

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. B. Pannen

**Mechanismen der Toxizität von Ketamin und Midazolam
an Lymphom- und Neuroblastomzellen des Menschen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Nina Gaza

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. med. J. Windolf
Dekan

Referent: PD Dr. med. M. F. Stevens, DEAA

Korreferent: PD Dr. med. M. Jäger

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	6
1.1.	Einleitung	6
1.1.1.	Die Anästhetika Ketamin und Midazolam	6
1.1.2.	Signalwege der Apoptose	8
1.1.3.	Bedeutung des NMDA- und GABA _A -Rezeptors für die Neurotoxizität von Ketamin und Midazolam	11
1.2.	Fragestellung	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Material	14
2.1.1.	Reagenzien	14
2.1.2.	Zelllinien	16
2.1.3.	Geräte	16
2.1.4.	Software	17
2.2.	Methoden	17
2.2.1	Zellkulturen	17
2.2.2.	Bestimmung der Zellvitalität und –dichte	19
2.2.3.	Durchflußzytometrie	19
2.2.3.1.	Nachweis von Frühapoptose durch AnnexinV / 7AAD	19
2.2.3.2.	Nachweis von Caspase-3 Aktivität	20
2.2.4.	Spektralphotometrie	21
2.2.4.1.	Nachweis metabolischer Aktivität in Mitochondrien durch XTT	21
2.2.5.	Western Blot	21
2.2.6.	Statistik	22

3.	Ergebnisse	23
3.1.	Konzentrationsabhängiger Effekt von Ketamin und Midazolam auf T-Lymphomzellen	23
3.1.1.	Racemat und Stereoisomer des Ketamin	25
3.1.2.	Wirkung des Rezeptor-Antagonisten Flumazenil	26
3.2.	Untersuchung der Signalwege der Apoptose	27
3.3	Untersuchungen an neuronalen Zellen	30
3.3.1.	Nachweis des NMDA-Rezeptors bei SHEP Zellen	30
3.3.2.	Konzentrationsabhängige Effekte auf neuronale Zellen	30
3.3.3.	Aktivierung von Caspase-3	33
3.3.4.	Pancaspase-Inhibitor (Q-VD)	35
3.3.5.	Racemat und Stereoisomer des Ketamins	37
3.3.6.	Wirkung des Rezeptor-Antagonisten Flumazenil	38
3.3.7.	Langzeitbehandlung	39
3.3.8.	Benzethonium	40
4.	Diskussion	43
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Danksagung	59
8.	Lebenslauf	60

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

1.1.1. Die Anästhetika Ketamin und Midazolam

Ketamin und Midazolam werden in der Anästhesie systemisch zur Sedierung und Anästhesie appliziert. Beide Substanzen werden auch rückenmarksnah in der akuten und chronischen Schmerztherapie eingesetzt.¹⁻⁴ Sie werden dabei meist mit Lokalanästhetika oder Opioiden kombiniert. Allerdings gibt es Hinweise, dass Ketamin und Midazolam intrathekal zyto- bzw. neurotoxisch wirken.⁵⁻⁸ In der vorliegenden Untersuchung wurde daher evaluiert, ob diese Substanzen *in vitro* tatsächlich zyto- und neurotoxische Eigenschaften besitzen und welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist. Es wurde zunächst untersucht, ob die Substanzen konzentrationsabhängig Zelltod induzieren und ob es sich dabei um Apoptose handelt. Weiterhin wurden der Signalweg der Apoptose und die Rolle der spezifischen Rezeptoren für die Toxizität von Ketamin und Midazolam untersucht.

Ketamin ist ein chirales Cyclohexanderivat und chemisch mit dem Phencyclidin verwandt. Seine analgetische und anästhetische Wirkung wird über den NMDA-Rezeptor vermittelt. Sowohl epidural als auch intrathekal wird Ketamin zur Behandlung von postoperativen, chronischen und neuropathischen Schmerzen eingesetzt.^{1,2} Trotz viel versprechenden klinischen Erfahrungen besteht jedoch der begründete Verdacht, dass Ketamin lokal zyto- bzw. neurotoxisch wirkt. *In vitro* induzieren S-Ketamin und andere NMDA-Antagonisten bei intrathekaler Gabe über Tage und Wochen Neurotoxizität.⁵⁻⁷ In Tiermodellen und an Patienten konnten nach intrathekaler Gabe von Ketamin Läsionen der grauen und weißen Substanz nachgewiesen werden. Histologisch fanden sich nach Langzeitbehandlung mit konservierungsmittelfreiem Ketamin Zeichen der Chromatolyse.^{7,9} Erstaunlicherweise zeigten sich weder bei Tieren noch bei Patienten neurologische Ausfälle. Die Chromatolyse wiederum ist ein mögliches Spätzeichen der Apoptose. Der genaue Mechanismus der lokalen Toxizität von Ketamin ist allerdings bisher unbekannt. Dennoch wird Ketamin weiterhin zur epiduralen und intrathekalen Applikation in der akuten und chronischen Schmerztherapie empfohlen.^{10,11}

In den letzten Jahren konnten für systemisch appliziertes Ketamin sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Wirkungen gezeigt werden. Zum einen wirkt Ketamin als NMDA-Antagonist neuroprotektiv in verschiedenen tierexperimentellen Modellen für cerebrale Ischämie-Hypoxie und traumatische Hirnschädigung.¹² Andererseits wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Ketamin in Gehirnen neugeborener und erwachsener Tiere Apoptose induzieren kann.^{13,14}

Es besteht zudem der Verdacht, dass ein Teil der neurotoxischen Wirkung des klinisch verwendeten KetanestS® durch die beigefügten Konservierungsmittel Benzethoniumchlorid oder Chlorbutanol verursacht wird.^{15,16} So konnte gezeigt werden, dass Kaninchen, denen Ketamin mit Chlorbutanol oder nur Chlorbutanol appliziert wurde, neurologische Schäden aufwiesen im Gegensatz zu Tieren, die Ketamin ohne Konservierungsmittel erhielten.¹⁵ Ein weiterer Versuch an Schweinen zeigte keinerlei neurologische Schäden nach Gabe von Ketamin, wohingegen der Zusatz von Benzethoniumchlorid zu leichten neurotoxischen Effekten führte.¹⁶ Erstaunlicherweise erzeugte dabei Benzethoniumchlorid alleine sogar einen stärkeren Gewebeschaden als in Kombination mit Ketamin. Weiterhin induziert Benzethoniumchlorid Apoptose in verschiedensten menschlichen epithelialen Tumorzellen sowie embryonalen Fibroblasten und wurde als potentielles Chemotherapeutikum in der Onkologie beschrieben.¹⁷

Midazolam ist ein häufig systemisch in der Anästhesie eingesetztes Benzodiazepin, das seine sedierende und anxiolytische Wirkung über den GABA_A-Rezeptor entfaltet. Während es in der Anästhesie häufig zur präoperativen Anxiolyse eingesetzt wird, wird es in der Intensivmedizin hauptsächlich zur Sedierung genutzt. Wie Ketamin wird es ebenfalls perioperativ rückenmarksnah verwendet.^{3,4} Neben der analgetischen bzw. co-analgetischen Wirkung trägt es zur Verminderung von postoperativer Übelkeit und Erbrechen bei.⁴ Trotz der guten klinischen Erfahrung wird auch beim Midazolam eine mögliche lokale zyto- bzw. neurotoxische Wirkung diskutiert. Es konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass Midazolam nach einmaliger intrathekaler Gabe innerhalb von Tagen Neurotoxizität induziert. So kam es nach intrathekaler Gabe von Midazolam zur Schädigung von Myelin und Neuronen innerhalb des Rückenmarks.⁸ Auch hier ist der Mechanismus der lokalen Neurotoxizität unbekannt.

Ähnlich wie Ketamin induziert auch Midazolam bei neugeborenen Tieren Apoptose im zentralen Nervensystem.^{13,18} Es existieren vielfach Studien an Tiermodellen in denen die Unterdrückung neuronaler Aktivität durch dauerhafte Blockade von NMDA-Rezeptoren oder Überaktivierung von inhibitorischen GABA_A-Rezeptoren zu Apoptose neuronaler Zellen führt.²⁰ Diese Schädigungen sind nicht nur morphologisch nachweisbar, sondern führen auch zu langfristig irreversiblen Lerndefiziten, die mit dem Alkoholembryopathie-Syndrom vergleichbar sind.^{21,22} Neuere Studien zeigen sogar eine Potenzierung des neuronalen Zelltodes durch kombinierte Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten und GABA_A-Rezeptor-Agonisten bei neugeborenen Tieren, die zu funktionellen Defiziten im Erwachsenenalter führen.¹⁸

1.1.2. Signalwege der Apoptose

Die Apoptose ist eine spezielle Form des programmierten Zelltodes, der als physiologischer Prozess von zentraler Bedeutung ist. Während der Embryogenese ist die Apoptose an Differenzierungsvorgängen beteiligt und auch im adulten Organismus spielt sie eine wichtige Rolle. Hier dient die Apoptose der Kontrolle der Zellzahl in Geweben, der Regulation von Immunfunktion, der Selektion von Keimzellen und der Elimination entarteter Zellen. Auch bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen ist übermäßige Apoptose der wesentliche Pathomechanismus.

Apoptose kann von extrazellulär, unter anderem durch Immunzellen oder auch aufgrund zellinterner Prozesse initiiert werden. Die Apoptose wird von der betreffenden Zelle selber aktiv initiiert und ist deshalb im Gegensatz zur Nekrose ein Energie verbrauchender Prozess. Sie sorgt für die Elimination genetisch defekter oder gealterter Zellen sowie autoreaktiver Lymphozyten. Es wird gewährleistet, dass die betreffenden Zellen ohne Schädigung des umgebenden Gewebes zugrunde gehen. Im Gegensatz dazu wird bei der Nekrose durch Anschwellen der Zelle die Plasmamembran zerstört und es kommt zu lokalen Entzündungsreaktionen.

Die Einleitung der Apoptose wird maßgeblich durch Caspasen kontrolliert, eine Familie von Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen. Diese fungieren als Initiatoren und Exekutoren der Apoptose und werden durch zwei Hauptsignalwege aktiviert, den extrinsischen oder Todesrezeptor-Signalweg und den intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg.^{23,24}

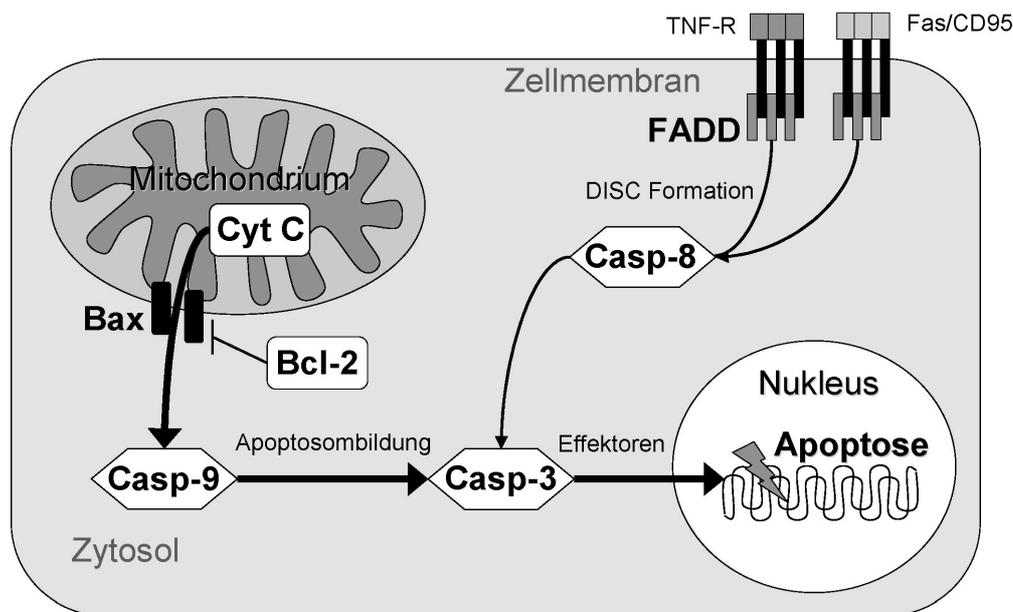


Abb. 1: Die Signalwege der Apoptose. Beim intrinsische Signalweg der Apoptose (linker Bildteil) kommt es zum Einbau von Bax-Kanälen (Bax = Bcl-2 assoziiertes X Protein) in die äußere Mitochondrienmembran. Dies wird durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) inhibiert. Durch die Bax-Kanälen in der kommt es zur Freisetzung Apoptose-induzierender Mediatoren (z. B. Cytochrom C = Cyt C). Diese Substanzen aktivieren die Initiatorcaspase 9 (Casp-9), welche zusammen mit anderen Faktoren das Apoptosom bildet. Das Apoptosom wiederum aktiviert die Effektorcaspase 3 (Casp-3). Der extrinsische Signalweg (rechter Bildteil) beginnt mit der Aktivierung von Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie (TNF-R) in der Zellmembran (z.B. Fas = Fibroblast assoziiertes Protein). Intrazellulär wird das FADD-Protein (Fas-assoziiertes Protein mit death domain) zur Bildung des „death-inducing signaling complex“ (DISC) benötigt, der die Initiatorcaspase 8 (Casp-8) des extrinsischen Signalwegs aktiviert. Die aktivierte Caspase 8 führt wiederum zur Aktivierung der Effektorcaspasen wie Caspase 3 und mündet mit dem intrinsischen Weg in einer gemeinsamen Signalkaskade, die letztendlich zur Apoptose-typischen morphologischen Zellveränderungen und spezifischer DNA-Fragmentierung führt. (Werdehausen R: Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von Signalwegen der Apoptose im Rahmen der Neurotoxizität von Lidocain)

Die Initiatorcaspase 8 ist der wichtigste Mediator des extrinsischen Signalweges (Abb. 1).^{25,26} Dieser wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie. Liganden sind unter anderem der Tumornekrosefaktor (TNF) und Zytokine, die von T-Lymphozyten sezerniert werden. In einem ersten Schritt wird

das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ rekrutiert. Hieran bindet in Folge das „Fas-associated proteins with death domain“ (FADD) und über dieses die Procaspase 8. Durch die Bildung des sogenannten Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (death-inducing signaling complex, DISC) wird die Caspase 8 aktiviert und löst ihrerseits eine Kaskade von Caspaseaktivierungen aus. Durch die Aktivierung der Effektorcaspasen Caspase 3, 6 und 7 kommt es im weiteren Verlauf zum apoptotischen Zelltod und zur Schrumpfung der Zelle sowie zur Kernfragmentation. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt hierbei die Zellmembran intakt.

Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird im Gegensatz dazu durch verschiedene Formen von zellulärem Stress reguliert zum Beispiel durch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, wie Cytochrom C aus den Mitochondrien.²⁷⁻²⁹ Die Freisetzung von Cytochrom C wird kontrolliert durch Proteine der B-Zell Lymphoma-2 (Bcl-2) Protein Familie, welche die mitochondriale Permeabilität und damit die Freisetzung apoptose-induzierender Faktoren aus den Mitochondrien kontrollieren.^{30,31} Das ebenfalls zu dieser Familie gehörende Protein Bax bildet Poren in der äußeren Mitochondrienmembran über die Cytochrom C und andere proapoptotische Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma gelangen.³² Im Zytosol induziert Cytochrom C gemeinsam mit der zentralen Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalweges (Caspase 9) das sogenannte Apoptosom. Dieses aktiviert die bereits oben beschriebene Kaskade von Effektorcaspasen und damit den Ablauf der Apoptose.

1.1.3. Bedeutung des NMDA- und GABA_A-Rezeptors für die Neurotoxizität von Ketamin und Midazolam

Die Stimulation des NMDA- bzw. des GABA_A-Rezeptors kann sowohl zu Apoptose führen, als auch vor Apoptose schützen.

Die Überstimulation des NMDA-Rezeptors (NMDAR), auch Exzitotoxizität genannt, kann zu neurodegenerativen Erkrankungen führen und ist der wesentliche Mechanismus sekundärer neuronaler Schäden nach ischämischen und traumatischen Hirnschäden. Hierfür verantwortlich ist zunächst der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration.³³ Die Erhöhung des Calciums wiederum kann zur Bildung von Sauerstoffradikalen, zur Ausschüttung von Cytochrom C und Caspase-3-Aktivierung führen.^{34,35} Dementsprechend konnten einige Studien einen antiapoptotischen Effekt von NMDA-Antagonisten zeigen. So kann die Apoptoserate

nach traumatischem Hirnschaden bei Ratten durch Gabe des spezifischen NMDA-Antagonisten MK-801 gesenkt werden.³⁶ Auch beim Menschen kann Ketamin in bestimmten Situationen neurologische Schäden begrenzen. So vermindert die perioperative Gabe von Ketamin das Ausmaß des postoperativen neurologischen Defizits nach Herzoperationen.¹²

Auf der anderen Seite existieren viele Studien über die Neurotoxizität von Ketamin und anderen NMDA-Antagonisten an neugeborenen und adulten Nagern.^{13,18-22} So untersuchten Jevtovic-Todorovic et al. die Wirkung von NMDAR-Antagonisten und anderen üblichen Anästhetika an neugeborenen Ratten. Es kam zu ausgedehnter apoptotischer Neurodegeneration, Defiziten der synaptischen Funktion im Hippocampus sowie irreversiblen Gedächtnis- und Lernstörungen.²¹ Die Neuroapoptose durch Anästhetika wurde hierbei altersabhängig sowohl über den mitochondrialen als auch über den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg ausgelöst.³⁷

Hardingham diskutiert den neuroprotektiven gegen den neurodestruktiven Effekt von NMDA-Antagonisten und kommt zu dem Schluss, dass sowohl eine Überstimulation, als auch eine komplette Hemmung der Rezeptorwirkung zu neuronalen Schäden führen kann.³⁸ In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe des NMDA-Agonisten Glutamat unabhängig von Caspasen zur Aktivierung der Apoptose führt, es wurden Apoptose-Induzierende Faktoren (AIF) direkt aktiviert.³⁹

Die Ergebnisse zeigen also, dass über den NMDAR sowohl bei Überstimulation als auch bei Blockierung Apoptose induziert wird, wobei die genauen Mechanismen noch nicht eindeutig geklärt sind.

Wie bei den durch den NMDAR vermittelten Effekten auf neuronale Strukturen wird auch beim GABA_AR eine neuroprotektive und eine neurotoxische Wirkung diskutiert. Auf der einen Seite existieren Studien über Neuroprotektion durch GABA_AR-Agonisten.^{40,41} So zeigten Tuttolomondo et al., dass Baclofen und Muscimol Neuronen vor Zelltod durch Ischämie und Reperfusion schützen.⁴⁰ Volatile Anästhetika wie beispielsweise Isofluran entfalten ihre anästhetische Wirkung über den GABA_AR.⁴² Isofluran kann bei Ratten das Ausmaß einer cerebralen Ischämie erheblich reduzieren und das funktionelle Ergebnis verbessern.⁴³ Viele andere Arbeiten beschreiben die neuroapoptotische Wirkung von GABA_AR-Agonisten an neugeborenen Nagetieren.¹⁸⁻²¹ So konnten Ikonomidou et al. in Gehirnen

neugeborener Ratten Neurodegeneration durch Apoptose nach Gabe verschiedener GABA_AR-Agonisten nachweisen.²⁰ Auch hier wird die Neuroapoptose in der empfindlichen Phase der Synaptogenese sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Weg verursacht.³⁷ Eine aktuelle Arbeit beschreibt nun an primären kortikalen Neuronen einen GABA_AR-getriggerten neuroprotektiven Effekt von Propofol, einem anderen GABA_AR-Agonisten sowie eine zeitabhängige, aber Rezeptor-unabhängige Neurodegeneration durch diese Substanz.⁴⁴

Damit können neurotoxische Wirkungen von Midazolam sowohl GABA_AR-Rezeptor-abhängig als auch rezeptorunabhängig verursacht werden. In der vorliegenden Untersuchung sollten die Mechanismen der lokalen Neurotoxizität von Midazolam geklärt werden.

1.2. Fragestellung

Konkret wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Induzieren Ketamin und Midazolam Apoptose an neuronalen und nicht neuronalen Zellen des Menschen?
- Sind die Effekte konzentrations- bzw. zeitabhängig?
- Wird die von Ketamin und Midazolam induzierte Apoptose über den mitochondrialen oder den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg induziert?
- Können Caspase-Inhibitoren die Neurotoxizität von Ketamin und Midazolam abschwächen bzw. aufheben?
- Welche Rolle spielt der NMDA-Rezeptor für die Neurotoxizität von Ketamin?
Ist die Toxizität stereospezifisch?
- Kann die Neurotoxizität von Midazolam durch den Rezeptorantagonisten Flumazenil reduziert oder aufgehoben werden?
- Kann das klinisch zusammen mit Ketamin verwendete Konservierungsmittel Benzethoniumchlorid dessen Toxizität verstärken?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Folgende Reagenzien und Hilfsmittel wurden verwendet und bei dem jeweils aufgeführten Hersteller erworben.

Ketamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
S-Ketamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
KetanestS®	Pfizer (Berlin)
Midazolam ratiopharm®	Ratiopharm (Ulm)
Anexate® (Flumazenil)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Benzethoniumchloride	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

- Chemikalien:

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Entwickler	Kodak (Stuttgart)
Fixierer	Kodak (Stuttgart)
Folins Reagenz	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Formaldehyd 35%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pancaspaseinhibitor (Q-VD)	Calbiochem (San Diego, USA)
N-(2-quinolyl)valylaspatyl-(2,6-difluorophenoxy)methylketon	
Phosphatebuffered Saline (PBS)	Gibco, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Rainbow-Marker	Amersham Biosciences (Freiburg)
Reagenz A (Proteinbestimmung) (Na ₂ CO ₃ ; 0,1M NaOH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Reagenz B (KNa-Tartrat; CuSO ₄ ; Aqua dest)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

SDS-PAGE Gel (PAA 30%; 1,5M Sigma 7-9, pH 8,8 (Trenngel); 1,25M Sigma 7-9, pH 6,8 (Sammelgel); Aqua dest; SDS 10%; Temed; APS 10%)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Staurosporin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TBS-T (Sigma 7-9; NaCl; Tween; Aqua dest; pH 8)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypanblau 0,2 % (Trypanblau ad PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Zweikomponenten-Chemilumineszenz-Reagenz (ECL)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H- tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

- Puffer

(Alle hier verwendeten Substanzen wurden bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erworben, wenn zuvor nicht anders erwähnt.)

Lysepuffer

(150mM NaCl; 50mM Tris-Hydrochlorid; 1% NP-40; 1µM Pepstatin; 0,1µM Phenylmethylsulphonylfluorid; 0,15µM Aprotinin; 1µM Leupeptin)

Annexin Binding Puffer

(10mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140mM NaCl; CaCl₂)

FACS Blockpuffer

(3% BSA; 0,05% Saponin in 1 x PBS)

FACS-Puffer

(2% BSA in 1 x PBS)

Running Buffer

(Sigma 7-9; Glycin, SDS; Aqua dest)

Transfer Buffer

(Sigma 7-9; Glycin, Methanol; Aqua dest)

SDS-Lade-Puffer

(SDS; Bromphenolblau; Mercaptomethanol)

- Farbstoffe und Antikörper:

Annexin-V -FITC	BD Biosciences (San Diego, USA)
Anti-Rabbit-AK (Merettichperoxidase gekoppelt)	Dianova (Hamburg)
Caspase-3-FITC	BD Biosciences (San Diego, USA)
Caspase-3-AK (Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NMDAR1-AK	Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
7-AAD (7-amino-actinomycin D)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

- Membran:

Immobilion-P	Millipore (Billerica, USA)
--------------	----------------------------

- Zellkulturmedien, -lösungen und Zusätze

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Sigma-Aldrich
versetzt mit: 10 % inaktiviertem fötalem	(St. Louis, USA)
Kälberserum (iFCS), 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Penicillin,	
50 µg/ml Streptomycin	
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG (Berlin)

2.1.2. Zelllinien

Jurkat T-Lymphomzellen

- Klon J16: Wildtypzellen und Bcl-2-überexprimierende Zellen wurden bereits 2000 beschrieben.⁴⁴
- Klon JMR: Caspase-9-defiziente Zellen wurden zuvor mehrfach charakterisiert.^{45,46}
- Klon A3: Wildtypzellen, Caspase-8- und FADD-defiziente Zellen wurde von Prof. Dr. John Blenis beschrieben und zur Verfügung gestellt.⁴⁷

SHEP-Neuroblastomzellen: Wildtypzellen wurden zuvor charakterisiert.^{48,49}

2.1.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Plate Reader <i>Victor</i> ²	Wallac bzw. PerkinElmer (Jügesheim)
Durchflußzytometer <i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson (Heidelberg)
Lichtmikroskop <i>Motic AE30</i>	Motic (Saarbrücken-Eschingen)

Sterilbank *Hera Safe*
 Zentrifuge *centrifuge 5810R*
 Brutschrank

Heraeus (Hanau)
 Eppendorf (Hamburg)
 Binder (Tuttlingen)

2.1.4. Software

FACS-Software: Cell-Quest-Pro
 Statistikprogramm: Statistik SPSS Ver. 12

BD Biosciences (San Diego, USA)
 SPSS Inc. (Chicago, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturen

Alle verwendeten nicht-adhärenenten T-Lymphomzellen und adhärenenten Neuroblastomzellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden auf eine Konzentration von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt und über Nacht inkubiert, um logarithmisches Wachstum zu ermöglichen.

Alle Zellen wurden entweder nur mit Medium als Negativkontrolle, mit Staurosporin als Positivkontrolle oder den jeweiligen Konzentrationen der Reagenzien über 24 h inkubiert (Tab. 1).

Bei Verwendung des Pancaspaseinhibitors Q-VD wurde dieser 60 min vor der eigentlichen Inkubation zugefügt.

Reagenz	Konzentration	Menge in 1ml	Stammlösung
Staurosporin	1,25 µM	0,5 µl	
	0,25 µM	10 µl	
	0,5 µM	20 µl	
	0,125 µM	5 µl	
Ketamin	1 mM	2 µl	0,5 M
	2 mM	4 µl	
	3 mM	6 µl	
	4 mM	8 µl	
	8 mM	16 µl	
	12 mM	24 µl	
S-Ketamin	0,5 mM	2,5 µl	0,2 M
	1 mM	5 µl	

	2 mM	10 μ l	
	3 mM	15 μ l	
	4 mM	20 μ l	
	5 mM	25 μ l	
	7 mM	35 μ l	
Midazolam	50 μ M	3,265	15,3 mM (0,5 %)
	75 μ M	4,88	
	100 μ M	6,52	
	150 μ M	9,78	
	200 μ M	13,04	
	300 μ M	19,56	
	400 μ M	26,08	
	500 μ M	32,6	
	700 μ M	45,64	
	800 μ M	52,16	
NMDA	0,4 mM	1,6 μ l	0,25 M
	1 mM	4 μ l	
	2 mM	8 μ l	
	4 mM	16 μ l	
	8 mM	32 μ l	
	12 mM	48 μ l	
	20 mM	80 μ l	
Flumazenil	1 μ M	3,03 μ l	3,3 M (0,01 %)
	10 μ M	30,33 μ l	
	20 μ M	60,66 μ l	
	30 μ M	90,9 μ l	
	60 μ M	181,8 μ l	
	10 μ M	2 μ l	5 mM
	100 μ M	20 μ l	
Benzethoniumchlorid	5 μ M	5 μ l	0,5 M (1:100 verdünnt)
Q-VD	20 μ M	20 μ l	

Tab. 1: Konzentrationen der Reagenzien

2.2.2. Bestimmung der Zellvitalität und -dichte

Trypanblau ist ein Farbstoff der avitale Zellen markiert.

Die mit Trypanblau versetzten Zellen können bei intaktem Stoffwechsel den Farbstoff aus der Zelle entfernen und erscheinen hell. Apoptotische oder nekrotische Zellen allerdings besitzen diese Fähigkeit nicht mehr und erscheinen blau gefärbt.

30 µl der Zellsuspension wurden mit 30 µl Trypanblau versetzt und nach 1-minütiger Inkubation in der Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt. Dazu wurden jeweils die 4 Eckquadrate eines Zählnetzes ausgezählt und die Lebendzellzahl errechnet:

$n = \text{Zellkonzentration} = \text{Zellzahl} / 4 * 2$ (Verdünnung mit Trypanblau 1:1)

2.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS (*fluorescence activated cell sorting*) wurde genutzt, um Zellen zu zählen und zu analysieren.

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen lassen sich mit diesem Verfahren auf bestimmte Eigenschaften untersuchen. Zur Analyse werden die suspendierten Zellen einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese zunächst auf ein höheres Energieniveau gehoben und geben diese Energie daraufhin in Form von Photonen wieder ab. Die emittierte Photonenkonzentration wird detektiert und verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper pro Zelle. Zusätzlich lassen sich durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität des Zytoplasmas gewinnen.

Es wurden je Probe 10.000 Zellen auf die beschriebene Weise untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software *CellQuest Pro*®.

2.2.3.1. Nachweis von Frühapoptose durch AnnexinV / 7AAD

Um den Anteil von früh- und spätapoptotischen Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen nach einer Färbung mit den Farbstoffen Annexin V und 7-AAD mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Annexin V bindet an Phosphatidylserine, deren Serin-Reste sich in der frühen Phase der Apoptose zunehmend von der Innenseite zur Außenseite der Zellmembran verlagern. Die Zellmembran ist in der frühen Phase der Apoptose noch intakt. In

späte Phasen der Apoptose wird die Membran permeabel, so dass auch innen liegende Phosphatidylserine markiert werden. Um diese spätapoptotische Phase von der frühen Phase zu unterscheiden, verwendet man einen zweiten Farbstoff 7-AAD, welches nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringt, Teile des Zellkerns anfärbt und somit sowohl spätapoptotische als auch nekrotische Zellen markiert.

Zur Durchführung der Färbung wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen nach Abschluss der Inkubation und zweimaligem Waschen mit kaltem PBS in 100 μ l Annexin-Binding-Puffer aufgenommen. Adhärenente SHEP Neuroblastomzellen wurden zunächst mit PBS gespült, dann mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 5 μ l Annexin V und 5 μ l 7-AAD (20 μ g/ml) lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 15 min gefärbt und unmittelbar danach mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen analysiert.

2.2.3.2. Nachweis von Caspase-3 Aktivität

Um Apoptose nachzuweisen, wurde bei neuronalen Zellen die Aktivierung der Effektorcaspase-3 untersucht. Diese gehört zu den wichtigsten Proteasen der Frühapoptose. Durch Eigen-Proteolyse oder Spaltung entsteht aus dem inaktiven Proenzym die aktivierte Caspase-3, die Untereinheiten mit 12 und 17 kDa enthält. Sie initiiert die Aktivierung weiterer Proteasen und führt schließlich zu der für die Apoptose typischen spezifischen Zerschneidung der DNA.

Der hier verwendete Caspase-3-FITC- Antikörper bindet spezifisch aktive Caspase-3 und weist so apoptotische Zelle in der Durchflusszytometrie nach.

Nach 24 h-Inkubation wurden je $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Probe entnommen und durch Behandlung mit 4 % Formaldehyd für 5 min bei 37 °C fixiert. Die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen und in 80 μ l FACS Blockpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 μ l Caspase-3-FITC zum Anfärben der Zellen, folgte eine einstündige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen, in 250 μ l FACS Puffer resuspendiert und unmittelbar durchflusszytometrisch analysiert. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen analysiert.

2.2.4. Spektralphotometrie

Die Photometrie ist ein Verfahren, bei dem mithilfe des sichtbaren Lichts Absorption und Farbe einer Flüssigkeit bestimmt werden und somit Rückschlüsse auf die stoffliche Zusammensetzung bzw. deren Konzentration möglich sind.

Eine Lösung wird mit monochromatischem Licht bestrahlt und das transmittierte Licht gemessen. Die Extinktion, auch Absorbanz genannt, ist ein Maß für die Abschwächung des transmittierten Lichtes. Der Anteil der durchgelassenen Strahlung wird als Transmissionsgrad bezeichnet. Die Extinktion ist der negativ dekadische Logarithmus des Transmissionsgrades. Durch die Messung der Extinktion bei einzelnen Wellenlängen kann man die Konzentrationen von bestimmten in Lösung befindlichen Stoffen messen.

Dieses Verfahren wurde genutzt um die Vitalität der neuronalen Zellen mithilfe eines Farbstoffes im Langzeitversuch nachzuweisen.

2.2.4.1. Nachweis metabolischer Aktivität in Mitochondrien durch XTT

XTT {2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]- 2H-tetrazolium hydroxide} ist eine Substanz, die bei metabolischer Aktivität von Zellen in das farbige Formazan umgewandelt wird. Dabei wird durch Dehydrogenasen der Atmungskette der Tetrazolium-Ring des XTT reduziert.

Wir verwendeten den XTT Assay zur Messung metabolischer Aktivität von Neuroblastomzellen nach einer Langzeitbehandlung mit Ketamin über 120 h. Dafür wurden SHEP-Zellen in einer Dichte von $0,05 \cdot 10^5$ Zellen über 120 h in je 200 μ l farblosem RPMI-Medium mit den jeweiligen Dosierungen von Ketamin inkubiert. Nach Zugabe von XTT-Lösung wurde weitere 90 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 450 nm bestimmt.

2.2.5. Western Blot

Der Westernblot dient der Aufspaltung von Proteinen in einem elektrostatischen Feld auf einer Trägermembran. Anschließend werden verschiedene Proteine mittels spezifischer Antikörper markiert.

Bei dieser Methode sollte die Aktivierung von Caspase-3 in SHEP Neuroblastomzellen nachgewiesen werden.

Die Proben für die durchgeführten Western Blot Analysen wurden mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einem Volumen von 10 ml vorbereitet. Die Inkubation erfolgte

mit Ketamin (2 mM; 4 mM; 8 mM), Midazolam (200 μ M; 400 μ M; 800 μ M) oder Staurosporin (0,05 μ M; 0,1 μ M) als Positivkontrolle. Die jeweiligen Medikamentenkonzentrationen ergaben sich dabei aus den vorangegangenen FACS-Analysen. Die Zellen wurden für 20 min mit Lysepuffer behandelt und die gewonnenen Lysate daraufhin bei 4 °C für 15 min bei 15.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe des Messverfahrens nach Lowry und einer BSA-Eichreihe wurden die Proteinkonzentrationen der Proben photometrisch bestimmt und anschließend durch Zugabe von Lysepuffer in allen Proben auf den gleichen Proteingehalt adjustiert. Es folgte eine 1:1 Verdünnung mit SDS-Ladepuffer. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben auf ein 12 %-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel (SDS-PAGE) aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Diese erfolgte in einer mit Running Buffer gefüllten Kammer bei konstanter Stromspannung von 100 V bis zum Erreichen einer Trennstrecke von 8 cm. Als Molekulargewichtsstandard diente der *Rainbow-Marker*. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferriert. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Transfer Buffer gefüllten Kammer mit einem Stromfluß von 220 mA über eine Stunde bei 4 °C. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit Blockpuffer (Dried skimmed milk; Aqua dest, PBS) über 2 h neutralisiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Caspase-3-Antikörper) für 12 h bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:10000. Nach 3-maligem 10-minütigen Waschen mit TBS-T wurde mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (Anti-Rabbit) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 min mit ECL-Reagenz behandelt und in einer Klarsichtfolie verpackt einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.6. Statistik

Die Effekte der verschiedenen Substanzen bzw. der verschiedenen Konzentrationen wurden zunächst mit dem Kruskal-Wallis-Test miteinander verglichen. Falls dieser sich als signifikant zeigte, wurden anschließend sinnvolle paarweise Vergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es wurde nicht für multiples Testen korrigiert. P-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Konzentrationsabhängiger Effekt von Ketamin und Midazolam auf T-Lymphomzellen

Die Zytotoxizität von Ketamin und Midazolam konnte zunächst durch Bestimmung der Anteil der noch lebenden Zellen mit Trypanblau nachgewiesen werden. Jurkat Wildtypzellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Medikamente inkubiert und dann die vitalen Zellen ausgezählt. Hierbei zeigte sich, dass Ketamin und Midazolam dosis-abhängig Zelltod induzierten, ebenso wie der als Chemotherapeutikum genutzte unspezifische Proteinkinaseinhibitor Staurosporin, welcher als Positivkontrolle diente. Nach der Behandlung mit Staurosporin 1,25 µM zeigten sich 16,1 % der Zellen vital. Der Anteil vitaler Zellen nach der Behandlung mit Ketamin nahm von 92,2 % bei 1 mM über 89,6 % bei 2 mM bis 46,5 % bei 3 mM zunehmend ab. Bezogen auf die Zahl vitaler Zellen der unbehandelten Kontrollen führte die Inkubation mit 3 mM Ketamin sogar zu einer Reduktion der vitalen Zellen auf 25 %. (Tab. 2) Nach Behandlung mit Midazolam konnte ebenfalls eine Abnahme der vitalen Zellen mit zunehmenden Konzentrationen beobachtet werden. 85,7 % vitale Zellen bei einer Midazolam-Konzentration von 75 µM sanken bei 100 µM auf 77,8 % und bei 150 µM auf 57,3 %. Auf die vitalen Zellen der Kontrolle bezogen bedeutete dies einen relativen Anteil vitaler Zellen von 22,9 % bei einer Midazolamkonzentration von 150 µM. (Tab. 2)

	absolut		relativ in %	
	Zellen insg.	vitale Zellen	vitale Zellen	bezogen auf vitale Zellen d. Kontrolle
1 Kontrolle (K)	240	230	95,8	
2 Staurosporin 1,25µM	124	20	16,1	8,3
3 Ketamin 1mM	167	154	92,2	64,2
4 2mM	125	112	89,6	46,7
5 3mM	129	60	46,5	25
6 Midazolam 75µM	154	132	85,7	55
7 100µM	135	105	77,8	43,8
8 150µM	96	55	57,3	22,9

Tab. 2: Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau. Der relative Anteil vitaler Zellen sinkt mit steigenden Medikamentenkonzentrationen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse sollte nun der genaue Mechanismus der Zytotoxizität der Narkotika untersucht werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten die Anteile früh- und spätapoptotischer Zellen nach Inkubation mit Ketamin oder Midazolam bestimmt werden. Die Behandlung von Jurkat-T-Lymphomzellen mit ansteigenden Konzentrationen von Ketamin oder Midazolam nach einer Inkubation von 24 h führte ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der avitalen Zellen. Mit Hilfe der Farbstoffe AnnexinV und 7AAD konnte zwischen frühapoptotischen (AnnexinV/7AAD +/-) und spätapoptotischen (AnnexinV/7AAD +/+) Zellen unterschieden werden.

Bei einer Konzentration von 1 mM Ketamin betrug der Anteil avitaler Zellen 11,4 %. Dieser war nach Behandlung mit 2 mM Ketamin mit 52,3 % deutlich höher. Bei 3 mM betrug dieser Anteil sogar 65,9 %. ($p < 0,05$; Abb. 2)

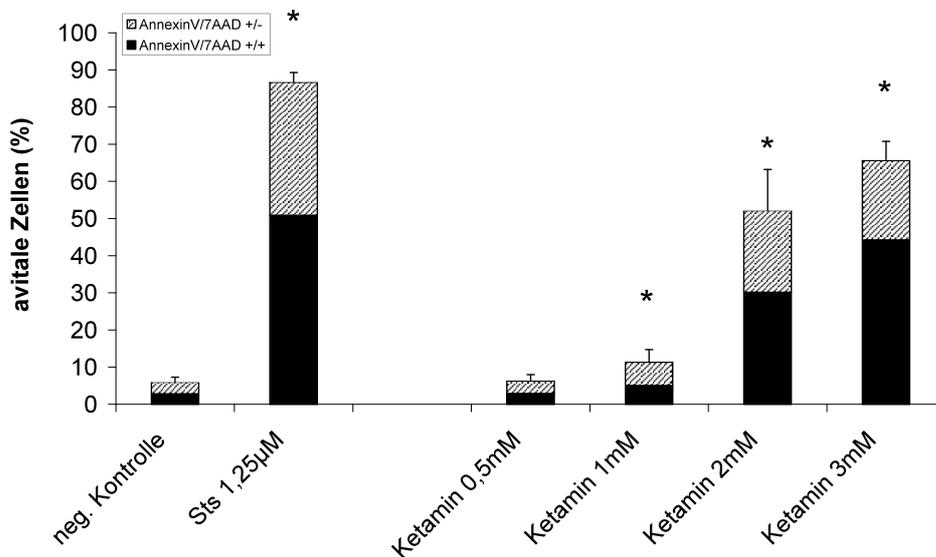


Abb. 2: Konzentrationsabhängiger Effekt von Ketamin auf Jurkat T-Lymphomzellen.

Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$), ($n=3$). Mit zunehmender Ketamin-Konzentration steigt die Apoptoserate.

Auch nach der Inkubation mit Midazolam konnte mit zunehmender Konzentration ein Anstieg der avitalen Zellen nachgewiesen werden. Von 12,5 % bei einer Konzentration von 50 μ M Midazolam stieg der Anteil avitaler Zellen von 55,7 % bei 100 μ M auf 69,5 % bei einer Konzentration von 150 μ M an. ($p < 0,05$; Abb. 3)

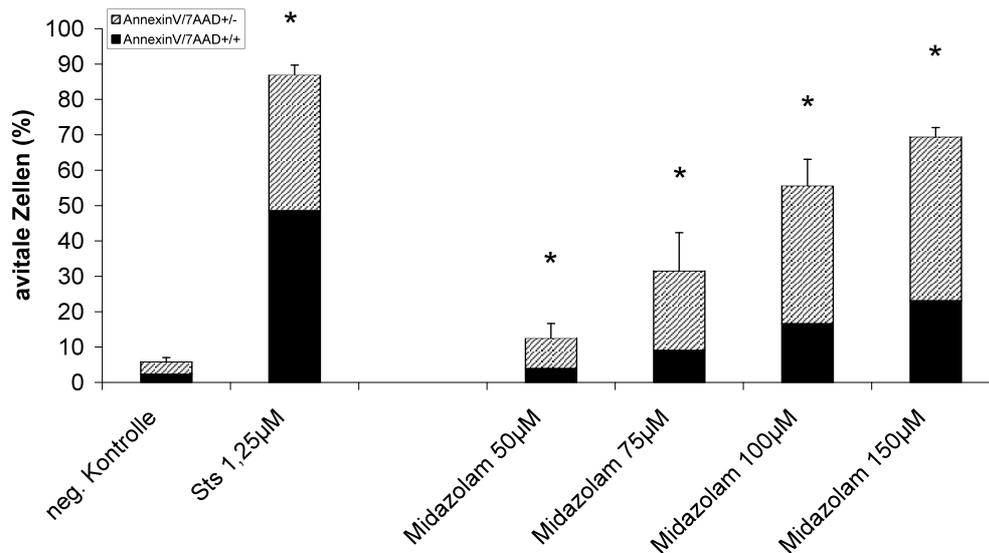


Abb. 3: Konzentrationsabhängiger Effekt von Midazolam auf Jurkat T-Lymphomzellen.

Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Die Apoptoserate steigt mit ansteigender Midazolam-Konzentration.

3.1.1. Racemat und Stereoisomer des Ketamin

Neben dem Racemat Ketamin kommt klinisch aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils bevorzugt das Stereoisomer S-Ketamin zur Anwendung. Es hat eine 3-4-fach höhere Affinität zum NMDA-Rezeptor als sein Enantiomer R-Ketamin.⁷⁸ Um die Rolle des Rezeptors in der Signalkaskade genauer zu untersuchen, wurden beide Substanzen in äquimolaren Konzentrationen verglichen. Dabei zeigte sich, dass beide Substanzen annähernd die gleiche Toxizität aufweisen. So führt die Inkubation mit Ketamin 2 mM zu einer Apoptoserate von 45,5 % und die Behandlung mit 2 mM S-Ketamin zu 45,4 % avitalen Zellen. (Abb. 4)

Da die höhere Affinität des S-Ketamin zum NMDA-Rezeptor hier keinen Einfluss auf die Apoptoserate zeigt, scheint die Toxizität nicht über diesen Weg vermittelt zu werden.

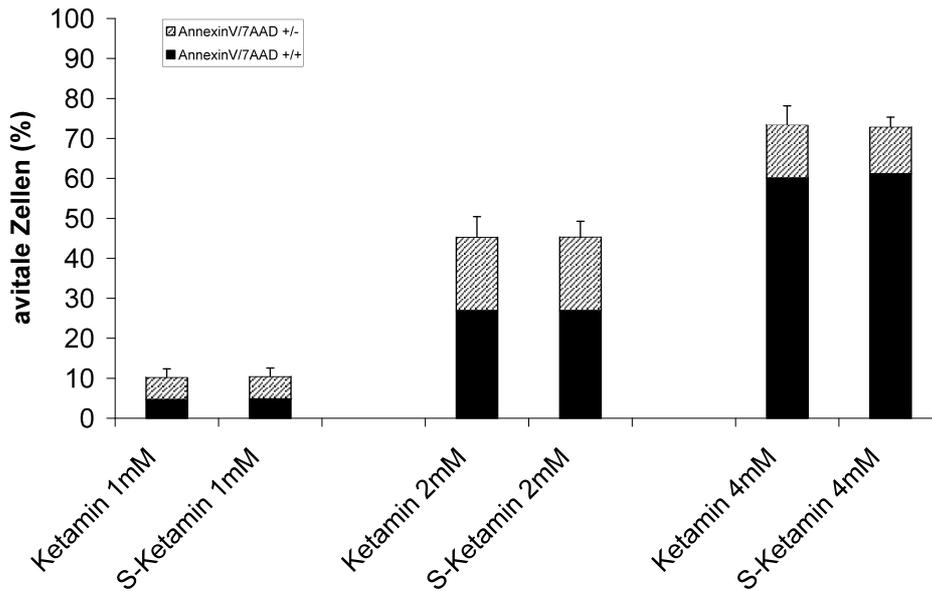


Abb. 4: Vergleich der Substanzen Ketamin und S-Ketamin in äquipotenten Konzentrationen in Bezug auf ihre toxische Wirkung an Jurkat-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. (n=3). Racemat und Stereoisomer sind annähernd gleich toxisch.

3.1.2. Wirkung des Rezeptor-Antagonisten Flumazenil

Um die Rolle des GABA_A-Rezeptors zu untersuchen, der die Wirkung von Midazolam an die Zelle vermittelt, wurde der Einfluss des Rezeptorantagonisten Flumazenil auf die Apoptoserate untersucht. Flumazenil ist ein Antagonist des Midazolam und wirkt somit hemmend am GABA_A-Rezeptor.

Flumazenil zeigte keine signifikante apoptotische Wirkung auf Jurkat T-Lymphomzellen und beeinflusste die Toxizität von Midazolam nicht. So bewirkte die Behandlung mit 100 μ M Midazolam einen relativen Anteil avitaler Zellen von 43,3 %, die sowohl durch den Zusatz von 10 μ M Flumazenil (43,9 %) als auch von 100 μ M Flumazenil (49 %) nicht signifikant beeinflusst wurde. (Abb. 5)

Flumazenil wird in der Klinik zur Antagonisierung des Midazolam eingesetzt. Dabei verwendet man im Vergleich zu der Midazolamkonzentration eine 10-fach kleinere Dosis Flumazenil. Die Konzentrationen wurden entsprechend gewählt.

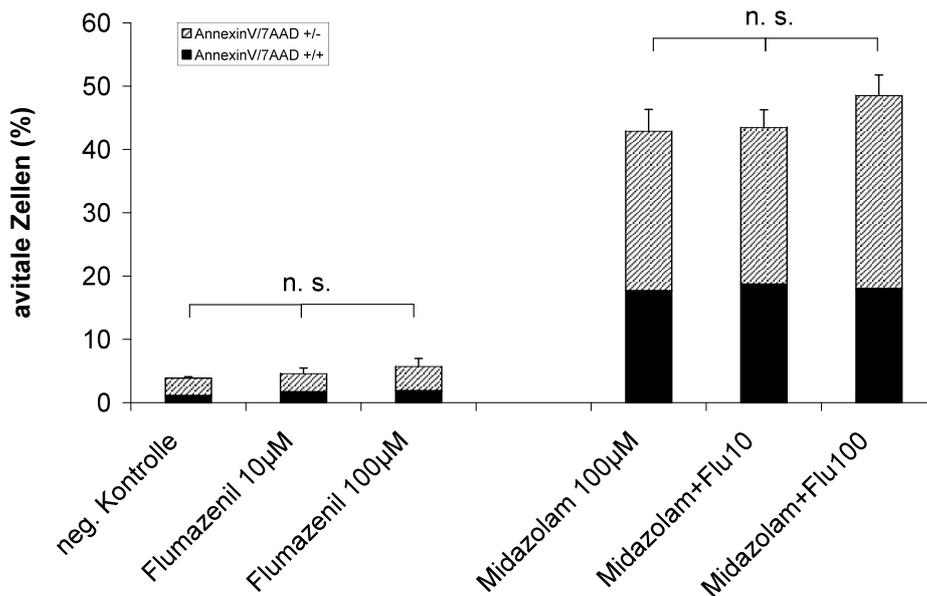


Abb. 5: Wirkung des Rezeptor-Antagonisten Flumazenil allein und kombiniert mit Midazolam auf Jurkat T-Lymphomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den Apoptoseraten von Midazolam allein und in Kombination mit Flumazenil waren nicht signifikant (n.s. mit $p=0,066$). Die Apoptoserate nach Inkubation mit Flumazenil unterschied sich im Vergleich zu der Negativkontrolle nicht signifikant ($p=0,061$) ($n=3$).

3.2. Untersuchung der Signalwege

Wie zuvor beschrieben unterscheidet man verschiedene Wege der Apoptoseinduktion. Um zu untersuchen, ob Ketamin und Midazolam über den mitochondrialen oder Todesrezeptor-vermittelten Signalweg Apoptose verursachen, wurden genetisch veränderte Zellen der Jurkat T-Lymphomzellreihe verwendet. Mit Hilfe von *bcl2*-überexprimierenden (*bcl2!*) und Caspase-9-defizienten (*cas9-*) Zellen wurde der mitochondriale Signalweg, mit Caspase-8- (*cas8-*) sowie FADD-defizienten-Zellen (*FADD-*) der Rezeptor-vermittelte Signalweg untersucht.

Bei Wildtypzellen (*wt*) der Jurkat T-Lymphomreihe induzierte Ketamin in einer Konzentration von 2 mM eine Apoptoserate von 43,2 %, während diese bei *bcl2*-überexprimierenden Zellen (*bcl2!*) auf 10,9 % und bei Caspase-9-defiziente (*cas9-*) Zellen auf 4,1 % reduziert war. ($p<0,05$; Abb. 6)

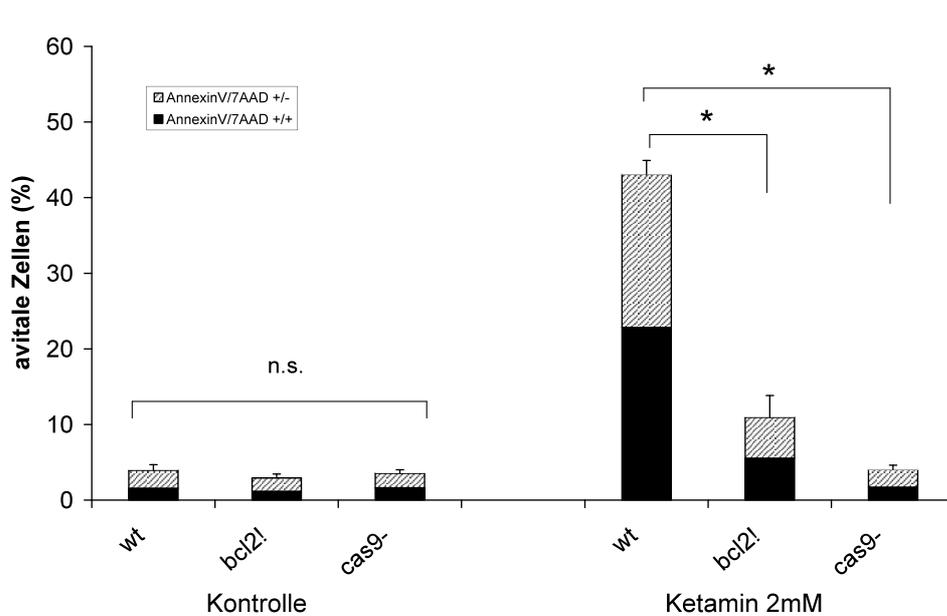


Abb. 6: Untersuchung des mitochondrialen Signalweges nach 24 h Inkubation mit Ketamin 2 mM. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). In der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n.s.) ($n=3$). Bcl2!-überexprimierende (bcl2!) und Caspase-9-defiziente (cas9-) Zellen weisen nach der Behandlung mit Ketamin 2 mM im Vergleich zu Jurkat-Wildtypzellen (wt) geringere Apoptoseraten auf.

Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Apoptoseraten bei der Behandlung mit Ketamin 2 mM bei Jurkat-Wildtypzellen (wt), Caspase-8- (cas8-) sowie FADD-defizienten-Zellen (FADD-). (Abb. 7)

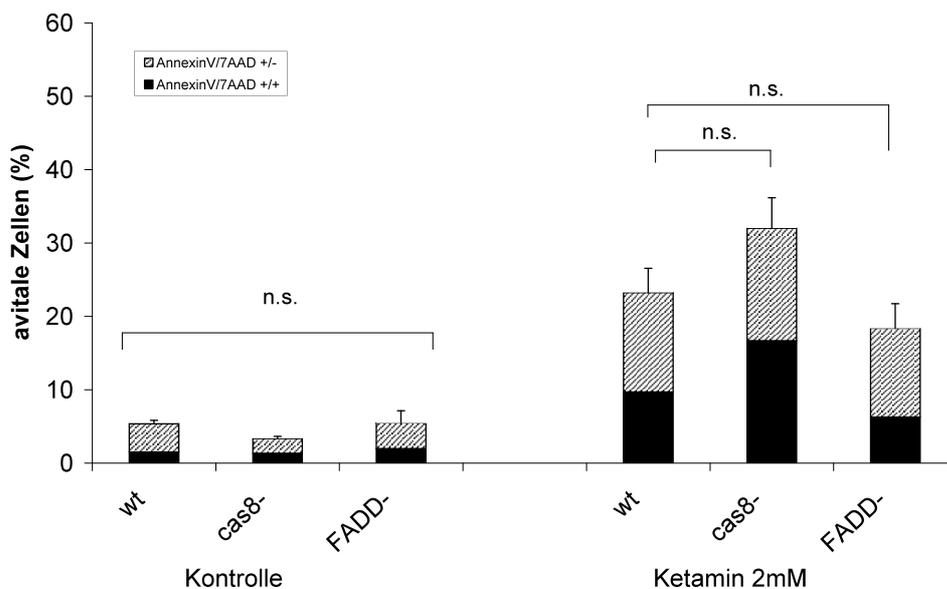


Abb. 7: Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Signalweges nach 24 h Inkubation mit Ketamin 2 mM. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. In der Kontrollgruppe sowie bei der Behandlung mit Ketamin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n.s.) ($n=3$). Caspase-8- (cas8-) und FADD-defiziente Zellen (FADD-) weisen im Vergleich zu Jurkat-Wildtypzellen (wt) keine signifikant unterschiedlichen Apoptoseraten auf.

Analoge Experimente wurden für Midazolam (100 μ M) durchgeführt. Es zeigte sich wie beim Ketamin eine Verringerung der Apoptoserate bei *bcl2*-überexprimierenden (*bcl2!*) sowie bei Caspase-9-defiziente Zellen (*cas9-*). Während Wildtyp-Zellen (*wt*) nach der 24 h Inkubation einen Anteil avitaler Zellen von 47 % aufwiesen, betrug dieser Anteil bei *bcl2*-überexprimierenden Zellen nur 4,9 % und bei Caspase-9-defiziente Zellen 11,1 %. ($p < 0,05$; Abb. 8)

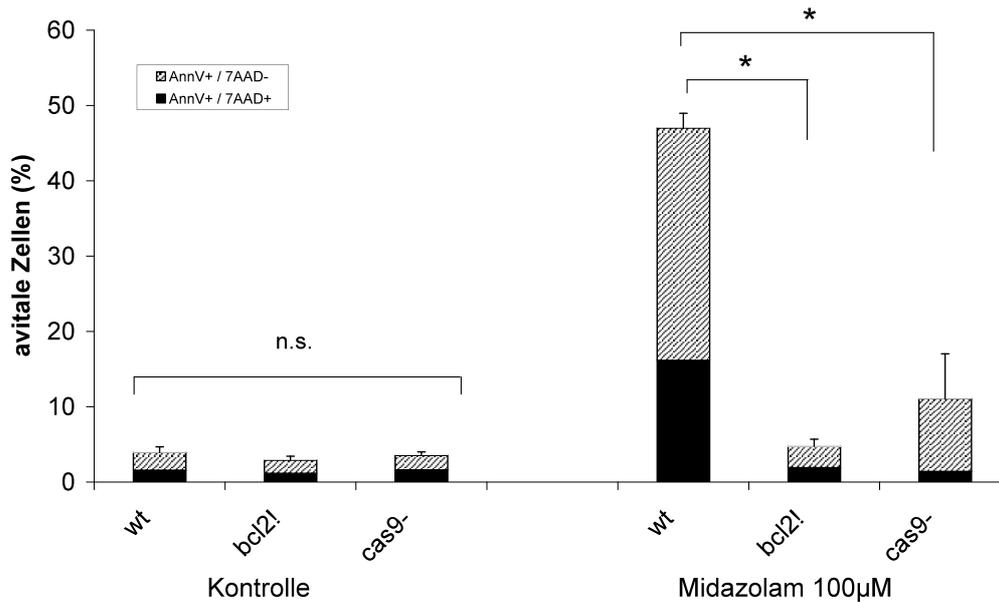


Abb. 8: Untersuchung des mitochondrialen Signalweges nach 24 h Inkubation mit Midazolam 100 μ M. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). In der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n.s.) ($n=3$). *Bcl2!*-überexprimierenden (*bcl2!*) und Caspase-9-defiziente (*cas9-*) Zellen weisen nach der Behandlung mit Midazolam im Vergleich zu Jurkat-Wildtypzellen (*wt*) geringere Apoptoseraten auf.

Die Untersuchung von Caspase-8- (*cas8-*) und FADD-defizienten Zellen (FADD-) im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen erbrachte auch bei der Behandlung mit Midazolam keine signifikanten Veränderungen in der Apoptoserate. (Abb. 9)

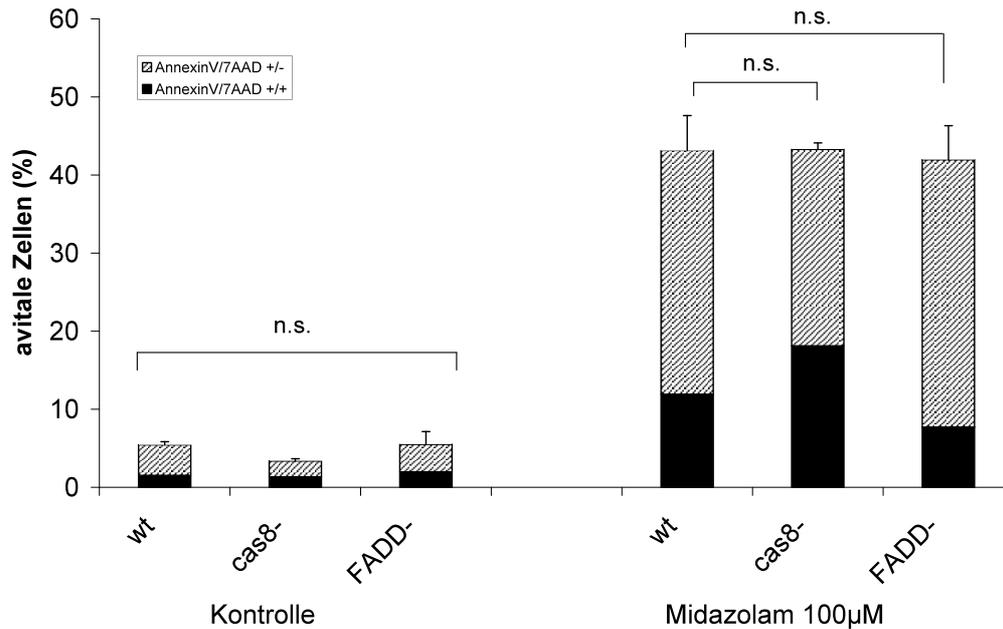


Abb. 9: Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Signalweges nach 24 h Inkubation mit Midazolam 100 µM. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten ± Standardabweichung. In der Kontrollgruppe sowie bei der Behandlung mit Midazolam zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n.s.) (n=3). Caspase-8- (cas8-) und FADD-defiziente Zellen (FADD-) weisen im Vergleich zu Jurkat-Wildtypzellen (wt) keine signifikant unterschiedlichen Apoptoseraten auf.

3.3 Untersuchungen an neuronalen Zellen

Durch die im Tierexperiment nachgewiesenen neuronalen Schäden nach intrathekaler Medikamentengabe und Induktion von Neurodegeneration interessierte in der vorliegenden Arbeit speziell die Wirkung von Ketamin und Midazolam auf neuronale Zellen, so dass ein neues Zellmodell mit SHEP-Neuroblastomzellen etabliert wurde.

3.3.1. Nachweis des NMDA-Rezeptors bei SHEP Zellen

Bislang unbekannt war, ob SHEP Neuroblastomzellen NMDA-Rezeptoren exprimieren. Der Nachweis gelang nun mittels Westernblotanalyse. Jurkat T-Lymphomzellen, welche bekannterweise den Rezeptor tragen dienten neben dem Marker als Positivkontrollen.⁷⁶ (Abb. 10)

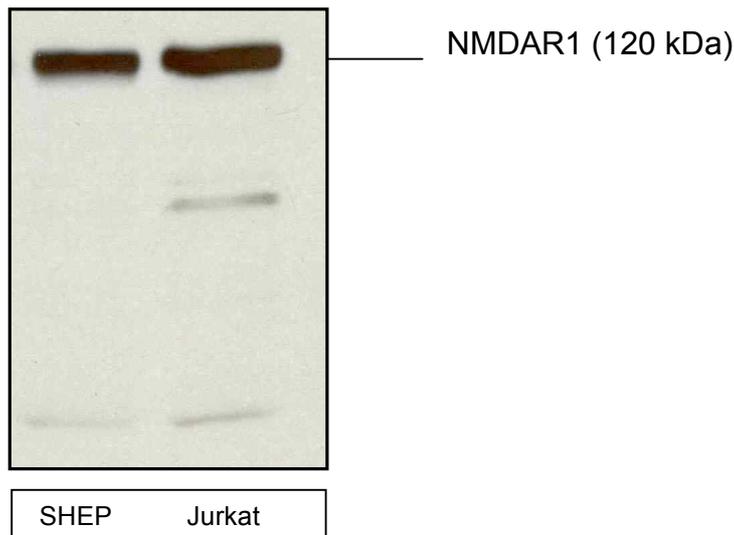


Abb. 10: Nachweis des NMDA-Rezeptors bei SHEP Neuroblastomzellen mittels Westernblot. Jurkat T-Lymphozyten dienen als Positivkontrolle. Bei beiden Zelllinien zeigt sich eine deutliche Bande bei 120 kDa und damit die Immunopositivität für den NMDA-Rezeptor Typ1.

3.3.2. Konzentrationsabhängiger Effekt von Ketamin und Midazolam auf neuronale Zellen

An SHEP Neuroblastomzellen konnte ebenfalls die Zytotoxizität von Ketamin und Midazolam nachgewiesen werden. So führte die Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von Ketamin oder Midazolam in der FACS-Analyse zu einem deutlichen Anstieg der avitalen Zellen. Mit Hilfe der Farbstoffe AnnexinV und 7AAD konnte zwischen früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden.

Nach 24 h Inkubation betrug der Anteil avitaler Zellen bei einer Konzentration von 2 mM Ketamin 18,3 %. Dieser war nach Behandlung mit 4 mM Ketamin mit 45,9 % und bei 8 mM mit 70,1 % signifikant höher. ($p < 0,05$; Abb. 11)

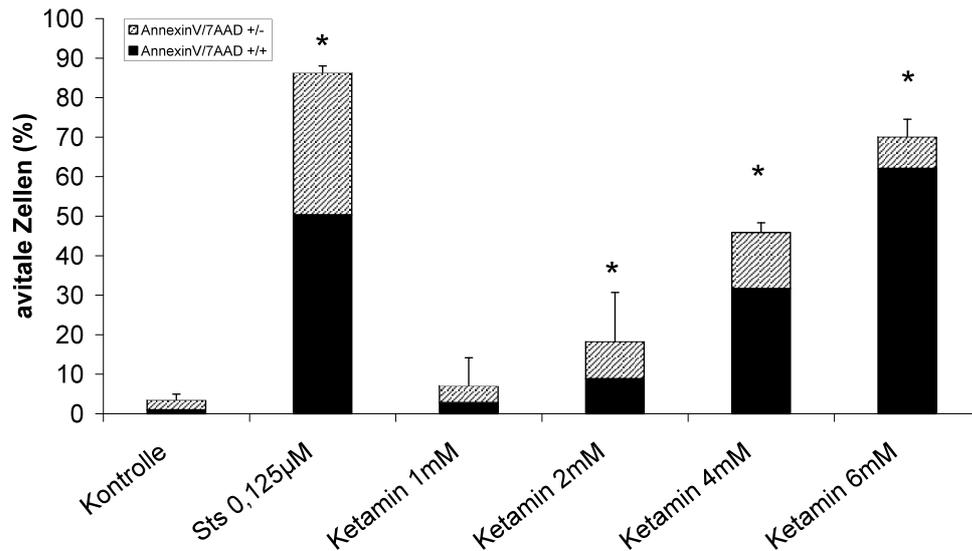


Abb. 11: Konzentrationsabhängiger Effekt von Ketamin auf SHEP Neuroblastomzellen. Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Mit zunehmender Ketamin-Konzentration steigt die Apoptoserate.

Auch nach 24 h Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen Midazolam konnte ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate nachgewiesen werden. So bewirkte eine Konzentration von 200 μ M Midazolam einen Anteil avitaler Zellen von 25,7 %. Dieser stieg bei 400 μ M auf 65,4 % an. ($p < 0,05$; Abb. 12)

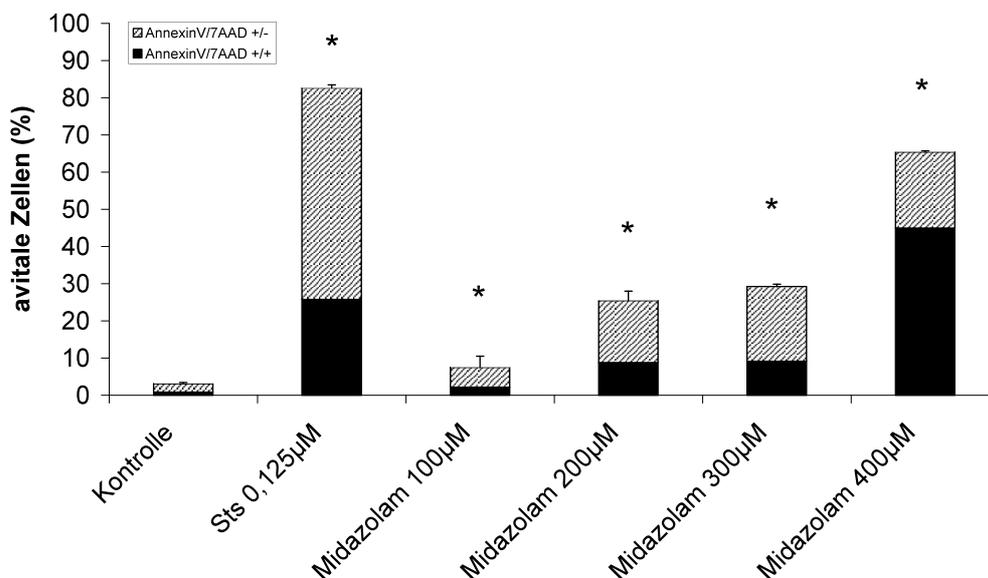


Abb. 12: Konzentrationsabhängiger Effekt von Midazolam auf SHEP Neuroblastomzellen. Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Mit zunehmender Midazolam-Konzentration steigt die Apoptoserate.

3.3.3. Aktivierung von Caspase-3

Außerdem konnte an SHEP Neuroblastomzellen die Aktivierung der Effektorcaspase-3 nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit aufsteigenden Ketamin-Konzentrationen zeigte die FACS-Analyse einen deutlichen Anstieg der aktivierten Caspase-3 bereits ab einer Konzentration von 2 mM. Die Aktivität stieg bis zu einem Maximum bei 8 mM an. ($p < 0,05$; Abb. 13)

Im Westernblot konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die größte Menge an aktivierter Caspase-3 wurde in der Durchflusszytometrie bei einer Ketamin-Konzentration von 4 mM nachgewiesen. (Abb. 14)

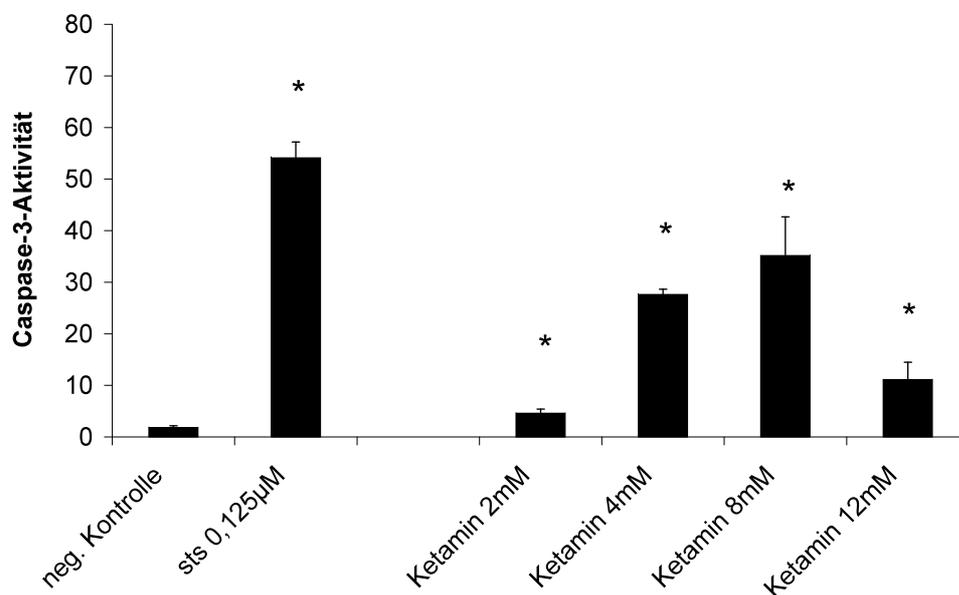


Abb. 13: Caspase-3-Aktivität bei SHEP Neuroblastomzellen nach 24 h Inkubation mit Ketamin. Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Die Aktivität der Caspase-3 steigt bis zu einer Ketamin-Konzentration von 8 mM.

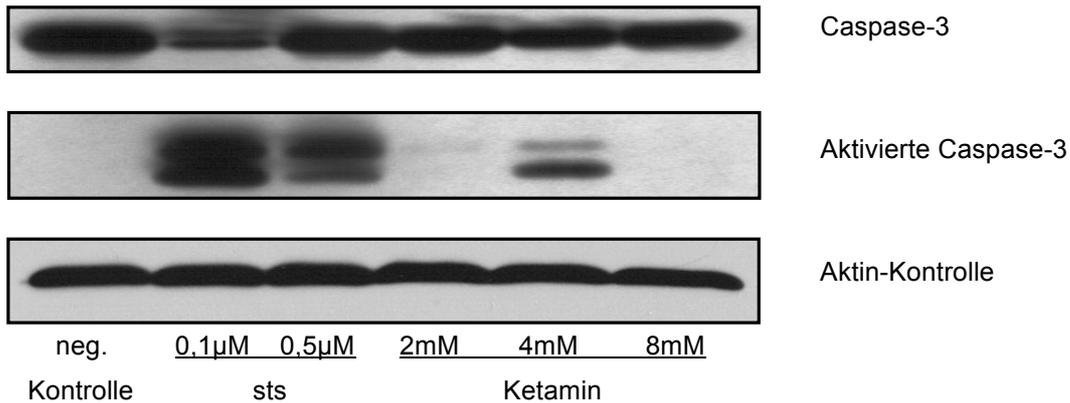


Abb. 14: Nachweis von Caspase-3-Aktivität nach 24 h Inkubation mit Ketamin mittels Westernblot. Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Eine Konzentration von 2 mM führt zu einer schwach erkennbaren, 4 mM zu einer deutlichen Doppelbande. Bei 8 mM ist keine Caspase-3-Aktivität mehr nachweisbar.

Auch die 24-stündige Inkubation mit Midazolam führte zu Aktivierung von Caspase-3. Dies konnte sowohl durchflusszytometrisch, als auch im Westernblot nachgewiesen werden. Im FACS-Versuch zeigte sich ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität mit zunehmender Midazolam Konzentration bis zu einem Maximum bei 400 µM. ($p < 0,05$; Abb. 15)

Im Westernblot konnte korrespondierend aktivierte Caspase-3 nach Behandlung mit Midazolam nachgewiesen werden. (Abb. 16)

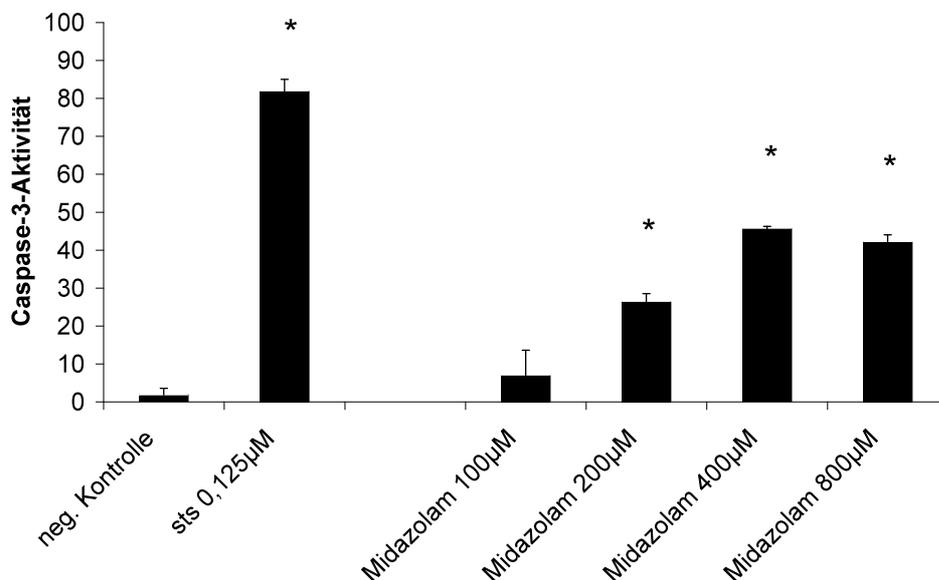


Abb. 15: Caspase-3-Aktivität bei SHEP Neuroblastomzellen nach 24 h Inkubation mit Midazolam. Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Die Aktivität der Caspase-3 steigt bis zu einer Midazolam-Konzentration von 400 µM. Zu diesem Zeitpunkt fand hier die höchste Apoptoserate statt.

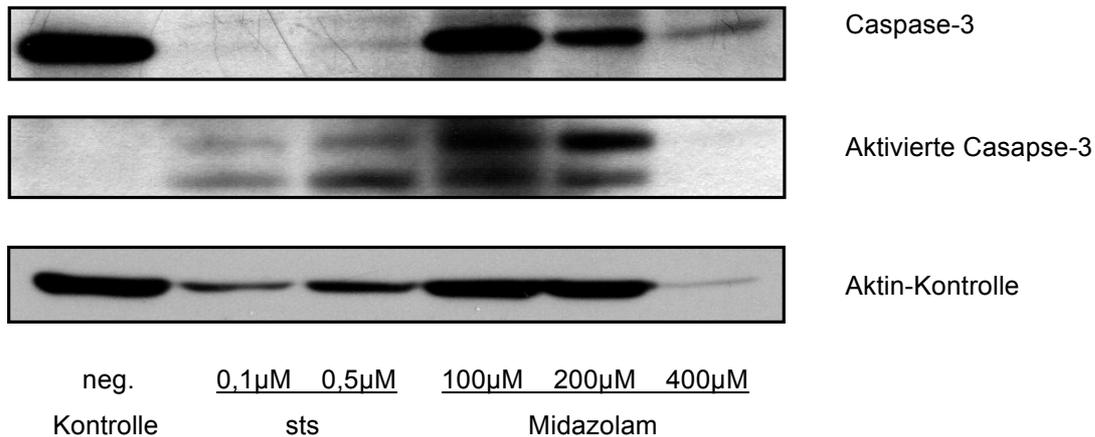


Abb. 16: Nachweis von Caspase-3-Aktivität nach 24 h Inkubation mit Midazolam mittels Westernblot. Staurosporin (sts) wurde als Positivkontrolle verwendet. Konzentrationen von 100 µM und 200 µM induzieren deutliche Doppelbanden. Bei 400 µM ist Caspase-3-Aktivität nicht mehr deutlich nachweisbar.

3.3.4. Q-VD Pancaspase-Inhibitor

Um weiterhin den Einfluss der Caspasen auf die durch Ketamin und Midazolam induzierte Zytotoxizität zu untersuchen wurde der Pancaspaseinhibitor Q-VD verwendet. Die Hemmung der Caspasen führt zu einem verbesserten Überleben der Zellen. Die Vorbehandlung der Zellen mit Q-VD konnte die Zytotoxizität von Ketamin und Midazolam signifikant reduzieren.

So sank die Apoptoserate von 18,3 % auf 0,9 % bei einer Konzentration von 2 mM Ketamin, bei 4 mM von 45,9 % auf 8,2 %, bei 6 mM Ketamin von 70,1 % auf 19 % und bei 8 mM von 90,1 % auf 59,4 %. ($p < 0,05$; Abb. 17)

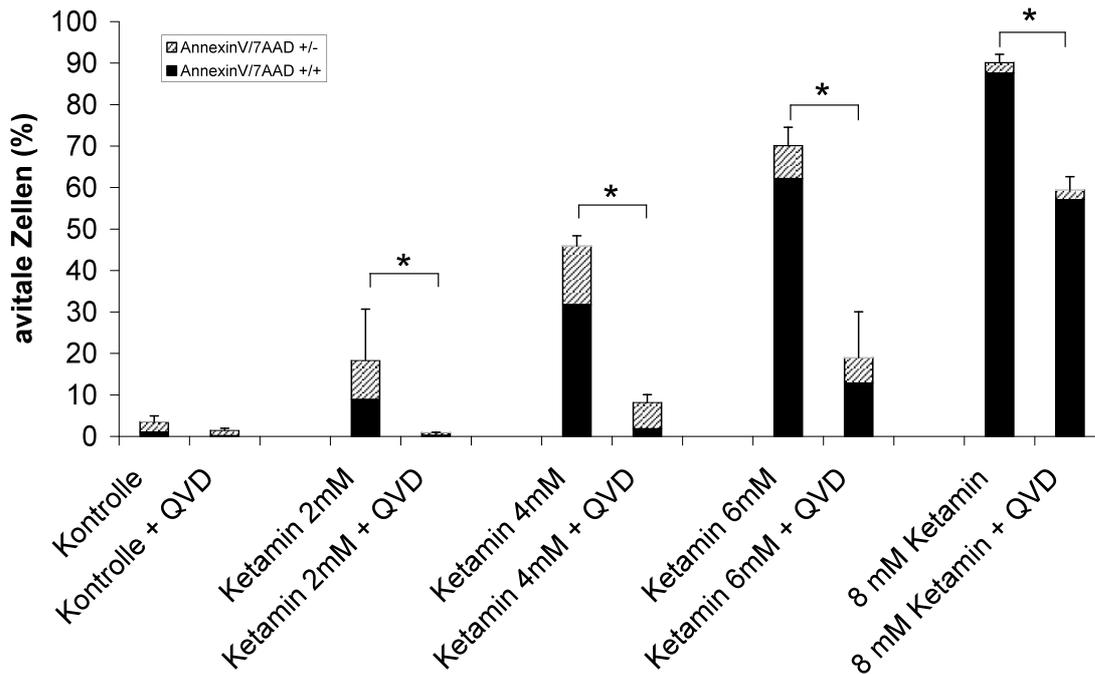


Abb. 17: Vergleich der Apoptoseraten nach 24 h Inkubation mit Ketamin mit und ohne Vorbehandlung durch den Pancaspaseinhibitor QVD bei SHEP Neuroblastomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Der Anteil avitaler Zellen wird durch Inhibition der Caspasen signifikant reduziert.

Auch bei der Behandlung mit Midazolam konnte der protektive Effekt von Q-VD nachgewiesen werden.

Von 28,6 % sank der Anteil avitaler Zellen nach Vorbehandlung mit Q-VD auf 2,6 % bei einer Midazolam-Konzentration von 200 μM . Bei 300 μM wurde der Anteil von 33,8 % auf 4,5 % und bei 400 μM Midazolam von 61,8 % auf 32,5 % gesenkt. ($p < 0,05$; Abb. 18)

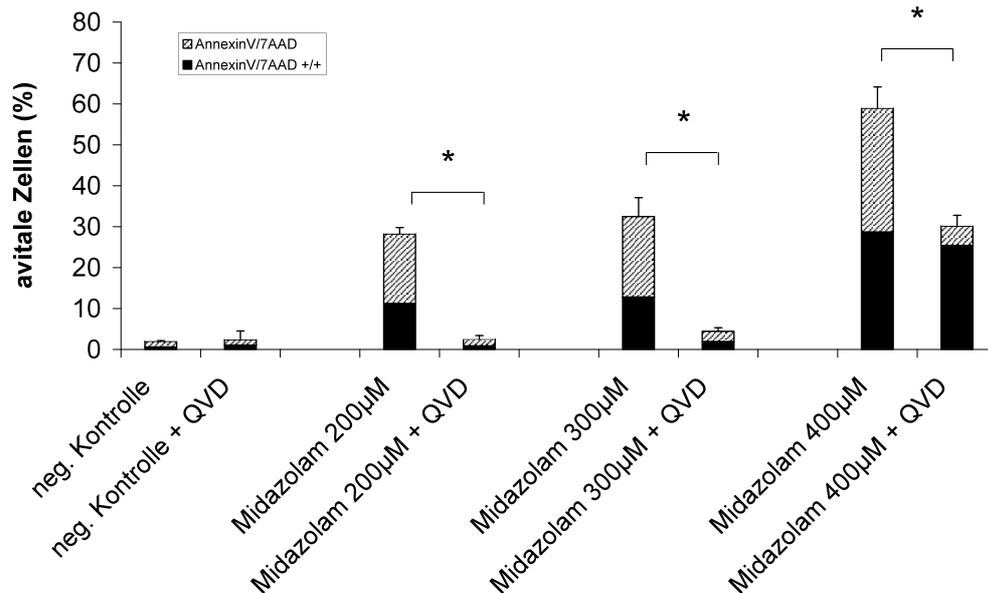


Abb. 18: Vergleich der Apoptoseraten nach 24 h Inkubation mit Midazolam mit und ohne Vorbehandlung durch den Pancaspaseinhibitor QVD bei SHEP Neuroblastomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Der Anteil avitaler Zellen wird durch Inhibition der Caspasen signifikant reduziert.

3.3.5. Racemat und Stereoisomer des Ketamin

Auch an neuronalen Zellen wurde die Wirkung des Racemats Ketamin im Vergleich zu seinem Stereoisomer S-Ketamin untersucht. Beide Substanzen wurden auch hier in äquimolaren Konzentrationen verwendet. Dabei zeigte sich ein mit dem Effekt an Jurkat T-Lymphomzellen vergleichbares Ergebnis: beide Substanzen weisen die gleiche Toxizität auf.

So führt die Inkubation mit Ketamin 4 mM zu 45,9 %, die Behandlung mit 4 mM S-Ketamin zu 40,4 % avitalen Zellen. (Abb. 19)

Da die höhere Affinität des S-Ketamin zum NMDA-Rezeptor auch hier keinen Einfluss auf die Apoptoserate zeigt, scheint die Toxizität auch bei SHEP Neuroblastomzellen nicht über diesen Weg vermittelt zu werden.

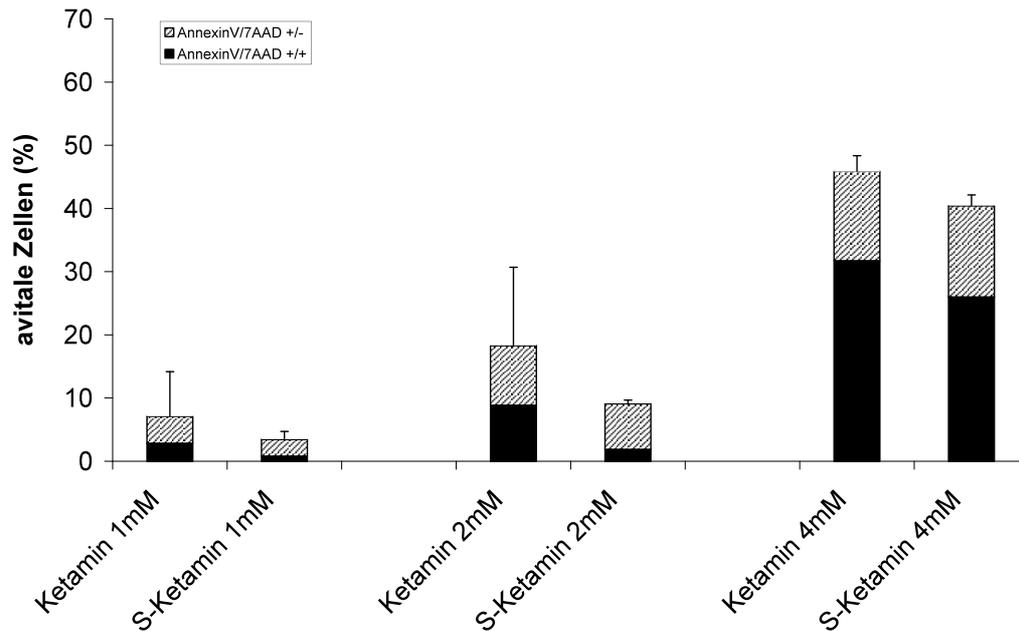


Abb. 19: Vergleich der Substanzen Ketamin und S-Ketamin in äquimolaren Konzentrationen in Bezug auf ihre toxische Wirkung an SHEP Neuroblastomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. (n=3). Racemat und Stereoisomer zeigen trotz der höheren Affinität des S-Ketamin zum NMDA-Rezeptor annähernd gleich toxisch.

3.3.6. Wirkung des Rezeptor-Antagonisten Flumazenil

Um auch an neuronalen Zellen die Rolle des GABA_A-Rezeptors zu untersuchen, der die Wirkung von Midazolam an die Zelle vermittelt, wurde der Einfluss des Rezeptorantagonisten Flumazenil auf die Apoptoserate untersucht.

Die Wirkung von Flumazenil als Antagonist des Midazolam wurde bereits an Jurkat T-Lymphomzellen getestet. Es zeigte sich, dass Flumazenil nur eine geringe apoptotische Wirkung auf SHEP Neuroblastomzellen ausübt und die Toxizität von Midazolam nicht signifikant beeinflusste. So führte die Inkubation über 24 h mit 200 μ M Midazolam zu einem relativen Anteil avitaler Zellen von 38,2 %, die sowohl durch den Zusatz von 20 μ M Flumazenil (37,1 %) als auch von 200 μ M Flumazenil (36,2 %) nicht signifikant beeinflusst wurde. (Abb. 20)

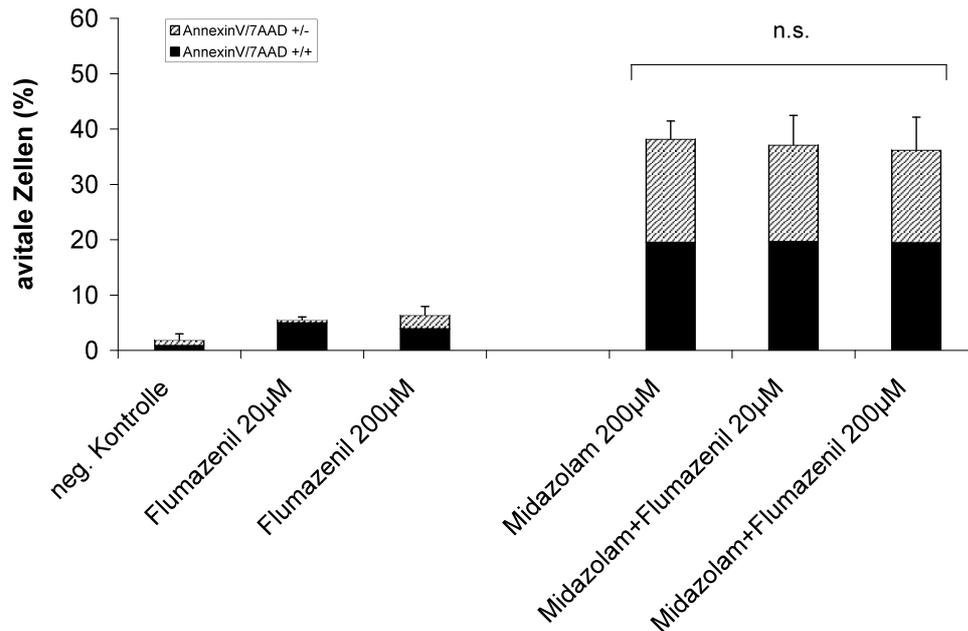


Abb. 20: Wirkung des Rezeptor-Antagonisten Flumazenil allein und kombiniert mit Midazolam auf SHEP Neuroblastomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den Apoptoseraten von Midazolam allein und in Kombination mit Flumazenil waren nicht signifikant (n.s.) (n=3).

3.3.7. Langzeitbehandlung

In den bisherigen Versuchen wurden, verglichen mit den Serumspiegeln, die bei klinischer Anwendung erreicht werden, hohe Konzentrationen von Ketamin verwendet. Die Inkubation betrug jedoch auch nur 24 h. Um nun nachzuweisen, dass auch bei der Langzeitbehandlung mit geringeren Konzentrationen Toxizität auftritt, wurden SHEP Neuroblastomzellen über einen Zeitraum von 120 h mit aufsteigenden Konzentrationen Ketamin inkubiert und die mitochondriale Aktivität bzw. der Anteil vitaler Zellen mithilfe des XTT-Assay gemessen.

Es zeigte sich, dass bereits 100-fach kleinere Ketamin- Konzentrationen (400 μ M) im Vergleich zu den Konzentrationen in den Versuchen mit 24 h-Inkubation (4 mM) toxisch auf SHEP Neuroblastomzellen wirkten. (Abb. 21)

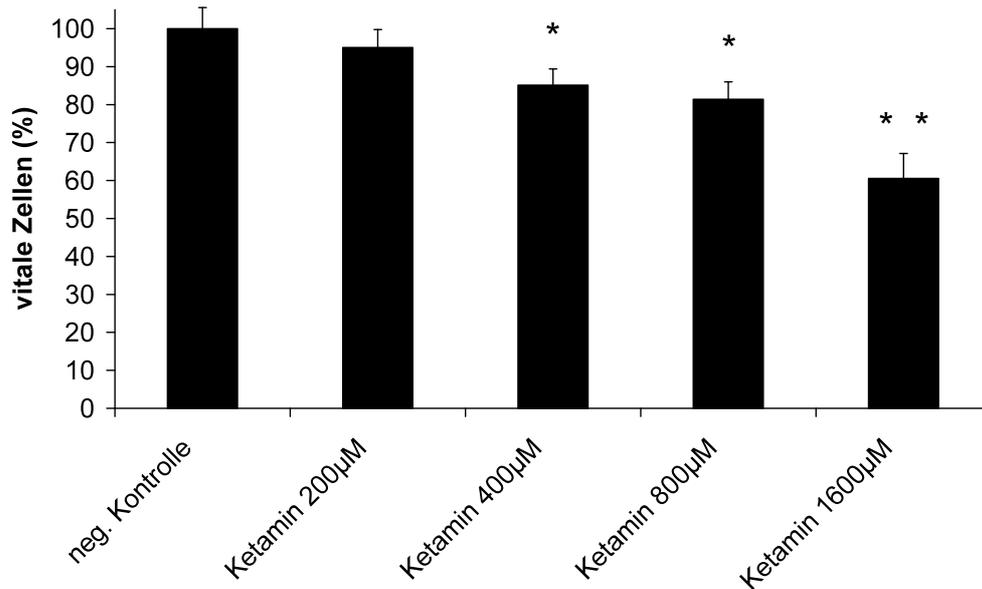


Abb. 21: Messung der mitochondrialen Aktivität (XTT-Assay) nach 120 h Inkubation mit ansteigenden Ketamin-Konzentrationen bei SHEP Neuroblastomzellen. Dargestellt sind die Daten als prozentuale Anteile der Kontrolle. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich (*, $p < 0,01$), (**, $p < 0,001$) ($n=6$). Die mitochondriale Aktivität und damit der Anteil vitaler Zellen fällt mit steigenden Ketamin-Konzentrationen ab. Zu beachten ist, dass hier bereits 100-fach kleinere Dosierungen toxisch wirken.

3.3.8. Benzethonium

Weiterhin stellten wir fest, dass klinisch verwendetes KetanestS® höhere Apoptoseraten aufwies als die Reinsubstanz S-Ketamin. Verantwortlich hierfür ist der Zusatzstoff Benzethoniumchlorid, ein Konservierungsmittel, der selbst Apoptose induziert. An Jurkat T-Lymphomzellen führte die 24 h Inkubation mit S-Ketamin 2 mM zu einer Apoptoserate von 31,8 % ($p < 0,05$) und die Behandlung mit 5 µM Benzethoniumchlorid zu 32,4 % ($p < 0,05$). Nach Ko-Inkubation von S-Ketamin und Benzethoniumchlorid betrug die Apoptoserate 80,8 %. Das klinisch verwendete KetanestS® wies mit einem Anteil avitaler Zellen von 86,3 % eine ähnliche hohe Apoptoserate auf wie die Kombination aus S-Ketamin und Benzethoniumchlorid. (Abb. 22)

Die kommerziell erhältliche Lösung KetanestS® enthält einen Benzethoniumchlorid-Anteil von 0,25 %. Wir wählten daher bei der Verwendung von S-Ketamin 2 mM eine Benzethoniumchlorid-Konzentration von 5 µM.

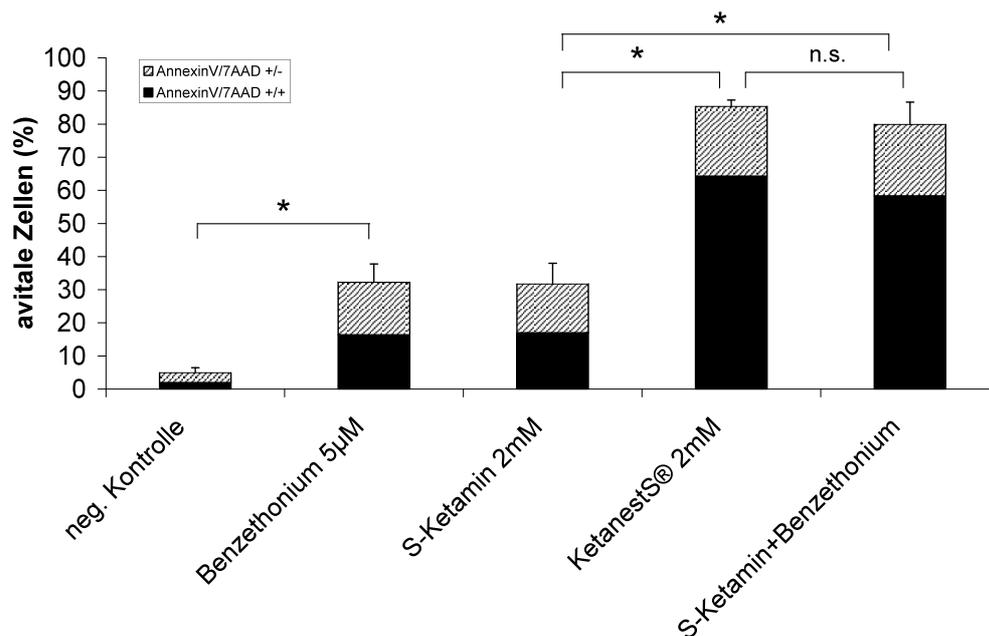


Abb. 22: Apoptotische Wirkung des klinisch verwendeten KetanestS® im Vergleich zu Benzethoniumchlorid, S-Ketamin und der Kombination beider Substanzen bei Jurkat T-Lymphomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der Negativkontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Benzethoniumchlorid zeigt in dieser Konzentration wie S-Ketamin einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu der Negativkontrolle. KetanestS sowie die Kombination aus S-Ketamin und Benzethoniumchlorid führen zu signifikant höheren Anteilen avitaler Zellen als bei der Behandlung mit S-Ketamin allein.

An SHEP Neuroblastomzellen konnte die an Jurkat T-Lymphomzellen nachgewiesene toxische Wirkung des Benzethoniumchlorid alleine nicht nachgewiesen werden. Die Änderung der Apoptoserate im Vergleich zu der Negativkontrolle war nicht signifikant.

Wir konnten jedoch zeigen, dass auch an SHEP Neuroblastomzellen die Kombination der Reinsubstanz S-Ketamin und Benzethoniumchlorid zu einer Potenzierung der Apoptoserate führte. So zeigte sich nach 24 h Inkubation mit S-Ketamin 4 mM eine Apoptoserate von 63,9 % ($p < 0,05$), nach Behandlung mit 10 µM Benzethoniumchlorid 6,1 %. Die Kombination der beiden Substanzen führte zu einer Apoptoserate von 86,6 %. Die kommerzielle Lösung KetanestS® wies auch hier mit einem Anteil avitaler Zellen von 87,9 % eine ähnlich hohe Apoptoserate auf wie die Kombination aus S-Ketamin und Benzethoniumchlorid. (Abb. 23)

Wir wählten hier bei der Verwendung von S-Ketamin 4 mM eine Benzethoniumchlorid-Konzentration von 10 µM um den relativen Anteil von 0,25 % in der Lösung zu erreichen.

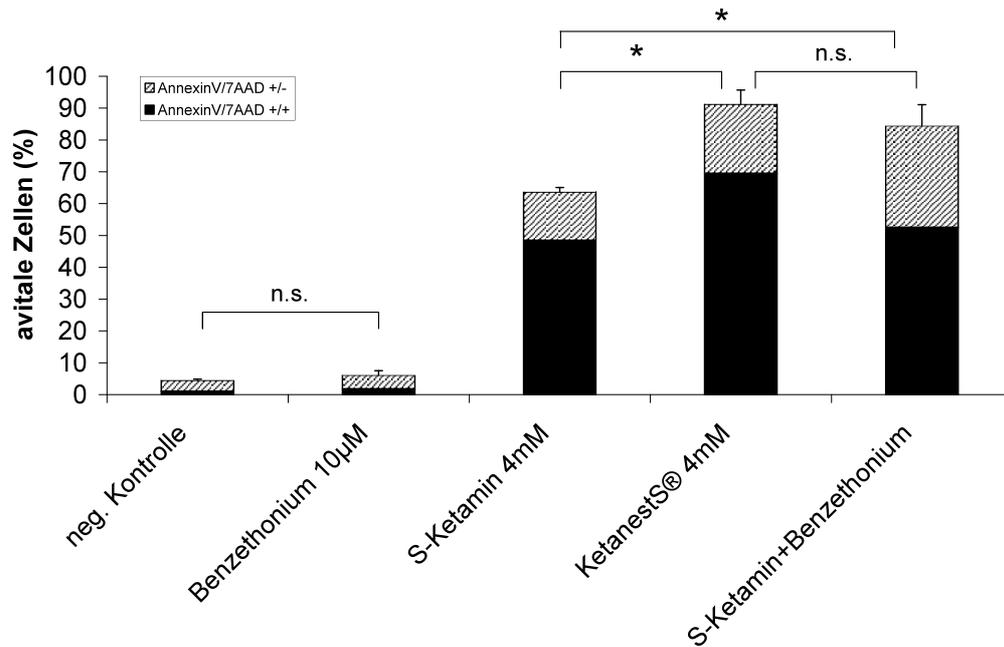


Abb. 23: Apoptotische Wirkung des klinisch verwendeten KetanestS® im Vergleich zu Benzethoniumchlorid, S-Ketamin und der Kombination beider Substanzen bei SHEP Neuroblastomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten \pm Standardabweichung. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant zu der Negativkontrolle ($p < 0,05$) ($n=3$). Benzethoniumchlorid zeigt hier keinen signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu der Negativkontrolle (n.s.). KetanestS sowie die Kombination aus S-Ketamin und Benzethoniumchlorid führen jedoch auch hier zu signifikant höheren Anteilen avitaler Zellen als bei der Behandlung mit S-Ketamin allein.

4. Diskussion

Ketamin induziert in millimolaren Konzentrationen Apoptose an neuronalen und nicht neuronalen Zellen. In höhere Konzentrationen verursacht es nekrotischen Zelltod. Die durch Ketamin induzierte Apoptose wird über den mitochondrialen Signalweg vermittelt und ist unabhängig von der Todesrezeptor-vermittelten Kaskade. Weiterhin kann die apoptotische Wirkung von Ketamin fast vollständig durch Caspase-Inhibitoren unterdrückt werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen zudem, dass der durch Ketamin induzierte apoptotische Effekt nicht stereospezifisch ist, was eine Beteiligung des NMDA-Rezeptors an der Signalkaskade unwahrscheinlich macht.

Postoperativ wird Ketamin in Kombination mit Opioiden oder Lokalanästhetika in einer Konzentration von ungefähr 0,4 mg/ml (~1,5 mM) über mehrere Tage zur epiduralen Schmerztherapie verwendet.⁵³⁻⁵⁸ Bei Patienten mit chronischen Schmerzen wurden sogar Lösungen mit Konzentrationen von bis zu 25 mg/ml (~93 mM) über Wochen und Monate intrathekal appliziert.⁵⁹ Leider sind die Konzentrationen, die während dieser Anwendungen epidural bzw. intrathekal auftreten nicht bekannt. Allerdings ist aufgrund der hohen Lipophilie der Substanzen davon auszugehen, dass die Konzentrationen rasch abnehmen. Trotzdem ist es bemerkenswert, dass im klinischen Gebrauch Medikamentenkonzentrationen intrathekal verwendet werden, die um ein 100-faches über denen liegen, die *in-vitro* bereits zu signifikanter Toxizität führen. Zwar wurde die Neurotoxizität von Ketamin nach Verwendung rückenmarksnah bereits beschrieben,⁵ allerdings wurde die toxische Wirkung hauptsächlich auf das Konservierungsmittel Chlorbutanol zurückgeführt.⁶⁰ Dennoch zeigten sich nach wiederholter Gabe auch von konservierungsmittelfreiem Ketamin *in vivo* morphologische Schäden, eine Assoziation mit Störungen der Nervenfunktion wurde jedoch nicht systematisch untersucht.⁶¹ Vor kurzem konnte an einem Tiermodell gezeigt werden, dass die intrathekale Gabe von konservierungsmittelfreiem S-Ketamin bei Kaninchen zu schweren histopathologischen Schäden allerdings ohne funktionelle Ausfälle führt.⁷ Ähnliche histopathologische Ergebnisse wurden bei Patienten erhoben, die aufgrund unerträglicher Schmerzen mit Ketamin intrathekal behandelt wurden. Auch diese Patienten wiesen keinerlei funktionelle Defizite auf. In den meisten Studien an Tieren oder an Patienten kann der Mechanismus der Toxizität aus methodischen Gründen

nicht untersucht werden. Es wurde meist allein die Lokalisation der Läsionen beschrieben. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um subependymale Strukturen, also die Bereiche, die auch den höchsten Ketamin-Konzentrationen ausgesetzt waren. Zumeist wurden morphologisch Demyelinisierung und Nekrosen beschrieben. Erst vor kurzem wurde nach intrathekaler Gabe von Ketamin Chromatolyse bei Kaninchen nachgewiesen.⁷ Chromatolyse kann ein Zeichen der späten Apoptose sein, ist aber nicht pathognomonisch für Apoptose.

In unserem Modell induziert Ketamin *in-vitro* konzentrations- und zeitabhängig Apoptose. Höhere Konzentrationen führten dagegen zu Nekrose. Dieses Phänomen ist nicht untypisch, der gleiche Effekt konnte mit dem Lokalanästhetikum Lidocain gezeigt werden.⁵¹ Wie bei Lidocain wird die Ketamin-induzierte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg vermittelt, unabhängig von der Todesrezeptor-Kaskade. Yon et al. zeigten an neugeborenen Ratten, dass nach systemischer Gabe von Ketamin Apoptose sowohl durch den mitochondrialen als auch durch den Rezeptor-vermittelten Signalweg induziert wird.⁶³ Dies mag auf den ersten Blick widersprüchlich zu den hier präsentierten Ergebnissen erscheinen, aber die systemisch in diesen Versuchen erreichten Plasmakonzentrationen liegen höchstwahrscheinlich weit unter denen, die lokal nach neuroaxialer Applikation von Ketamin erreicht werden. Zu beachten ist weiterhin, dass unsere Ergebnisse nicht *in vivo* an in der Differenzierung und Synaptogenese befindlichen Zellen, sondern an entdifferenzierten Tumorzellen beobachtet wurden. Weiterhin ist eine Beziehung zwischen den in Tiermodellen beobachteten Ketamin-Effekten und dem NMDA-Rezeptor wahrscheinlich, da auch andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Lachgas oder MK-801 diese Effekte hervorrufen.^{14,64} Der hier identifizierte Signalweg der Toxizität von Ketamin unterscheidet sich grundlegend von jenem, der im neonatalen Gehirn nach systemischer Gabe beobachtet wurde. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der hier beschriebene Signalweg auch bei der Apoptose-Induktion im Gehirn neonataler Ratten nach langdauernden Behandlung mit hohen Dosen Ketamin eine Rolle spielt. Es ist weiterhin erstaunlich, dass die hier beobachtete Toxizität von Ketamin unabhängig von der Signalübertragung des NMDA-Rezeptors zu sein scheint. S-Ketamin zeigt eine 2- bis 3-fach stärkere Wirkung am NMDA-Rezeptor als sein Enantiomer R-Ketamin.⁶⁵ Es ist also unwahrscheinlich, dass die Apoptosekaskade über den NMDA-Rezeptor induziert wird. Analog zu dieser Beobachtung beschreiben Sekino et al. den ebenfalls nicht

stereospezifischen kardiotoxischen Effekt von Ketamin.⁶⁷ Die lokale Toxizität von Ketamin wird also vermutlich nicht über den NMDA-Rezeptor vermittelt.

Yaksh et al. konnten nachweisen, dass die intrathekale Gabe von verschiedenen NMDA-Antagonisten über 28 Tage in ähnlichem Maße zu pathologischen Veränderungen des Rückenmarks führt.⁶ Unsere Resultate stehen dazu scheinbar in einem Widerspruch. In der Studie von Yaksh et al. wurden die verschiedenen Medikamentenkonzentrationen jedoch nach ihrer psychotropen und nicht nach der analgetischen Wirkung gewählt. Die Substanzen (Memantin, MK-801, Ketamin und Methadon) wurden also nicht in äquianalgetischen oder am NMDA-Rezeptor äquipotenten Dosierungen verglichen.⁶⁸⁻⁷⁰ Aus diesem Grund diskutieren die Autoren selbst die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung der Substanzen und es erscheint unwahrscheinlich, dass die hier untersuchte Toxizität stereospezifisch ist. Eine ähnliche Situation findet man bei der durch Lidocain oder Amitriptylin induzierten apoptotischen Wirkung auf neuronale Strukturen. Deren Toxizität ist ebenfalls unabhängig von ihrem ursprünglichen Wirkmechanismus, der Blockade spannungsabhängiger Natrium-Kanäle.^{51,71,72}

Weiterhin wurde gezeigt, dass das Konservierungsmittel Benzethoniumchlorid die Toxizität von KetanestS® verstärkt. Obwohl bereits oft Konservierungsmittel für die Neurotoxizität von Ketamin verantwortlich gemacht wurden,¹⁶ konnte hier gezeigt werden, dass die toxischen Effekte von S-Ketamin und Benzethoniumchlorid sich in T-Lymphomzellen und in Neuroblastomzellen verstärken. Die alleinige Gabe von Benzethoniumchlorid führte in Neuroblastomzellen hier zu keiner signifikanten Toxizität. Dennoch verstärkte Benzethoniumchlorid die toxische Wirkung von S-Ketamin an neuronalen Zellen signifikant.

Es bleibt unklar, warum das Konservierungsmittel allein in T-Lymphomzellen zu toxischen Effekten führt, nicht aber in Neuroblastomzellen selbst bei doppelter Konzentration. In weiterführenden Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass auch Benzethoniumchlorid allein an Neuroblastomzellen toxisch wirkt.⁷⁹ Die gewählte Konzentration war im AnnexinV/7AAD Assay gerade noch nicht toxisch, im XTT Assay konnte dagegen schon eine Toxizität bei dieser Konzentration nachgewiesen werden. Benzethoniumchlorid führt also bei neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zu einer Zunahme der Toxizität von Ketamin.

Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Errando et al., die zeigen konnten, dass nur Benzethoniumchlorid in-vivo neurotoxisch wirkt und dass diese toxische Wirkung durch Gabe von S-Ketamin sogar abgemildert wird.¹⁶ Neben vielen methodologischen Unterschieden verwendeten sie eine etwa 40-fach höhere Konzentration des Benzethoniumchlorid als in unserer Untersuchung und somit eine Dosierung, die weit über derjenigen liegt, die in kommerziell erhältlichen Lösungen verwendet wird. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in diesem Versuchsansatz die Toxizität von Benzethoniumchlorid stärker war als die von S-Ketamin.

Zusammenfassend sollte von der rückenmarksnahe Applikation von Benzethoniumchloridhaltigem Ketamin abgeraten werden. Leider müssen konservierungsmittelfreie S-Ketamin-Präparate bei 4 °C gelagert werden und bei Raumtemperatur innerhalb von 12 h verbraucht werden. Dies beschränkt die Anwendungsmöglichkeiten vor allem in der chronischen Schmerztherapie.

Unsere Ergebnisse zeigen außerdem, dass auch Midazolam in niedrigen Konzentrationen Apoptose an neuronalen und nicht neuronalen Zellen induziert, während höhere Konzentrationen vorwiegend zu Nekrose führen. Die durch Midazolam induzierte Apoptose wird ebenfalls über den mitochondrialen Signalweg vermittelt und ist unabhängig von der Todesrezeptor-vermittelten Kaskade. Die apoptotische Wirkung von Midazolam kann fast vollständig durch Caspase-Inhibitoren unterdrückt werden. Es zeigt sich zudem, dass der durch Midazolam induzierte apoptotische Effekte nicht oder nur unwesentlich von der Hemmung des GABA_A-Rezeptors beeinflussbar ist, was eine Beteiligung des Rezeptors an der Signalkaskade unwahrscheinlich macht.

Postoperativ wird Midazolam in Kombination mit Opioiden und Lokalanästhetika in einer Konzentration von 2 mg/ml (~6 mM) zur intrathekalen Schmerztherapie verwendet.^{73,74} Genaue Konzentrationen, die während dieser Anwendungen intrathekal auftreten sind leider unbekannt. Es ist jedoch bemerkenswert, dass im klinischen Gebrauch Medikamentenkonzentrationen verwendet werden, die um ein vielfaches über denen liegen, die in unseren *in vitro*-Modellen bereits zu signifikanter Toxizität führen. Eine mögliche Neurotoxizität von Midazolam nach rückenmarksnaher Verwendung wird bereits länger diskutiert.^{3,4} Die histologische Untersuchung verschiedener Rückenmarkssegmente nach intrathekaler Gabe von Midazolam führt zu morphologischen Schäden, die licht- und

fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sind, jedoch bislang nicht genauer beschrieben wurden.⁷⁵ Leider konnte bei diesen Untersuchungen der genaue Mechanismus der Toxizität nicht identifiziert werden. Bei Patienten führte die intrathekale Applikation von Midazolam jedoch bisher nicht zu neurologischen Schäden.⁷³

Hier konnte gezeigt werden, dass Midazolam konzentrations- und zeitabhängig Apoptose induziert und steigende Midazolamkonzentrationen zu Nekrose führen. Wie auch bei Ketamin und Lidocain,⁵¹ zeigen unsere Ergebnisse, dass die durch Midazolam induzierte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird und unabhängig von der Todesrezeptor-Kaskade ist. Es besteht ebenfalls ein scheinbarer Gegensatz zu den Ergebnissen von Yon et al., die zeigen, dass nach systemischer Gabe von üblichen Anästhetika Apoptose sowohl durch den mitochondrialen als auch durch den Rezeptor-vermittelten Signalweg induziert wird.⁶³ Aber auch hier lagen die systemisch in neugeborenen Ratten erreichten Plasmakonzentrationen weit unter denen, die bei lokaler Applikation von Midazolam erreicht werden. Auch bei dieser Untersuchung ist zu beachten, dass unsere Ergebnisse an entdifferenzierten Tumorzellen erhoben wurden und nicht an in der Synaptogenese befindlichen Zellen. Die in Tiermodellen beobachteten Midazolam-Effekte werden aller Wahrscheinlichkeit nach über den GABA_A-Rezeptor verursacht, da auch andere GABA_A-Rezeptor-Agonisten wie Propofol und Baclofen neurodegenerative Effekte hervorrufen.^{40,44} Bei den hier vorgestellten Ergebnissen scheint der GABA_A-Rezeptor jedoch keine spezifische Rolle bei der Apoptosekaskade zu spielen, d.h. die Toxizität von Midazolam ist unabhängig vom GABA_A-Rezeptor über den der analgetische Effekt vermittelt wird. Wie bei Ketamin und Lidocain scheint auch hier die Neurotoxizität unabhängig von ihrem eigentlichen Wirkmechanismus der Substanz zu sein.⁵¹

Offensichtlich bestehen bei dem hier untersuchten Modell Einschränkungen in der Übertragbarkeit der Daten auf die *in vivo*-Situation. So findet im *in vitro*-Modell mit Neuroblastomzellen im Gegensatz zu ausdifferenzierten Neuronen während der Behandlung mit Ketamin und Midazolam Zellteilung und Proliferation statt. Dennoch reagiert unser Modell mit humanen neuronalen Zellen schon empfindlich auf Ketamin- und Midazolamkonzentrationen, die geringer sind als solche, die in Tiermodellen und Patienten nach intrathekaler Gabe bereits zu neuronalen Schäden

führten. Es scheint also sensitiver gegenüber der Toxizität von Ketamin und Midazolam zu sein als ausdifferenzierte Zellen *in vivo*.^{5,7,62}

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Toxizität von Ketamin und Midazolam über den mitochondrialen Signalweg induziert wird, Benzethoniumchlorid die Toxizität erhöht und ein Pancaspaseinhibitor diese Toxizität aufheben kann. Daraus können keine direkten Schlüsse auf die klinische Situation gezogen werden. Dennoch ist es wichtig zu wissen, dass Midazolam, Ketamin, Lidocain und auch andere lokale Anästhetika Apoptose über denselben Signalweg induzieren.^{51,52} Es liegt nahe, dass sich die Toxizitäten der einzelnen Substanzen bei gemeinsamer Applikation addieren. Daher sollte man Kombinationen dieser Substanzen nur unter sehr strenger Indikationsstellung neuroaxial applizieren.

Um jedoch genauere Aussagen darüber machen zu können, in welchen Dosierungen und Konzentrationen und über welche Zeiträume Ketamin bzw. Midazolam sicher eingesetzt werden können, sind mehr tierexperimentelle und klinische Studien notwendig.

5. Zusammenfassung

Ketamin und Midazolam werden zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen rückenmarksnah eingesetzt. Trotz viel versprechenden klinischen Erfahrungen ist aus Tierexperimenten und Untersuchungen an Patienten bekannt, dass beide Substanzen lokal zyto- bzw. neurotoxisch wirken. Der Mechanismus der Neurotoxizität ist hingegen unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher *in vitro* an zum Teil genetisch veränderten nicht neuronalen und neuronalen Zelllinien dieser Mechanismus untersucht. So wurde die konzentrationsabhängige Toxizität der Medikamente und die Interaktion mit den verschiedenen Signalwegen der Apoptose durch unterschiedliche Methoden analysiert. Die spezifische Rolle der Rezeptoren wurde mittels des Stereoisomers S-Ketamin und dem GABA_A-Rezeptorantagonisten Flumazenil untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob das als Konservierungsmittel zugesetzte Benzethoniumchlorid die Toxizität von Ketamin erhöht.

Ketamin und Midazolam induzieren *in vitro* konzentrations- und zeitabhängig Apoptose in T-Lymphom- und Neuroblastomzellen. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit millimolaren Konzentrationen zu Apoptose führt, höhere Konzentrationen verursachen dagegen vorwiegend Nekrose. Diese Ergebnisse wurden durch Analyse der Caspase-Aktivierung und durch Einsatz eines Pancaspaseinhibitors bestätigt. Anhand von Zelllinien mit genetisch verändertem mitochondrialen und Todesrezeptor-vermitteltem Apoptoseweg, konnte gezeigt werden, dass Ketamin und Midazolam allein über den mitochondrialen Signalweg Apoptose induzieren.

Die Toxizität beider Substanzen wird weiterhin nicht über den spezifischen Rezeptor vermittelt. S-Ketamin und das Racemat Ketamin induzieren in gleichem Maße Apoptose. Somit ist der Effekt wahrscheinlich unabhängig vom NMDA-Rezeptor, an welchem das S-Isomer mehrfach stärker wirkt. Auch die durch Midazolam induzierte Toxizität ist nicht durch den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Flumazenil zu unterdrücken.

Benzethoniumchlorid, ein dem klinisch verwendeten KetanestS® beigefügtes Konservierungsmittel verstärkt außerdem die Toxizität von Ketamin signifikant.

Auch wenn keine direkten Schlüsse aus den hier erhobenen Befunden auf die klinische Situation gezogen werden können, sollte man dennoch Zurückhaltung bei der neuroaxialen Applikation beider Substanzen sowie eine strenge Indikationsstellung fordern. Klinisch werden Ketamin und Midazolam häufig zusammen mit Lokalanästhetika rückenmarksnah eingesetzt. Alle diese Substanzen induzieren Apoptose über den mitochondrialen Apoptoseweg. Das legt die Vermutung nahe, dass sie die Toxizität von Lokalanästhetika additiv verstärken. Um jedoch genauere Aussagen darüber machen zu können, in welchen Dosierungen und Konzentrationen und über welche Zeiträume Ketamin bzw. Midazolam sicher eingesetzt werden können, sind mehr tierexperimentelle und klinische Studien notwendig.

6. Literaturverzeichnis

1. Walker SM, Goudas LC, Cousins MJ, Carr DB: Combination spinal analgesic chemotherapy: a systematic review. *Anesth Analg* 2002; 95: 674-715
2. Hocking G, Cousins MJ: Ketamine in chronic pain management: an evidence-based review. *Anesth Analg* 2003; 97: 1730-9
3. Sandby TM, Sullivan G, Hall JE: A national survey into the peri-operative anaesthetic management of patients presenting for surgical correction of a fractured neck of femur. *Anaesthesia* 2008; 63: 250-8
4. Ho KM, Ismail H: Use of intrathecal midazolam to improve perioperative analgesia: a meta-analysis, *Anaesth Intensive Care* 2008; 36: 365-73
5. Malinovsky JM, Cozian A, Lepage JY, Mussini JM, Pinaud M, Souron R: Ketamine and midazolam neurotoxicity in the rabbit. *Anesthesiology* 1991; 75: 91-7
6. Yaksh TL, Tozier N, Horais KA, Malkmus S, Rathbun M, Lafranco L, Eisenach J: Toxicology profile of N-methyl-D-aspartate antagonists delivered by intrathecal infusion in the canine model. *Anesthesiology* 2008; 108: 938-49
7. Vranken JH, Troost D, de Haan P, Pennings FA, van der Vegt MH, Dijkgraaf MG, Hollmann MW: Severe toxic damage to the rabbit spinal cord after intrathecal administration of preservative-free S(+)-ketamine. *Anesthesiology* 2006; 105: 813-8
8. Ugur B, Basaloglu K, Yurtseven T, Ates U, Aydin ON, Ozenç D, Yurtseven M, Gürel A: Neurotoxicity with single dose intrathecal midazolam administration. *Eur J Anaesthesiol* 2005; 22: 907-12
9. Vranken JH, Troost D, Wegener JT, Kruis MR, van der Vegt MH: Neuropathological findings after continuous intrathecal administration of S(+)-ketamine for the management of neuropathic cancer pain. *Pain* 2005; 117: 231-5
10. Ivani G, De Negri P: New insights into paediatric regional anaesthesia: new drugs. *Curr Opin Anaesthesiol* 2001; 14: 353-7
11. De Negri P, Ivani G, Visconti C, De Vivo P: How to prolong postoperative analgesia after caudal anaesthesia with ropivacaine in children: S-ketamine versus clonidine. *Paediatr Anaesth* 2001; 11: 679-83

12. Hudetz JA, Pagel PS: Neuroprotection by Ketamine: A Review of the Experimental and Clinical Evidence. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009
13. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW: Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 189-97
14. Beals JK, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: Neurotoxicity of nitrous oxide and ketamine is more severe in aged than in young rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 993: 115
15. Malinovsky JM, Lepage JY, Cozian A, Mussini JM, Pinaudt M, Souron R. Is ketamine or its preservative responsible for neurotoxicity in the rabbit? *Anesthesiology* 1993;78:109-15.
16. Errando CL, Sifre C, Moliner S, Valia JC, Gimeno O, Minguez A, Boils P. Subarachnoid ketamine in swine--pathological findings after repeated doses: acute toxicity study. *Reg Anesth Pain Med* 1999;24:146-52.
17. Yip KW, Mao X, Au PY, Hedley DW, Chow S, Dalili S, Mocanu JD, Bastianutto C, Schimmer A, Liu FF. Benzethonium chloride: a novel anticancer agent identified by using a cell-based small-molecule screen. *Clin Cancer Res* 2006;12:5557-69
18. Fredriksson A, Ponte' n E, Gordh T, Eriksson P: Neonatal Exposure to a Combination of N-Methyl-Daspartate and α -Aminobutyric Acid Type A Receptor Anesthetic Agents Potentiates Apoptotic Neurodegeneration and Persistent Behavioral Deficits. *Anesthesiology* 2007; 107: 427–36
19. Mellon RD, Simone AF, Rappaport BA: Use of Anesthetic Agents in Neonates and Young Children. *Anesth Analg* 2007; 104: 509-520
20. Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW: Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62: 401-405
21. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF: Early Exposure to Common Anesthetic Agents Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Deficits. *J Neurosci.* 2003; 23: 876-882
22. Farber NB, Olney JW: Drugs of abuse that cause developing neurons to commit suicide. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 147: 37-45

23. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1): 1-16
24. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-90
25. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H: Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 2002; 21: 4520-30
26. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439-59
27. Bossy-Wetzell E, Green DR: Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 1999; 434: 243-51
28. Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 1999; 10: 629-39
29. Muravchick S, Levy RJ: Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 2006; 105: 819-37
30. Cory S, Huang DC, Adams JM: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-607
31. Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D: Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 2003; 39: 73-88
32. Antignani A, Youle RJ: How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 685-9
33. Jang S, Jeong HS, Park JS, Kim YS, Jin CY, Seol MB, Kim BC, Lee MC: Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against quinolinic acid-induced excitotoxicity via PI3K pathway and NO inhibition. *Brain Res.* 2010; 1313: 25-33
34. Gao X, Xu X, Pang J, Zhang C, Ding JM, Peng X, Liu Y, Cao JM: NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Physiol Res* 2007; 56: 559-569
35. Tseng WP, Lin-Shiau SY: Activation of NMDA receptor partly involved in beta-bungarotoxin-induced neurotoxicity in cultured primary neurons. *Neurochem Int* 2003; 42: 333-344

36. Han RZ, Hu JJ, Weng YC, Li DF, Huang Y: NMDA receptor antagonist MK-801 reduces neuronal damage and preserves learning and memory in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosci Bull* 2009; 25: 367-375
37. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience*. 2005; 135: 815-827
38. Hardingham GE: Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 1147-1160
39. Evstratova AA, Mironova EV, Dvoretzkova EA, Antonov SM: Apoptosis and the receptor specificity of its mechanisms during the neurotoxic action of glutamate. *Neurosci Behav Physiol* 2009; 39: 353-362
40. Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Arnao V, Renda C, Pinto A, Licata G: Neuron protection as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Curr Top Med Chem*. 2009; 9: 1317-1334
41. Ginsberg MD.: Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2008; 55: 363-389
42. Hall AC, Lieb WR, Franks NP: Stereoselective and non-stereoselective actions of isoflurane on the GABAA receptor. *Br J Pharmacol*. 1994; 112: 906-910
43. Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Möllenberg O, Mielke L, Kochs E: Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br J Anaesth*. 1999 Sep;83(3):415-21.
44. Berns M, Seeberg L, Schmidt M, Kerner T.: High-dose propofol triggers short-term neuroprotection and long-term neurodegeneration in primary neuronal cultures from rat embryos. *J Int Med Res*. 2009; 37: 680-688
45. Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W, Schulze-Osthoff K: Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 1181-1190
46. Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzler R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S: Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 4563-4573

47. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I: Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 29652-9
48. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J: Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998; 8: 1001-1008
49. Reddy UR, Venkatakrishnan G, Roy AK, Chen J, Hardy M, Mavilio F, Rovera G, Pleasure D, Ross AH: Characterization of two neuroblastoma cell lines expressing recombinant nerve growth factor receptors. *J Neurochem* 1991; 56: 67-74
50. Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM: Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4453-4460
51. Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P, Stevens MF: Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology* 2007; 107: 136-43
52. Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns H, Essmann F, Hollmann MW, Bauer I, Stevens MF: Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth* 2009; 103: 711-18
53. Chia YY, Liu K, Liu YC, Chang HC, Wong CS: Adding ketamine in a multimodal patient-controlled epidural regimen reduces postoperative pain and analgesic consumption. *Anesth Analg* 1998; 86: 1245-9
54. Tan PH, Kuo MC, Kao PF, Chia YY, Liu K: Patient-controlled epidural analgesia with morphine or morphine plus ketamine for post-operative pain relief. *Eur J Anaesthesiol* 1999; 16: 820-5
55. Choudhuri AH, Dharmani P, Kumarl N, Prakash A: Comparison of caudal epidural bupivacaine with bupivacaine plus tramadol and bupivacaine plus ketamine for postoperative analgesia in children. *Anaesth Intensive Care* 2008; 36: 174-9
56. Gunes Y, Secen M, Ozcengiz D, Gunduz M, Balcioglu O, Isik G: Comparison of caudal ropivacaine, ropivacaine plus ketamine and ropivacaine plus tramadol administration for postoperative analgesia in children. *Paediatr Anaesth* 2004; 14: 557-63

57. Ozbek H, Bilen A, Ozcengiz D, Gunes Y, Ozalevli M, Akman H: The comparison of caudal ketamine, alfentanil and ketamine plus alfentanil administration for postoperative analgesia in children. *Paediatr Anaesth* 2002; 12: 610-6
58. Gunduz M, Ozalevli M, Ozbek H, Ozcengiz D: Comparison of caudal ketamine with lidocaine or tramadol administration for postoperative analgesia of hypospadias surgery in children. *Paediatr Anaesth* 2006; 16: 158-63
59. Sator-Katzenschlager S, Deusch E, Maier P, Spacek A, Kress HG: The long-term antinociceptive effect of intrathecal S(+)-ketamine in a patient with established morphine tolerance. *Anesth Analg* 2001; 93: 1032-4, table of contents
60. Malinovsky JM, Lepage JY, Cozian A, Mussini JM, Pinaudt M, Souron R: Is ketamine or its preservative responsible for neurotoxicity in the rabbit? *Anesthesiology* 1993; 78: 109-15
61. Borgbjerg FM, Svensson BA, Frigast C, Gordh T, Jr.: Histopathology after repeated intrathecal injections of preservative-free ketamine in the rabbit: a light and electron microscopic examination. *Anesth Analg* 1994; 79: 105-11
62. Stotz M, Oehen HP, Gerber H: Histological findings after long-term infusion of intrathecal ketamine for chronic pain: a case report. *J Pain Symptom Manage* 1999; 18: 223-8
63. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 2005; 135: 815-27
64. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW: Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283: 70-4
65. Lodge D, Anis NA, Burton NR: Effects of optical isomers of ketamine on excitation of cat and rat spinal neurones by amino acids and acetylcholine. *Neurosci Lett* 1982; 29: 281-6
66. Zeilhofer HU, Swandulla D, Geisslinger G, Brune K: Differential effects of ketamine enantiomers on NMDA receptor currents in cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 1992; 213: 155-8

67. Sekino N, Endou M, Hajiri E, Okumura F: Nonstereospecific actions of ketamine isomers on the force of contraction, spontaneous beating rate, and Ca²⁺ current in the guinea pig heart. *Anesth Analg* 1996; 83: 75-80
68. Parsons CG, Panchenko VA, Pinchenko VO, Tsyndrenko AY, Krishtal OA: Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 446-54
69. Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, Krzascik P, Hartmann S, Danysz W: Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1239-58
70. Callahan RJ, Au JD, Paul M, Liu C, Yost CS: Functional inhibition by methadone of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes: stereospecific and subunit effects. *Anesth Analg* 2004; 98: 653-9
71. Sakura S, Bollen AW, Ciriales R, Drasner K: Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels. *Anesth Analg* 1995; 81: 338-348
72. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Frauscher S, Kirchmair L, Gerner P, Klimaschewski L: In vitro, lidocaine-induced axonal injury is prevented by peripheral inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase, but not by inhibiting caspase activity. *Anesth Analg* 2007; 105: 1657-64
73. Tucker AP, Lai C, Nadeson R, Goodchild CS: Intrathecal midazolam I: a cohort study investigating safety. *Anesth Analg*. 2004; 98: 1512-1520
74. Kim MH, Lee YM: Intrathecal midazolam increases the analgesic effects of spinal blockade with bupivacaine in patients undergoing haemorrhoidectomy. *Br J Anaesth*. 2001; 86: 77-79
75. Erdine S, Yücel A, Ozyalçın S, Ozyuvaci E, Talu GK, Ahiskali B, Apak H, Savci N: Neurotoxicity of midazolam in the rabbit. *Pain*. 1999; 80: 419-423
76. Miglio G, Varsaldi F, Lombardi G: Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1875-83

77. Alam S, Laughton DL, Walding A, Wolstenholme AJ: Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol Immunol* 2006; 43: 1432-42
78. Liu HT, Hollmann MW, Liu WH, Hoenemann CW, Durieux ME: Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part I. *Anesth Analg* 2001; 92: 1173-81
79. Braun S, Werdehausen R, Gaza N, Hermanns H, Kremer D, Küry P, Hollmann MW, Stevens MF: Benzethonium increases the cytotoxicity of S(+)-ketamine in lymphom, neuronal and glial cells *Anesth Analg* 2010; [epub ahead of print]

7. Danksagung

Ich danke allen, die mir mit ihrer Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn PD Dr. med. MARKUS F. STEVENS und Herrn Prof. PETER LIPFERT danke ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie für die Überlassung des Themas und die sehr engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. J. TARNOW sowie Herrn Prof. Dr. med. B. PANNEN danke ich für die freundliche Aufnahme als Doktorandin Ihrer Klinik.

Frau PD Dr. rer. nat. INGE BAUER danke ich für Ihre Unterstützung und Betreuung im Labor.

Ich möchte besonders Herrn Dr. med. SEBASTIAN BRAUN, Herrn Dr. med. ROBERT WERDEHAUSEN und Herrn Dr. med. HENNING HERMANNNS für ihre Hilfsbereitschaft, Zusammenarbeit und schöne Zeit im Labor danken.

CLAUDIA DOHLE, YVONNE GRÜBER und allen anderen Mitarbeitern im Labor danke ich für die vielfältige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. KLAUS SCHULZE-OSTHOFF und allen Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Medizin danke ich für die gute Kooperation und die Nutzung der Gerätschaften.

Von Herzen danke ich meiner Familie und besonders meinen Eltern BÄRBEL und FERDINAND GAZA, die mich zu jeder Zeit unterstützt und in meinen Entscheidungen bestärkt haben.

8. Lebenslauf

Persönliches

Geburtsname	Nina Gaza
Geburtsdatum	05.04.1984
Geburtsort	Mülheim a. d. Ruhr
Nationalität	deutsch

Ausbildung

1990-2003	Karl-Ziegler Gymnasium, Mülheim a. d. Ruhr Abitur (1,7)
08/2000-10/2000	Pelion High School, Pelion, South Carolina
2003-2009	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Studium der Humanmedizin
09/2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)
11/2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)

Haupttätigkeit

02/2010-02/2011	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie Lukaskrankenhauses Neuss
seit 03/2011	Klinik für Anästhesiologie Universitätsklinik Düsseldorf

Famulaturen und Praktisches Jahr

02/2006	Universitätsklinik Düsseldorf Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Prof. Dr. med. W. Budach
07-08/2006	Universitätsklinik Düsseldorf Famulatur in der Klinik für Anästhesiologie, Prof. Dr. med. B. Pannen
09-10/2006	Hospitationen (Buenos Aires, Niteroi/Rio de Janeiro)
03/2007	St. Joseph Medical Center, Houston, Texas Famulatur in der Chirurgischen Abteilung, Dr. T. Taylor
09/2007	Praxis/Klinik für Dermatologie Drs. von Schmiedeberg, Düsseldorf Praxisfamulatur Dermatologie

08/2008-12/2008	1. Tertial: Chirurgie Greenslopes Private Hospital, Brisbane, Australia Departement of General Surgery, Dr. Stephen Allison Kantonsspital Laufen, Basellandschaft, Schweiz Chirurgische Klinik, Dr. med. Wolfgang Jockers
12/2008-04/2009	2. Tertial: Innere Medizin Universitätsklinik, Inselspital Bern Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Prof. Bernhard Meier
04/2008-07/2009	3. Tertial: Anästhesiologie Universitätsklinik Düsseldorf Klinik für Anästhesiologie, Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Vorträge und Publikationen

Mechanismen der Ketamin-induzierten Apoptose an nicht-neuronalen und neuronalen Zellen
S. Braun, **N. Gaza**, R. Werdehausen, S. Fazeli, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Mechanismus der durch Midazolam induzierten Apoptose an T-Lymphom- und Neuroblastomzellen des Menschen
N. Gaza, S. Braun, R. Werdehausen, S. Fazeli, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Ketanest S® induziert mehr Apoptose als die Reinsubstanz S-Ketamin an T-Lymphomzellen und Neuroblastomzellen des Menschen durch den Zusatz von Benzethonium
S. Braun, **N. Gaza**, R. Werdehausen, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Ketamine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells.

Braun S, **Gaza N**, Werdehausen R, Hermanns H, Bauer I, Durieux ME, Hollmann MW, Stevens MF.

Br J Anaesth. 2010 Sep; 105(3): 347-54. Epub 2010 Jul 21.

Benzethonium Increases the Cytotoxicity of S(+)-Ketamine in Lymphoma, Neuronal, and Glial Cells.

Braun S, Werdehausen R, **Gaza N**, Hermanns H, Kremer D, Küry P, Hollmann MW, Stevens MF.

Anesth Analg. 2010 Dec; 111(6): 1389-93. Epub 2010 Oct 1.

Midazolam activates the intrinsic pathway of apoptosis independent of benzodiazepine and death receptor signalling.

Stevens MF, Werdehausen R, **Gaza N**, Hermanns H, Kremer D, Bauer I, Küry P, Hollmann MW, Braun S.

Reg Anesth Pain Med. 2011