in der anästhesiologischen Praxis bald eingestellt, da bei den Patienten Bewusstseinsspaltungen auftraten.

Anwendung fand jedoch wieder ein Derivat der Ursprungssubstanz mit ähnlich guten analgetischen und positiven Kreislaufeigenschaften und geringeren psychischen Nebenwirkungen. Es ist seitdem unter dem Namen 2-(o-chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon hydrochlorid oder Ketamin (Ketanest®) im klinischen Alltag gebräuchlich. In Kombination mit Benzodiazepinen wird es überwiegend für kleine chirurgische Eingriffe, in der Notfallmedizin bei Schock und in seltenen Fällen als Einleitungsmittel für die Allgemeinnarkose eingesetzt. Seine pharmakologischen Wirkungen übt es hauptsächlich auf das zentrale Nervensystem und das kardiovaskuläre System aus.

Im zentralen Nervensystem führt es zur sogenannten dissoziativen Anästhesie, einer Art kataleptischem Zustand, in dem der Patient von der Umgebung abgekoppelt zu sein scheint, ohne dass ein normaler Schlafzustand vorhanden ist. Mit dieser Situation können eine ausgeprägte Analgesie und Amnesie einhergehen. Bekannt ist weiterhin, dass unter Ketamineinwirkung bizarre, teils furchterregende Träume und optische Halluzinationen auftreten.

Auf das Herz-Kreislauf-System kann Ketamin eine stimulierende Wirkung ausüben. Es führt unter anderem zu Tachykardien sowie erhöhtem Blutdruck. Die Ursache hierfür ist noch nicht eindeutig geklärt. In der Forschung stehen ein kokainartiger Effekt, eine zentrale Sympathikusstimulation und eine Beeinträchtigung der Barorezeptoren-Funktion zur Diskussion. Die zentrale Sympathikusstimulation scheint jedoch den Hauptmechanismus darzustellen, da Untersuchungen gezeigt haben, dass Ketamin über einen zentral ausgelösten Mechanismus das sympathonervale und das sympathoadrenerge System aktivieren kann (APPEL et al., 1979).

Ketamin sollte hingegen nicht bei Patienten mit manifester Herzinsuffizienz, erhöhtem intrakraniellem Druck, perforierten Augenverletzungen, Präeklampsie, Eklampsie, psychiatrischen Erkrankungen und manifester Hyperthyreose angewendet werden.
Die Applikationsform von Ketamin ist im klinischen Alltag vor allem die intravenöse und seltener die intramuskuläre. Eine weitere Möglichkeit besteht in der epiduralen oder intrathekalen Gabe von Ketamin. Verschiedene Erklärungsansätze sind zum genauen Wirkmechanismus der zuletzt genannten Verabreichungsform bekannt (GEBHARDT, 1994). Der Forschung fehlen allerdings Erkenntnisse im Bezug auf die lokalanästhetische, rückenmarksnahe Applikation.
Die Anwendung der Patch-Clamp-Methode an der Slice-Präparation der Rückenmarks kann Aufschluss über die Beeinflussung von Ionenkanälen an sensorischen Neuronen geben. Die Formen der neuronalen Signalverarbeitung können auf diese Weise erforscht werden. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich deshalb mit folgender Fragestellung:

Welchen Einfluss und welche Auswirkung haben Ketamin und seine Enantiomere auf die Ionenkanäle und Erregbarkeit der Hinterhornneurone neugeborener Ratten unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik?

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind vorgestellt und veröffentlicht worden in:

Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI 2000 (in Würzburg)
Wolff, M.; Ehehalt, R.; Olschewski, A.; Vogel, W. und G. Hempelmann: Effekte von Ketamin auf sensorische Hinterhornneurone des Rückenmarks.

Joint Meeting with CENSA (World Federation of Societies of Anesthesiologists), 30th Congress of the Hungarian Society of Anesthesiology and Intensive Care Medicine 2000 (in Siófok)
Olschewski, A.; Ehehalt, R.; Wolff, M.; Vogel, W. and G. Hempelmann: Effect of ketamine on sensory neurons of the spinal cord.

Joint meeting of the German Physiological Society and the Scandinavian Physiological Society 2001 (in Berlin)
Ehehalt, R.; Wolff, M; Vogel, W, Hempelmann, G. and A. Olschewski: Stereoselective block by enantiomers of ketamine on sodium channels of spinal dorsal horn neurones.

Anästhesiologie & Intensivmedizin 41. S. 813-846 (2000)
Wolff, M.; Ehehalt, R.; Olschewski, A.; Vogel, W. und G. Hempelmann: Effekte von Ketamin auf sensorische Hinterhornneurone des Rückenmarks.

Pflügers Archiv 441 (8): R159 (2001)
Ehehalt, R.; Wolff, M.; Vogel, W.; Hempelmann, G. und A. Olschewski: Stereoselective block by enantiomers of ketamine on sodium channels of spinal dorsal horn neurones.

Deutscher Anästhesiekongress, 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin 2002 (in Nürnberg), Teilnahme am Vortragswettebewerb:
Ehehalt, R.; Wolff, M; Hempelmann, G. und A. Olschewski: Lokalanästhetische Effekte von Ketamin an Hinterhornneuronen des Rückenmarks.

2. Spinale Hinterhornneurone

Das Rückenmark (Medulla spinalis) ist ein Teil des zentralen Nervensystems. Über Spinalnerven werden Signale aus der Peripherie aufgenommen. Ankommende Signale können entweder ins Gehirn weitergeleitet oder bereits auf Rückenmarksebene reflektorisch beantwortet werden. Auf Rückenmarksquerschnitten sind die den Zentralkanal umgebende graue und die sie umschließende weiße Substanz makroskopisch erkennbar. Erstere besteht im wesentlichen aus den Perikarya von Neuronen, während letztere Nervenfasern und Gliazellen aufweist. Die Vorwölbungen der grauen Substanz, wie in Abbildung 1C zu sehen ist, stellen die Hinterhörner und die ventralen Prominenzen die Vorderhörner dar.

Das Rückenmark kann zytoarchitektonisch in Laminae gegliedert werden. Dies wird in der Abbildung 1A (vgl. Seite 5) dargestellt. Die Einteilung ist durch Rexed geprägt worden, wobei dem Hinterhorn sechs der zehn Laminae zugeordnet werden (REXED, 1952 und 1954). Die Laminae unterscheiden sich sowohl aufgrund der Form, Größe und Dichte ihrer Neurone als auch durch die an ihnen endenden afferenten Nervenfasern. Die Klassifizierung der afferenten Fasern ist unter anderem von Erlanger und Gasser (GASSER und GRUNDFEST, 1939) vorgenommen worden. Die Darstellung der Laminae I-IV und die daran endenden afferenten Fasern sind in Abbildung 1B (vgl. Seite 5) zu sehen. In Lamina I enden die dünnen, marklosen C-Fasern, während sich in den Außenbezirken der Lamina I und in der Lamina II die markhaltigen Aδ-Fasern hinziehen (RETHELYI, 1977; LAMOTTE, 1977; LIGHT und PERL, 1977; KUMAZAWA und PERL, 1978; LIGHT und PERL, 1979a; LIGHT und PERL, 1979b; LIGHT et al., 1979; SUGIURA et al., 1986). Diese Fasern sind für die Übertragung der Nozizeption und der Vermittlung von Thermozeption zuständig. Die dicken markhaltigen Aα-, Aβ– und Aγ–Fasern leiten unter anderem Informationen der Muskelspindeln und der Chemorezeptoren zu den Laminae III-VI (LAMOTTE, 1977; LIGHT und PERL, 1977; LIGHT und PERL, 1979a; LIGHT und PERL, 1979b; GRANT et al., 1979; RALSTON und RALSTON, 1982).

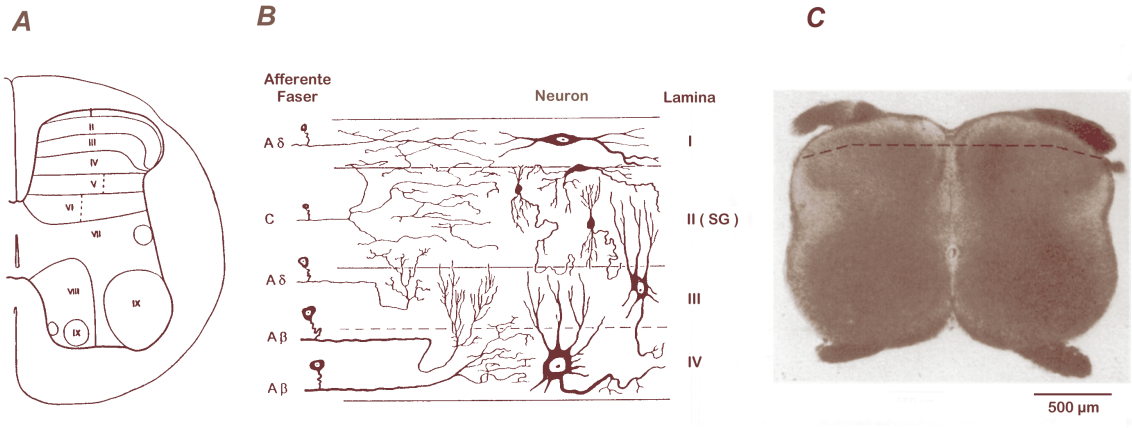


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau des Hinterhorns

A. Schematische Zeichnung der grauen Substanz des Rückenmarks, die in zehn Laminae eingeteilt wird. Die Abbildung zeigt die Laminae I-IX des fünften lumbalen Segments einer neugeborenen Katze (REXED, 1952).
B. Darstellung der Laminae I-IV und der daran endenden afferenten Nervenfasern Aδ–Aβ. Die Lamina II entspricht der Substantia gelatinosa (CEVERO und IGGO, 1980).
C. Rückenmarksquerschnitt aus der intumescentia lumbalis einer fünf Tage alten Ratte. Die gestrichelte Linie grenzt die Hinterhornregion ab, aus der die untersuchten Neurone stammen (SAFRONOV et al., 1997).

Die spinalen Hinterhornneurone nehmen eine wichtige Rolle in der Verarbeitung und Weiterleitung von sensorischen Informationen ein. Die Abbildung 2 (vgl. Seite 6) gibt einen schematischen Überblick über den Verlauf aufsteigender und absteigender modulierender Bahnen. Auf allen Rückenmarksebenen kann eine modulierende Hemmung und Aktivierung stattfinden. Die Nervenzellen müssen zusammenlaufende, unterschiedliche Afferenzen aus demselben Gebiet oder aus verschiedenen Organen organisieren. Für nozizeptive Signale stellen sie die erste Schaltstelle des zentralen Nervensystems dar. Die Weiterleitung der Signale zum Gehirn kann entweder kontralateral über den Tractus spinothalamicus und den Tractus spinoreticularis oder ipsilateral über den Tractus spinocervicalis erfolgen.

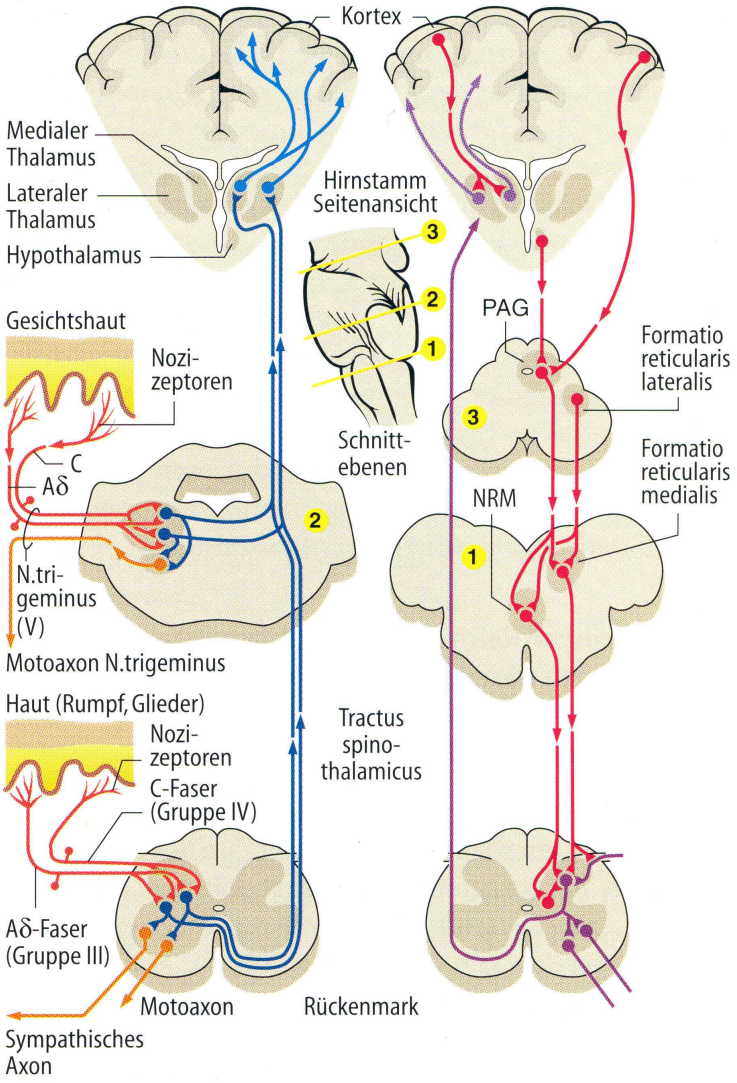


Abbildung 2: Schematischer Überblick über den Verlauf aszendierender und deszendierender modulierender Bahnen

Links: Die Afferenzen enden im Rückenmark an den Neuronen des Hinterhorns. Von dort aus werden die Informationen teilweise durch den Tractus spinothalamicus weitergeleitet. Auf dem Weg zum Thalamus kommen auch noch einige, aus dem Nervus trigeminus stammenden Afferenzen des Kopfbereichs hinzu. Thalamokortikale Bahnen können ihren Ursprung im lateralen Thalamus und ihren Endpunkt im sensomotorischen Kortex haben.

Mitte: Die eingesetzte Figur zeigt die Lage der Hirnstammschnitte an.

Rechts: Die deszendierenden Bahnen modulieren den nozizeptiven Zustrom von Informationen. Ihren Einfluss üben sie überwiegend auf spinaler Ebene aus. PAG: periaquäduktales Gebiet; NRM: Nucleus raphe magnus (SCHMIDT et al., 2000).

3. Mechanismus der neuronalen Erregbarkeit

Die Änderung des Membranpotenzials eines Neurons dient zur Nachrichtenübermittlung im Nervensystem. Obwohl das Membranpotenzial im Ruhezustand (etwa -70 mV) ein Mischpotenzial des Natrium- (+61 mV) und Kalium-Gleichgewichtspotenzials (-90 mV) ist, kann das Membranpotenzial weitgehend als Kalium-Gleichgewichtspotenzial interpretiert werden. Es ist deutlich in Richtung Kalium-Gleichgewichtspotenzial verschoben. Mit Hilfe der Nernst-Formel, d. h. mit der Gleichung 1 (NERNST, 1888), ist es möglich, das Gleichgewichtspotenzial zu errechnen:

Gleichung 1:

$$E_{K^+} = \frac{R * T}{z * F} \ln * \frac{[K^+]\text{innen}}{[K^+]\text{außen}}$$

E_K^+ = Spannung des Membranpotenzials [mV]
R = allgemeine Gaskonstante (8,31 $J*K^{-1}*mol^{-1}$)
T = absolute Temperatur (hier: 296 K)
z = Wertigkeit des Ions (für Kalium und Natrium gleich 1)
F = Faraday-Konstante ($9{,}648*10^4$ $C*mol^{-1}$)
$[K^+]$ = Konzentration von K^+-Ionen in mmol/l an der Innen- bzw. Außenseite der Membran

Das Ruhepotenzial stellt ein Diffusionspotenzial dar. Es entsteht aufgrund der unterschiedlichen Permeabilität verschiedener Ionen. Intrazellulär befinden sich Kalium-Ionen in einer 40fach höheren Konzentration als im extrazellulären Raum, die Natrium-Konzentration im Zellinneren ist zwölffach niedriger als die extrazelluläre. Aufgrund von aktiven Transportmechanismen können die auftretenden passiven Ströme von Natrium-Ionen in den intrazellulären und von Kalium-Ionen in den extrazellulären Bereich kompensiert werden. Ein Abbau bestehender Konzentrationsgradienten und somit des Ruhemembranpotenzials kann dadurch verhindert werden.
Wird eine Zellmembran von ihrem negativen Ruhemembranpotenzial durch einen Reiz in positive Richtung gelenkt (Depolarisation), so öffnen sich ab einer bestimmten

Schwelle Natrium-Kanäle, die zu einer Potenzialumkehr führen können. Allerdings kommt es schon zeit- und potenzialabhängig vor dem Erreichen des Natrium-Gleichgewichtspotenzials zu einer Inaktivierung des Natrium-Systems und zu einer Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit, die zu einem Kalium-Strom aus der Zelle führt. Sowohl die Inaktivierung der Natrium-Kanäle als auch der zunehmende Kalium-Strom wirken der Depolarisation entgegen und es kommt zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotenzials der Zelle (Repolarisation). Diese Potenzialumkehr wird als Aktionspotenzial bezeichnet und ist die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit einer Zelle. Informationen über die Reizstärke sind in der die Aktionspotenziale auslösenden Frequenz enthalten.

4. Ketamin als Wirkstoff

Ketamin ist ein Phencyclidinderivat, das in Deutschland seit 1969 von der Firma Gödecke/Parke-Davis (jetzt Pfitzer) unter dem Namen Ketanest ® vertrieben wird. Es ist ein sehr schnell wirkendes Medikament, dessen Effekte aber auch wieder rasch abklingen können. Die Rückverteilungen in die Muskulatur und das Fettgewebe spielen hier eine entscheidende Rolle. In der folgenden Tabelle 1 werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Ketamin dargestellt.

Tabelle 1: Physikalische und chemische Charakteristika von Ketamin

Kategorie	Ketamin-Hydrochlorid
Chemische Bezeichnung	2-(o-chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon hydrochlorid
Relatives Molekulargewicht	274,19 g/mol
Beschreibung	Weißes, kristallines Pulver mit einem schwachen, charakteristischen Geruch
Löslichkeit	Löslich in Wasser, Methanol und Ethanol
pH	3,0 – 4,5
pKa	7,5
Log(p)	2,18
Chiralität	Das chirale Zentrum befindet sich am C-2-Atom des Cyclohexanonrings, so dass die zwei enantiomeren Formen S-(+) und R-(-) vorliegen können.

(nach Analysezertifikat von Gödecke/Parke-Davis, Freiburg)

Wie in Tabelle 1 zu sehen, besitzt Ketamin eine chirales Zentrum. Es stellt biochemisch gesehen ein Razemat dar, welches zu gleichen Teilen aus zwei optischen Enantiomeren besteht, dem rechtsdrehenden S-(+)- sowie seinem linksdrehenden R-(-)-Ketamin. In Abbildung 3 (vgl. Seite 10) ist ein Schema dieser Enantiomere dargestellt.

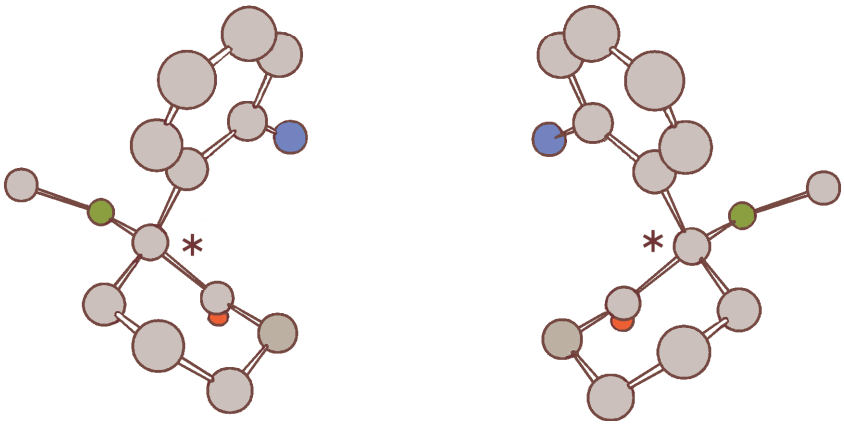


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stereoisomere

Links abgebildet ist das S-(+)-Enantiomer und rechts das R-(-)-Enantiomer von Ketamin. Mit einem Sternchen wird das chirale Zentrum, mit Rot Sauerstoff, mit Grün Stickstoff und mit Blau Chlorid aufgezeigt.

Durch Untersuchungen mit Ketamin haben Corssen und Domino den Begriff der dissoziativen Anästhesie geprägt (CORSSEN und DOMINO, 1966). Sie haben festgestellt, dass unter Ketamineinfluss sensorische Signale zwar kortikale, nicht aber assoziative Gehirnareale erreichen. Da somit keine echten sensorischen Blockaden auftreten, kommt es besonders in der Aufwachphase zu einer veränderten Reaktionslage des Gehirns, die sich in psychotischen, alptraumhaften und bedrohlichen Empfindungen der Patienten (Herzrhythmus- und Blutdruckanstieg) äußert. Hierzu haben mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander nachgewiesen, dass S-(+)-Ketamin in der postoperativen Aufwachphase bezogen auf Amnesie, Kurzzeitgedächtnis, Konzentrationsfähigkeit und Vigilanz deutlich weniger psychische Störungen hervorruft als sein R-(-)-Enantiomer (HEMPELMANN und KUHN, 1997; PFENNINGER, 1994; DOENICKE et al., 1992).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von R-(-)-Ketamin und S-(+)-Ketamin besteht in den verschieden stark ausgeprägten pharmakologischen Wirkungen. So bindet zum Beispiel S-(+)-Ketamin mit einer vierfach höheren Affinität als R-(-)-Ketamin an NMDA-Rezeptoren an (KOEK und WOODS 1984). S-(+)-Ketamin hat ferner eine eineinhalb- bis dreifach stärkere hypnotische Wirkung als das R-(-)-Enantiomer (RYDER, 1978). Desweiteren besitzt S-(+)-Ketamin eine zweifach höhere analgetische Potenz als das Razemat und eine dreifach höhere als R-(-)-Ketamin (RYDER, 1978).

Seine Wirkung kann Ketamin über verschiedene Rezeptorsysteme entfalten. Dazu gehören GABA-, NMDA-, non-NMDA-, Opiat-, nikotinische Azetylcholin-, muskarinische Azetylcholin-, monoaminerge Rezeptoren, Glutamat-NO-cGMP-Systeme und spannungsgesteuerte Ionenkanäle. An der zentralen Rolle der NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) bezüglich der Analgesie, Amnesie, Anästhesie und psychomimetische Wirkungen besteht kein Zweifel (KRESS, 1997). Diese Bindungsstellen können als postsynaptische neuronale Wirkorte von Ketamin bei der Verminderung der Erregung im zentralen Nervensystem angesehen werden (KRESS, 1997; ANIS et al., 1983; BROCKMEYER und KENDIG, 1995; CARLÀ und MORONI, 1992; DAVIES et al., 1988; OSHIMA und RICHARDS, 1988; YAMAMURA et al., 1990). Innerhalb dieser Rezeptoren stellt ein Phencyclidin-Rezeptor die eigentliche Bindungsstelle für Ketamin dar (VINCENT et al., 1979). Über ihn findet die nichtkompetitive Hemmung der NMDA-Agonisten statt (LODGE und JOHNSON, 1990). Da aber reine NMDA-Antagonisten auf spinaler Ebene schlechte Analgetika sind, wird die schmerzlindernde Wirkung von Ketamin wahrscheinlich über andere Mechanismen und zusätzliche zerebrale Effekte verursacht (GORDH et al., 1995; KRESS, 1994; KRESS, 1997; NÄSSTRÖM et al., 1992).

Neben seinen allgemeinanästhetischen Wirkungen weist Ketamin auch lokal- bzw. regionalanästhetische Effekte auf. Eine Studie, die während des Bürgerkrieges in Kambodscha durchgeführt wurde, zeigt eindeutig die lokalanästhetische Wirkung (BION, 1984). Die intrathekale Gabe von Ketamin führte zu einer sensorischen und motorischen Blockade. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kathrivel (KATHRIVEL et al., 2000) geben wieder, dass bei Kombination von Ketamin (25 mg) und Bupivacain (7,5 mg) die intrathekal applizierte Menge von Lokalanästhetika reduziert werden kann. Eine intrathekale Applikation einer analgetisch wirksamen Menge von 30 mg Ketamin ergibt eine Liquorkonzentration von 150 µg/ml (GEBHARDT, 1994). Diese Konzentration ist allerdings höher als diejenige, die zur Interaktion mit Opiat- (FINK und NGAI, 1982) und NMDA-Rezeptoren (ØYE et al., 1992) verwendet wurde.

Epidural appliziertes Ketamin zeigt in niedrigen Dosierungen (4-12 mg) widersprüchliche Ergebnisse bezüglich seiner analgetischen Effekte (EL-KHATEEB et al., 1980; MANKOWITZ et al., 1982; KAWANA et al., 1987; ISLAS et al., 1985). Eindeutige schmerzlindernde Wirkungen konnten hingegen mit höheren Mengen (25-30 mg) von Ketamin erreicht werden (NAGUIB et al., 1986; SAMARYUTEL et al., 1986).

Brock-Utne et al. untersuchten in ihrer Studie, wie sicher sich Ketamin bei intrathekaler Applikation verhält und ob gewebliche Veränderungen durch diese Technik mit Ketamin auftreten können. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Gabe mit oder ohne Konservierungsmittel keine Schäden am Spinalmark von Affen verursacht (BROCK-UTNE et al., 1982). Eine Studie mit Menschen legte ebenfalls den Schluss nahe, dass wiederholt intrathekal gespritztes, kein Konservierungsmittel enthaltendes Ketamin nur geringe neurotoxische Wirkungen auf das Rückenmark hat (BORGBJERG et al., 1994). Die routinemäßige Anwendung von rückenmarksnaher Applikation in Deutschland verbietet sich jedoch, solange die Frage einer möglichen Neurotoxizität durch das Konservierungsmittel Benzethoniumchlorid nicht sicher geklärt und die pharmakokinetische Wirkung nach periduraler und intrathekaler Gabe aufgezeigt ist.

5. Materialien und Arbeitsweisen

5.1 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik (Patch-Clamp: Membranfleckklemme) ist eine elektrophysiologische Methode zur Analyse von Ionenströmen durch Membranen. Alle Experimente dieser Arbeit beruhen auf dieser Technik. Sie ist 1976 von Neher und Sakmann (NEHER UND SAKMANN, 1976) zum ersten Mal erwähnt und danach weiterentwickelt worden (HAMILL et al., 1981). Ihre Basis stellt die Spannungsklemme (Voltage-Clamp) von erregbaren Membranen dar. Vereinfacht kann eine Membran als elektrischer Schaltkreis betrachtet werden, in dem die Lipidschicht als Kondensator, die Pore als Widerstand und das Membranpotenzial als Spannungsquelle angesehen werden. Während der Spannungsklemme wird das Membranpotenzial mittels einer elektrischen Regeleinrichtung konstant gehalten, wobei mit Hilfe des Kompensationsstroms (Klemmstrom) die Membranströme spiegelbildlich aufgezeichnet werden. Das Prinzip dieser Regeleinrichtung lässt sich anhand der Abbildung 4 darstellen.

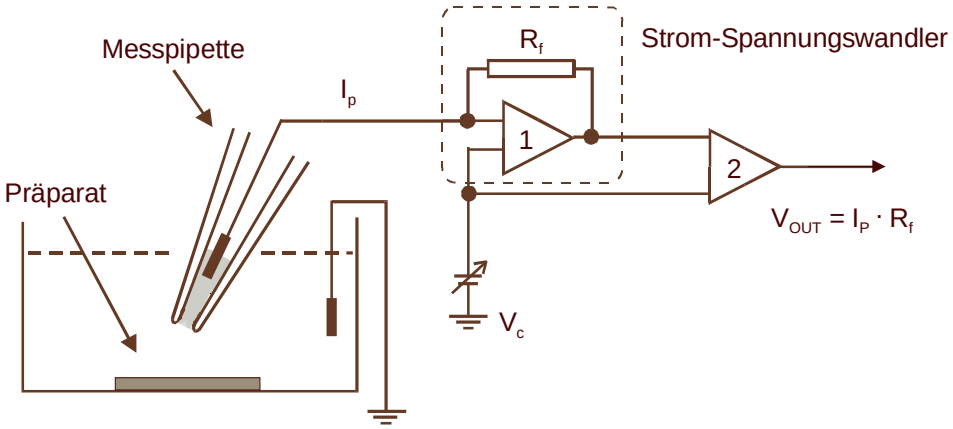


Abbildung 4: Schaltbild einer Voltage-Clamp-Versuchsanordnung

Die wichtigsten Komponenten des Patch-Clamp-Verstärkers sind der Differenzialverstärker (2) und der Strom-Spannungs-Wandler. Letzterer besitzt als Hauptbestandteile den Operationsverstärker (1) und den Rückkopplungswiderstand (R_f). Der Pipettenstrom (I_p) kann durch den Rückkopplungswiderstand eine Potenzialdifferenz erzeugen, anhand derer der geflossene Strom berechnet wird. (modifizierte Abbildung nach HAMILL et al., 1981; Gruß, 1989; Wolff, 1999).

Die in der Messpipette befindliche Elektrode steht in Verbindung mit einem Vorverstärker, der alle Messwerte zu einem Differenzialverstärker (2) weiterleitet. Im Vorverstärker ist ein Schaltkreis eingebaut, der sogenannte Strom-Spannungs-Wandler, der hauptsächlich aus dem Operationsverstärker (1) und dem Rückkopplungswiderstand (R_f) besteht. Der Operationsverstärker vergleicht die Sollspannung (V_c) mit dem Pipettenpotenzial (I_p). Ist eine Differenz vorhanden, so fließt durch den Rückkopplungswiderstand so lange ein kompensierender Strom, bis das Pipettenpotenzial sich der Sollspannung wieder angepasst hat. Gleichzeitig entsteht an dem Rückkopplungswiderstand eine Spannung, die proportional zu dem in der Pipette injizierten Strom ist. Durch Umrechnung der Ausgangsspannung mit entsprechenden Kalibrierungsfaktoren, die abhängig von der Größe des Rückkopplungswiderstands sind, kann der Differenzialverstärker schließlich den fließenden Strom darstellen (V_{out}).
Generell kann eine Unterscheidung zwischen Voltage-Clamp-Experimenten und Current-Clamp-Experimenten getroffen werden. Der Unterschied zwischen beiden besteht darin, dass bei den ersteren die Spannung vorgegeben wird und der Strom variabel bleibt, während es bei den letzteren umgekehrt ist. Dadurch hat man die Möglichkeit, in Voltage-Clamp-Untersuchungen Ströme zu analysieren. Rückschlüsse auf das Ruhemembranpotenzial und auf die Erregungsmuster einer Zelle können mit Hilfe des Current-Clamp-Modus gezogen werden.
Bei der praktischen Anwendung der Patch-Clamp-Methode wird eine Messpipette, bei der ein leichter Überdruck das Verschmutzen der Spitze verhindert, unter mikroskopischer Kontrolle auf die Zellmembran aufgesetzt. Der dabei entstehende Kontakt zwischen Pipettenrand und Membran besitzt nur einen geringen Abdichtungswiderstand von 10 bis 50 MΩ. Unter Anlegen eines leichten Unterdrucks an die Pipette entstehen Abdichtungswiderstände bis zu 50-100 GΩ (sogenanntes Gigaseal). Diese hohen Abdichtungswiderstände tragen beträchtlich zur Verringerung des Hintergrundrauschens bei. Die Erklärung hierfür liefert das sich aus der Isolierung des Membranflecks ergebende Spektrum des Signalrauschens bei permanentem Hintergrundrauschen (Johnson noise).

Damit lässt sich folgende Gleichung aufstellen:

Gleichung 2:

$$S(f) = 4 * k * T * Re(Y(f))$$

S(f) = Signalrauschen bei der Frequenz f [Hz]
k = Boltzmannkonstante [JK^{-1}]
T = absolute Temperatur [K]
Re(Y(f)) = Realteil des Scheinwiderstandes [Ω]

Wenn der Abdichtungswiderstand und die Membrankapazität als ein RC-Glied angesehen werden, so ergibt sich für Re(Y(f)):

Gleichung 3:

$$Re(Y(f)) = \frac{1}{R}$$

R = Abdichtwiderstand [Ω]

Hieraus resultiert insgesamt für das Hintergrundrauschen:

Gleichung 4:

$$\delta = \sqrt{4 * k * T * \frac{f}{R}}$$

f = Frequenzbandbreite der Messung [Hz]
δ = Amplitude des Stromrauschens [Ω]

Dies bedeutet, dass mit Vergrößerung des Abdichtungswiderstandes R die Amplitude des Rauschens kleiner wird und deshalb insgesamt genauere Messungen stattfinden können.

Die Patch-Clamp-Technik besitzt unterschiedlich anwendbare Konfigurationsmöglichkeiten, nämlich Cell-Attached, Whole-Cell, Outside-Out und Inside-Out. Voraussetzung für diese Konfigurationstechniken ist primär die Bildung eines Gigaseals. Zur Verdeutlichung sind die genannten Konfigurationen in folgender Darstellung abgebildet:

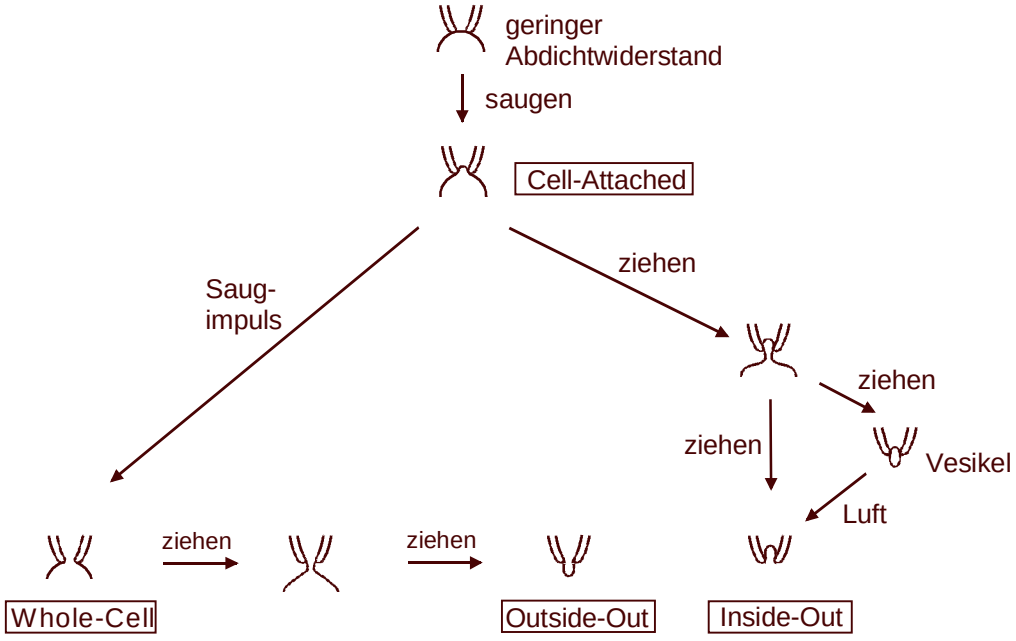


Abbildung 5: Messkonfiguration der Patch-Clamp-Technik

Folgende Modi werden aufgezeigt: Cell-Attached, Whole-Cell, Outside-Out, Inside-Out. Die Pfeile beschreiben die Arbeitsschritte, um von der einen in die andere Konfiguration zu gelangen.

Auf diese vier Konfigurationsmöglichkeiten soll nun näher eingegangen werden.

Die Cell-Attached-Konfiguration wird durch das vorsichtige Aufsetzten der Pipette auf die Membranoberfläche und Anlegen eines Saugimpulses erreicht. Die Membran bleibt hierbei unbeschädigt, wobei eine geringe Deformation durch die Pipette zu einer Aktivierung von mechanosensiblen Ionenkanälen führen kann. An der zytoplasmatischen Membranseite bleiben alle Second-Messenger-Systeme und Ionenkonzentrationen erhalten.

Wird durch einen Unterdruckimpuls die Membran durchbrochen, so entsteht aus der Cell-Attached- eine Whole-Cell-Konfiguration. Mit dieser Ableitung besteht die

Möglichkeit, die gesamte Membran einer Zelle zu erfassen und nicht nur den Bereich der Pipettenspitze.

Wird von der letzten Konfiguration ausgehend die Pipette vorsichtig von der Zelle weggezogen, so löst sich ein Teilbereich der Membran und schließt sich über der Pipettenspitze zu einer Halbkugel. Da die Außenseite der Membran dann wieder der Badlösung zugewandt ist, wird diese Ableitung als Outside-Out-Konfiguration bezeichnet.

Die Inside-Out-Konfiguration entsteht, indem ausgehend vom Cell-Attached-Modus die Pipette langsam weggezogen wird. Hierdurch kann die zytoplasmatische Membranoberfläche der Badlösung zugewandt werden. Es kommt jedoch häufig vor, dass sich beim Wegziehen der Pipette das Membranstück zu einem Vesikel verschließt. Um daraus eine Inside-Out-Konfiguration herzustellen, kann die Pipette kurz aus dem Bad an die Luft gehoben oder zum Beispiel mit einer Luftblase in der Badlösung in Kontakt gebracht werden. Dabei platzt meistens das Vesikel und der gewünschte Modus entsteht.

Diese hier genannten Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik ermöglichen es, sowohl Einzelkanalströme der Membranflecken darzustellen als auch makroskopische Ströme einer gesamten Zelle wiederzugeben. Alle Experimente dieser Arbeit sind in der Whole-Cell-Konfiguration unter Voltage-Clamp- bzw. Current-Clamp-Bedingungen durchgeführt worden.

5.2 Präparation des Rückenmarks

Für die Präparation des Rückenmarks wurden 2-15 Tage alte Ratten (Stamm: Wistar, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland) beiderlei Geschlechts verwendet. Die Präparationstechnik lehnte sich hierbei an die Beschreibungen von Edwards, Takahashi und Safronov an (EDWARDS et al., 1989; TAKAHASHI et al., 1990; SAFRONOV et al., 1995).

Zu Beginn der Präparation wurde ein Liter einer begasten Präparationslösung (s. Tab. 3 auf S. 23) dreigeteilt in:

(1) Eine 800 ml Lösung, die zur Bildung von Eiswasser in ein Tiefkühlfach gelegt und als solche verwendet wurde.
(2) Eine 125 ml Lösung für die spätere Aufbewahrung der fertigen Rückenmarksschnitte.
(3) Eine 75 ml Lösung zur Auflösung von 1,5 g Agar. Die Agar-Lösung wurde vor der Präparation aufgekocht und danach auf 39°C abgekühlt.

Nach Dekapitierung der Ratte legte man diese in eine mit Eiswasser gefüllte Präparierschale und präparierte das Rückenmark heraus. Hierbei wurde zunächst mit einer Irisschere der Wirbelkanal aufgeschnitten und dann die Spinalwurzeln durchtrennt. Dies geschah möglichst weit entfernt vom Rückenmark, um Verletzungen desselben zu vermeiden.
Daraufhin wurde das Rückenmark in eine mit Eiswasser gefüllte Petrischale unter eine Stereolupe (Wild, Heerebrugg, Schweiz) gegeben, um die Wurzelfäden zu kürzen und die Dura Mater, die Arachnoidea sowie das dorsale und ventrale Blutgefäß zu entfernen. Das so gesäuberte Rückenmark legte man in die bereits vorbereitete Agar-Lösung in ein Becherglas, wobei auf die allseitige Abdeckung des Rückenmarks durch die Agar-Lösung geachtet wurde. Damit es zu einer rascheren Verhärtung des Agars kommen konnte, wurde das Becherglas in einen Behälter mit tiefgekühlter, 23%iger NaCl-Lösung gestellt. Nach Erhärtung löste man das Agar mit einem Spatel heraus und enfernte es mit Hilfe eines Skalpells (Bayha, Tuttlingen, Deutschland) bis auf ca. 3-4 mm rund um das Rückenmark. Dieses Präparat gab man wiederum in eine mit Eiswasser gefüllte Schale unter die Stereolupe, um die Lumbalregion in Form eines

Pyramidenstumpfs zurecht zu schneiden. Daraufhin klebte man letzteren mit Acrylcyanat (UHU, Brühl, Deutschland) auf den Rand einer Glasplatte (40 x 25 x 5 mm) auf. Als nächstes spannte man diese Glasplatte in die Haltevorrichtung einer mit Eiswasser gefüllten Petrischale des Mikro-Vibratoms Vibracut FTB (Vibracut, Weinheim, Deutschland) ein. Mit einer Schnittgeschwindigkeit von 3 mm/min und einer Querschnittsdicke von 200 µm wurden die endgültigen Präparate hergestellt, anschließend mit einer umgekehrten Pasteur-Pipette aufgesaugt und in die auf 32°C aufgewärmte Lösung (2) gegeben. Diese konnte mit Hilfe eines Wasserbades der Umwälzapparatur (Colora, Lorch, Deutschland) 30 Minuten lang auf einer konstanten Temperatur gehalten werden.

Die Lösungen (1 und 2) waren während der gesamten Präparation und die Lösung (2) anschließend zur Aufbewahrung der Schnitte bei Raumtemperatur von 21°-24°C unter ständiger Begasung mit Carbogen (95% CO_2, 5% O_2).

Die Durchführung dieser experimentellen Methode wurde dem Regierungspräsidium Gießen als staatliche Aufsichtsbehörde gemeldet.

5.3 Methode der Soma-Isolierung

Viele Experimente dieser Arbeit beruhten auf der Methode der Soma-Isolierung, die zum ersten Mal von Safronov et al. beschrieben wurde (SAFRONOV et al., 1997). Die verwendeten Zellen hatten eine durchschnittliche Größe von 10 µm und konnten während der Whole-Cell-Ableitung jeweils durch vorsichtiges Wegziehen der Messpipette unbeschädigt aus dem Schnitt isoliert werden (siehe Abbildungen 6A, B, C, D und E, Seite 21). Bei dem Vorgang der Isolierung blieben alle oder fast alle Ausläufer im Schnitt zurück. Die Klassifizierung der so isolierten Strukturen wurde folgendermaßen vorgenommen:

1. Soma: isolierte Struktur ohne Ausläufer
2. Soma + Axon-Komplex: isolierte Struktur mit einem 10 bis 100 µm langen Ausläufer. Der hierbei gemessene Natrium-Strom hatte noch mindestens 85% der ursprünglichen Amplitude, die vor der Isolierung gemessenen wurde.
3. Soma + Dendrit-Komplex: isolierte Struktur mit einem Ausläufer, wobei hier der gemessene Natrium-Strom genauso klein war wie in den meisten anderen isolierten Somata.

Eine erfolgreiche Isolierung war immer mit einer drastischen Verminderung des Leckstroms verbunden. Der gute physiologische Zustand der isolierten Struktur zeigte sich in den stabilen Ruhepotenzialen. Es war nun möglich, pharmakologische Untersuchungen durchzuführen, ohne dass die freie Diffusion der Moleküle zur neuronalen Membran durch das umliegende Gewebe behindert wurde.

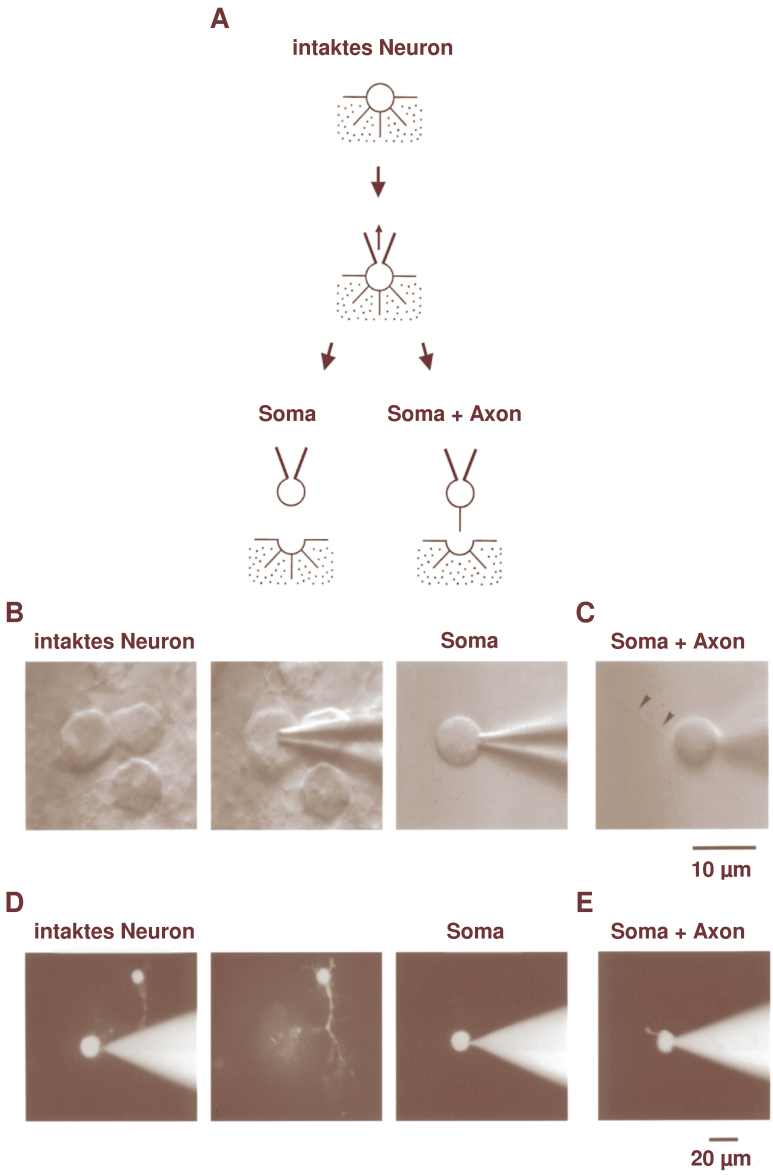


Abbildung 6: Methode der Soma-Isolierung

A. Die Darstellung zeigt eine Soma-Isolierung eines Hinterhornneurons. Die Isolierung erfolgt mit Hilfe eines leichten Unterdrucks.

B. Die linke Abbildung gibt intakte Hinterhornneurone im Rückenmarksschnitt, die mittlere ein Neuron während der Whole-Cell-Ableitung und die rechte das isolierte Soma wieder.

C. Das Bild stellt ein isoliertes Soma und einen Axon-Komplex eines Neurons dar, dessen Ausläufer durch Pfeile markiert wird.

D, E. Auf diesen Darstellungen werden von links nach rechts der eben beschriebenen Vorgang mit der Farbstofffärbung Lucifer-Yellow gezeigt. Als erstes ist das intakte Neuron im Rückenmarksschnitt während der Whole-Cell-Ableitung abgebildet, als zweites der zurückgebliebene Dendritenbaum nach der Soma-Isolierung und als drittes und viertes das isolierte Soma bzw. der Soma + Axon-Komplex (modifiziert nach SAFRONOV et al., 1997).

5.4 Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien für die Außen- und Innenlösungen stammten von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (Steinheim, Deutschland). Sie wurden in Aqua bidestillata gelöst.

Innenlösungen:

Alle Lösungen wurden stets über ein vorgesetztes Filtersystem, d. h. 0,2 µm Filter (Renner, Darmstadt, Deutschland) appliziert. Zur Einstellung des pH-Wertes enthielten die Innenlösungen HEPES und wurden mit Hilfe von jeweils 1 N NaOH (High Cs_i, Innenlösung-2) oder 1 N KOH (Innenlösung-1) auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. Hierbei wurden für die Einstellung von High Cs_i 9,2 ml, von Innenlösung-2 10 ml und von Innenlösung-1 10,6 ml verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Innenlösungen

	NaCl	KCl	$MgCl_2$	CsCl	EGTA	HEPES
Innenlösung-1	5	144,4	1		3	10
Innenlösung-2	5	144,4	1		3	10
High Cs_i	5,8		1	134	3	10

(alle Angaben in mmol/l)

Abkürzungen:
EGTA: Ethylenglycol-bis[β-Aminoethylether]N,N,N´,N´-Tetraacetat
HEPES: N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N´-[2-Ethansulfonsäure]

Außenlösungen:

Alle Außenlösungen stellte man mit Hilfe von Carbogengas (95% O_2, 5% CO_2) auf den pH-Wert 7,4 ein. Nur die Cholinchlorid-Badlösung wurde mit Hilfe von KOH auf den gewünschten pH-Wert normiert. Um die Sauberkeit zu erhöhen und den Seal-Prozess zu erleichtern, reinigte man die Lösungen vor dem Gebrauch mit einem Papier-Porenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland).

Tabelle 3: Verwendete Außenlösungen

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	Glukose	NaH_2PO_4	$NaHCO_3$	HEPES	Ch-Cl	TEA-Cl	KOH
Präparationslösung	115	5,6	2	1	11	1	25				
Badlösung	115	5,6	0,1	5	11	1	25				
TEA-Badlösung	95	5,6	0,1	5	11	1	25			20	
Cholinchlorid-Badlösung		0,6	0,1	5	11			10	141		5

(alle Angaben in mmol/l)

Abkürzungen:
TEA-Cl: Tetraäthylammoniumchlorid
HEPES: (N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N´-[2-Ethansulfonsäure])
Ch-Cl (Cholin-Chlorid): (2-Hydroxyethyl)-trimethylammoniumchlorid

Kanalmodifizierende Substanzen und Toxine:

Folgende Wirkstoffe fanden bei den Experimenten Verwendung:

1. Ketamin: Das Razemat von Ketamin wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erworben und die verwendeten Enantiomere S-(+) und R-(-) von der Firma Gödecke/Parke-Davis (Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Hieraus wurden mit Aqua bidestillata Stammlösungen in Konzentrationen von 100 mmol/l hergestellt.

2. Tetraethylammonium: TEA ist ein klassischer Blocker potenzialabhängiger Kalium-Kanäle und wurde für die Isolierung des Natrium-Stroms verwendet. Zum ersten Mal war seine Wirkung am Tintenschneckenriesenaxon (TASAKI und HAGIWARA, 1957) beschrieben worden. Es konnte bereits in millimolaren Konzentrationen wirken, zeigte aber an der Außen- und Innenseite der Zellmembran unterschiedliches Blockierungsverhalten. Dies ließ auf das Vorhandensein unterschiedlicher Rezeptoren schließen (KOPPENHÖFER und VOGEL, 1969).

3. Cholin: Cholin-Ionen wurden in der Außenlösung an Stelle von Natrium-Ionen eingesetzt, um Kaliumkanäle zu untersuchen. Aufgrund ihrer Molekülgröße haben sie nicht wie Natrium-Ionen die Möglichkeit, durch Natriumkanäle in die Zelle zu gelangen.

4. Cäsium: Das Cäsium-Ion stellt ebenfalls einen potenzialabhängigen Kalium-Kanalblocker dar (QUAYLE, 1988). Es dringt in die Kanalpore ein und verschließt sie nach dem Prinzip des Multi-Ion-Blocks (HILLE und SCHWARZ, 1978).

5. Lidocain: Lidocain war wie das Razemat von Ketamin von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bereitgestellt worden. Von den Substanzen wurden Stammlösungen in Konzentrationen von 20-200 mmol/l in Aqua bidestillata erzeugt.

5.5 Elektrophysiologische Technik

Pipetten:

Das Material für die Pipetten stellten Borosilikatglaskapillaren (Clark Elektromedical Instruments, Pangbourn, Großbritannien) dar, die 75 mm lang waren und ein inneres Filament besaßen. Zunächst wurden sie mit Methanol entfettet und ihre Enden mit Hilfe eines Bunsenbrenners angeschmolzen. Dies geschah, um die Pipettenelektrodenschicht weniger zu beschädigen. Dann wurde die Pipette in ein Horizontal-Ziehgerät (Sutter Instruments, Novato, USA) eingespannt, um die Pipetten herzustellen. Die Widerstände lagen in einem Bereich von 2,5-8 MΩ, wobei unter Anwendung der Methode des isolierten Somas Widerstände von 2,5-4 MΩ benutzt wurden. Hierauf hitzepolierte man die Pipetten mit einer Mikroforge (wörtlich: „Kleinschmiede“), indem jede Pipettenspitze durch Annäherung an einen stromdurchflossenen Draht aus Platin-Iridium (Ventron, Karlsruhe, Deutschland) leicht angeschmolzen wurde. Dies entfernte vorhandene Verunreinigungen und führte zu einem guten Abdichtungswiderstand. Eine kleine angeschmolzene Glaskugel an dem Draht verhinderte, dass Metall auf die Glasoberfläche aufdampfen konnte.

Danach wurde die Pipetten so weit mit der Innenlösung gefüllt, bis der Elektrodendraht im Pipettenhalter gerade in die Füssigkeit eintauchte. Ein Überfüllen der Pipette kann sich ungünstig auf die Rauscheigenschaften auswirken, da Flüssigkeit im Pipettenhalter eine Ausbildung leitendender Brücken fördern kann (NUMBERGER, 1996).

Versuchsstand:

Der Versuchsstand bestand aus dem schwingungsgedämpften Messtisch, umgeben von einem Faraday-Käfig. Auf dem Messtisch befanden sich, wie in Abbildung 7 (vgl. Seite 27) dargestellt, unter anderem das Mikroskop, die Experimentierkammer und der Mikromanipulator.

Das Mikroskop Axioskop FS (Zeiss, Frankfurt a. M., Deutschland) war ein aufrechtes Mikroskop mit einer Differenzinterferenzkontrast-Einrichtung (Nomarski-Optik) zur Betrachtung ungefärbter Schnitte und einem Wasserimmersionsobjektiv (40x). Nach der Fokussierung des Präparates mit dem zuletzt genannten Objektiv bestand noch genügend Arbeitsabstand, um eine Pipette unter dem Objektiv bewegen zu können.

Die Experimentierkammer war aus einem aus Delrin bestehendem Ring (Durchmesser 30 mm, Dicke 4 mm) aufgebaut. Dadurch besaß sie eine hohe mechanische Stabilität und eine relativ hohe Hydrophobizität, die durch einen Vaselineüberzug noch verstärkt werden konnte. In dieser Experimentierkammer war, zentral vertieft, eine dünne runde Glasscheibe eingebracht. Diese Kammer gewährleistete einen vollständigen Austausch der Perfusionslösung mit einem Durchlauf von 2-3 ml/min. Die Präparate wurden in einer solchen Messkammer mit Hilfe eines Gitters (Grid) fixiert, dessen Rahmen aus Platin bestand und in dem Nylonfilamente quer aufgespannt waren.

An einem dreiachsigen Mikromanipulator HS6/2 (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) wiederum war der Pipettenhalter befestigt, wobei die Steuereinheit MultiControl 2000 (Märzhäuser) die Achsen antrieb und das gesamte System über einen Joystick ferngesteuert wurde.

Insgesamt gab es zwei Elektroden: die im Pipettenhalter eingelassene Messelektrode und die geerdete Badelektrode. Beide bestanden aus Silber und mussten regelmäßig in 1 mol/l KCl-Lösung chloriert werden, um Abweichungen des Offsets zu minimieren. Mit Offset-Potenzialen werden Spannungen bezeichnet, die innerhalb der Messkette Silberdraht–Pipettenlösung–Badlösung–Erdung entstehen. Diese Spannungen können zu Abweichungen zwischen dem angezeigten und tatsächlichen Potenzial von Zellmembran und Patch führen (NUMBERGER, 1996). In jedem Experiment wurden die Elektrodenpotenziale unmittelbar vor dem Seal abgeglichen.

Mittels eines EPC-7-Verstärkers (List Electronic, Darmstadt, Deutschland) wurden alle Strom- und Spannungsmessungen durchgeführt. Er besaß einen Verstärkungsbereich von 0,5-1000 mV/pA. Ein Brückenwiderstand von 500 MΩ mit einer Frequenzbandweite von bis zu 100 kHz wurde in Bereichen von 0,5 bis 20 mV/pA zugeschaltet. Dadurch konnten Ströme bis zu 20 nA aufgenommen werden. In Bereichen von 50-1000 mV/pA wurde hingegen ein Widerstand von 50 GΩ vorgeschaltet, der eine Frequenzbandbreite von bis zu 50 kHz besaß. Durch den EPC-7-Verstärker konnten Spannungen in Form von Reizimpulsen von –200 bis +200 mV an die Pipette angelegt werden. Um den Pipettenwiderstand festzulegen, wurden Stufen bei der Einteilung der Skala (0,001-0,01) verwendet. Höhere Werte von 0,1 Skalenteilen stellte man ein, sobald ein Gigaseal erzeugt wurde. Durch die Reizimpulse entstanden kapazitive Ströme, die durch eine elektronisch kapazitive Kompensation mit zwei

zeitlich verschiedenen Komponenten kompensiert wurden. Die Korrektur der Artefakte erfolgte durch computergestützte Subtraktion.

Die Filterung der Signale erfolgte für Kalium- und für Natrium-Kanäle unterschiedlich. Bei ersterem schaltete man einen 1 kHz-Filter (mit 2 kHz digitalisiert) und bei letzterem einen 3 kHz-Filter (mit 10 kHz digitalisiert) vor. Die Daten der Messungen im Current-Clamp-Modus wurden ebenso mit 10 kHz digitalisiert.

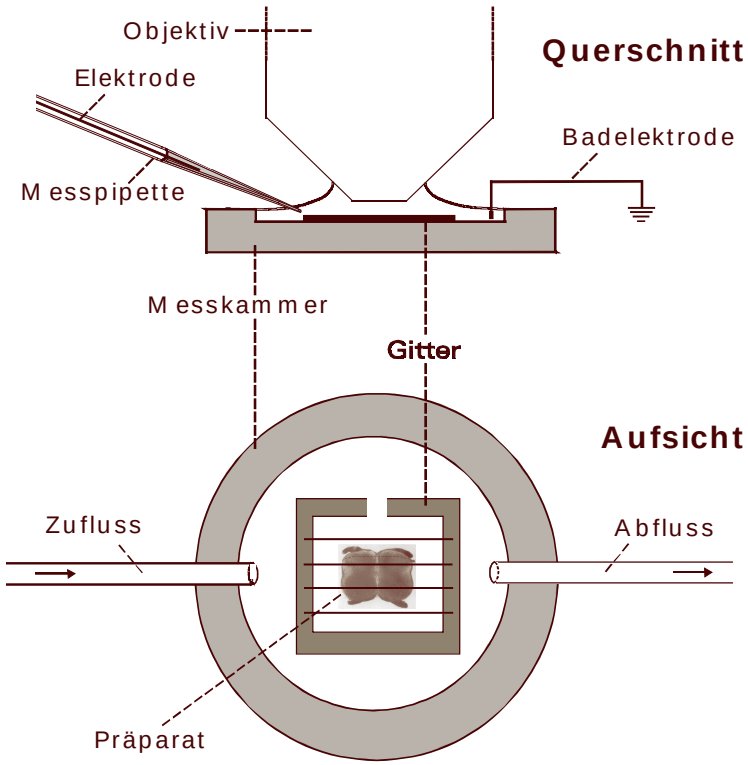


Abbildung 7: Schematische Übersicht über die Experimentierkammer

Die obere Abbildung stellt den Querschnitt der Experimentierkammer dar. Die darunter liegende Aufsicht zeigt den Rückenmarksschnitt, der durch ein Gitter auf dem Boden der Kammer fixiert wird. Der Lösungswechsel erfolgte über zwei Stahlkanülen, wobei die Perfusionslösung die Experimentierkammer mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min durchströmte.

5.6 Aufzeichnungs-, Darstellungs- und Auswertungsverfahren

Die gesamte Erfassung und Darstellung der Daten erfolgte über einen Personal Computer (PC, AT 386), der auch als programmgesteuerter Impulsgenerator diente. Hierbei wurden die Messdaten mit Hilfe eines AD/DA-Wandler des Typs Labmaster TM-40 (Scientific Solutions, Solon, USA) mit 12 Bit digitalisiert und danach auf die Festplatte des Computers geschrieben. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit dem Programm pClamp, Version 5.1.1 (Axon Intruments, Foster City, USA). Kapazitive Ströme und Leckströme wurden digital von den eigentlichen Aufzeichungen subtrahiert. Hierfür fanden als Subtrahenden Stromantworten auf hyperpolarisierende Reize von -40 mV Verwendung, die nur passive Membraneigenschaften anzeigten. Zur Darstellung kamen die so ermittelten spezifischen Ionenströme.

Die endgültigen Auswertungen der Daten (statistische Analysen, Kurvenanpassungen, grafische Darstellungen) fanden mit Hilfe von Fig. P 6.0 software (Biosoft, Cambridge, England) statt. Mittels der Summe der kleinsten Abweichungsquadrate wurde die nicht-lineare Anpassung der Konzentrations-Wirkungskurven durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden der Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts/standard error of mean) und das 95% Konfidenzintervall (KI) als nummerische Werte dargestellt. Übertraf der SEM die Symbolgröße der Datenpunkte, so wurde er durch Fehlerbalken gekennzeichnet.

Für den statistischen Vergleich von Daten unter verschiedenen pharmakologischen Interventionen wurde die einfache Varianzanalyse (ANOVA) verwendet (WinStat Software, Staufen, Deutschland). Im Nachfolgetest (Scheffé-Test) erfolgte die Untersuchung der linearen Kontraste und die Festlegung der Signifikanz bei $p < 0,05$.

6. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit über die Wirkungsmechanismen von Ketamin und seinen Enantiomeren beruhten auf Untersuchungen von insgesamt 162 Hinterhornneuronen. Davon wurden 102 Experimente im Whole-Cell-Modus im Gewebeschnitt und 60 Experimente mit der Methode der Soma-Isolierung durchgeführt.
Um Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen darzustellen, wurden aus den einzelnen Blockierungswerten des Ketamins Kurvenverläufe konstruiert. Dies geschah unter Einbeziehung sämtlicher erhobener Daten. Unter Annahme, dass ein Molekül mit einem Rezeptor interagiert, wurde mit einem Hill-Koeffizienten von h=1 den Kurven folgende Gleichung zugrunde gelegt:

Gleichung 5:

$$I/I_0 = 1 / (1 + (C / IC_{50})^h)$$

I = Natrium-Spitzenstrom unter Ketaminapplikation
I_0 = Natrium-Spitzenstrom in der Kontrolllösung
C = Konzentration des Pharmakons [mol/l]
h = Hill-Koeffizient (h=1)
IC_{50} = halbmaximale Blockierungskonzentration [mol/l]

6.1 Ketamineffekte an Natrium-Kanälen

Die Natrium-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung bzw. der Membrandepolarisation von Nervenzellen. Durch Blockade mit Tetrodotoxin (TTX) ist die Auslösung dieser Funktion nicht mehr möglich (HILLE, 1966).
Da in einem Rückenmarksschnitt neben Neuronen auch Gliazellen vorkommen, wurden folgende Kriterien zur Unterscheidung dieser Zellen verwendet. Eine Zelle zeichnet sich als Neuron aus, wenn sie im Voltage-Clamp-Modus auf depolarisierende Potenzialsprünge große Natrium-Stromamplituden (0,5 – 4 nA) und im Current-Clamp-Modus Aktionspotenziale generieren kann. Eine Gliazelle kann hingegen auf depolarisierende Potenzialsprünge nur sehr kleine Natrium-Ströme (0,01 – 0,3 nA) und

keine Aktionspotenziale generieren (SAFRONOV et al., 1997). Grund für diese mangelnde Erregbarkeit liegen in ihrem relativ kleinen Natrium- und großen Leckstrom. Wenn bei Experimenten aufgrund ihrer Lösungen (z.B. CsCl) es nicht möglich war, Aktionspotenziale auszulösen, so wurden die Zellen mit Natrium-Strömen über 1 nA als Neurone angesehen.

Bei den Whole-Cell-Experimenten und bei den Experimenten am isolierten Soma wurde mit gleichen Impulssprüngen gearbeitet. Ausgehend vom Ruhemembranpotenzial wurde zunächst ein hyperpolarisierender Vorimpuls auf -120 mV (über 50 ms) gegeben, dem sich danach ein Reizimpuls auf -20 mV (ebenfalls über 50 ms) anschloss. Der Korrekturimpuls sprang hierbei ausgehend von –80 mV auf –120 mV und dann auf –80 mV zurück. Eine Ausnahme stellen die Experimente bezüglich des Use-dependent-Blocks dar (vgl. Seite 33).

6.1.1 Wirkung von Ketamin im Gewebeschnitt

Um die generelle Wirkung von Ketamin auf die Natrium-Kanäle der Hinterhornneurone festzustellen, erfolgte eine Durchführung von Experimenten an Rückenmarksquerschnitten von jungen Ratten. Durch Untersuchungen an insgesamt sieben Hinterhornneuronen konnten die Abbildungen 8A und B (vgl. Seite 31) erstellt werden. Die Abbildung 8A zeigt Originalregistrierungen von Natriumströmen im Whole-Cell-Modus mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ketamin Razemat. Dabei wird deutlich, dass mit steigenden Konzentrationen von Ketamin eine Abnahme des Natrium-Spitzenstroms verursacht wurde. Diese Blockierungsweise wird tonische Blockade genannt.

Die nebenstehende Konzentrations-Wirkungskurve 8B wurde nach Gleichung 5 (vgl. Seite 31) erstellt. Die Berechnung der vorliegenden Blockade erfolgte, indem die Spitzenströme in Bezug zu dem Ausgangsstrom in der Kontrolllösung gesetzt wurden. Die halbmaximale Blockierungskonzentration lag für den Natrium-Strom bei einer IC_{50} von 182 ± 11 µmol/l.

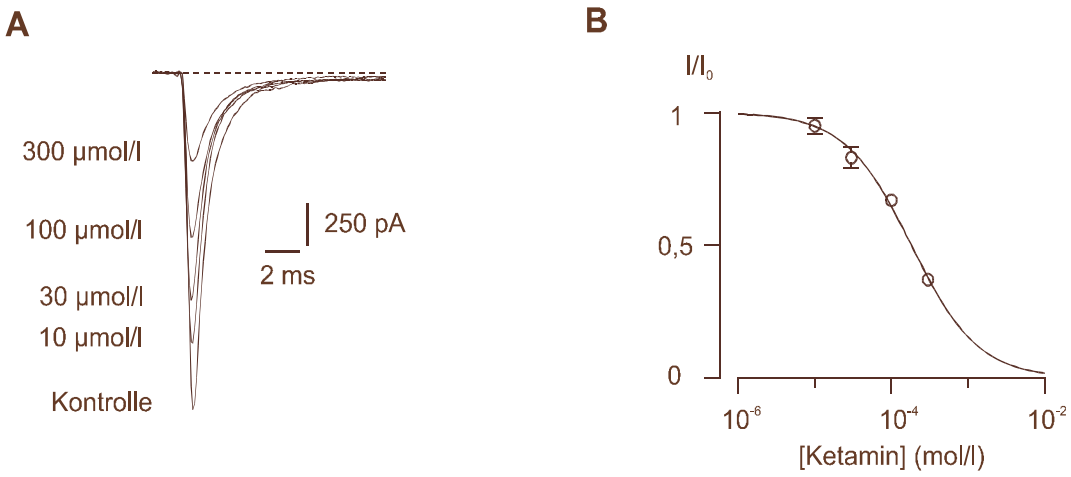


Abbildung 8: Blockade der Natrium-Ströme im Rückenmarksschnitt

A. Dargestellt ist die Originalregistrierung makroskopischer Natrium-Ströme in Whole-Cell-Konfiguration. Die Registrierung fand in TEA-Badlösung und nach Zugabe steigender Razemat-Konzentrationen statt (10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l, 300 µmol/l). Das Impulsprotokoll sprang ausgehend vom Haltepotenzial -80 mV auf -120 mV und dann auf -20 mV. Die gestrichelte Linie zeigt das Nullniveau an. Pipettenlösung High Cs_i, Versuchstemperatur 22°C.

B. Vorgestellt ist die Konzentrations-Wirkungskurve des Razemats am Natrium-Kanal. Die Kurve wurde mit der Gleichung 5 (vgl. Seite 29 berechnet. Die halbmaximale Blockierungskonzentration lag bei 182 ± 11 µmol/l (n=7).

6.1.2 Untersuchungen am isolierten Soma

An insgesamt 15 Hinterhornneuronen wurde mit Hilfe der Soma-Isolierung das Vorhandensein einer phasischen Blockade, die Empfindlichkeit der Stereoisomere, die Spannungsabhängigkeit der Natrium-Strom-Blockierung und die eventuell vorliegende selektive Blockade einzelner Stromkomponenten untersucht. Die Vorteile der Soma-Isolierung wurden bereits in Kapitel 5.3 dargelegt.

Tonische Blockade

Die Originalregistrierung in Abbildung 9A gibt die Abnahme des Natrium-Spitzenstroms durch Ketamin Razemat wieder. Die Datenpunkte der nebenstehenden Dosis-Wirkungkurve 9B wurden mit Hilfe der Gleichung 5 (vgl. Seite 29) angefertigt. Die halbmaximale Blockierungskonzentration lag hier bei 165 ± 23 µmol/l (n = 8).

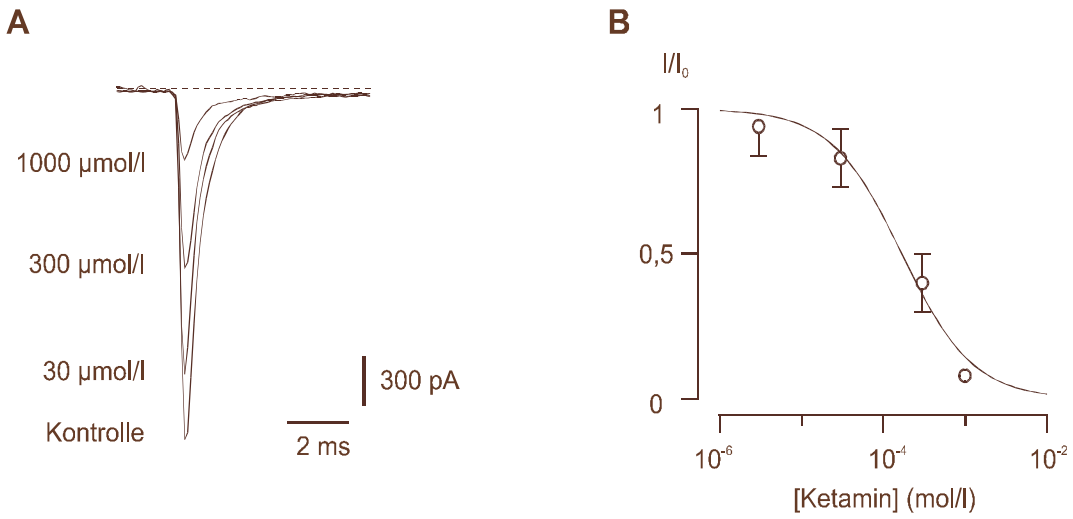


Abbildung 9: Tonische Blockade der Natrium-Ströme durch Ketamin Razemat

A. Die Originalregistrierungen präsentieren Natrium-Ströme eines isolierten Somas mit Axon. Die Aufzeichnungen fanden in der TEA-Badlösung und nach Zugabe von steigenden Razemat-Konzentrationen (30 µmol/l, 300 µmol/l und 1000 µmol/l) statt. Das Impulsprotokoll zeigte einen Sprung vom Haltepotenzial -80 mV auf -120 mV und dann auf -20 mV. Das Nullniveau des Stroms wird durch die gestrichelte Linie angegeben. Pipettenlösung High Cs_i, Versuchstemperatur 22°C.

B. Gegeben ist die Dosis-Wirkungskurve des Razemats am Natrium-Kanal. Die Kurve wurde mit der Gleichung 5 (vgl. Seite 29) berechnet. Die halbmaximale Blockierungskonzentration lag bei 165 ± 23 µmol/l (n=8).

Phasische Blockade

Es ist bekannt, dass Lokalanästhetika eine Use-Dependent-Blockade hervorrufen können (STRICHARTZ, 1987 und HILLE, 1992). Unter der Bezeichung Use-Dependent-Blockade wird eine zunehmende Reduktion des Natrium-Stroms verstanden, die während der Applikation von Pharmaka durch repetitive Impulse entsteht. Diese zunehmende Reduktion wird auch als phasischer Block bezeichnet. Das Lokalanästhetikum kann dabei nach Öffnen des Kanals und nach seiner Bindung auch nach der Repolarisation im Ruhezustand des Kanals gebunden bleiben, weil Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen sein Wegdiffundieren verhindern. Bei der darauffolgenden Aktivierung ist ein Teil der Natrium-Kanäle bereits blockiert und der Gesamtstrom wird während der folgenden Depolarisation zunehmend kleiner. Da auch Ketamin eine lokalanästhetische Wirkung zugedacht wird, wurden deshalb hierzu Untersuchungen durchgeführt. Die in Abbildung 10A und B (vgl. Seite 33) dargestellten

Reizungen der Zelle erfolgten ohne hyperpolarisierenden Vorimpuls mit einer Frequenz von 10 Hz. In 10A sind Originalregistrierungen abgebildet und in 10B die gemessenen Amplituden, die nach jedem Impuls unter 100 µmol/l Ketamin Razemat mit den Amplituden der ersten Impulse unter Kontrolllösung (TEA-Badlösung) verglichen wurden. Es wird deutlich, dass die Abnahme der Amplitude nach wiederholter Reizung unter Applikation von Ketamin stärker als in der Kontrolllösung ist. Es liegt demnach neben einer tonischen auch eine phasische Blockade des Natrium-Stroms durch Ketamin Razemat vor (siehe Abbildung 10B). Das könnte darauf hindeuten, dass die bereits beschriebenen IC_{50}-Werte für die tonische Blockade eine Unterschätzung der tatsächlichen Blockierungspotenz darstellen.

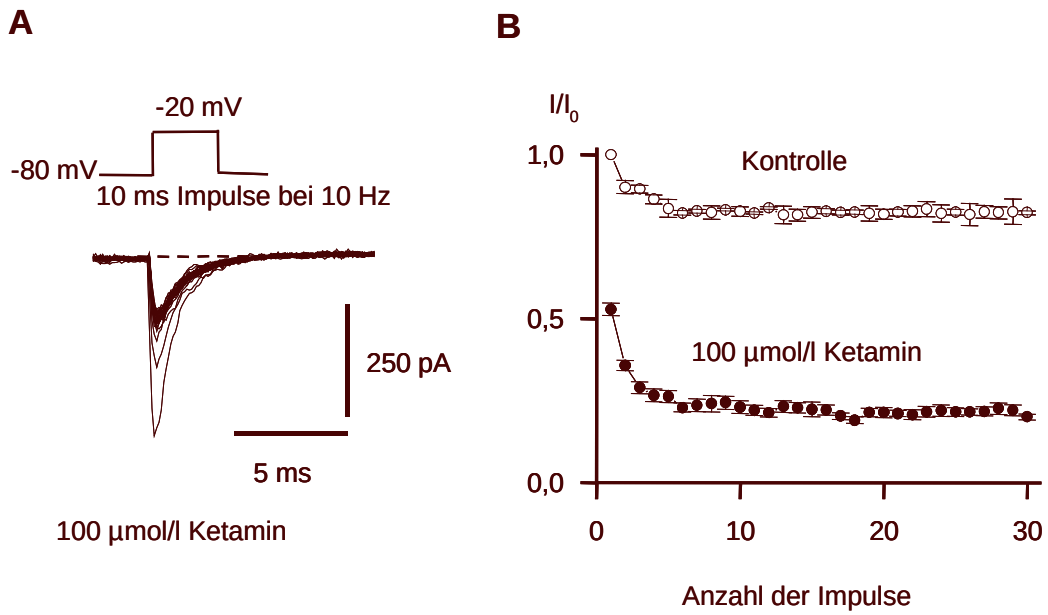


Abbildung 10: Ketaminblockade des Natrium-Stroms, repetitive Reizung

A. Die Aufzeichnung stellt die Originalregistrierungen der phasischen Blockade makroskopischer Natrium-Ströme dar. Die gestrichelte Linie zeigt das Nullniveau an. Die Aufzeichnungen fanden in TEA-Badlösung und mit 100 µmol/l Ketamin statt.

B. Dargestellt sind die phasische und tonische Blockade durch Ketamin Razemat. Es wird der jeweils auf den ersten Impuls in der Kontrolllösung normierte Natrium-Spitzenstrom, ausgelöst durch wiederholte Impulse von 10 Hz, aufgezeigt (offene Kreise: Kontrolllösung. Geschlossene Kreise 100 µmol/l Ketamin Razemat). Ausgehend vom Haltepotenzial –80 mV wurde ein 50 ms lang andauernder Impuls nach –20 mV durchgeführt. Die Mittelwerte aus fünf Experimenten sind gegen die Anzahl der Impulse aufgetragen.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit Ketamin Lokalanästhetika im Hinblick auf die spannungsabhängige Blockade von Natrium-Strömen ähnelt. Die in Abbildung 11A (vgl. Seite 36) dargestellten Erfassungen der Ströme zeigen, dass es sowohl in der Kontrolllösung (TEA-Badlösung) als auch unter 100 µmol/l Ketamin bei verschiedenen Testpotenzialen zu Änderungen in ihrer Verlaufsform und zu unterschiedlichen Natrium-Summenströmen kam. Die Ströme inaktivierten bei -20 mV schneller als bei -30 mV und der Natrium-Spitzenstrom war bei -20 mV größer als bei -30 mV. Der Grund hierfür lag in der erhöhten Leitfähigkeit der Natrium-Ströme bei -20 mV. Die maximale Amplitude dieser Ströme war sowohl in der Kontrolllösung als auch nach Gabe von 100 µmol/l Ketamin bei einem Testpotenzial von -20 mV zu finden. Die Gabe des Ketamins reduzierte den Natrium-Strom spannungsunabhängig um etwa 50 %.
Die Darstellung 11B (vgl. Seite 36) zeigt eine Strom-Spannungskurve für Natrium-Ionen-Ströme am isolierten Soma in der Kontrolllösung und unter Applikation von 100 µmol/l Ketamin Razemat. Die Strom-Spannungs-Kurve wurde aus den jeweiligen Spitzenwerten des Natriumstroms bei verschiedenen Potenzialen (I(E)) mit Hilfe der Gleichung 6 erstellt:

Gleichung 6:

$$I(E) = gNa_{max} /(1 + \exp((E_{50} - E)/k))(E - E_{Na})$$

E = Membranpotenzial [mV]
E_{50} = halbmaximales Aktivierungspotenzial [mV]
E_{Na} = Umkehrpotenzial für Natrium-Ionen [mV]
k = Steilheitsfaktor [mV]
gNa_{max} = maximale Leitfähigkeit für Natrium [S]

In der Kontrolllösung ergaben sich ein halbmaximales Aktivierungspotenzial von –30,1 mV (50% der Kanäle sind aktiviert), ein Umkehrpotenzial von +53 mV und ein Steilheitsfaktor von 5,1 mV. Nach Applikation von 100 µmol/l Ketamin veränderten sich die Ergebnisse nur geringfügig (E_{50} = –32,7 mV, E_{Na} = +53 mV, k = 5,7 mV).
Die Aktivierung der Natrium-Ströme in TEA-Badlösung und unter Applikation von 100 µmol/l Ketamin wird in Abbildung 11C (vgl. Seite 36) gezeigt. Hierbei veränderten sich das halbmaximale Aktivierungspotenzial von –29,62 mV auf –30,87 mV und der

Steilheitsfaktor von 6,58 mV auf 6,53 mV. Zur Erstellung der Abbildung 11C (vgl. Seite 36) wurde folgende Gleichung benutzt:

Gleichung 7:

$$g_{Na} = 1 /(1 + \exp((E_{50} - E)/k))$$

g_{Na} = relative Natriumleitfähigkeit [mV]
E_{50} = halbmaximales Aktivierungspotenzial [mV]
E = Membranpotenzial
k = Steilheitsfaktor [mV]

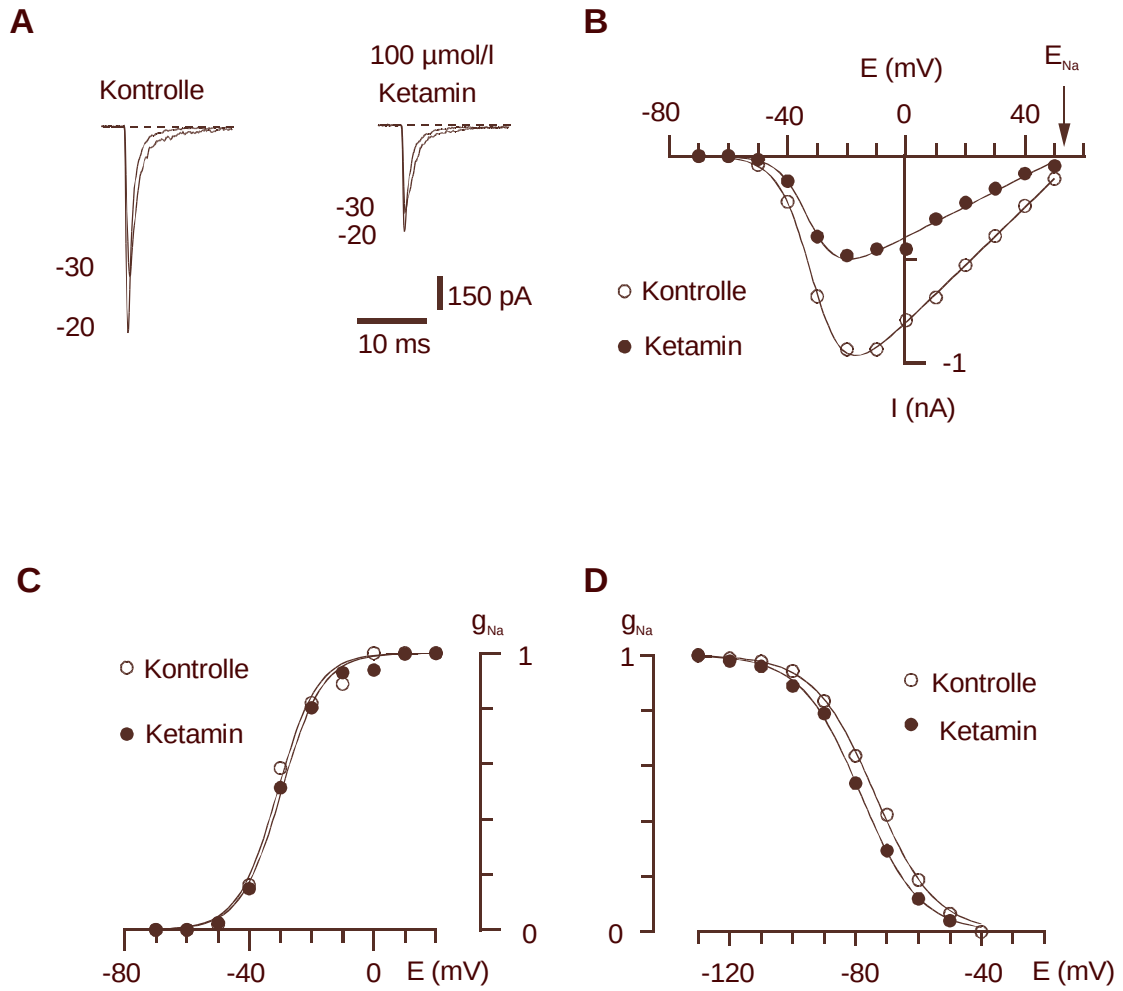
Die Darstellung der Inaktivierungskurve ist in Abbildung 11D (vgl. Seite 36) zu sehen. Sie zeigt eine - wenn auch nicht sehr ausgeprägte - Verschiebung zu hyperpolarisierenden Potenzialen. Zur Berechnung der Datenpunkte wurde folgende Gleichung verwendet:

Gleichung 8:

$$g_{Na} = 1 /(1 + \exp(-(E_{50} - E)/k))$$

g_{Na} = relative Natriumleitfähigkeit [mV]
E_{50} = halbmaximales Aktivierungspotenzial [mV]
E = Membranpotenzial
k = Steilheitsfaktor [mV]

Um das Inaktivierungsverhalten des Natrium-Kanals und seine Beeinflussung unter Applikation von Ketamin zu untersuchen wurden die Stromamplituden bei einem Testpotenzial von -20 mV nach einem Vorimpuls zu veränderbaren Potenzialen (von -130 mV bis -20 mV) gemessen und festgelegt. Die Werte der halbmaximalen Inaktivierung betrugen in der Kontrolllösung -73,9 ±0,4 mV und unter Ketamingabe -78,5 ±0,3 mV, während die Steigungsfaktoren mit 9,3 ±0,3 mV und 9,4 ±0,4 mV (n = 5) beinahe identisch waren.



Abbildungen 11: Beeinflussung von Natrium-Strömen am isolierten Soma

A. Dargestellt sind Erfassungen makroskopischer Natrium-Ströme am isolierten Soma. Sie erfolgten mit unterschiedlichen Potenzialen in TEA-Badlösung und nach Zugabe von 100 µmol/l Ketamin Razemat. Ausgehend von dem Haltepotenzial -80 mV wurden Impulssprünge in jeweils 10 mV-Schritten bis zu dem Potenzial 50 mV durchgeführt. Pipettenlösung High Cs_i, Versuchstemperatur 22°C.

B. Gezeigt werden Strom-Spannungskurven in TEA-Badlösung (offene Kreise) und mit 100 µmol/l Ketamin Razemat (geschlossene Kreise). Die Kurven wurden mit der Gleichung 6 (vgl. Seite 34) erstellt. In der Kontrolllösung lag das halbmaximale Aktivierungspotenzial bei -30,11 mV, das Umkehrpotenzial bei +53 mV und der Steilheitsfaktor bei 5,12 mV. Unter Applikation von 100 µmol/l Ketamin ergaben sich für E_{50} = -32,7 mV, E_{Na} = +53 mV und k = 5,71 mV.

C. Präsentiert werden Aktivierungskurven in TEA-Badlösung und unter Applikation von 100 µmol/l Ketamin Razemat. Die Kurve wurde mit der Gleichung 7 (vgl. Seite 35) angefertigt. Das halbmaximales Aktivierungspotenzial veränderte sich von -29,62 mV auf -30,87 mV und der Steilheitsfaktor von 6,58 mV auf 6,53 mV nach Zugabe von Ketamin zur Kontrolllösung.

D. Gegeben ist die Inaktivierungskurve unter Gabe von 100 µmol/l Ketamin Razemat. Die Anpassung der Datenpunkte erfolgte mit Hilfe der Gleichung 8 (vgl. Seite 35). In der Kontrolllösung wurden für die halbmaximale Inaktivierung –73,9 ±0,4 mV und unter Ketaminapplikation –78,4 ±0,3 mV gemessen. Die Steigungsfaktoren hatten die Werte 9,6 ±0,3 mV und 9,4 ±0,4 mV.

Wirkung der Enantiomere

Wie in Kapitel 4 bereits beschrieben, besitzt Ketamin ein chirales Zentrum am C_2-Atom, das zwei enantiomere Formen zulässt. Diese sterischen Unterschiede könnten für die Wechselwirkung zwischen dem Pharmakon und den Kanalproteinen von Bedeutung sein. In den folgenden Experimenten, wie in Abbildung 12 (vgl. Seite 38) dargestellt, wurden deshalb die eventuell vorliegenden, unterschiedlichen Wirkungen der Enantiomere auf die Natrium-Ströme untersucht. Die Abbildung zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven von S-(+)- und R-(-)-Ketamin, die mit Hilfe der Gleichung 5 (vgl. Seite 29) erstellt wurden. Die zugehörigen Daten konnten aus Konzentrations-Effekt-Experimenten gewonnen werden. Die niedrigste, halbmaximale Blockierungskonzentration hatte S-(+)-Ketamin, welches demnach die größte blockierende Potenz besitzt. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) ergab sich ausschließlich zwischen S-(+)- und R-(-)-Ketamin, wie den Mittelwerten und den entsprechenden 95% Konfidenzintervallen (95% KI) der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 4: Blockade der Natrium-Ströme mit Ketamin am isolierten Soma

	IC_{50} (µmol/l)	SEM (µmol/l)	95% KI (µmol/l)
Razemat	165 (n = 8)	23	59
S-(+)-Ketamin	126 (n = 7)	14	36
R-(-)-Ketamin	245 (n = 7)	24	66

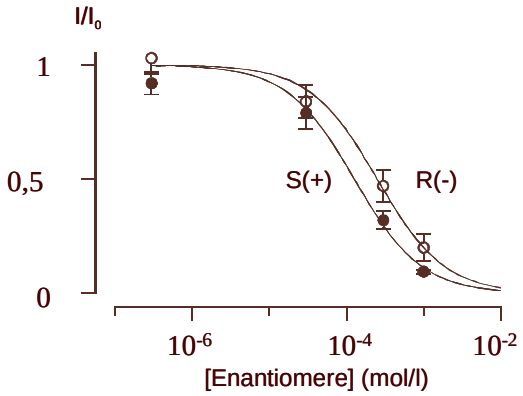


Abbildung 12: Wirkung der Ketaminenantiomere am Natrium-Kanal

Die Abbildung stellt die Konzentrations-Wirkungskurven von S(+)- und R(-)Ketamin auf Natrium-Ströme am isolierten Soma dar. Die Kurven wurden nach der Gleichung 5 (vgl. Seite 29) berechnet. Die IC_{50} für S-(+) lag bei 126 ± 14 µmol/l (n=7) und für R-(-) bei 245 ± 24 µmol/l (n=7).

6.1.4 Blockierung der Natriumstromkomponenten

Die TTX-sensitiven Natrium-Ströme bestehen aus drei Stromkomponenten (SAFRONOV et al., 1997). Diese lassen sich aufgrund ihrer Inaktivierungskinetiken in drei Gruppen unterscheiden: erstens schnell inaktivierende, zweitens langsam inaktivierende und drittens nicht inaktivierende Natrium-Ströme. Laut Safronov et al. können drei Natrium-Kanaltypen in der Membran von Hinterhornneuronen unterschieden werden (SAFRONOV et al., 1997). Sie lassen sich aufgrund ihrer Inaktivierungskinetik differenzieren. Die schnelle Komponente inaktiviert mit einer Zeitkonstante von 0,6 bis 2 ms (80-90 % des gesamten Whole-Cell-Stroms) und die langsame mit 5-20 ms (5-20 % des Gesamtstroms). Die Amplitude des nicht inaktivierenden Natrium-Stroms nimmt einen Wert zwischen 0,5 und 6 % des Gesamtstroms an. Auf der Somamembran der hier untersuchten Hinterhornneurone sind nur schnelle und langsame, aber keine nicht inaktivierenden Natrium-Kanäle zu beobachten. Um herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen der Blockade mit Ketamin und den „klassischen“ Natrium-Kanalblockern TTX und Lidocain gibt, wurde die Wirkung dieser Substanzen auf den Natrium-Strom untersucht. Die Trennung der Stromkomponenten konnte nur mit der Methode der Soma-Isolierung durchgeführt werden. Die Experimente ergaben, dass die Substanzen TTX und Lidocain sowohl die schnell inaktivierende als auch die langsam inaktivierende Komponente des Natrium-Stroms blockieren können. Die

biexponentielle Anpassung der Originalregistrierung von Natrium-Strömen unter Ketaminapplikation zeigt schließlich, dass Ketamin die gleichen Effekte wie TTX und Lidocain hervorruft.

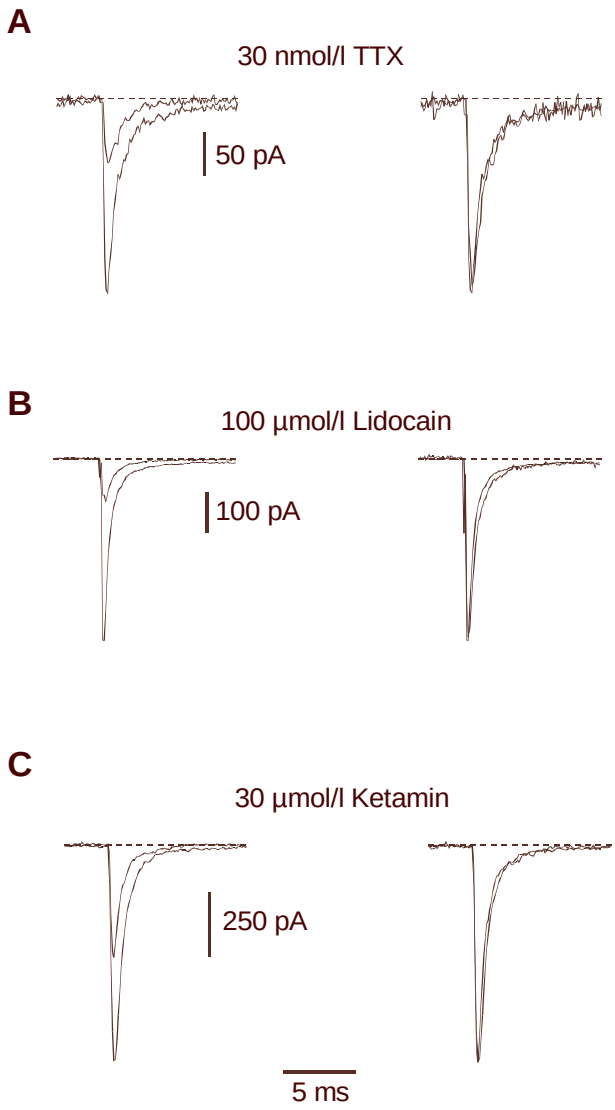


Abbildung 13: Wirkungsunterschiede von TTX, Lidocain und Ketamin

Die Abbildungen zeigen die Aufzeichnungen der Natrium-Ströme in Whole-Cell-Konfiguration. Die Registrierungen haben in TEA-Badlösung und nach Zugabe von TTX (30 nmol/l, n=1), Ketamin Razemat (30 µmol/l, n=1) und Lidocain (100 µmol/l, n=1) stattgefunden. Das Impulsprotokoll zeigte einen Sprung vom Haltepotenzial -80 mV auf -120 mV und dann auf -20 mV. Die gestrichelte Linie zeigt das Nullniveau an. Pipettenlösung High Cs_i, Versuchstemperatur 22°C.
Die linken Darstellungen von 13A, B und C zeigen die Originalregistrierungen in Kontrolle und mit dem jeweiligen Pharmakon. Rechts werden die auf den jeweiligen Spitzenstrom in der Kontrollösung normalisierten Registrierungen wiedergegeben.

6.1.5 Bindungsstelle der Ketaminmoleküle

Das Medikament Lidocain gilt als typisches Lokalanästhetikum, das seine Hauptwirkung über die Blockade des Natrium-Kanals ausübt. Um herauszufinden, ob Ketamin über die gleiche Bindungsstelle wirkt, wurden Verdrängungsexperimente in Anlehnung an die Arbeit der Arbeitsgruppe Bräu (BRÄU et al., 1997) durchgeführt. Dabei wurden makroskopische Natrium-Ströme bereits vor der Applikation der

einzelnen Ketaminkonzentrationen jeweils durch verschiedene Lidocain-Konzentrationen blockiert. Liegen zwei unterschiedliche Rezeptoren für Lidocain und Ketamin vor, so müssten die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) für Ketamin trotz steigender Lidocainkonzentrationen konstant bleiben. Bei Vorhandensein nur eines Rezeptors sollten sich die Moleküle gegenseitig am Rezeptor verdrängen und die IC_{50} von Ketamin mit zunehmenden Lidocainkonzentrationen ansteigen. Aufgrund der Gleichung 9 (vgl. Seite 41) konnte eine Gerade erstellt werden, auf der die IC_{50}-Werte für Ketamin liegen sollten.

Die Abbildung 14 zeigt die scheinbaren IC_{50} für Ketamin Razemat gegenüber den applizierten Lidocainkonzentrationen (300 µmol/l, 600 µmol/l und 1000 µmol/l). Die Darstellung zu den Verdrängungsexperimenten macht deutlich, dass es zu keiner Verschiebung der halbmaximalen Blockierungskonzentration kam. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass verschiedene Bindungsstellen für Lidocain und für Ketamin vorhanden waren oder dass unterschiedliche Wirkungsweisen der beiden Substanzen zur Blockade des Natrium-Kanals führten.

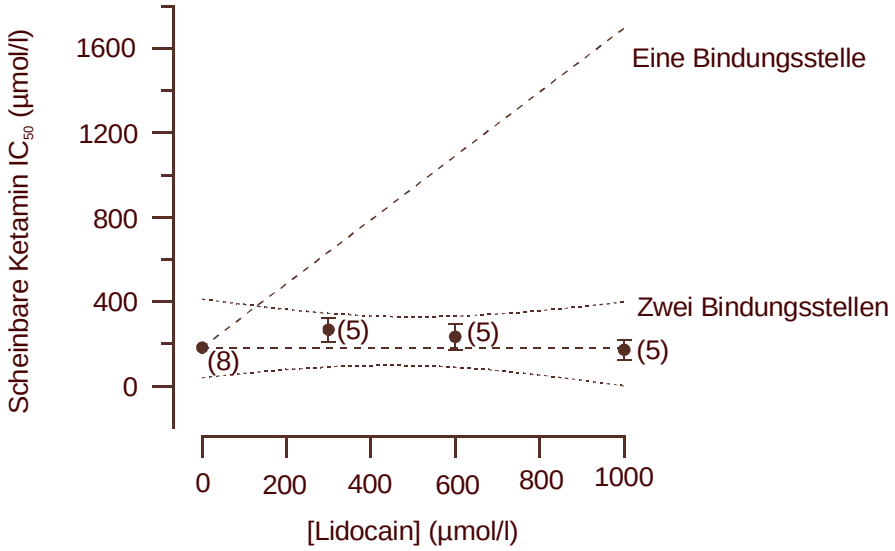


Abbildung 14: Untersuchung der Bindungsstelle von Ketamin

Die Darstellung zeigt die scheinbaren, halbmaximalen Bockierungskonzentrationen für Ketamin gegenüber den jeweils vorher applizierten Lidocainkonzentrationen (300 µmol/l, 600 µmol/l und 1000 µmol/l). Die theoretischen Änderungen der apparenten IC_{50} von Ketamin Razemat sind in Abhängigkeit von den gleichzeitig blockierenden Lidocainkonzentrationen und der Annahme einer oder zweier Bindungsstellen durch zwei gestrichelte Linie dargestellt. Das Konfidenzintervall wird durch die beiden gepunkteten Linien angezeigt und die Experimentenanzahl ist neben den Datenpunkten zu finden.

Gleichung 9:

$$IC_{50,\ Keta,\ app} = IC_{50,\ Keta}\left(1 + \frac{[Lido]}{IC_{50,\ Lido}}\right)$$

$IC_{50,\ Keta,\ app}$ = Scheinbare halbmaximale Blockierungskonzentration von Ketamin Razemat

$IC_{50,\ Keta}$; $IC_{50,\ Lido}$ = Tatsächliche halbmaximale Blockierungskonzentration von Ketamin Razemat bzw. Lidocain (aus Konzentrations-Effekt-Experimenten)

[Lido] = verwendete Lidocain-Konzentrationen

Keta = Ketamin Razemat

6.2 Ketamineffekte an Kalium-Kanälen

Spannungsabhängige Kaliumkanäle haben die Möglichkeit, sowohl die Auslösung eines Aktionspotenzials bei den Neuronen im Zentralnervensystems zu steuern als auch eine Membranrepolarisation eines Aktionspotenzials zu bewirken (HODGKIN und HUXLEY, 1952a; HODGKIN und HUXLEY, 1952b; CONNOR und STEVENS, 1971; LLINAS, 1988; HILLE, 1992). Die schnell inaktivierenden Kalium-Kanäle sind besonders wichtig für die Generierung einer Serie von Aktionspotenzialen, da sie sowohl die schnelle Repolarisation als auch die Reaktivierung der Natrium-Kanäle verursachen können (LLINAS, 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung von Ketamin auf die schnell inaktivierenden Kalium-Kanäle (K_A) und die verzögert aktivierenden Kalium-Kanäle (K_{DR}) an insgesamt 49 Hinterhornneuronen untersucht. Zu Beginn jedes Experiments wurden zunächst Natrium-Ströme in Whole-Cell-Konfiguration abgeleitet, um eine Unterscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen zu treffen.

6.2.1 Trennungsmethode der Kalium-Ströme

Um Kaliumströme getrennt von Natriumströmen zu untersuchen, wurden die Experimente in natriumfreier Cholinchloridlösung durchgeführt. Die Trennung der Kalium-Ströme untereinander erfolgte unter Ausnutzung ihres unterschiedlichen Aktivierungsverhaltens (WOLFF et al., 1998). Die Abbildung 15 (vgl. Seite 43) beinhaltet die Darstellung der Trennung. Der Kalium-Gesamtstrom K_{DR+A} und der K_{DR}-Strom wurden immer direkt aufgenommen, während der K_A-Strom immer aus der Differenz beider Ströme resultierte. Ausgehend von dem Haltepotenzial -80 mV wurde der K_{DR+A}-Strom nach einem 150 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls auf -120 mV durch einen Spannungssprung auf +20 mV (200 ms) hervorgerufen. Der Vorimpuls diente dazu, alle inaktivierten Kaliumkanäle in einen aktivierbaren Zustand zu überführen. Um den K_{DR}-Strom isoliert zu aktivieren, wurde ein 150 ms langer depolarisiernder Vorimpuls von -80 mV auf -60 mV, gefolgt von einem Spannungssprung auf +20 mV (200 ms), genutzt. Bei einem Potenzial von -60 mV waren sämtliche K_A-Kanäle inaktiviert.

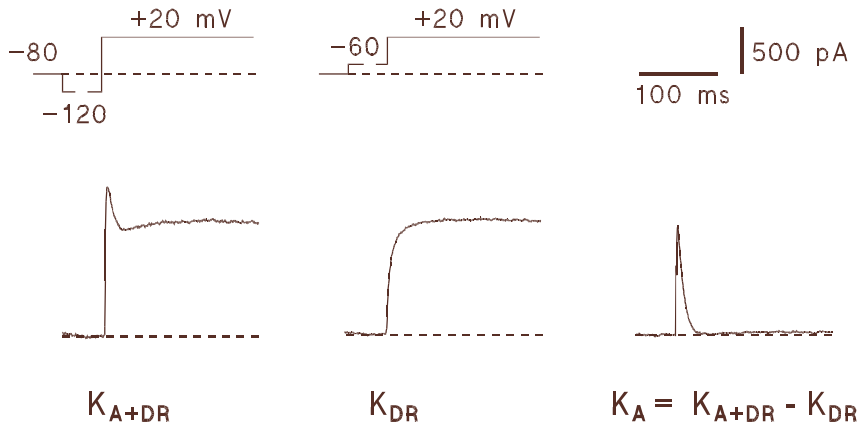


Abbildung 15: Trennung spannungsabhängiger Kalium-Ströme

Links Präsentation des Kalium-Summenstroms (K_{A+DR}).
Mitte Abbildung des verzögert aktivierenden Kaliumstroms (K_{DR}).
Rechts Darstellung der Differenz beider Ströme als K_A-Strom (K_A).
Die Impulsprotokolle sind jeweils darüber abgebildet (modifiziert nach OLSCHEWSKI et al., 1998).

6.2.2 Wirkung auf Kalium-Kanäle im Gewebeschnitt

Um herauszufinden, ob Ketamin am K_{DR}- und K_A-Kanal vergleichbare oder unterschiedliche Wirkungen entfaltet, fanden Untersuchungen mit verschiedenen Ketaminkonzentrationen statt. Zur Beurteilung der Blockade wurde für den K_{DR}-Strom die Abnahme des Steady-State-Stroms am Ende des Impulses und für den K_A-Strom die Abnahme der Spitzenstroms berechnet. Die Aufzeichnung der Korrekturimpulse erfolgte bei jeder Stromregistrierung. Ihre Subtraktion von der Testregistrierung wurde vorgenommen, um Leck- oder kapazitive Ströme zu kompensieren.

In Abbildung 16A (vgl. Seite 44) wird deutlich, dass bei den Natrium-Kanälen ebenso wie bei den K_{DR}-Kanälen eine tonische Blockade mit steigenden Ketaminkonzentrationen bewirkt wurde. Für die Erstellung der nebenstehenden Konzentrations-Effektkurve wurde die Gleichung 5 (vgl. Seite 29) genutzt. Bei der Berechnung der halbmaximalen Blockierungskonzentration (IC_{50}) ergab sich ein Wert von 296 ± 54 µmol/l.

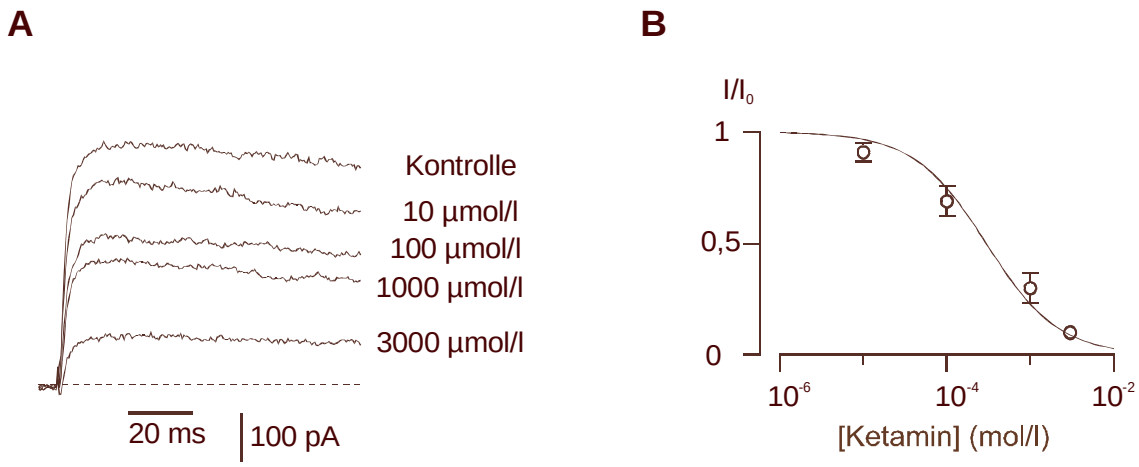
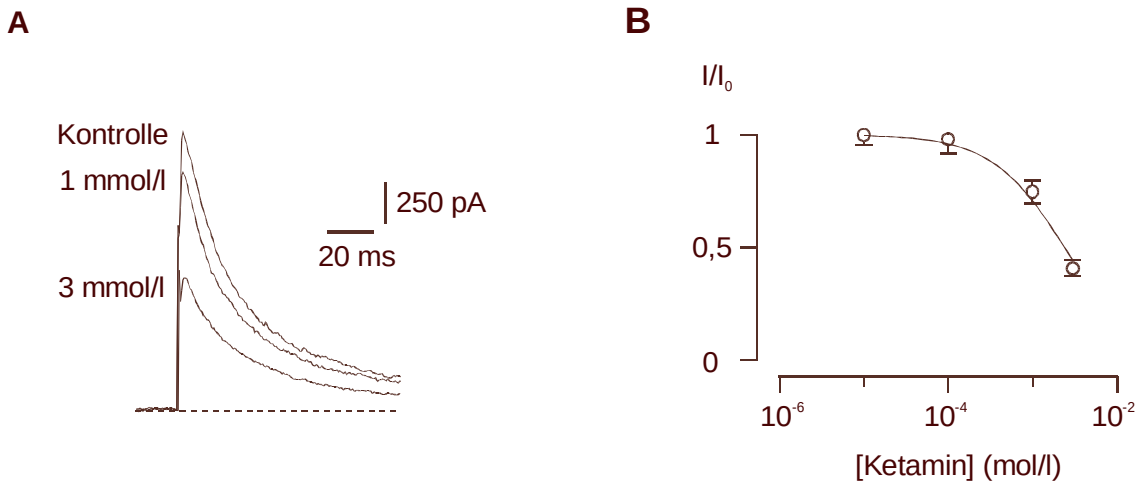


Abbildung 16: Blockade des K_{DR}-Kanals durch Ketamin Razemat

A. Es liegt die Originalregistrierung makroskopischer K_{DR}-Ströme in Whole-Cell-Konfiguration vor. Die Registrierung fand in der Cholinchlorid-Badlösung und nach Zugabe steigender Razemat-Konzentrationen (10 µmol/l, 100 µmol/l, 1000 µmol/l, 3000 µmol/l) statt. Das Impulsprotokoll zeigte einen Sprung vom Haltepotenzial –80 mV auf –60 mV und dann auf +40 mV. Die gestrichelte Linie gibt das Nullniveau an. Pipettenlösung Innenlösung-1, Versuchstemperatur 25°C.

B. Abgebildet wird die Konzentrations-Wirkungskurve des Razemats am K_{DR}-Kanal. Die Erstellung der Kurve erfolgte mit Hilfe der Gleichung 5 (vgl. Seite 29). Die IC_{50} liegt bei 296 ± 54 µmol/l (n=5).

Auch an den K_A-Kanälen wurden tonische Blockaden durch Ketamin Razemat ausgelöst. Mit den Daten von insgesamt sechs Hinterhornneuronen errechnete sich eine IC_{50} von 2400 ± 200 µmol/l. Die Untersuchungen zeigten, dass die K_A-Kanäle wesentlich weniger auf gleiche Ketaminkonzentrationen reagierten als die K_{DR}-Kanäle. Dies ist in den Abbildungen 17A und 17B (vgl. Seite 45) dargestellt.



Abbildungen 17: Wirkung von Ketamin Razemat auf K_A-Kanäle

A. Die Aufzeichnung zeigt die Ströme des schnell inaktivierenden Kalium-Kanals (K_A) im Whole-Cell Modus. Sie wurden in einer Cholinchlorid-Badlösung und nach Zugabe verschiedener blockierender Ketaminkonzentrationen (1 mmol/l, 3 mmol/l) registriert. Das Nullniveau wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Pipettenlösung Innenlösung-1, Versuchstemperatur 21-24°C.

B. Das vorliegende Bild stellt die Konzentrations-Effektkurve des Razemats am K_A-Kanal dar. Die Anfertigung der Kurve erfolgte mit Hilfe der Gleichung 5. Die halbmaximale Blockierungskonzentration lag bei 2400 ± 200 µmol/l (n=6).

6.2.3 Effekt von Ketamin am isolierten Soma

Die vorangegangenen Untersuchungen im Whole-Cell-Modus gaben Hinweise, in welchen Konzentrationen Ketamin auf Kalium-Kanäle wirken kann. Die folgenden Experimente benutzten die bereits im Kapitel 5.3 (vgl. S. 20) beschriebenen Vorteile des isolierten Somas, bei der die bessere Diffusion der Moleküle der Testsubstanz eine wichtige Rolle spielt.

Die nachstehende Abbildung 18 (vgl. S. 46) gibt die Blockade der K_{DR}-Kanäle durch Ketamin Razemat wieder, wobei in 18A die Registrierung der Ströme und in 18B die Konzentrations-Wirkungskurve aufgezeigt wird.

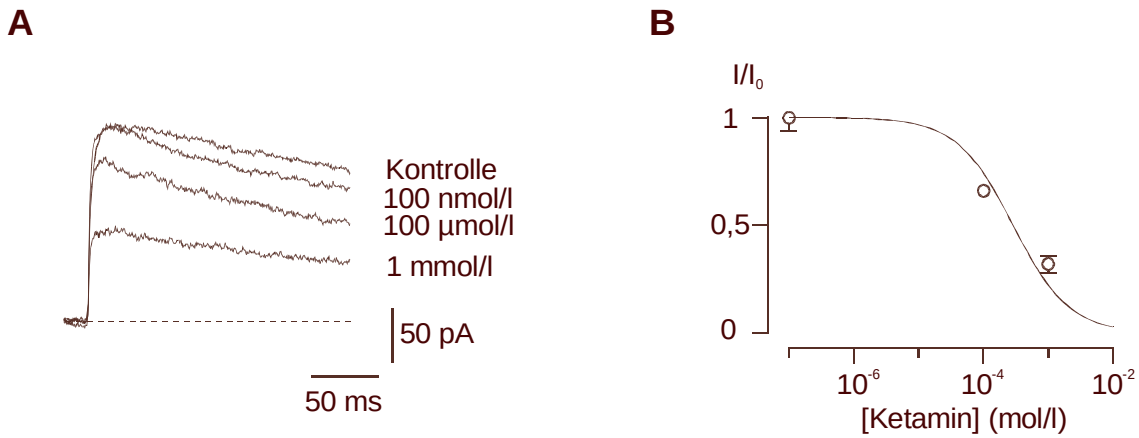


Abbildung 18: Blockade der K_{DR}-Kanäle am isolierten Soma

A. Die Präsentation zeigt die Registrierung der Ströme des K_{DR}-Kanals am isolierten Soma. Es werden die Ströme in der Kontrolllösung und nach Zugabe von 100 nmol/l, 100 µmol/l und 1 mmol/l Ketamin Razemat dargestellt. Das Impulsprotokoll zeigte einen Sprung vom Haltepotenzial -80 mV auf -60 mV und dann auf +40 mV. Die gestrichelte Linie stellt das Nullniveau des Stroms dar. Pipettenlösung Innenlösung-2, Versuchstemperatur 22°C.

B. Die Darstellung gibt die Konzentrations-Wirkungskurve des Razemats am K_{DR}-Kanal wieder. Die Kurve wurde nach der Gleichung 5 (vgl. Seite 29) erstellt. Die halbmaximale Blockierungskonzentration lag bei 183 ± 27 µmol/l (n=5).

In weiteren Experimenten wurde die Wirkung der Enantiomere untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass am K_{DR}-Kanal kein bedeutender Unterschied zwischen der Applikation von Ketamin Razemat und seinen Enantiomeren S-(+) und R-(-) zu finden war (siehe Tabelle 3, Seite 23). Wie man in der Tabelle 5 (siehe Tabelle 5, Seite 47) aus der Überlappung der 95% Konfidenzintervalle ablesen kann, unterschieden sich die halbmaximale Blockierungskonzentrationen für Ketamin Razemat und seiner Stereoisomere nicht signifikant.

In Abbildung 19 werden die Konzentration-Wirkungs-Verläufe von S-(+)- und R(-)-Ketamin aufgezeigt.

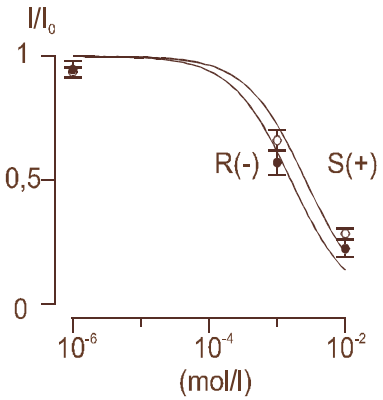


Abbildung 19: Wirkung der Ketaminenantiomere am K_{DR}-Kanal

Die Darstellung spiegelt die Konzentration-Wirkungskurve von S-(+)- und R-(-)-Ketamin am K_{DR}-Kanal wieder. Die Kurven wurden nach Gleichung 5 (vgl. Seite 29) berechnet. Die IC_{50} lagen hier bei 200 ± 25 µmol/l (n=5) für S-(+)- (offene Kreise) und bei 144 ± 24 µmol/l (n=6) für R-(-)-Ketamin (geschlossene Kreise).

Die Wirkungen des Razemats von Ketamin als auch seiner Enantiomere S-(+) und R-(-) am K_A-Kanal werden in den Abbildungen 20A und B (vgl. S. 48) dargestellt. Die blockierenden Konzentrationen betrugen jeweils 600 µmol/l (Abbildung 20A). Die nebenstehende Abbildung 20B zeigt die Konzentration-Wirkungskurve von Ketamin Razemat, S-(+) und R-(-). Die in der nun folgenden Tabelle 5 gegebenen 95 % Konfidenzintervalle spiegeln wieder, dass S-(+)-Ketamin signifikant weniger wirksam war als Ketamin Razemat und sein Enantiomer R-(-). Eine Blockade der K_A-Ströme erfolgte erst in höheren Konzentrationen von Ketamin Razemat.

Tabelle 5: Blockade von K_{DR}-Kanälen und K_A-Kanälen mit Ketamin am isolierten Soma

	K_{DR}-Kanal				K_A-Kanal			
	IC_{50}	n	SEM	95%KI	IC_{50}	n	SEM	95%KI
Razemat	183	5	27	74	497	7	49	137
S-(+)-Ketamin	200	5	25	86	1350	7	63	172
R-(-)-Ketamin	144	5	24	65	447	8	63	175

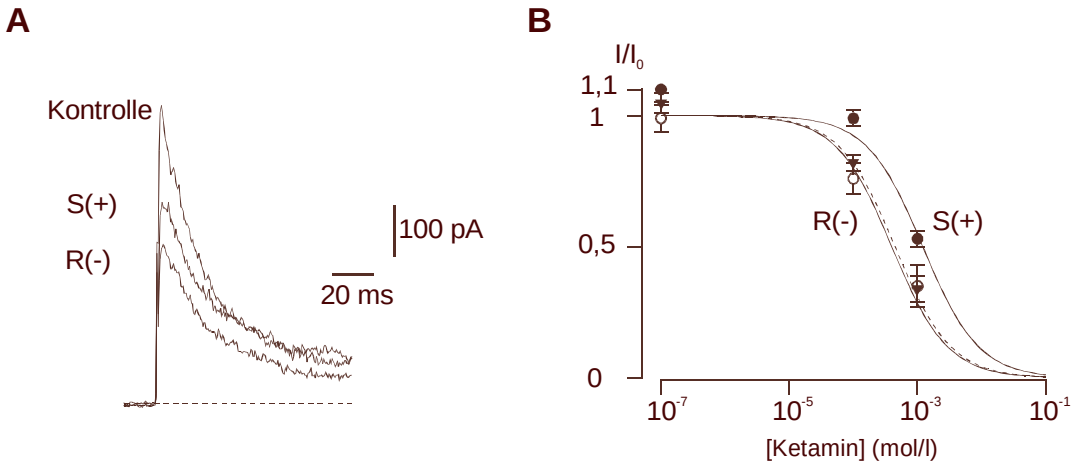


Abbildung 20: Blockade des K_A-Kanals durch Ketamin und seine Enantiomere

A. Die Originalregistrierung stellt die Ströme des K_A-Kanals am isolierten Soma dar. Die Ströme wurden in einer Cholinchlorid-Badlösung und nach Zugabe von jeweils 600 µmol/l S-(+)- und R-(-)-Ketamin aufgezeichnet. Das Nullniveau wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Pipettenlösung Innenlösung-2, Versuchstemperatur 22°C.

B. Gezeigt werden die Konzentrations-Wirkungskurven von Ketamin und seinen Enantiomeren am K_A-Kanal. Die Erstellung der Kurven erfolgte mit Hilfe der Gleichung 5 (vgl. Seite 29). Die Werte für R-(-)- werden durch einen offenen Kreis und für S-(+)-Ketamin durch einen geschlossenen Kreis symbolisiert. Die gestrichelte Linie und das Symbol des auf der Spitze stehenden Dreiecks repräsentieren das Razemat. Die IC_{50} waren für das Razemat 497 ± 70 µmol/l (n=7), für S-(+) 1350 ± 63 µmol/l (n=7) und für R-(-) 447 ± 63 µmol/l (n=8).

Die nun folgende Abbildung 21 (vgl. S. 49) gibt eine statistische Darstellung der Ketaminwirkung am K_A-Kanal wieder. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Scheffé-Tests. Das Ketaminenantiomer R-(-) unterscheidet sich mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ von S-(+) und mit $p < 0,001$ vom Razemat. Das R-(-)-Ketamin zeigte jedoch keine signifikante Differenz gegenüber dem Razemat. Die drei Sternchen stellen die hochsignifikanten Differenz zwischen dem Razemat und S-(+)-Ketamin dar, das einzelne Sternchen gibt den weniger starken, aber dennoch signifikanten Unterschied zwischen S-(+)- und R-(-)-Ketamin wieder.

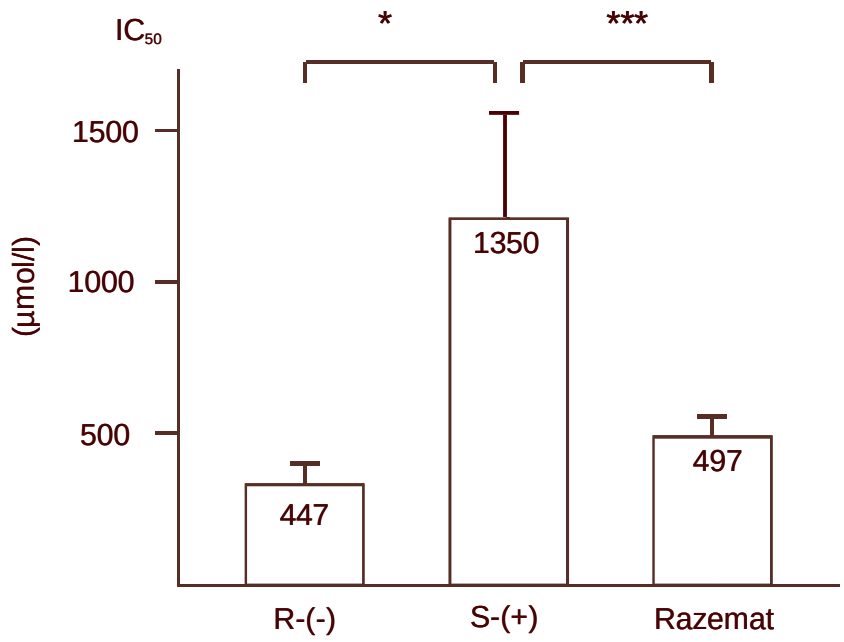


Abbildung 21: Statistische Darstellung der Ketaminwirkung am K_A-Kanal

Es werden die jeweiligen IC_{50} als Säulen gezeigt. Drei Sternchen (***) stellen den hochsignifikanten Unterschied zwischen dem Razemat und S(+) heraus ($p < 0{,}001$). Ein einzelnes Sternchen (*) zeigt den signifikanten Unterschied zwischen S(+) und R(-) ($p < 0{,}05$).

6.3 Auswirkungen von Ketamin auf die neuronale Erregbarkeit

Ein Aktionspotenzial stellt sich als die der Signalfortleitung dienende, kurzzeitige Änderung des Membranpotenzials dar, die entweder vorhanden ist oder nicht („Alles-oder-Nichts-Prinzip“). Vereinfacht kann der Mechanismus folgendermaßen darstellt werden. In Ruhe überwiegt die Kaliumleitfähigkeit einer Nervenzelle. Erfolgt ein depolarisierender Reiz, so kommt es zu einer Öffnung von Natriumkanälen in der Zelle und zu einer Zunahme der Natriumleitfähigkeit. Das negative Membranpotenzial erreicht rasch positive Werte. Nach kurzer Zeit schließen sich die Natriumkanäle wieder und es tritt die Repolarisation ein, die zusätzlich durch die anschließende Zunahme der Kaliumleitfähigkeit verursacht wird.

Die vorangegangenen Experimente zeigten die Ketaminwirkung an Natrium-Kanälen und an den Kalium-Kanälen. Die nun folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen der durch Ketamin hervorgerufenen Kanalblockade einerseits und der möglichen Generierung von Aktionspotenzialen andererseits zu beleuchten.

Die verwendeten Neurone wurden aufgrund ihres spezifischen Aktions-potenzialmusters ausgewählt (THOMSON et al., 1989). Geeignet waren nur die Neurone der Kategorie 1, da sie kurze, einzelne Aktionspotenziale auslösen und auf Dauerdepolarisation mit nicht-adaptierenden Aktionspotenzialserien antworten können. Im Gegensatz dazu bilden Neurone der Kategorie 2 nur am Anfang des langen depolarisierenden Reizes kurze adaptierende Aktionspotenzialserien und die der Kategorie 3 nur ein oder zwei Aktionspotenziale. Mit Hilfe langer depolarisierender Impulse (500 ms) wurden die Neurone der Kategorie 1 von den anderern Zellen unterschieden. Das Ruhemembranpotenzial wurde immer bei –70 mV gehalten. Es zeigte sich, dass Ketamin Razemat die Impulsfrequenz der Neurone signifikant vermindern konnte.

Die Anwendung von Ketamin machte deutlich, dass sich sowohl die Amplitudenhöhe als auch die Signalbreite mit steigenden Konzentrationen verändert. Die Abweichungen bestanden darin, dass sich die Amplitudenhöhe mit zunehmender Ketaminkonzentration (100 µmol/l, 300 µmol/l und 1 mmol/l) verkleinerte und sich die Repolarisation verlangsamte (Abbildung 22, vgl. S. 52). Die Abnahme der Stromamplitude wurde

durch die Blockade der Natrium-Ströme und die verlangsamte Repolarisation durch die Blockade des K_{DR}-Stroms verursacht. Die Messungen fanden im Current-Clamp-Modus und im Gewebeschnitt statt. Während der Experimente wurde das Membranpotenzial bei –70 mV gehalten. Die Pipetten waren mit einer hohen Kalium-Innenlösung (Innenlösung-1) gefüllt.

Die statistische Analyse zur Wirkung von Ketamin auf die Amplitude und die Repolarisation der Aktionspotenziale ist in Tabelle 6 (vgl. S. 53) aufgelistet. Die Abbildung 22 stellt die Originalregistrierungen von Aktionspotenzialen in der Kontrolllösung und die Änderungen der Aktionspotenziale nach Zugabe von Ketamin dar. Die rechte Darstellung zeigt überlappend die Registrierungen mit einer anderen zeitlichen Auflösung. Die gepunkteten Linien geben dabei die passiven Membranantworten wieder, die aus fünf Antworten nicht aktivierter Kanäle gemittelt wurden. Diese Kurven werden als die passive Antwort der Zellmembran auf einen hyperpolarisierenden Stromimpuls (-10 pA, 10 ms) gewertet. Mit Hilfe von zwei Exponenzialfunktionen (eine für den ansteigenden und eine für den abfallenden Teil) konnten sie angepasst werden. Schließlich erfolgte eine Multiplikation mit einem Faktor von –11, um die passive Membranantwort auf einen depolarisierenden Stromimpuls von +110 pA zu erhalten. Wie die Abbildung 22 zeigt, führten bereits 100 µmol/l Ketamin zu einer Verminderung der Amplitude des Aktionspotenzials. Da mit höheren Konzentrationen von Ketamin die Amplitudenhöhe stärker abnahm, liegt die Vermutung nahe, dass eine zunehmende Blockade der Natriumkanäle dafür verantwortlich ist. Nach Hinzugabe von 1 mmol/l Ketamin war das Neuron schließlich nicht mehr in der Lage, ein Aktionspotenzial zu generieren.

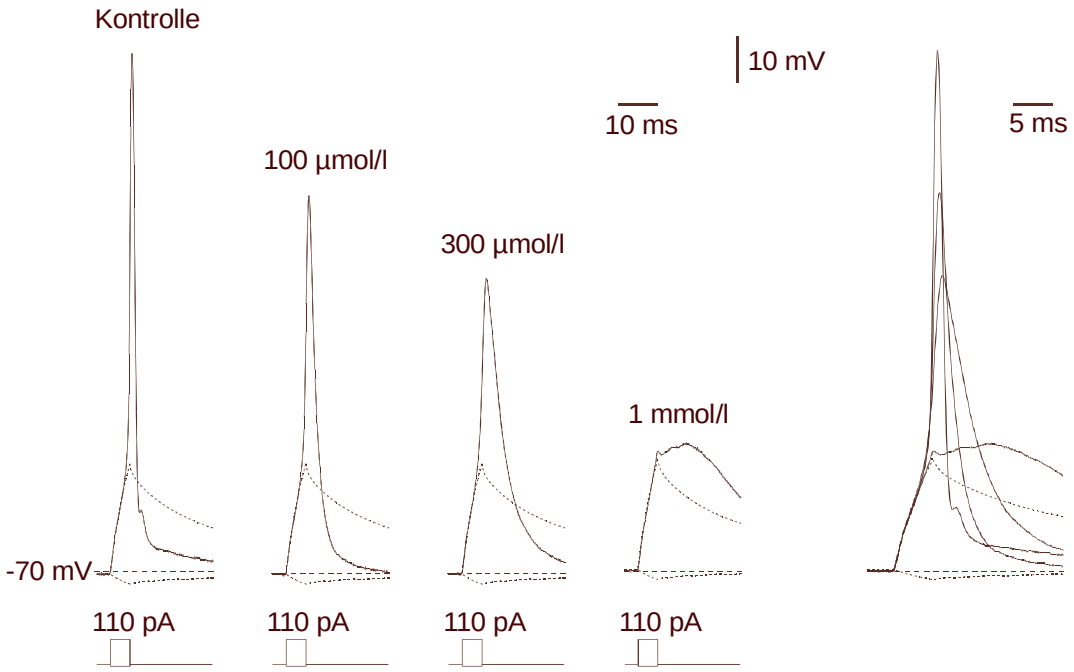


Abbildung 22: Wirkung von Ketamin Razemat auf einzelne Aktionspotenziale

Die Abbildung zeigt die mit unterschiedlichen Ketaminkonzentrationen (100 µmol/l, 300 µmol/l und 1 mmol/l) blockierten Potenziale für sich (links) und übereinander gelagert (rechts). Die Current-Clamp Ableitung erfolgte im Whole-Cell-Modus. Das Membranpotenzial wurde während des Experiments in der Nähe des Ruhemembranpotenzials bei -70 mV gehalten. Die passiven Antworten sind mit einer gepunkteten Linie in jeder Kurve dargestellt, während die gestrichelte Linie das Nullniveau der Ströme wiederspiegelt. Das Impulsprotokoll ist unter den Registrierungen abgebildet.

In Abbildung 23 (vgl. Seite 53) wird dargestellt, dass es unter Applikation von 100 µmol/l Ketamin sowohl zu einer Abnahme der Aktionspotenzialhäufigkeit als auch zu einer Verlangsamung der Repolarisation kam. Die Abnahme der Impulsfrequenz wird wahrscheinlich durch die Blockade von K_{DR}-Kanälen hervorgerufen. Die statistische Auswertung der Effekte ist in Tabelle 6 (vgl. Seite 53) zusammengefasst dargestellt. Als Quotient der mittleren Impulsfrequenz in der Kontrolllösung und der mittleren Impulsfrequenz unter Applikation von Ketamin wurde die Frequenz k gebildet.

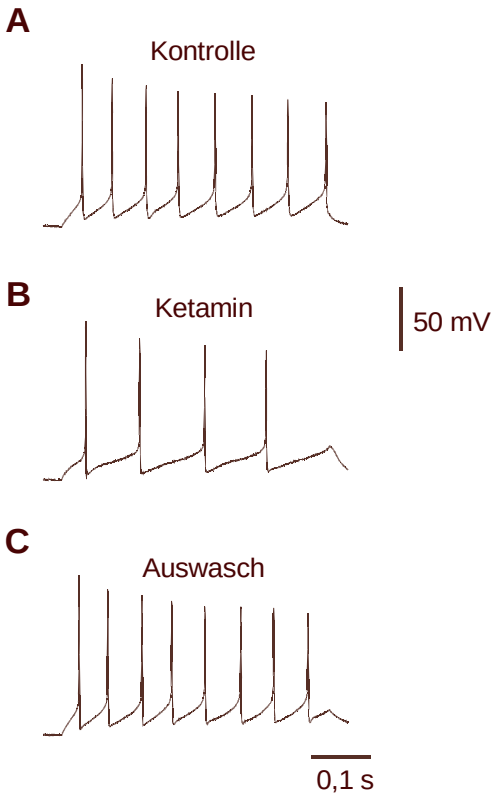


Abbildung 23: Effekt von Ketamin Razemat auf Aktionspotenzialserien

Die obige Darstellung zeigt Aktionspotenzialserien in Kontrolle (A), mit einer Ketaminkonzentration von 100 µmol/l (B) und letztendlich im Auswasch (C). Die Current-Clamp-Ableitung erfolgte im Whole-Cell-Modus. Das Membranpotenzial wurde während des Experiments bei -70 mV gehalten.

Tabelle 6: Effekte von Ketamin auf einzelne Aktionspotenziale und Aktionspotenzial-serien

	n	Kontrolle	Ketamin	Auswasch	p
AP-Höhe [mV]	20	+48,8 ± 1,5	+34,4 ±1,5	+47,8 ± 1,4	< 0,001
AP-Breite [ms]	28	1,9 ± 0,3	5,6 ± 0,4	1,94 ±0,4	< 0,001
Frequenz	5	1,0	0,74 ± 0,008	0,99 ±0,02	< 0,01

Ketamin führte sowohl zu einer Verkleinerung des Aktionspotenzials als auch zu einer Verbreiterung. Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten Senkung der relativen Impulsfrequenz (k).
Abkürzungen: AP = Aktionspotenzial, n = Anzahl, p = Wahrscheinlichkeit

7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Wirkung von Ketamin und seiner Enantiomere S-(+) und R-(-) auf die spannungsabhängigen Ionenkanäle spinaler Hinterhornneurone junger Ratten. Ohne eine enzymatische Vorbehandlung ist es möglich mit Hilfe der inzwischen etablierten Slice-Methode pharmakologische Untersuchungen auf Rückenmarksebene durchzuführen. In allen Experimenten wurde die Patch-Clamp-Technik benutzt und zur genaueren Analyse der Ketamineffekte die Methodik der Soma-Isolierung verwendet. Diese Methode bietet vor allem für pharmakologische Untersuchungen Vorteile, da die freie Diffusion der zu untersuchenden Substanz zum Rückenmarksschnitt kaum behindert wird. Weitere Vorteile bestehen zum einen in den verbesserten Bedingungen der räumlichen Spannungsklemme in Soma und Soma + Axon-Strukturen und zum anderen in der Verminderung der Spannungsfehler aufgrund des vergleichsweise geringen Serien-widerstands in den isolierten Zellen.

Natrium-Kanäle

Die Natrium-Kanäle gehören derzeit zu den am besten untersuchten spannungsabhängigen Membrankanälen. Sie wurden zum ersten Mal von Hodgkin und Huxley (HODGKIN und HUXLEY, 1952) aufgezeichnet. In den 60er und 70er Jahren erfolgten detaillierte Analysen dieser Kanäle (ARMSTRONG, 1981 und HILLE, 1984). Der Aufbau des Natrium-Kanalproteins konnte schließlich aufgrund biochemischer und gentechnischer Untersuchungen entschlüsselt werden (CATTERALL, 1980 und NODA et al., 1984). Das Gesamtprotein besteht aus vier Untereinheiten (I-IV), von denen jede wiederum aus sechs Segmenten (S_1-S_6) aufgebaut ist. Die sechs Segmente der Untereinheiten entsprechen einander weitgehend. Während das Segment S_4 für die Kanalöffnung verantwortlich gemacht wird, scheinen vier extrazelluläre Schleifen zwischen S_5 und S_6 an der Bildung des Selektivitätsfilters beteiligt zu sein. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivierungszustände des Natrium-Kanals lässt sich ein vereinfachtes Reaktionsschema über die Funktionsweise des Natrium-Kanals aufstellen. Es werden drei Funktionszustände unterschieden: geschlossen aktivierbar, offen

aktivierbar und geschlossen inaktiviert. Vom geschlossen aktivierbaren Zustand aus wird der Kanal durch Repolarisation geöffnet. Dieser Zustand der Öffnung führt innerhalb von Millisekunden zum inaktivierten Zustand. Aus letzterem wird der Kanal durch Repolarisation wieder zum aktivierbaren Zustand zurückgebracht.

Durch Experimente mit hohen Ketaminkonzentrationen wurde der lokalanästhetische Effekte des Medikaments bekannt. So zeigten Århem und Rydquist mit Versuchen am Nervenpräparat des Xenopus laevis, dass Ketamin eine halbmaximale Blockierungskonzentration von 2 mmol/l erreichte (ÅRHEM und RYDQUIST, 1986). Im gleichen Jahr fanden Benoit und seine Mitarbeiter eine IC_{50} von 700 µmol/l am Riesenaxon der Tintenschnecke des Loligo pealii (BENOIT et al., 1986). Untersuchungen am Froschnerven der Rana esculenta ergaben hingegen eine IC_{50} von 1,1 mmol/l (FRENKEL und URBAN, 1992) und Erforschungen der Arbeitsgruppe Bräu stellten wiederum am Präparat Xenopus laevis eine IC_{50} von 325 µmol/l fest (BRÄU et al., 1997). Diese verschiedenen halbmaximalen Blockierungskonzentrationen könnten unter anderem auf die verschiedenen Tierarten zurückzuführen sein, die die Forscher untersuchten. Aufgrund der nur gering ausgeprägten Hemmung der Natrium-Kanäle in narkotischen Konzentrationen (< 20 µmol/l oder 5,48 µg/ml) kann insgesamt geschlossen werden, dass Ketamin zwar klinische Relevanz bei lokaler Applikation (epidurale Injektion, intravenöse Regionalanästhesie) aufweist, jedoch eine Beteiligung an der Entstehung der Ketaminanalgesie bzw. Narkose unwahrscheinlich ist (KRESS, 1997; FRENKEL und URBAN, 1992).

Bereits im Jahre 1973 wurden Untersuchungen zur Wirkung von Ketamin durchgeführt. Damals stellten Dowdy et al. zunächst am Froschnerven fest, dass eine Lösung mit einer Ketaminkonzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ [M] zu einer Reduktion der Reizweiterleitung um 50 % führte. Die weiterhin vorgenommene, intrathekale Applikation von Ketamin (Konzentration 1,25%, Volumen 3 ml) an Hunden zeigten Verluste der sensorischen oder motorischen Fähigkeiten (DOWDY et al., 1973). Århem und Rydquist benutzten 1986 die gleichen Konzentrationen wie Dowdy et al. am Froschnerven. Damit zeigten sie, dass Ketamin eine 50%ige Reduktion der Natriumleitfähigkeit am myelinisierten Axon hervorruft (ÅRHEM und RYDQUIST, 1986). Für eine vollständige Blockade war eine Konzentration von 10^{-2} Mol (2,38 mg/ml) notwendig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die halbmaximale Blockierungskonzentration von Ketamin Razemat am spinalen Hinterhornneuron der

Ratte um den Faktor zehn geringer war als die in klinischen Studien gefundenen Konzentrationen. Sie lag bei 165 µmol/l (isoliertes Soma). Dieser Sachverhalt könnte damit erklärt werden, dass das Anästhetikum in den Untersuchungen dieser Arbeit näher an die Zellen appliziert wurde, so dass nur eine geringe Behinderung der Diffusion durch umliegendes Gewebe bestand. Deshalb kann der Schluss gezogen werden, dass zur direkten Blockade der Neurone eine geringere als bisher angenommene Ketamindosis benötigt wird. Wie hoch die Dosierung von Ketamin zur spinalen Blockade gewählt werden sollte, hängt jedoch nicht nur von der Diffusion zum Zielrezeptor ab.

Es spielen auch die Eigenschaft „Use-Dependent“ und das Ruhemembranpotenzial, von dem die Reizung ausgeht, eine Rolle. Begründet wird das Verhalten des Use-Dependent-Blocks mit Hilfe des Modulated-Receptor Models. Dieses besagt, dass Lokalanästhetika eine höhere Sensitivität auf offene und auf die im inaktivierten Zustand befindlichen Natriumkanäle besitzen als auf geschlossene Kanäle (HILLE, 1992; STRICHARTZ et al., 1990). Der Effekt von Ketamin auf NMDA-Rezeptorkanäle kann ebenfalls eine Blockade zeigen, die der eines Offenkanalblocks entspricht, da eine zeit-, konzentrations- und reizfrequenzabhängige („Use-Dependent“) Hemmung ausgelöst werden konnte (MACDONALD et al., 1987; RODRIGUEZ-PAZ et al., 1995). Auch Untersuchungen an Natrium-Kanälen des Skelettmuskels (WAGNER et al., 2001) und der Spinalganglien (ZHOU und ZHAO, 2000) zeigten, dass eine Use-Dependent-Blockierung möglich ist. Bereits 1977 stellte man jedoch fest, dass ein Molekül umso geladener sein muss, je stärker sein Use-Dependent-Block ausgeprägt ist (SCHWARZ et al., 1977). So führte ein neutrales Anästhetikum wie zum Beispiel Benzocain zu keinem Use-Dependent-Block. Die Arbeitsgruppe Bräu fand heraus, dass Ketamin im alkalischen Medium eine stärker blockierende Wirkung auf Natriumkanäle ausübt, als dies in einem sauren Milieu der Fall ist (BRÄU et al., 1997). Aufgrund seines pK_a-Werts von 7,5 lag das Ketaminmolekül bei niedrigen pH-Werten wegen einer Protonenanlagerung an das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms vermehrt in positiv geladener und somit lipophober Form vor. Dies demonstrierte eine lokalanästhetische Eigenschaft von Ketamin. Lokalanästhetika sollten nämlich nicht in entzündentes Gewebe applizieren werden, da das dort vorherrschende saure Milieu die Wirkung des Medikaments herabsetzen kann. Die vorliegende Studie ergab, dass Ketamin Razemat am Natrium-Kanal der spinalen Hinterhornneurone einen Use-Dependent-Block auslösen kann.

Durch die repetitiven Impulse entwickelte Ketamin eine erhöhte Sensitivität auf offene oder im inaktivierten Zustand befindlichen Natrium-Kanäle. Dieser Effekt legt den Schluss nahe, dass wahrscheinlich eine Unterschätzung der bereits beschriebenen tonischen Blockierungspotenz vorliegt. Demzufolge könnten bereits niedrigere Konzentrationen von Ketamin ausreichen, neuronale Natrium-Kanäle unter physiologischen Bedingungen zu blockieren.

Die Wirkung von Ketamin Razemat auf das Inaktiverungsverhalten von Natrium-Kanälen zeigte, dass eine leichte Verschiebung zu hyperpolarisierenden Potenzialen stattfand. Vor nicht allzu langer Zeit fand jedoch Benoit heraus, dass am Nerven des Frosches Rana esculenta keine Veränderung durch Ketamingabe sichtbar waren (BENOIT, 1995). Diese unterschiedlichen Ergebnissse können zum einen auf die verschiedenen Präparate zurückgeführt werden, andererseits auch mit den ungleichen Untersuchungsbedingungen einhergehen.

Bereits in Kapitel 4 wurden die klinisch fassbaren Unterschiede in der Wirkung von S-(+)- und R-(-)-Ketamin dargestellt. Es zeigte sich in vielen Untersuchungen, dass S-(+)-Ketamin mit wenigeren Nebenwirkungen behaftet ist. Diese Aussage wurde durch die bereits aufgezeigten, experimentellen Ergebnisse am Natrium-Kanal unterstützt, da bereits mit 126 µmol/l S-(+)-Ketamin die halbmaximale Blockierungskonzentration erreicht war und im Gegensatz dazu 245 µmol/l des Enantiomers R-(-) benötigt wurde. Lediglich Smith et al. und Puu et al. maßen in ihren Untersuchungen eine stärkere Wirkung des R-(-)-Ketamins (SMITH et al., 1981; PUU et al., 1991). Smith et al. zeigten einen geringen stereoselektiven Blockierungsvorteil von R-(-)-Ketamin an neuronalen Serotonintransportprozessen. Puu et al. publizierten eine verstärkte Hemmung der Azetylcholinesterase durch R-(-)-Ketamin sowie die Behinderung seiner irreversiblen Hemmung durch organische Phosphorsäureester. Auch die Arbeitsgruppe Bräu stellte am peripheren Nerven fest, dass die R-(-)-Form geringfügig stärker blockierte als sein S-(+)-Enantiomer, wobei aber kein eindeutiger stereospezifischer Vorteil gegenüber dem S-(+)-Ketamin bestand (BRÄU et al., 1997). Hierbei wird deutlich, dass Ketamin und seine Enantiomere je nach Wirkort unterschiedliche Effekte und Blockierungspotenzen besitzen. Viele Anästhetika können den Ionenstrom der Natrium-Kanäle auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Die Wirkungsweise der Lokalanästhetika wurde bereits anfangs beschrieben. Die Bindungsstelle für diese Moleküle liegt innerhalb des Natrium-Kanals und scheint hierbei mehr der

Membraninnenseite zugewandt zu sein (BRÄU et al., 1997). Da bekannt ist, dass das Medikament Lidocain über diesen Rezeptor seine lokalanästhetische Wirkung ausübt, wurde es für die Analyse des Bindungsortes von Ketamin in den bereits beschriebenen Verdrängungsexperimenten benutzt. Das Ergebnis zeigte, dass Ketamin vermutlich einen anderen Ort am oder im Kanal benutzt, vielleicht aber auch eine völlig andere Wirkungsweise besitzt. Offensichtlich können Lokalanästhetika und Ketamin durch unterschiedliche Beeinflussung der Natrium-Kanäle ihre Wirkung ausüben.

Kalium-Kanäle

Inzwischen sind eine Vielzahl unterschiedlicher Kalium-Kanäle bekannt, die alle annähernd die gleiche Struktur besitzen (CATTERALL, 1988). Meist liegen sechs transmembranäre Abschnitte vor und vier der kürzeren Einzelproteine lagern sich wahrscheinlich zusammen, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden. Unter anderem unterscheiden sich die Kanäle aufgrund ihres Aktivierungs- und Inaktivierungsverhaltens sowie in ihren Reaktionen mit Pharmaka. So zeigt zum Beispiel der K_A-Kanal nach der Depolarisation sowohl eine schnelle Aktivierung als auch Inaktivierung.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei spannungsabhängige Kalium-Kanäle untersucht. Einerseits die sogenannten „delayed rectifier“ (K_{DR}-Kanäle), die mit einer zeitlichen Verzögerung („delay“) aktivieren und mit einer Zeitkonstante > 100 ms inaktivieren (SCHWARZ und VOGEL, 1971). Davon unterschieden wurden andererseits die schnell inaktivierenden „A-Typ“-Ströme, die mit einer Zeitkonstante von 15-60 ms während der Depolarisation einer Zelle sehr schnell inaktivieren und erst durch eine Hyperpolarisation erneut aktivieren. Aufgrund seiner frühen Aktivierung nahe dem Ruhemembranpotenzial ist der K_A-Kanal befähigt, die Impulsfrequenz („Feuerfrequenz“), die für die Weiterleitung neuronaler Informationen wichtig ist, zu modulieren (HILLE, 1992). Neurone haben daher die Möglichkeit, über den Grad ihrer Depolarisation Informationen als Frequenz der Aktionspotenziale an nachgeschaltete Neurone weiterzuleiten.

Die bisher veröffentlichten Daten zeigten, dass Kalium-Kanäle gegenüber Ketamin wenig empfindlich waren. So waren sowohl der K_A-Kanal (ROTHMAN, 1988) als auch der K_{DR}-Kanal (BAUM, 1993; ROTHMAN, 1988) erst von millimolaren Konzentrationen blockiert. Auch Frenkel und Urban schrieben über Kalium-Kanäle des zentralen

Nervensystems, dass eine IC_{50} mit einer Konzentration von 1,1 mmol/l und eine maximale Blockierung von 71% des Stroms möglich war (FRENKEL und URBAN, 1992). Etwas empfindlicher reagierten die potenzialunabhängigen „Flicker"-Kanäle auf Ketamin. Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen lagen hier bereits zwischen 100 und 200 µmol/l (BRÄU et al., 1993). Ebenso stellten 1999 Friederich und Urban an neuronalen Kalium-Kanälen des zentralen Nervensystems eine IC_{50} von 361 µmol/l fest (FRIEDERICH und URBAN, 1999). Auch Endou et al. erreichten durch Untersuchungen an Meerschweinchen-Kardiomyozyten eine Hemmung des K_{DR}-Kanals in Konzentrationen von 100 µmol/l (ENDOU et al., 1992), während an isolierten Herzmuskelzellen Baum keine Blockierung in diesem Konzentrationsbereich feststellte (BAUM, 1993). Trotzdem besitzen die durch hohe Ketaminkonzentrationen hervorgerufenen Inhibitionen von Ionenkanälen klinische Relevanz, da sie höchstwahrscheinlich ein Grund für die lokalanästhetische Wirkung von Ketamin sind. Die Kanalblockaden könnten bei der rückenmarksnahen Gabe einen wesentlichen Beitrag zur analgetischen Wirksamkeit leisten (KRESS, 1994).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Hemmkonzentrationen von Ketamin am K_{DR}-Kanal unterschieden sich nicht sehr von denen der Natrium-Kanäle. In den Untersuchungen am isolierten Soma differierte jedoch die Empfindlichkeit des K_{DR}-Kanals deutlich gegenüber der des K_A-Kanals. Der langsam inaktivierende Kalium-Kanal war etwa dreimal sensitiver gegenüber Ketamin Razemat (vgl. Kap. 6.2.3). Ketamin blockierte die K_A-Kanäle zwar zu etwa 40%, aber erst in einer Konzentration von 3 mmol/l. Eine Stereoselektivität am K_{DR}-Kanal konnte nicht festgestellt werden. Zu diesem Ergebnis führten auch die Untersuchungen von Bräu et al. am peripheren Nerven (BRÄU et al., 1997). Im Gegensatz dazu zeigte sich durch die Untersuchungen an K_A-Kanälen der Hinterhornneurone, dass Ketamin Razemat und seine Enantiomere sich in ihrer Blockierungspotenz unterschieden. Das Enantiomer R-(-) zeigte eine deutlich potentere Wirkung als S-(+)-Ketamin. Zusammen mit der bereits erwähnten, unterschiedlichen Wirkung von S-(+)- und R-(-)-Ketamin am Natrium-Kanal wurde durch diese Studie zum ersten Mal dargestellt, dass Ketamin an Ionenkanälen eine deutlich stereoselektive Wirkung besitzt. Die Arbeitsgruppe Bräu et al. beobachtete zwar ebenfalls am Flicker-Kanal eine Stereoselektivität, deren Ausprägung jedoch eindeutig geringer war (IC_{50}: S-(+) = 168 µmol/l und R-(-) = 146 µmol/l). Ob die unterschiedliche Stereoselektivität am K_A-Kanal und Natrium-Kanal auch für verschiedene Wirkungen und

Nebenwirkungen des Medikaments Ketamin verantwortlich ist, kann aus den vorliegenden Daten nicht eindeutig gefolgert werden. Aus klinischen Untersuchungen ist aber bekannt, dass das Enantiomer S-(+) überwiegend die positiven und R-(-) vermehrt die negativen Eigenschaften von Ketamin trägt. Eindeutig ist, dass am Natrium-Kanal S-(+)-Ketamin und am K_{DR}- und K_A-Kanal R-(-)-Ketamin am potentesten sind. Weiterhin scheint sicher zu sein, dass die Blockade des Natrium-Kanals für die Wirkung von Lokalanästhetika zuständig ist. Die Beeinträchtigung des Ionenstroms durch den K_A-Kanal könnte für die Modulation der Schmerzempfindung relevant sein.

Aktionspotenziale

Das Nervensystem verarbeitet und verteilt Informationen im Körper. Diese Informationen werden als Änderung in Aktionspotenzialserien (Frequenzkodierung) verschlüsselt und weitergegeben. Aktionspotenziale werden durch Überschreiten des „Schwellenpotenzials“ (der Depolarisation der Zellmembran) ausgelöst. Es schließt sich selbsttätig eine Depolarisation zum Spitzenpotenzial an, von dem aus die Repolarisation zum Nachpotenzial erfolgt.

Es ist bekannt, dass die Hemmung spannungsabhängiger neuronaler Natrium-Kanäle zu einer erschwerten oder verhinderten Entstehung eines Aktionspotenzials an der Zelle führt (WANN, 1993). Die Erregungsleitung wird unterbrochen, da die ankommende Erregung die Nervenmembran an der Wirkstelle des Lokalanästhetikums nicht mehr depolarisieren kann. Die Gabe des Natrium-Kanal-Blockers TTX kann zu einer Reduktion einzelner Aktionspotenzialamplituden führen, während die Anzahl der Aktionspotenziale gleich bleibt (OLSCHEWSKI et al., 2001). Umgekehrt kommt es nach Gabe des Kalium-Kanal-Blockers TEA zu einer signifikanten Reduktion der Aktionspotenzialanzahl und die Amplitudenhöhe wird nur unwesentlich beeinflusst (OLSCHEWSKI et al., 2001). Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass die Länge der Repolarisationsphase der Hinterhornneurone durch K_{DR}-Kanäle reguliert wird und dass eine Blockade der K_{DR}-Kanäle zu einer Abnahme der Aktionspotenzialfrequenz führt (OLSCHEWSKI et al., 2001). Die vorliegende Arbeit zeigte, dass Ketaminkonzentrationen von 100 µmol/l eine Zelle sowohl am Auslösen eines Aktionspotenzials signifikant beeinflussen als auch zu einer drastischen Abnahme der Frequenz von

Aktionspotenzialserien führen können. Die schmerzdämpfende Wirkung von Ketamin lässt sich hierdurch erklären. Ob auch andere Kanäle eine Rolle spielen, ist bisher noch nicht bestimmt worden. Die eben genannte Arbeitsgruppe hatte keinen Anhalt dafür, dass die Generierung der spinalen Neuronenimpulse auch durch kalziumabhängige Kaliumkanäle beeinflusst wird. Jedoch beobachteten Murase und Randic während der Blockade der spannungsabhängigen Natrium- und Kalium-Kanäle mit TTX und TEA in Hinterhornneuronen sich langsam entwickelnde, kleine depolarisierende, für Kalzium selektive Potenziale. Diese könnten darauf hinweisen, dass spannungsabhängige Kalziumleitfähigkeiten an der Generierung von Aktionspotenzialen beteiligt sind (MURASE und RANDIC, 1983).

Sicherheitsfaktor

Die Zuverlässigkeit und Stabilität der Ausbreitung eines Aktionspotenzials wird durch den sogenannten Sicherheitsfaktor charakterisiert. Er wird aus dem Verhältnis von Schwellenstromstärke und verfügbarer Reizstromstärke bestimmt. Dieses gibt an, um wieviel der aus der nächsten Umgebung kommende Strom die zur Erregung mindestens notwendige Stromstärke überschreitet.

Es ist bekannt, dass die Erregungsleitung eines Axons einen hohen Sicherheitsfaktor besitzt. Dieser beträgt an der motorischen Faser des Froschischiadicus 5-7. Dieser Sicherheitsfaktor bedeutet, dass die Amplitude eines Aktionspotenzials auf 1/5 bis 1/7 ihres normalen Wertes abnehmen kann, ohne dass es dabei zu einer unterbrochenen Erregungsfortleitung kommt (LULLIES, 1970). Eine Unterbrechung der Erregung könnte nur durch eine 80%ige Blockade aller beteiligten Natrium-Kanäle hervorgerufen werden (ECKERT und RANDALL., 1978). Unter der Vermutung, dass ein Molekül mit einem Rezeptor interagiert, würde eine 80%ige Blockade erst durch das Vierfache der halbmaximalen Blockierungskonzentration (4 x IC_{50}) eines Pharmakons zustande kommen.

Ein Sicherheitsfaktor, der für die Generierung des Aktionspotenzials am Hinterhorn-neuron bedeutsam ist, wurde bisher noch nicht beschrieben. Er kann aber folgendermaßen abgleitet werden. Ein Aktionspotenzial kann am Hinterhornneuron generiert werden, wenn der Natrium-Strom größer als 1 nA ist (SAFRONOV et al., 1997). Dieser erreicht eine durchschnittliche Größe bei älteren Ratten von 5 nA (SAFRONOV et

al., 1999). Wenn die Aktionspotenzialamplitude der einzige limitierende Faktor ist, dann müssten mehr als 80% der Natrium-Kanäle blockiert werden (wie am Axon), um kein Aktionspotenzial auszulösen. Es regulieren jedoch auch K_{DR}-Kanäle die Länge der Repolarisationsphase eines Neurons. Ein zugehöriger Sicherheitsfaktor wurde auch hier noch nicht beschrieben. Unter der Annahme, dass der Sicherheitsfaktor von Natrium- und K_{DR}-Kanälen gleich groß ist, dürfte eine gleichzeitige Blockierung beider Kanäle ab einer Blockerkonzentration von 4 x IC_{50} nicht zur Auslösung eines Aktionspotenzials führen. In Experimenten mit dem Kalium-Kanal-Blocker TEA konnte jedoch gezeigt werden, dass es bereits bei einer 50%ige Blockade des K_{DR}-Kanals zu einer Verlangsamung der Repolarisation und Reduktion der Frequenz von Aktionspotenzialserien kommt (OLSCHEWSKI, 2001). Deshalb muss angenommen werden, dass die Sicherheitsfaktoren vom K_{DR}-Kanal und Natrium-Kanal sich unterscheiden.

8. Schlussfolgerung und Ausblick

Innerhalb der letzten Jahre sind viele klinische Untersuchungen zu den Wirkungen von Ketamin auf das zentrale Nervensystem duchgeführt worden. Dabei wurden die Ketamineffekte während der Allgemeinanästhesie und bei rückenmarksnaher Applikation untersucht. Die meisten Experimente auf elektrophysiologischer Ebene wurden jedoch hauptsächlich am peripheren Nerven vorgenommen. Die Ergebnisse lassen sich aufgrund der elektrophysiologischen und pharmakologischen Unterschiede zwischen den axonalen und somatischen Membranen nicht unmittelbar auf das ZNS übertragen. Diese Dissertation hat deshalb die Wirkung von Ketamin auf die Ionenkanäle spinaler Hinterhornneurone analysiert.

Die verschiedenen Untersuchungen haben gezeigt, dass Ketamin die typische Eigenschaft eines Lokalanästhetikums, nämlich die Blockade von Natrium-Kanälen, besitzt. Interessanterweise hat sich jedoch herausgestellt, dass Ketamin anscheinend nicht den bisher für Lokalanästhetika angenommenen Zielort im Natrium-Kanal für seine Wirkungsentfaltung benutzt. Hier stellt sich deshalb die Frage, auf welche Weise Ketamin den Natrium-Strom im Kanal behindern bzw. blockieren kann. Geschieht dies durch Benutzung eines eigenen Rezeptors, durch Modulation von Bestandteilen des Kanals oder der umgebenden Zellmembran (Verschiebung von Bestandteilen der Doppellipidschicht)? Mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode könnte es möglich sein, eine Antwort zu finden. Sie könnte auch benutzt werden, um festzustellen, inwieweit andere Lokalanästhetika vergleichbare Ergebnisse wie Ketamin an spinalen Hinterhornneuronen aufweisen und ob ligandengesteuerte Rezeptorkanäle an der lokalanästhetischen Wirkung bzw. der Behinderung der Schmerzweiterleitung beteiligt sind. Bemerkenswert ist auch die unterschiedliche Potenz der Enantiomere am Natrium- und K_A-Kanal. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob und welcher genaue Zusammenhang zwischen der Blockade und den durch Ketamin verursachten Nebenwirkungen besteht.

Diese Fragestellungen können wahrscheinlich nur gemeinsam mit elektrophysiologischen, zellbiologischen, molekularbiologischen und klinischen Untersuchungen beantwortet werden. Obwohl bereits vor 34 Jahren die ersten Untersuchungen zu Ketamin stattfanden, liegt der genaue Wirkungsmechanismus noch

im Dunkeln. Es bleibt daher eine Herausforderung für die Forschung, diese Zusammenhänge zu beleuchten.

9. Anhang

9.1 Literaturverzeichnis

Anis, N. A.; Berry, S. C.; Burton, N. R. und D. Lodge: The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-D-aspartate. In: Br J Pharmacol 79 (1983). S. 565-575.

Appel, E.; Dudziak, R.; Palm, D. und A. Wnuk: Sympathoneural und sympathoadrenal activation during ketamine anesthesia. In: Eur J Clin Pharmacol 16 (1979). S. 91.

Århem, P. und B. Rydquist: The mechanism of action of ketamine on the myelinated nerve membrane. In: Eur J Pharmacol 126 (1986). S. 245-251.

Armstrong, C. M.: Sodium channels and gating currents. In: Physiol. Rev. 61 (1981). S. 644-682.

Baum, V. C.: Distinctive effects of three intravenous anesthetics on the inward rectifier (I_{K1}) and the delayed rectifier (I_K) potassium currents in myocardium: implications for the mechanism of action. In: Anesth Analg 76 (1993). S. 18-23.

Benoit, E.; Carratu, M. R.; Dubois, J. M. und D. Mitolo-Chieppa: Mechanism of action of ketamine in the current and voltage clamped myelinated nerve fibre of the frog. In: Br J Pharmacol 87 (1986). S. 291-297.

Benoit, E.: Effects of intravenous anaesthetics on nerve axons. In: Eur J Anaesthesiol 12 (1995). S. 59-70.

Bion, J. F.: Intrathecal ketamine for war surgery. A preliminary study under field conditions. In: Anesthesia 39 (1984). S. 1023-1028.

Borgbjerg, F. M.; Svensson, B. A.; Frigast, C und T. Gordh Jr.: Histopathology after repeated intrathecal injections of preservative-free ketamine in the rabbit: a light and electron microscopic examination. In: Anaesth Analg 79 (1994). S. 105-111.

Bräu, M. E.; Sander, F.; Vogel, W. und G. Hempelmann: Untersuchung des lokalanästhetischen Effekts von Ketamin und seinen Stereoisomeren an einzelnen Ionenkanälen des peripheren Nerven. In: Anaesthesist 42 (1993). S. 871.

Bräu, M. E.; Sander, F.; Vogel, W. und G. Hempelmann: Blocking mechanisms of ketamine and its enantiomers in enzymatically demyelinated peripheral nerve as revealed by single-channel experiments. In: Anesthesiology 86 (1997). S. 394-404.

Brockmeyer, D. M. und J. J. Kendig: Selective effects of ketamine on amino acid-mediated pathways in neonatal rat spinal cord. In: Br J Anaesth 74 (1995). S. 79-84.

Brock-Utne, J. G.; Mankowitz, E.; Kallichurum, S. und J. W. Downing: Effects of intrathecal saline and ketamine with and without preservative on the spinal nerve roots of monkeys. In: S A Med J 61 (1982). S. 360-361.

Carlà, V. und F. Moroni: General anaesthetics inhibit the responses induced by glutamate receptor agonists in the mouse cortex. In: Neurosci Lett 146 (1992). S. 21-24.

Catterall, W. A.: Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. In: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20 (1980). S. 15-43.

Catterall, W. A.: Structure and function of voltage-sensitive ion channels. In: Science 242 (1988). S. 50-61.Cevero, F. und A. Iggo: The substantia gelatinosa of the spinal cord: a critical review. In: Brain 103 (1980). S. 717-772.

Connor, J. A. und C. F. Stevens: Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. In: J Physiol 213 (1971). S. 21-30.

Corssen, G. und E. F. Domino: Dissociative anaesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivate CI-581. In: Anaest Analg 45 (1966). S. 29-40.

Davies, S. N.; Alford, S. T.; Coan, E. J.; Lester, R. A. und G. L. Collingridge: Ketamine blocks a NMDA receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus in a voltage-dependent manner. In: Neurosci Lett 92 (1988). S. 213-217.

Doenicke, A.; Kugler, J.; Mayer M.; Angster, R. und P. Hoffmann: Ketamin-Razemat oder S-(+)-Ketamin und Midazolam. Die Einflüsse auf Vigilanz, Leistung und subjekives Befinden. In: Anaesthesist 41 (1992). S. 610-618.

Dowdy, E. G.; Kaya, K. und Y. Gocho: Some pharmacologic similarities of ketamine, lidocaine and procaine. In: Anaesth Analg 52 (1973). S. 839-842.

Eckert, R. und D. Randall: Nerve cells and signals. In: Animal Physiology. WH Freeman and Co. San Francisco 1987.

Edwards, F. A.; Konnerth, A.; Sakmann, B. und T. Takahashi: A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. In: Pfluegers Arch 414 (1989). S. 600-612.

El-Katheeb, O. E.; Ragab, A.; Metwalli, M. und H. A. Hassan: Assessment of epidural ketamine for relief of pain following vaginal and lower abdominal surgery. In: Domino EF (ed) Status of Ketamine in Anesthesiology. NPP Books, Ann Arbour (1980).

Endou, M.; Hattori, Y.; Nakaya, H.; Gotoh, Y. und M. Kanno: Electrophysiologic mechnisms responsible for inotropic responses to ketamine in guinea pig and rat myocardium. In: Anesthesiology 76 (1992). S. 409-418.

Fink, A. D. und S. H. Ngai: Opiate receptor mediation of ketamine analgesia. In: Anesthesiology 56 (1982). S. 291-297.

Frenkel, C. und B. W. Urban: Molecular actions of racemic ketamine on human CNS sodium channels. In: Br J Anaesth 69 (1992). S. 292-297.

Friederich, P. und B. W. Urban: Interaction of intravenous anesthetics with human neuronal potassium currents in relation to clinical concentrations. In: Anesthesiology 91 (1999). S. 1853-60.

Gasser, H. S. und H. Grundfest: Axon diameters in relation to the spike dimension and the conduction velocity in mammalian A-fibers. In: Am J Physiol 127 (1939). S. 393.

Gebhardt, B.: Pharmakologie und Klinik der periduralen und intrathekalen Anwendung von Ketamin. In: Anaesthesist 43 (1994). S. 34-40.

Gordh, T.; Karlsten, R. und J. Kristensen: Intervention with spinal NMDA, adenosine and NO systems for pain modulation. In: Ann Med 27 (1995). S. 229-234.

Grant, G.; Arvidsson, J.; Robertson, B. und J. Ygge: Transganglionic transport of horseradish peroxidase in primary sensory neurons. In: Neurosci Lett 12 (1979). S. 23-28.

Greifenstein, F.; Yoshitake, J.; De Vault, M. und E. Grajewski: A study of arylcyclo-hexyl-amine for anesthesia. In: Anesth Analg 37 (1959). S. 282.

Gruß, M.: Eigenschaften und Funktionen von BK_{Ca}-Kanälen in kleinen Hinterwurzelganglien junger Ratten: Untersuchung in einer dünnen Schnittpräparation. In: Dissertation, Universität Gießen (1998). S. 25.

Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B. und F. J. Sigworth: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: Pfluegers Arch 391 (1981). S. 85-100.

Hempelmann, G. und D. F. M. Kuhn: Klinischer Stellenwert des S-(+)-Ketamin. In: Anaesthesist 46 (1997). S. 3-7.

Hille, B. und W. Schwarz: Potassium channels as multi-ion single-file pores. In: J Gen Physiol 72 (1978). S. 409-442.

Hille, B.: Ionic channels of excitable membranes. 1. Auflage. Massachussets 1984.

Hille, B.: Ionic channels of excitable membranes. 2. Auflage. Massachussets 1992.

Hille, B: Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. In: Nature (1966). S. 1220-1222.

Hodgkin, A. L. und A. F. Huxley: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. In: J. Physiol. 117 (1952). S. 500-544.

Hodgkin, A. L. und A. F. Huxley: Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. In: J. Physiol (1952a). S. 449-472.

Hodgkin, A. L. und A. F. Huxley: The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. In: J Physiol (1952b). S. 497-506.

Islas, J. A.; Astorga, J. und M. Laredo: Epidural ketamine for control of postoperative pain. In: Anesth Analg 64 (1985). S. 1161-1162.

Kathrivel, S.; Sadhasivam, S.; Saxena, A.; Kannan, T. R. und P. Ganjoo: Effects of intrathecal ketamine added to bupivacaine for spinal anaesthesia. In: Anaesthesia 55 (2000). S. 899-904.

Kawana, Y.; Sato, H.; Shimada, H.; Fujita, N.; Ueda, Y.; Hayashi, A. und Y. Araki: Epidural ketamine for postoperative pain relief after gynecologic operations: A double-blind study and comparison with epidural morphine. Anesth Analg 66 (1987). S. 735-738.

Koek, W. und J. H. Woods: Phencyclidine- inducted catalepsy in pigeons: Specifity and stereoselectivity. In: Eur J Pharmacol 106 (1984). S. 635-638.

Koppenhöfer, E. und W. Vogel: Wirkung von Tetrodotoxin und Tetraäthylammonium-chlorid an der Innenseite der Schnürringsmembran von Xenopus laevis. In: Pfluegers Arch 313 (1969). S. 361-380.

Kress, H. G.: NMDA- und Opiatrezeptorunabhängige Wirkungen von Ketamin. In: Anaesthesist 43 (1994). S. 15-24.

Kress, H. G.: Wirkmechanismen von Ketamin. In: Anaesthesist 46 (1997). S. 8-19.

Kumazawa, T. und E. R. Perl: Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. In: J Comp Neurol 177 (1978). S. 417-434.

LaMotte, C.: Distribution of the tract of lissauer and the dorsal root fibers in the primate spinal cord. In: J Comp Neurol 172 (1977). S. 529-561.

Light, A. R. und E. R. Perl: Differential termination of large-diameter and small-diameter primary afferent fibers in the spinal dorsal gray matter as indicated by labeling with horseradish peroxidase. In: Neurosci Lett 6 (1977). S. 59-63.

Light, A. R. und E. R. Perl: Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observation on the differential termination of coarse and fine fibers. In: J Comp Neurol 186 (1979a). S. 117-131.

Light, A. R. und E. R. Perl: Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. In: J Comp Neurol 186 (1979b). S. 133-150.

Light, A. R.; Trevino, D. L. und E. R. Perl: Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. In: J Comp Neurol 186 (1979). S. 151-171.

Llinas, R. R.: The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insight into central nervous system function. In: Science 242 (1988). S. 1543-1664.

Lodge, D. und K. M. Johnson: Noncompetetive excitatory amino acid receptor antagonists. In: Trends Pharmacol Sci 11 (1990). S. 81-86.

Mankowitz, E.; Brock-Utne, J. G.; Cosnett, J. E. und R. Green-Thompson: Epidural ketamine. A preliminary report. S A Med J 61 (1982). S. 441-442.

Lullies, H.: Peripherer Nerv. In: Keidel WD. Lehrbuch Physiologie. Stuttgart (1970).

MacDonald, J. F.; Miljkovic, Z. und P. Pennefather: Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. In: J Neurophysiol 58 (1987). S. 251-266.

Murase, K. und M. Randic: Electrophysiological properties of rat spinal dorsal horn neurones *in vitro*: calcium-dependent action potentials. In: J Physiol 334 (1983). S. 141-153.

Näsström, J.; Karlsson, U. und C. Post: Antinociceptive actions of different classes of excitatory amino acid receptor antagonists in mice. In: Eur J Pharmacol 212 (1992). S. 21-29.

Naguib, M.; Adu-Gyamfi, Y.; Absood, G. H.; Farag, H. und H. K. Gyasi: Epidural ketamine for postoperative analgesia. In: Can Anaesth Soc J 33 (1986). S. 16-21.

Neher, E. und B. Sakmann: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: Nature 260 (1976). S. 779-802.

Nernst, W.: Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusionen. In: Z. Phys. Chem. (1888). S. 613-637.

Noda, M.; Shimizu, S.; Tanabe, T.; Takai, T.; Kayano, T.; Ikeda, T.; Takahashi, H.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y. und N. Minamino et al.: Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deducted from cDNA sequence. In: Nature 312 (1984). S. 121-127.

Numberger, M. und A. Draguhn: Patch-Clamp-Technik. Heidelberg 1996.

Olschewski, A.; Hempelmann, G.; Vogel, W. und B. V. Safronov: Blockade of Na^+ and K^+ Currents by local anesthesics in the dorsal horn neurons of the spinal cord. In: Anesthesiology 88 (1998). S. 172-180.

Olschewski, A.; Hempelmann, G.; Vogel, W. und B. V. Safronov: Supression of potassium conductance by droperidol has influence on excitability of spinal sensory neurons. In: Anesthesiology 94 (2001). S. 280-289.

Øye, I.; Paulsen, O. und A. Maurset: Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. In: J Pharmacol Exp Ther 260 (1992). S. 1209-1213.

Oshima, E. und C. D. Richards: An in vivo investigation of the action of ketamine on excitatory synaptic transmission in the hippocampus of the guinea-pig. In: Eur J Pharmacol 148 (1988). S. 25-33.

Pfenninger, E.: Untersuchung zu psychometrischen Veränderungen sowie analgetischen Wirkungen und kardiovaskulären Nebenwirkungen von Ketamin-Razemat versus S-(+)-Ketamin in subanästhetischer Dosierung. In: Anaesthesist 42 (1994). S. 68-75.

Puu, G.; Koch, M. und E. Artursson: Ketamine enantiomers and acetylcholinesterase. In: J Biochem 41 (1991). S. 2043-2045.

Quayle, J. M.; Standen, N. B. und P. R. Stanfield: The voltage-dependent block of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle by caesium and barium ions. In: J Physiol 405 (1988). S. 677-697.

Ralston, H. J. und D. D. Ralston: The distribution of dorsal root axons to laminae IV, V and VI of the Macaque spinal cord: a quantitative electron microscopic study. J Comp Neurol 212 (1982). S. 435-448.

Rethelyi, M.: Preterminal and terminal axon arborizations in the substantia gelatinosa of cat´s spinal cord. In: J Comp Neurol 172 (1977). S. 511-521.

Rexed, B.: The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. In: J Comp Neurol 96 (1952). S. 415-495.

Rexed, B.: A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. In: J Comp Neurol 100 (1954). S. 297-397.

Rodriguez-Paz, J. M.; Anantharam, V. und S. N. Treistman: Block of the N-methyl-D-aspartate receptor by phencyclidine-like drugs is infuenced by alternative splicing. In: Neurosci Lett 190 (1995). S. 147-150.

Rothman, S.: Noncompetitive N-Methyl-D-Aspartate Antagonist Affect Multiple Ionic Currents. In: J Pharmacol Exp Ther 246 (1988). S. 137-142.

Ryder, S.; Way W. L. und A. J. Trevor: Comparative pharmacology of the optical isomers of ketamine in mice. In: Eur J Pharmacol 49 (1978). S. 15-23.

Safronov, B. V. und W. Vogel: Single voltage-activated Na^+ and K^+ channels in the somata of rat motoneurones. In: J Physiol 487 (1995). S. 91-106.

Safronov, B. V.; Wolff, M. und W. Vogel: Functional distribution of three types of Na^+ channel on soma and processes of dorsal horn neurones of rat spinal cord. In: J Physiol. 503 (1997). S. 371-385.

Safronov, B. V.; Wolff, M. und W. Vogel: Axonal expression of sodium channels in rat spinal neurones during postnatal development. In: J Physiol 514 (1999). S. 729-734.

Samaryutel, J.; Kolesnikov, J.; Nikolajev, G. und K. Zilmer: Suppression of neuroendocrine stress reaction in oncologic surgery with epidural ketamine and morphine. In: Beiträge zur Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Band 17. Wien (1986).

Schwarz, J. R. und W. Vogel: Potassium inactivation in single myelinated nerve fibres of Xenopus laevis. In: Pflügers Arch. 330 (1971). S. 61-73.

Schwarz, W.; Palade, P. T. und B. Hille: Local anesthetics: effects of pH on use-dependent block of sodium channels in frog muscle. In: Biophys J 20 (1977). S. 343-368.

Smith, D. J.; Azzaro, A. J.; Zaldivar, S. B.; Palmer, S. und H. S. Lee: Properties of the optical isomers and metabolites of ketamine on the high affinity transport and katabolism of monoamines. In: Neuropharmacology 20 (1981). S. 391-396.

Strichartz, G. R.: Handbook of Experimental Pharmacology: Local Anesthetics. Berlin (1987).

Strichartz, G. R.; Sanchez, V.; Arthur, R.; Chafetz, R. und D. Martin: Fundamental properties of local anaesthetics: II. Measured octanol: Buffer partition coefficients and pK_a values of clinically used drugs. In: Anesthesia and Analgesia 71 (1990). S. 158-70.

Sugiura, Y.; Lee C. L. und E. R. Perl: Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. In: Science 234 (1986). S. 358-361.

Takahashi, T.: Membrane currents in visually identified motoneurones of neonatal rat spinal cord. In: J Physiol 423 (1990). S. 27-46.

Tasaki, I. und S. Hagiwara.: Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. In: J Gen Physiol 40 (1957). S. 859-885.

Thomson, A. M.; West, D. C. und P. M. Headley: Membrane characteristics and synaptic responsiveness of superficial dorsal horn neurons in a slice preparation of adult rat spinal cord. In: Eur J Neurosci 1 (1989). S. 479-488.

Vincent, J. P.; Kartalowski, B.; Geneste, P.; Kamenka, J. M. und M. Lazdunski: Interaction of phencyclidine („angel dust“) with specific receptor in rat brain membranes. In: Proc Natl Acad Sci USA 76 (1979). S. 4678-4682.

Wagner, L. E.; Gingrich, K. J.; Kulli, J. C. and J. Yang: Ketamine blockade of voltage-gated sodium-channels. In: Anesthesiology 95 (2001). S. 1406-1413.

Wann, K. T.: Neuronal sodium and potassium channels: Structure and function. In: Br J Anaesth 71 (1993). S. 2-14.

Wolff, M.; Vogel, W. und B. V. Safronov: Uneven distribution of K^+ channels in soma, axon and dendrites of rat spinal neurones: functional role of the soma in generation of action potentials. In: J Physiol 509 (1998). S. 767-776.

Wolff, M.: Grundlagen der Erregbarkeit spinaler Hinterhornneurone. In: Dissertation, Universität Gießen (1999). S. 14.

Yamamura, T.; Harada, K.; Okamura, A. und O. Kemmotsu: Is the site of ketamine anesthesia the N-methyl-D-aspartate receptor. In: Anesthesiology 72 (1990). S. 704-710.

Zhou, Z.-S. and Z.-Q. Zhao: Ketamine blockage of both tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels of rat dorsal root ganglion neurons. In: Brain Research Bulletin 52 (2000), S. 427-433.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Anatomischer Aufbau des Hinterhorns 5
Abb. 2 Schematischer Überblick über den Verlauf aszendierender und deszendierender modulierender Bahnen 6
Abb. 3 Schematische Darstellung der Stereoisomere 10
Abb. 4 Schaltbild einer Voltage-Clamp-Versuchsanordnung 13
Abb. 5 Messkonfiguration der Patch-Clamp-Technik 16
Abb. 6 Methode der Soma-Isolierung 21
Abb. 7 Schematische Übersicht über die Experimentierkammer 27
Abb. 8 Blockade der Natrium-Ströme im Rückenmarksschnitt 31
Abb. 9 Tonische Blockade der Natrium-Ströme durch Ketamin Razemat 32
Abb. 10 Ketaminblockade des Natrium-Stroms durch Kalibrierungen, repetetive Reizung 33
Abb. 11 Beeinflussung von Natrium-Strömen am isolierten Soma 36
Abb. 12 Wirkung der Ketaminenantiomere am Natrium-Kanal 38
Abb. 13 Wirkungsunterschiede von TTX, Lidocain und Ketamin 39
Abb. 14 Untersuchung der Bindungsstelle von Ketamin 39
Abb. 15 Trennung spannungsabhängiger Kalium-Ströme 43
Abb. 16 Blockade des K_{DR}-Kanals durch Ketamin Razemat 44
Abb. 17 Wirkung von Ketamin Razemat auf K_A-Kanäle 45
Abb. 18 Blockade der K_{DR}-Kanäle am isolierten Soma 46
Abb. 19 Wirkung der Ketaminenantiomere am K_{DR}-Kanal 47
Abb. 20 Blockade des K_A-Kanals durch Ketamin Razemat und seine Enantiomere 48
Abb. 21 Statistische Darstellung der Ketaminwirkung am K_A-Kanal 49
Abb. 22 Wirkung von Ketamin Razemat auf einzelne Aktionspotenziale 52
Abb. 23 Effekt von Ketamin Razemat auf Aktionspotenzialserien 53

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1 Physikalische und chemische Charakteristika von Ketamin 9
Tab.2 Verwendete Innenlösungen 22
Tab.3 Verwendete Aussenlösungen 23
Tab.4 Blockade der Natrium-Ströme mit Ketamin am isolierten Soma 37
Tab.5 Blockade von K_{DR}-Kanälen und K_A-Kanälen mit Ketamin am isolierten Soma 47
Tab.6 Effekte von Ketamin auf einzelne Aktionspotenziale und Aktionspotenzialserien 53

9.4 Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1 7
Gleichung 2 15
Gleichung 3 15
Gleichung 4 15
Gleichung 5 29
Gleichung 6 34
Gleichung 7 35
Gleichung 8 35
Gleichung 9 41

Zusammenfassung

Das Pharmakon Ketamin und seine Enantiomere R-(-) und S-(+) wurden auf ihre Wirksamkeit an Ionenkanälen der Hinterhornneurone mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik geprüft. Die verwendeten Neurone stammten von Rückenmarksquerschnitten junger Ratten (drei bis neun Tage alt), die eine Schnittdicke von 200 µm besaßen. Mit Hilfe von Whole-Cell-Ableitungen im Gewebeschnitt und der Methode der Soma-Isolierung wurden die Experimente durchgeführt. Die untersuchten Ionenkanäle waren der Natrium-Kanal, der verzögert aktivierende und der schnell inaktivierende Kalium-Kanal. An allen hat Ketamin die Eigenschaft einer reversiblen Blockade gezeigt.

Die typische lokalanästhetische Eigenschaft der Natrium-Kanal-Blockade hat eine halbmaximale Blockierungskonzentration von 165 ± 23 µmol/l (n = 8) durch Razemat, von 126 ± 14 µmol/l (n = 7) durch S-(+)-Ketamin und von 245 ± 24 µmol/l (n = 7) durch R-(-)-Ketamin ergeben. Untersuchungen mit Ketamin Razemat zeigten neben einer tonischen auch eine phasische (use-dependent) Blockade der Natrium-Kanäle. Statistische Auswertungen ergaben, dass die Wirkung von S-(+)-Ketamin signifikant potenter war als die von R-(-)-Ketamin und Ketamin Razemat. Die auch am Natrium-Kanal durchgeführten Verdrängungsexperimente mit Ketamin Razemat und Lidocain wiesen auf unterschiedliche Bindungsstellen oder Wirkmechanismen hin. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Aktivierungsverhalten der Natrium-Kanäle sich durch Ketamin Razemat kaum veränderte, wohingegen eine leichte Verschiebung der Inaktivierungskurve zu hyperpolarisierenden Potenzialen zu bemerken war. Auch eine selektive Blockade der Natrium-Stromkomponenten wurde nicht festgestellt.

Die experimentell herausgefundenen, halbmaximalen Blockierungskonzentrationen für den K_A-Kanal betrugen 497 ± 70 µmol/l (n = 6) für das Razemat, 1350 ± 63 µmol/l (n = 5) für das S-(+)-Ketamin und 447 ± 63 µmol/l (n = 6) für das R-(-)-Ketamin. Das R-(-)-Ketamin besaß hierbei die stärkste Wirkung auf diesen Kanal. Im Gegensatz hierzu ergaben sich am K_{DR}-Kanal eine IC_{50} von 183 ± 27 µmol/l (n = 7) durch Razemat, von 200 ± 25 µmol/l (n = 7) durch S-(+)-Ketamin und von 144 ± 24 µmol/l (n = 8) durch R-(-)-Ketamin. An dieser Stelle wurde keine spezifische stereoselektive Wirkung festgestellt.

Auch die Generierung von Aktionspotenzialen und Aktionspotenzialserien kann durch Ketamin beeinflusst werden. Bereits die Ketamindosis von 100 µmol/l führt zu einer Reduktion der Aktionspotenzialdauer und –frequenz. Dabei spielen die Blockade des Natrium- und K_{DR}-Kanals eine bedeutende Rolle.

Zwar hat die vorliegende Dissertation gezeigt, dass die untersuchten spannungsgesteuerten Ionenkanäle erst in Konzentrationen gehemmt werden, die deutlich höher als die zur Narkose notwendigen Plasmakonzentrationen liegen. Eine klinische Relevanz könnte dennoch in der lokalanästhetischen Wirkung von Ketamin und seinen Enantiomeren an den spinalen Hinterhornneuronen liegen. Schließlich werden bei der rückenmarksnahen Anästhesie Konzentrationen von Ketamin erreicht, die den halbmaximalen Blockierungskonzentrationen in den Untersuchungen dieser Dissertation entsprechen. Deshalb wäre es möglich, dass dieser lokalanästhetische Effekt einen bedeutsamen Anteil an der analgetischen Wirkung von Ketamin aufweist. Denn in der Weiterleitung und Verarbeitung sensorischer Informationen auf Rückenmarksebene und zum Gehirn spielen diese Neurone eine entscheidende Rolle.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mir den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburt:	3.1.1977 in Gießen
Eltern:	Prof. Dr. Volker Ehehalt, Arzt
	Gretl Ehehalt, geb. Schatty, Hausfrau
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch

Schulzeit

8/1983-7/1987	Erich Kästner-Schule Lich
8/1987-7/1993	Dietrich-Bonhoeffer-Schule Lich
8/1993-6/1996	Liebigschule Gießen
6/1996	Abitur

Studium

10/1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin,
	Justus-Liebig-Universität Gießen
8/1998	Physikum
8/1999	Erstes Staatsexamen
8/2001	Zweites Staatsexamen
11/2002	Drittes Staatsexamen

Wetzlar, 14.11.2002

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bedanken bei

meinem Doktorvater
Prof. Dr. rer. nat. Werner Vogel
für die Aufnahme als Doktorandin und für die fachliche Beratung und Unterstützung während der Erarbeitung meiner Ergebnisse

PD Dr.med./ Dr. Univ. Debrecen Andrea Olschewski
für die Einführung in die elektrophysiologische Wissenschaft und ständige, unermüdliche Betreuung meiner experimentellen Arbeit

den Mitarbeitern der
Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Werner Vogels,
besonders Dr. med. Matthias Wolff, für seine Beratungen und Unterstützungen

Brigitte Agari, Elke Sturmfels und Otto Becker
für ihren angenehmen Beistand im Labor und ihre Hilfe bei technischen Problemen

meinem Mann Dr. phil. Marcus Schnöbel
für sein stetes Interesse und seine andauernde Hilfsbereitschaft

meiner Familie
für die Ermöglichung meines Werdegangs und die tatkräftiger Unterstützung während meiner Doktorarbeit