

Aus der Klinik für Anästhesiologie

der Heinrich-Heine-Universität

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen

Kardiovaskuläre Stabilität während Xenon-basierter
Anästhesie – Welche Rolle spielt die NMDA-
Rezeptor-abhängige Wiederaufnahmehemmung von
Noradrenalin?

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julian Hipp

(2016)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: apl. Prof. Dr. Kienbaum

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hohlfeld

Meinen Eltern und Katharina Ziegler gewidmet.

In Gedenken an meinen Freund Sebastian Gerdes.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Neukirchen M, Hipp J, Schaefer MS, Brandenburger T, Bauer I, Winterhalter M, Kienbaum P, Werdehausen R (2012).

Cardiovascular stability and unchanged muscle sympathetic activity during xenon anaesthesia: role of norepinephrine uptake inhibition.

British Journal of Anaesthesia 109(6): 887-96.

I. Zusammenfassung

Fragestellung: Im Gegensatz zur Anwendung der meisten intravenösen und inhalativen Anästhetika sind Patienten unter Xenon-basierter Anästhesie hämodynamisch sehr stabil. Bei erhaltener efferenter Sympathikusaktivität, sympathischen Baroreflexen, systemisch vaskulärem Widerstand und Herzzeitvolumen ist der arterielle Blutdruck unverändert. Obwohl diese unter Xenon beobachtete hämodynamische Stabilität nicht mit einer Steigerung der efferenten Sympathikusaktivität einhergeht, ist die Konzentration des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin (NA) im Plasma nahezu verdoppelt.

Für das Anästhetikum Ketamin, das wie Xenon als Rezeptorantagonist an N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) wirkt, sind vergleichbare Kreislaufeffekte bekannt, die über eine rezeptorvermittelte Hemmung der Noradrenalintransporter zu einem gesteigerten Noradrenalin-spillover und Anstieg der NA-Plasmakonzentration führt.

Daher testeten wir die Hypothese, dass Xenon die NA-Wiederaufnahme *in vitro* durch einen NMDA-Rezeptor (NMDAR)-vermittelten Mechanismus hemmt.

Methoden: HEK 293 Zellen mit hNAT-, aber ohne NMDAR-Expression sowie humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y), die sowohl hNAT als auch NMDAR exprimieren, wurden für 20 min ohne Zusätze sowie mit Ketamin (1 mM), dem spezifischen NMDA-Antagonisten MK-801 (2 μ M) oder der Kombination aus NMDA (25 μ M) und Glycin (10 μ M) behandelt. Anschließend wurde die NA-Aufnahme nach Inkubation ohne oder mit Xenon (65%) bei 37°C für 20 min mittels eines fluorogenen Substrates des hNAT gemessen (n=4). Der unspezifische Anteil der Fluoreszenzintensität wurde durch Desipramin (5 μ M) bestimmt und subtrahiert.

Die Spezifität der Effekte auf die NA-Aufnahme wurde zusätzlich radiometrisch nach Inkubation mit 3 H-NA bestimmt (n=6).

Statistik: Mittelwert \pm SD, ANOVA, Bonferroni post hoc Test, p<0,05.

Ergebnisse: HEK 293 Wildtypzellen zeigten keine NA-Aufnahme. In hNAT-überexprimierenden HEK 293 Zellen wurde die NA-Aufnahme durch Ketamin gehemmt (-53% \pm 3), während Xenon, MK-801 sowie die Kombination von NMDA und Glycin zu keiner Veränderung führten.

Im Gegensatz dazu hemmte Xenon die hNAT-Aktivität in Neuroblastomzellen (-35% \pm 14). Während MK-801 (-48% \pm 16) und Ketamin (-87% \pm 10) die NA-Aufnahme ebenfalls reduzierten, hatte eine Kombination mit Xenon keinen additiven Effekt. Die Radiometrie bestätigte dies, wobei die Kombination von NMDA und Glycin den Effekt von Xenon aufhob.

Schlussfolgerungen: Xenon hemmt die NA-Aufnahme in NMDAR-exprimierenden humanen Neuroblastomzellen, während sich in Zellen ohne NMDAR kein Effekt zeigt. Im Gegensatz zu Ketamin, das auch ohne Anwesenheit von NMDAR die NA-Aufnahme durch einen direkten Antagonismus am hNAT partiell hemmt, hängt die Xenon-bedingte hNAT-Hemmung wesentlich von dem bekannten Antagonismus am NMDAR ab.

Dieser Mechanismus könnte für die Anstiege der NA-Plasmakonzentration unter Xenon-Anästhesie und die damit assoziierte hämodynamische Stabilität verantwortlich sein.

II. Abkürzungsverzeichnis

[³H]	Tritium
ADH	Antidiuretisches Hormon/Vasopressin
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DHPG	3,4-Dihydroxyphenylglycol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOPAL	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd
DOPEGAL	3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyd
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FiO₂	<i>Fraction of inspired oxygen</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
GABA_A	Ionotroper GABA _A -Rezeptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
hDAT	Humaner Dopamintransporter
HEK	<i>Human Embryonic Kidney 293</i> – Zellen
hNAT	Humaner Noradrenalintransporter
hSERT	Humaner Serotonintransporter
IP₃	Inositoltriphosphat
K	Kelvin
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin

MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	<i>mitogen-activated protein-Kinase</i>
MK-801	Dizocilpine
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PONV	<i>postoperative nausea and vomiting</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SH-SY5Y	Neuroblastom-Zelllinie
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
VMAT-2	Vesikulärer Monoamintransporter-2
wt	Wildtyp

III. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Intraoperative Hypotension	- 1 -
1.2 Blutdruckregulation	- 2 -
1.3 Beeinflussung des Blutdrucks durch Anästhetika	- 4 -
1.4 Xenon-basierte Anästhesie	- 5 -
1.4.1 Physikalische und chemische Eigenschaften von Xenon	- 6 -
1.4.2 Pharmakologische Eigenschaften von Xenon	- 6 -
1.4.3 Hämodynamische Veränderungen während Xenon-basierter Anästhesie	- 8 -
1.5 Physiologie der Katecholamine	- 11 -
1.5.1 Intrazellulärer Katecholaminmetabolismus	- 12 -
1.5.2 Der humane Noradrenalintransporter (hNAT)	- 14 -
1.5.3 Abbau der Katecholamine	- 15 -
2. Ziele der Arbeit	- 17 -
3. Material und Methoden	- 18 -
3.1 Reagenzien und Antikörper	- 18 -
3.2 Reverse Transkriptase-PCR	- 18 -
3.3 Western Blot	- 23 -
3.4 Zellkultur	- 24 -
3.5 Xenonapplikation	- 25 -
3.6 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen der hNAT-Aktivität	- 26 -
3.7 Messung der [³ H]-Noradrenalin-Aufnahme	- 28 -
3.8 Statistische Auswertungen	- 30 -
4. Ergebnisse	- 31 -
4.1 Untersuchungen der Expression des humanen Noradrenalintransporters und des NMDA-Rezeptors mittels RT-PCR und Western Blot	- 31 -
4.2 Fluoreszenz-basierte Untersuchung der hNAT-Aktivität	- 33 -
4.3 Messung der [³ H]-Noradrenalin-Aufnahme	- 36 -
4.4 Messungen der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der hNAT-Hemmung durch Xenon	- 39 -

5. Diskussion.....	- 41 -
5.1 Xenon hemmt die Noradrenalinwiederaufnahme über einen NMDA- Rezeptor-abhängigen Mechanismus	- 41 -
5.2 Bedeutung für die klinische Anästhesie	- 49 -
5.3 Ausblick	- 51 -
5.4 Methodenkritik.....	- 53 -
6. Schlussfolgerung.....	- 55 -
7. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	- 57 -

1. Einleitung

1.1 Intraoperative Hypotension

Arterielle Hypotension während Allgemeinanästhesie und operativen Eingriffen ist mit einer erhöhten Morbidität und Letalität assoziiert. Bisher ist allerdings unklar, ob hier ein Kausalzusammenhang besteht oder a priori schwerer erkrankte Patienten lediglich empfindlicher auf Anästhesie und den operativen Eingriff reagieren ^{1,2}.

In der Literatur werden verschiedene, uneinheitliche Definitionen der intraoperativen Hypotension genutzt ³. Je nach verwendeter Definition und verwendeten Grenzwerten variiert die Inzidenz der intraoperativen Hypotension von 5% bis 99% ^{4,5}.

Die intraoperative Hypotension ist assoziiert mit akutem postoperativen Nierenversagen ⁶, Myokardischämien und einer erhöhten Rate an perioperativen zerebralen Ischämien ⁷. Darüber hinaus besteht auch eine Assoziation zwischen perioperativer Letalität und intraoperativer Hypotension insbesondere bei Patienten, die mit ausgeprägten Blutdruckabfällen auf geringe Anästhetikadosen reagieren ^{8,9}.

Pathophysiologisch fällt während hypotensiver Phasen die Endorganperfusion und somit die Sauerstoffversorgung der Zellen der betroffenen Organe ab. Durch Minderperfusion können ischämische Endorganschäden hervorgerufen werden, wobei das Risiko mit steigender Dauer der Hypotension ansteigt.

Es kann allerdings keine sichere Zeitspanne für die Dauer einer tolerierbaren Hypotension angegeben werden. Auch nach kurz andauernden hypotensiven Phasen treten bereits postoperative Komplikationen wie das akute Nierenversagen und Myokardischämien gehäuft auf. Walsh et al, die Autoren einer 2013 in *Anesthesiology* veröffentlichten Studie, in welcher die Abhängigkeit postoperativer Komplikationen von intraoperativer Hypotension untersucht werden, schlagen auf Grund ihrer Resultate einen Grenzwert des mittleren arteriellen Druckes von 55 mmHg zur einheitlichen Definition der intraoperativen Hypotension vor ¹⁰.

Dieser Wert deckt sich unter anderem auch mit den Ergebnissen klassischer physiologischer Experimente zur Autoregulation der Nieren- und zerebralen

Durchblutung. Bei einem mittleren arteriellen Blutdruck oberhalb von 50-60 mmHg sind die Nieren und das zentrale Nervensystem in der Lage ihre Perfusion durch lokale Vasokonstriktion und -dilatation konstant zu halten ^{11, 12}. Unterhalb von 50-60 mmHg ist mit einer Minderperfusion dieser Organe zu rechnen ¹³.

Es muss festgehalten werden, dass intraoperative Hypotension ein unerwünschtes Ereignis während einer Allgemeinanästhesie ist. Sie sollte verhindert beziehungsweise nach ihrem Auftreten schnellstmöglich beendet werden, da sie mit einer erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate einhergeht ¹⁴.

1.2 Blutdruckregulation

Die Blutdruckregulation findet auf verschiedenen Ebenen statt. Es gibt eine lokale, eine hormonale und eine neuronale Kontrolle der Kreislauffunktion.

Die lokale Kreislaufregulation wird durch mehrere Mechanismen reguliert. Zum einen wird die blutdruckbedingte Wanddehnung der Arterien und Arteriolen durch eine Kontraktion der glatten Muskelzellen der Media beantwortet, so dass es zu einem konstanten Blutfluss in bestimmten Organen, z.B. den Nieren und dem Gehirn, kommt ^{11,12}. O₂-Mangel wirkt lokal gefäßerweiternd, so dass die Durchblutung und damit das Sauerstoffangebot steigen.

Einzig die Lungenstrombahn bildet hierbei eine Ausnahme. Der Euler-Liljestrand-Mechanismus sorgt über die sogenannte hypoxische Vasokonstriktion für eine Minderdurchblutung der schlecht ventilerten Lungenanteile und somit für eine Reduktion des Shuntvolumens in der Lungenstrombahn ¹⁵.

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die lokal-metabolische Regulation. Eine lokale Erhöhung von Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise CO₂, ADP, AMP, H⁺- und K⁺-Ionen vermittelt eine Vasodilatation präkapillärer Arteriolen. Dies führt zum einen zu einem verbesserten Sauerstoffangebot und zum anderen zu einem effektiveren Abtransport der Stoffwechselprodukte. Diese lokal-metabolische Regulation ist der wichtigste Mechanismus zur Steuerung der koronaren Durchblutung ¹⁶.

Die hormonale Kreislaufregulation erfolgt über in der Blutbahn zirkulierende Hormone. Diese wirken entweder selbst an Rezeptoren der Gefäßmuskulatur, wie etwa Adrenalin aus dem Nebennierenmark über α_1 -Rezeptoren, oder indirekt auf die Gefäßmuskulatur über eine Steigerung der Produktion lokal wirkender Substanzen wie Stickstoffmonoxid ein. An dieser Regulation sind eine Vielzahl von Hormonen wie Bradykinin, Kallidin, Prostaglandine und Thromboxan A₂, Endothelin, Histamin und Acetylcholin beteiligt.

Ein weiterer Mechanismus ist die neuronale Kreislaufregulation. Dieser Mechanismus wirkt über das vegetative Nervensystem auf den Gefäßtonus kleiner Arterien und großer Arteriolen im Hochdrucksystem. Über die Tonusänderung venöser Kapazitätsgefäße wird der venöse Rückstrom zum Herzen gesteuert.

Vermittelt wird die neuronale Kreislaufregulation über den Sympathikus. Ein erhöhter Sympathikotonus wirkt über eine Erhöhung der NoradrenalinKonzentration im synaptischen Spalt stimulierend auf G_q-gekoppelte α_1 -Rezeptoren, was wiederum über die Aktivierung der Phospholipase C zu einer IP₃-vermittelten Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur in der Gefäßwand führt. Ein nachlassender Sympathikotonus senkt den Gefäßtonus ¹⁷.

Der wichtigste Regulationsmechanismus der neuronalen Kreislaufkontrolle ist der sogenannte Baroreflex. Über Druckrezeptoren im Aortenbogen und in der A. carotis werden Änderungen des Blutdrucks registriert. Im Falle eines Blutdruckanstiegs wird die steigende Wandspannung durch die Aktivierung von Dehnungsrezeptoren gemessen und vermehrt afferente, hemmende Signale über den N. vagus zum Nucleus tractus solitarius in die Medulla oblongata transportiert. Nach zentraler Verarbeitung und Integration mit weiteren Signalen der hämodynamischen Situation des Organismus werden die Efferenzen über das sympathische Nervensystem zum Herz-Kreislaufsystem verringert ¹⁸. Somit resultieren eine erhöhte Sympathikusaktivität bei erniedrigten Blutdruckwerten und eine erniedrigte Sympathikusaktivität bei erhöhten Blutdruckwerten. Eine pharmakologisch-induzierte Senkung des diastolischen Blutdruckes von 78 mmHg auf 70 mmHg induziert beispielsweise eine Steigerung der muskulären Sympathikusaktivität auf 300% des Ausgangswertes ¹⁹.

Bei experimenteller lokalanästhetischer Blockade des N. vagus und N. glossopharyngeus kam es zu einem starken Anstieg der muskulären Sympathikusaktivität und klinisch zu einer Tachykardie und Hypertension der Probanden ²⁰. Dieses Experiment verdeutlicht die Bedeutung des Baroreflexes auf die Blutdruckregulation.

Neben den Druckrezeptoren im Hochdrucksystem liegen in den großen Venen und Herzvorhöfen Druckrezeptoren im Niederdrucksystem, welche den Volumenstatus und die Vorlast des Herzens registrieren. Über den sogenannten „Bainbridge-Reflex“ wird bei erhöhter Volumenbelastung durch eine Steigerung des Sympathikotonus und einen nachlassenden Parasympathikotonus eine Beschleunigung der Herzfrequenz und eine Steigerung der Inotropie erreicht ²¹.

Alle diese beschriebenen Mechanismen sorgen für kurzfristige Anpassungen des Blutdruckes an verschiedene Situationen. Beispielhaft zu nennen sind die Regulation in Ruhe, orthostatische Anforderungen und auch anästhesierelevante Situationen, wie beispielsweise Hypovolämien oder lagerungsbedingte Veränderungen der Hämodynamik.

Neben der kurzfristigen Regulation existiert eine mittelfristige Blutdruckregulation, welche vor allem über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflusst wird, und eine langfristige Blutdruckregulation.

Die langfristige Blutdruckregulation wird vor allem über den Volumenstatus des Körpers reguliert. Die Niere nimmt dabei eine zentrale Funktion ein. Die Diurese und der Volumenstatus des Körpers werden über Hormone gesteuert, die die Nierenfunktion beeinflussen. Wichtig sind insbesondere das atriale natriuretische Peptid (ANP), welches von Kardiomyozyten in den Herzvorhöfen produziert wird, und das Antidiuretische Hormon (ADH) aus der Neurohypophyse.

1.3 Beeinflussung des Blutdrucks durch Anästhetika

Allgemeinanästhesie hat einen großen Effekt auf die Kreislaufsituation. Neben den Auswirkungen der maschinellen Beatmung auf den Kreislauf ²² beeinflussen die meisten gebräuchlichen Anästhetika direkt die Vasomotorik und interferieren indirekt mit der sympathischen Kreislaufregulation ²³.

Beispielsweise schränkt Propofol die Blutdruckregulation über verschiedene Mechanismen ein. Zum einen verringert es die myokardiale Kontraktilität²⁴⁻²⁶ und senkt das Herz-Zeit-Volumen²⁷, zum anderen führt es über eine Vasodilatation zu einer Abnahme des total peripheren Widerstandes^{25, 26}.

Für diese Beobachtungen werden hauptsächlich zentrale, sympatholytische Mechanismen verantwortlich gemacht^{28, 29}, obwohl auch direkt vasodilatierende Effekte von Propofol beschrieben sind³⁰. Propofol senkt somit nicht nur den Blutdruck, sondern beeinflusst auch die reflexkontrollierten Blutdruckanpassungen über den Baroreflex.

Auch die weiteren gängigen Injektionsanästhetika, beispielsweise Thiopental und Midazolam, senken die Aktivität des sympathischen Nervensystems und interferieren mit dem Baroreflex²³.

Etomidate nimmt in der Gruppe der Injektionsanästhetika eine Sonderstellung ein, da es keinerlei Einfluss auf den Baroreflex und den Sympathikotonus ausübt³¹.

Auch die inhalativen Anästhetika interferieren mit der Kreislauffunktion. Alle inhalativen Anästhetika aus der Gruppe der Flurane setzen sowohl die Aktivität des sympathischen Nervensystems als auch die des Baroreflexes herab³². Desfluran, Isofluran und Sevofluran senken die myokardiale Kontraktilität und üben vasodilatierende Effekte aus^{33, 34}. Innerhalb dieser Gruppe unterscheiden sich die verschiedenen verwendeten Substanzen allerdings im Grad der Ausprägung der Wirkungen³⁵.

1.4 Xenon-basierte Anästhesie

Aufgrund seiner Eigenschaften kommt Xenon einem idealen Anästhetikum sehr nahe. Es bietet hämodynamisch-stabile Patienten, hat organprotektive Eigenschaften, schnelle An- und Abflutzeiten bei gleichzeitig fehlenden relevanten Nebenwirkungen. Daher könnte es gerade für ASA III-IV Patienten Vorteile im klinischen Alltag bieten.

1.4.1 Physikalische und chemische Eigenschaften von Xenon

Xenon ist das Element mit der Ordnungszahl 54, bei vollständig besetzten Elektronenschalen in der 8. Hauptgruppe gelistet und zählt somit zu den Edelgasen. Es ist bei Raumtemperatur ein geruch- und farbloses, reaktionsträges, einatomiges Gas.

Der Schmelzpunkt liegt bei 161,4 K (-111,7°C) und der Siedepunkt bei 165,2 K (-108°C). Es kommt natürlicherweise in der Erdatmosphäre mit einem Anteil von 0,09 ppm vor, ist damit das seltenste nicht-radioaktive Element auf der Erde.

Entdeckt wurde Xenon 1898 durch fraktionierte Destillation flüssiger Luft. Heutzutage erfolgt die Xenonproduktion durch das Linde-Verfahren, ein technisches Verfahren zur Gastrennung, aus Luft. Dabei wird für die Gewinnung eines Kubikmeters Xenon die Aufspaltung von rund 10.000.000 m³ Luft benötigt. Wegen dieses aufwendigen Produktionsprozesses liegen die Kosten, welche derzeit einen großen Nachteil von Xenon als Narkosegas darstellen, bei etwa 20 €/Liter Xenon.

Im Gegensatz zu anderen inhalativen Anästhetika trägt Xenon nicht zur Entwicklung des Treibhauseffektes bei.

1.4.2 Pharmakologische Eigenschaften von Xenon

Erstmalig beschrieben wurde die narkotisierende Wirkung von Xenon 1951³⁶. Es ist das einzige Edelgas mit narkotisierender Wirkung.

Der MAC-Wert von Xenon liegt bei etwa 65%. Dadurch und durch den geringen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten von 0,115 (Sevoflurane 0,69; Desflurane 0,42) bedingt kommt es zu sehr guter Steuerbarkeit der Narkose durch schnelles An- und Abfluten und kurze Einschlaf- und Aufwachphasen³⁷. Auch beeinflusst die Dauer der Narkose nicht die Aufwachzeit³⁸. Gleichzeitig kann allerdings, durch den hohen MAC-Wert bedingt, auch nur eine FiO₂ vor 0,3-0,4 gewährleistet werden.

Für eine zweistündige Narkose werden ohne Recycling des Xenons etwa 10-15 Liter benötigt, so dass bisher die Kosten einen wichtigen Faktor dafür darstellen, dass sich Xenon-basierte Anästhesie noch nicht zu einem Standardverfahren im klinischen Alltag durchgesetzt hat. Das könnte sich in

Zukunft durch die Einführung spezieller Narkosegeräte für eine Xenon-sparende Narkose ändern, welche den Xenonverbrauch signifikant senken können ³⁹.

Xenon zeigt vor allem hypnotische, aber auch schwache analgetische Wirkung. Außerdem ist Xenon arm an Nebenwirkungen. Vor allem wurden bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet ⁴⁰, lediglich werden eine erhöhte Rate an PONV gegenüber einer total intravenösen Anästhesie mit Propofol ⁴¹ und erhöhte Atemwegsdrücke, ausgelöst durch die im Vergleich zur Luft erhöhte Dichte und Viskosität beobachtet ⁴².

PONV wurde während einer neuen, multizentrischen Studie bei etwa einem Drittel der Patienten beobachtet. Die routinemäßig verabreichte PONV-Prophylaxe (Dexamethason und 5-HT-3-Antagonisten) scheint weniger effektiv zu sein, als es nach klassischer balancierter Anästhesie zu erwarten gewesen wäre ⁴³.

Der MAC-Wert liegt mit 63-71% deutlich über der MAC anderer Anästhetika ⁴⁴, wobei ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied bei Patienten mit einem Alter über 65 Jahren nachgewiesen werden kann. So benötigen Frauen dieser Altersgruppe mit 51,3% deutlich niedriger Xenonkonzentrationen als gleichaltrige Männer mit 69,3% ⁴⁵.

Seine anästhesierende Wirkung löst Xenon nicht durch eine Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren aus ⁴⁶, sondern durch die Hemmung von NMDA-Rezeptoren. So reduziert eine Konzentration von 80% Xenon den Stromfluss über den NMDA-Rezeptor um etwa 60% ^{47,48}. Daneben existieren allerdings weitere pharmakologische Angriffspunkte, so dass davon auszugehen ist, dass Xenon seine Wirkung, wie auch alle weiteren inhalativen Anästhetika, nicht über einen einzigen Mechanismus vermittelt ⁴⁰.

In der praktischen Durchführung wird eine Xenon-basierte Anästhesie in der Regel mit einer intravenösen Einleitung begonnen. Anschließend folgt eine Denitrogenisierung mit anschließendem Einwaschen des Xenons bis zum Erreichen einer Konzentration von 50-70%.

Aufrechterhalten wird die Narkose in low- oder minimal-flow als balancierte Anästhesie in der Regel in Kombination mit einem kurzwirksamen Opioid. Zum Ende der Narkose wird Xenon mit reinem Sauerstoff ausgewaschen, um eine Diffusionshypoxie zu verhindern.

1.4.3 Hämodynamische Veränderungen während Xenon-basierter Anästhesie

Wie bereits erwähnt, ist eine weitere entscheidende Eigenschaft der Xenon-basierten Anästhesie die hohe hämodynamische Stabilität der Patienten. Xenon hat als Narkosegas, im Gegensatz zu den anderen inhalativen Anästhetika, keinen negativen Effekt auf die Kreislauffunktion ⁴⁹⁻⁵².

Es werden sogar Blutdruck und Herzfrequenz steigernde Effekte von Xenon auf die Kreislaufsituation beobachtet ^{53, 54}.

In einer Studie von Baumert et al. an Patienten mit Herzinsuffizienz wurden eine Allgemeinanästhesie mit Xenon und Remifentanyl und eine total-intravenöse Anästhesie mit Propofol und Remifentanyl bezüglich der Veränderungen der Herzkreislaufsituation verglichen. Propofol senkte sowohl das Herz-Zeit-Volumen als auch den total peripheren Widerstand. Unter Xenonapplikation nahm ebenfalls das Herz-Zeit-Volumen leicht ab (der Unterschied war jedoch nicht signifikant) während der totale periphere Widerstand unter Xenon sogar zunahm. Des Weiteren wurde auch der Einfluss auf den mittleren arteriellen Druck untersucht. Dieser fiel unter Propofol signifikant ab, während die Druckverhältnisse unter Xenon erhalten blieben ⁵⁵. Eine große Studie mit 252 Patienten von Wappler et al. zeigte zudem, dass unter Xenon die linksventrikuläre Funktion vollständig erhalten bleibt, wohingegen diese erwartungsgemäß durch Isofluran reduziert wird ⁴⁹.

Nun stellt sich die Frage nach den Ursachen dieser beobachteten hämodynamischen Stabilität.

Die klinischen Eigenschaften einer Xenon-basierten Anästhesie sind vergleichbar mit den Eigenschaften einer Ketamin-basierten Anästhesie. Während einer Ketamin-basierten Anästhesie sind die Patienten ebenfalls hämodynamisch stabil, der Blutdruck steigt an und der Baroreflex ist erhalten ⁵⁶. Diese hämodynamisch stabilen Verhältnisse sind mit einer erhöhten Noradrenalinplasmakonzentration assoziiert ⁵⁷. Zudem senkt Ketamin die muskuläre Sympathikusaktivität. Dies ist am ehesten durch eine Inhibition des Baroreflexes aufgrund des erhöhten Blutdruckes zu erklären. Bei medikamentöser Senkung des Blutdruckes mit Natrium-Nitroprussid normalisiert sich der Baroreflex wieder und somit auch die muskuläre

Sympathikusaktivität. Der Baroreflex ist während einer Ketamin-basierten Anästhesie somit erhalten⁵⁸.

Aufgrund dieser hämodynamischen Eigenschaften ist Ketamin das Narkotikum der Wahl in präklinischen Notfallsituationen. Wegen des breiten Spektrums an unerwünschten anderen Wirkungen wird im klinischen Alltag jedoch anderen Injektionsanästhetika der Vorzug gegeben.

Auch unter Xenon-basierter Anästhesie werden erhöhte Plasmakatecholamin-konzentrationen beobachtet. Im Tierversuch zeigen sich beispielsweise stark erhöhte Adrenalin- und Noradrenalinplasmakonzentrationen. Nebenbefundlich liegen ebenfalls erhöhte Konzentrationen an Angiotensin II und Vasopressin (ADH) vor. Dies ist allerdings ebenfalls in den mit Isofluran/ N₂O und Isofluran/ Remifentanil behandelten Gruppen zu beobachten, während die Veränderungen der Plasmakatecholamine nur in der Xenon/ Remifentanil-Gruppe gemessen werden kann. Auch diese Studie bestätigt den unveränderten mittleren arteriellen Druck unter Xenon, während in den anderen Gruppen der mittlere arterielle Druck abfällt⁵⁹.

Man kann also eine Assoziation zwischen erhöhten Plasmakatecholaminkonzentrationen und erhaltenen Blutdruckverhältnissen auch für Xenon-basierte Anästhesie postulieren.

Durch welchen Mechanismus kommt es nun zur Erhöhung der Plasmakatecholamine?

Eine Möglichkeit wäre eine zentrale Steigerung des Sympathikotonus durch Xenon, da die Plasmakatecholaminkonzentrationen, wenn auch nur sehr grob, mit der Aktivität des sympathischen Nervensystems assoziiert sind⁶⁰.

Um diesen Effekt weiter aufzuklären und den Einfluss einer Komedikation mit Opiaten auszuschließen, wurden an der Klinik für Anästhesiologie der Universität Düsseldorf Untersuchungen an gesunden Probanden in Xenon-basierter Monoanästhesie durchgeführt. Durch die Untersuchung der muskulären Sympathikusaktivität, welche eng mit der kardialen und renalen sympathischen Innervation korreliert^{61, 62}, ist es möglich, die Auswirkungen von Xenon auf das sympathische Nervensystem zu untersuchen.

Entgegen der Erwartungen bleibt die muskuläre Sympathikusaktivität während Xenon-basierter Anästhesie unverändert. Trotzdem wird auch in dieser Studie von Neukirchen et al. ein signifikanter Anstieg des mittleren arteriellen Drucks,

eine konstante Herzfrequenz und deutlich erhöhte Noradrenalinplasmakonzentrationen beobachtet.

Ebenfalls beobachtet werden konnte ein erhaltener Baroreflex unter Xenon ⁶³.

Die Ergebnisse dieser Studie bilden die Grundlage zu der vorliegenden Arbeit, da sich die Fragestellungen aus dieser Untersuchung ableiten lassen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Xenon-basierte Allgemeinanästhesie sich durch einige Besonderheiten im Vergleich zu den konventionellen inhalativen Anästhetika auszeichnet:

- Erhaltene arterielle Blutdruckverhältnisse ⁵⁵
- Erhaltener Baroreflex ⁶³
- Unveränderte muskuläre Sympathikusaktivität ⁶³
- Erhöhte Noradrenalin- und Adrenalinplasmakonzentrationen ^{59, 63}

1.5 Physiologie der Katecholamine

Nun stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, durch den es während Xenon-basierter Anästhesie zu einem Anstieg der Noradrenalin- und Adrenalinplasmakonzentrationen kommt. Dazu muss man zunächst den physiologischen Metabolismus der Katecholamine betrachten, um mögliche pharmakologische Mechanismen zur Erklärung der erhöhten Noradrenalinplasmakonzentrationen ableiten zu können.

Die Katecholamine sind eine Gruppe von Hormonen, welche aus der Aminosäure Tyrosin gebildet werden und wichtige physiologische Funktionen als postganglionäre Transmitter des sympathischen Nervensystems und als zentralnervöse Transmitter einnehmen. Zu den Katecholaminen zählen Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, wobei im Rahmen der kardiovaskulären Regulation vor allem Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen und Adrenalin (und zu einem deutlich geringeren Teil auch Noradrenalin) aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks eine große Rolle spielen ⁶⁴.

1.5.1 Intrazellulärer Katecholaminmetabolismus

In den sympathischen Nervenzellen wird Noradrenalin aus Tyrosin, L-DOPA und Dopamin synthetisiert und in Vesikeln gespeichert.

Abbildung 1:

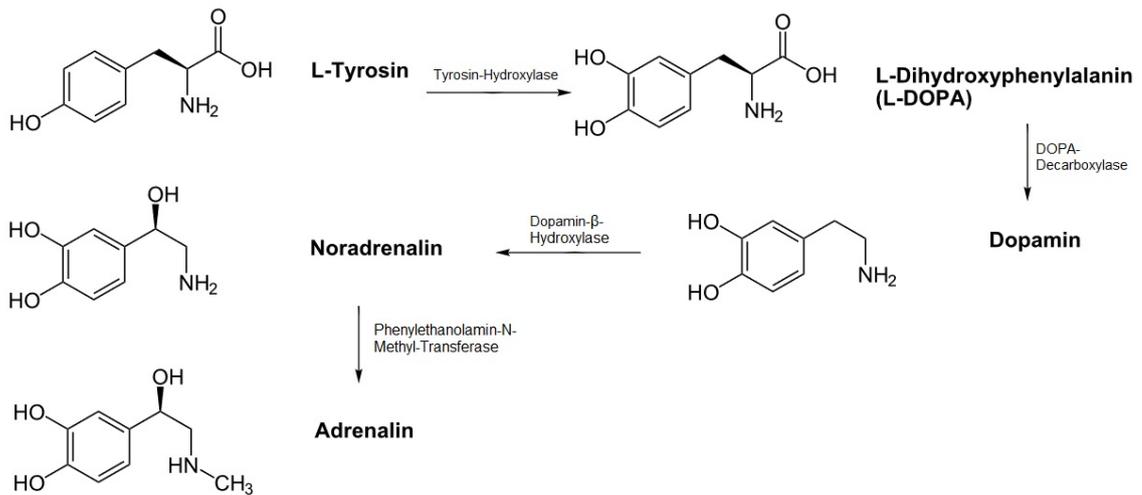


Abb. 1: Biochemische Synthese der Katecholamine

Die Abbildung zeigt den Syntheseweg der Katecholamine ausgehend von der Aminosäure L-Tyrosin. Zunächst erfolgt die Hydroxylierung des L-Tyrosins zu L-DOPA, welches anschließend zu Dopamin decarboxyliert wird. Danach erfolgt die Hydroxylierung zu Noradrenalin, welches abschließend zu Adrenalin methyliert wird.

Anschließend erfolgt bei Erregung der Nervenzelle die Exozytose des Noradrenalins in den synaptischen Spalt, wo es durch Bindung an Rezeptoren seine Wirkung auf die postsynaptische Membran ausübt.

Beendet wird das zelluläre Signal durch Entfernung des Noradrenalins aus dem synaptischen Spalt. Dazu stehen zwei Mechanismen zur Verfügung. Zum einen diffundiert ein geringer, überschüssiger Teil ab und wird anschließend extraneural metabolisiert oder gelangt in den Blutstrom. Der mit über 90% weitaus größere Teil wird über den humanen Noradrenalintransporter (hNAT) durch Wiederaufnahme in die sympathische Nervenzelle entfernt.

Abbildung 2:

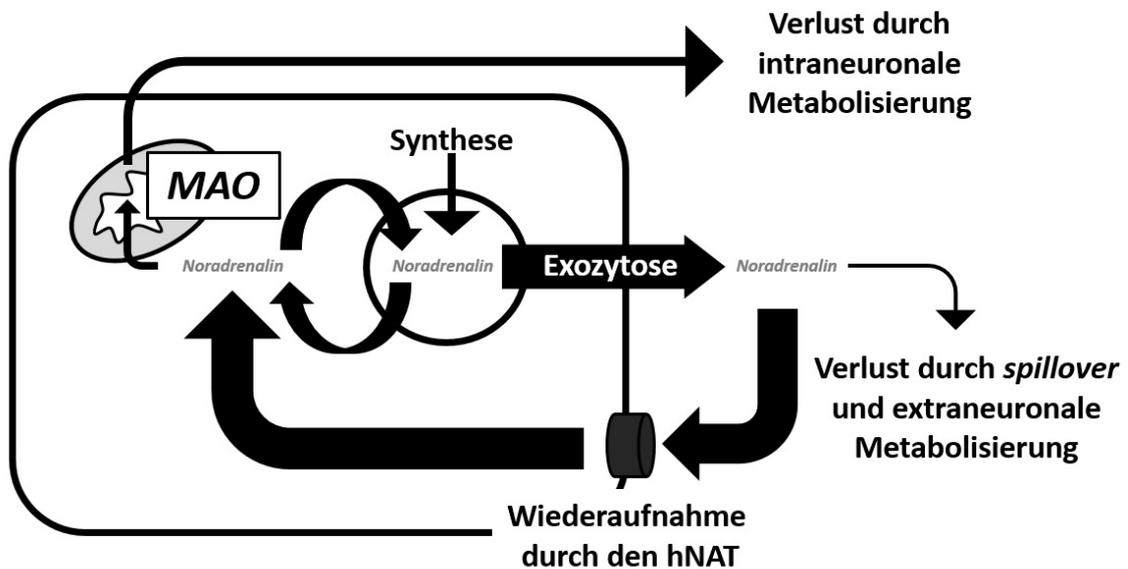


Abb. 2: Nach Eisenhofer et al. - *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*⁶⁵.

Die Speicherung der Katecholamine in Vesikeln stellt einen dynamischen Prozess dar, zwischen Transport in das Vesikel durch den Vesikulären Monoamintransporter-2 (VMAT-2) und Leckage besteht ein Gleichgewicht. Durch Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt wird das Signal ausgelöst, durch Wiederaufnahme in die präsynaptische Zelle wird das Signal beendet. Nur ein sehr geringer Teil des freigesetzten Noradrenalins entgeht der Wiederaufnahme und kann systemische Wirkung durch Steigerung der Noradrenalinkonzentration im Blut entfalten.

Dieser Mechanismus bietet große funktionelle Reserven und kann auch bei starker Exzitation die Freisetzung weiterhin zum größten Teil kompensieren. Nach der Wiederaufnahme steht das Noradrenalin für weiteren Metabolismus erneut zur Verfügung. Entweder wird das Noradrenalin durch den vesikulären Monoamin-Transporter-2 erneut in Vesikel transportiert und steht anschließend wieder zur Exozytose und Reizübertragung zur Verfügung, oder es wird über die Monoaminoxidase (MAO) metabolisiert und als 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG) über den Blutstrom abtransportiert.

Die sympathischen Nervenzellen haben, im Gegensatz zu den Zellen des Nebennierenmarks und den extraneuronalen Zellen, keine eigene Catechol-O-Methyltransferase (COMT), so dass beim Abbau von Noradrenalin kein Normetanephrin sondern DHPG entsteht.

In der Realität stellt sich das System als deutlich dynamischer dar, da aus den Vesikeln ein sehr großer Anteil durch Leckage ins Zytoplasma entweicht und zurücktransportiert oder metabolisiert werden muss ⁶⁵.

Die Überschussrate (*spillover*) von Noradrenalin hängt von verschiedenen Faktoren ab. Entscheidend ist die Rate an Exzitationen der Nervenendigungen, der Blutfluss, die Kapillarpermeabilität und die Wiederaufnahmerate durch den hNAT ⁶⁶.

1.5.2 Der humane Noradrenalintransporter (hNAT)

Eine zentrale Aufgabe im Katecholaminmetabolismus kommt dem Noradrenalintransporter zu. Die Reizweiterleitung im synaptischen Spalt geschieht durch Exozytose von Noradrenalin oder Adrenalin aus der präsynaptischen Zelle und Bindung der Katecholamine an Katecholaminrezeptoren auf der postsynaptischen Membran.

Durch die Wiederaufnahme von Noradrenalin in die präsynaptische Zelle wird dieser Reiz auf die postsynaptische Zelle beendet und gleichzeitig das Noradrenalin im Sinne ökonomischer Ausnutzung zellulärer Ressourcen wiederverwertet.

Der humane Noradrenalintransporter (hNAT) gehört mit dem humanen Dopamintransporter (hDAT) und dem humanen Serotonintransporter (hSERT) zur Familie der Monoamintransporter und besteht aus 12 Transmembrandomänen.

Der Transport von Noradrenalin erfolgt als Na⁺-abhängiger Kotransport und wird durch den Na⁺-Gradienten angetrieben, welcher durch die Na⁺-K⁺-ATPase aufgebaut wird ⁶⁷. Das humane NAT-Gen (SLC6A2, NET-1) liegt auf Chromosom 16q12.2 und kodiert für das 612 Aminosäuren große Protein ⁶⁸.

Reguliert wird die Aktivität des Transporters vor allem durch Phosphorylierung des Transporters und durch Endozytose der Transporter oder vermehrte Expression auf der Zellmembran. Vermittelt wird die Hemmung des hNAT über die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und die Proteinkinase C, dieser Mechanismus wird vor allem durch Internalisierung des Rezeptors vermittelt, und cAMP. Aktivierend auf die hNAT-Aktivität wirken unter anderem Insulin, p38 MAPK, Ca²⁺-Calmodulin mit Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen Kinasen ^{67, 69}.

Durch die zentrale Funktion des hNAT in der zentralen und peripheren Regulation des Noradrenalin-Systems können auch schon geringe Veränderungen in der Aktivität des hNAT zu tiefgreifenden Veränderungen der Regulation des kardiovaskulären Systems führen. Ein Beispiel dafür ist das sogenannte posturale Tachykardiesyndrom, bei dem es durch eine Mutation des hNAT zu einer erhöhten Noradrenalinplasmakonzentration und daraus resultierend zur Entwicklung einer Tachykardie kommt, die vor allem im Stehen auftritt⁷⁰.

Außerdem können hNAT-Inhibitoren wie Reboxetin, Sibutramin und Desipramin zur Therapie hypoadrenerger Zustände genutzt werden. Ein Beispiel ist der therapeutische Einsatz bei schweren Fällen vasovagaler Synkopen⁷¹.

1.5.3 Abbau der Katecholamine

Der primäre Abbauschritt der Katecholamine ist die oxidative Desaminierung und wird durch die Monoaminoxidase (MAO) katalysiert. Dabei entstehen desaminierte Aldehyde. Aus Dopamin entsteht 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (DOPAL) und aus Noradrenalin und Adrenalin entsteht als gemeinsamer Abbauprodukt 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyd (DOPEGAL). Der zweite Schritt wird entweder durch die Aldehyddehydrogenase oder durch die Aldehydreduktase katalysiert, wobei das nicht β -hydroxylierte Dopamin zum größten Teil über die Aldehyddehydrogenase zu einer Säure, dem 3,4-Dihydroxyphenylacetat, abgebaut wird, während der Abbauweg der β -hydroxylierten Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin hauptsächlich über die Aldehydreduktase vom DOPEGAL zu 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG) verläuft, also über die Entstehung eines Alkohols. Dieses wird über die COMT zu 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol (MHPG) methyliert und kann anschließend als Abbauprodukt von Noradrenalin und Adrenalin im Blut nachgewiesen werden. Parallel entsteht über die Aldehyddehydrogenase 3,4-Dihydroxymandelsäure, dieser Abbau ist allerdings im Vergleich zum Abbau über DHPG nur sehr gering ausgeprägt. Außerdem können Noradrenalin und Adrenalin direkt über die COMT zu Normetanephrin und Metanephrin metabolisiert werden. Dieser Abbau findet vor allem im Nebennierenmark statt. Der wichtigste Endmetabolit des Abbaus von Noradrenalin und Adrenalin ist Vanillinmandelsäure⁷². Die bisher dargestellten Schritte des

Katecholaminmetabolismus finden zum größten Teil direkt in der Zelle statt, in der die Katecholamine auch gebildet wurden, also in den postganglionären Nervenzellen des sympathischen Nervensystems und in den Zellen des Nebennierenmarks. Die Bildung von Vanillinmandelsäure findet hingegen hauptsächlich in der Leber statt ⁷³. Dabei wird der bei weitem größte Teil mit 87% der Vanillinmandelsäure aus zirkulierendem MHPG, 11% direkt aus Noradrenalin und Adrenalin und nur 2% aus Normetanephrin und Metanephrin gebildet ⁷⁴.

Über die Alkoholdehydrogenase wird MHPG zunächst zu 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycolaldehyd umgeformt ⁷⁵ und anschließend durch die Aldehyddehydrogenase zu Vanillinmandelsäure oxidiert, welches letztendlich über den Urin ausgeschieden wird.

Über welche Mechanismen kommt es nun bei gleichbleibender muskulärer Sympathikusaktivität zu einem Anstieg der Noradrenalinplasmakonzentration? Aus den physiologischen Grundlagen kann man nun verschiedene hypothetische Mechanismen ableiten:

- Eine erhöhte Ausschüttung von Noradrenalin ⁷⁶
- Eine verringerte Wiederaufnahme von Noradrenalin durch den hNAT ⁶³ mit nachfolgender Steigerung des Noradrenalinspillovers
- Eine Hemmung des intraneuralen oder des hepatischen Abbaus der Katecholamine

Yoshida et al. fanden *in vivo* durch Mikrodialyse im limbischen System von Ratten und *in vitro* im Medium neuronaler Zellen jeweils erhöhte extrazelluläre NoradrenalinKonzentrationen während einer Xenonapplikation ⁷⁶.

Aufgrund der durchgeführten Experimente kann allerdings nicht zwischen einer erhöhten Ausschüttung oder einer verringerten Wiederaufnahme oder auch einer Kombination beider Effekte unterschieden werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, diese Frage besser beantworten zu können.

2. Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von Xenon auf die Wiederaufnahme von Noradrenalin über den humanen Noradrenalintransporter hNAT *in vitro*.

Die klinischen Versuche von Neukirchen et al. an Probanden zeigen erhöhte Noradrenalinplasmakonzentrationen bei gleichbleibender muskulärer Sympathikusaktivität ⁶³, so dass eine Veränderung des Noradrenalin-metabolismus als Ursache vermutet werden kann.

Aufgrund der ähnlichen klinischen Eigenschaften von Ketamin und Xenon und der ebenfalls bei beiden Substanzen erhöhten NoradrenalinKonzentration im Plasma könnten beide Substanzen über denselben Mechanismen ihre Wirkung auf die hämodynamische Situation ausüben. Von Ketamin ist sowohl ein Antagonismus am Noradrenalintransporter bekannt ⁷⁷, als auch ein Antagonismus am NMDA-Rezeptor. Ebenso ist bekannt, dass Xenon den NMDA-Rezeptor hemmt ⁴⁸.

Nicht bekannt ist bisher die Wirkung von Xenon auf den humanen Noradrenalintransporter (hNAT).

Neben einem möglichen direkten Effekt auf die Aktivität des Noradrenalintransporters soll auch ein indirekter Effekt durch den bereits bekannten Antagonismus am NMDA-Rezeptor überprüft werden.

Untersucht werden kann dies über verschiedene Experimente mit Zellkulturen. Um direkte Effekte auf den hNAT zu untersuchen, werden HEK 293-Zellen, die mit hNAT stabil transfiziert sind und keine NMDA-Rezeptoren exprimieren, eingesetzt.

Um zusätzlich einen indirekten Einfluss von Xenon auf die Funktion von Noradrenalintransportern zu untersuchen, werden humane Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) verwendet, welche sowohl Noradrenalintransporter als auch NMDA-Rezeptoren exprimieren.

Zusätzlich untersucht werden soll eine mögliche Konzentrations-Wirkungsbeziehung der beobachteten Effekte.

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Antikörper

Alle verwendeten Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, über die Firma Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Noradrenalin wurde in der klinisch verwendeten Form als Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol, Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland) erworben.

Das Neurotransmitter-Uptake-Assay-Kit wurde bei Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) erworben. Hank's balanced salt solution (HBSS) und phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurden über Gibco Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) erworben. Die Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold wurde bei PerkinElmer (Waltham, MA, USA) erworben.

Als primäre Antikörper für die Western Blot-Analyse wurden murine monoklonale anti-Noradrenalin-Transporter-Antikörper (cat. no. MAB 5620; Millipore, Billerica, MA, USA) und anti-NMDA-R1-Antikörper vom Kaninchen (cat. no. 5704; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden die Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-AK (Jackson Immunolab, Dianova, Hamburg, Deutschland) und Maus-AK (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) verwendet.

3.2 Reverse Transkriptase-PCR

Trotz der bereits bekannten Proteinexpression der verwendeten Zelllinien wurden zur Sicherung der Expression des hNAT und des NMDA-Rezeptors eine RT-PCR und ein Western Blot durchgeführt. Diese wurde nach Standardprotokollen der Experimentellen Anästhesiologie der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt und sind bereits häufig publiziert worden ⁷⁸.

Zur Durchführung der RT-PCR erfolgte zunächst die Isolierung der RNA aus den Zellen, welche zuvor bei -80°C aliquotiert und gelagert worden waren.

Die Isolierung der Proben erfolgte nach der Trizol-Methode, welche 1987 von Chomczynski und Sacchi publiziert wurde⁷⁹. Die Proben wurden dabei in Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), einer Mischung aus Phenol und Guanidin-Isocyanat homogenisiert und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Chloroform (VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich) hinzugegeben und die Proben für 15-20 Minuten bei 13.000 G und 4°C zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase übertragen, 0,5 ml Isopropylalkohol hinzugegeben und nach einer erneuten Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 12.000 G und 4° C für 30 Minuten.

Dann wurde der Überstand verworfen und das Pellet, in dem sich nun die RNA befand, mit Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemischt, gevortext und anschließend bei 7.500 G und 4° C für 5 Minuten erneut zentrifugiert. Dann wurde der Überstand erneut verworfen, das RNA-haltige Pellet unter dem Abzug getrocknet und dann anschließend bei 70° in RNase-freiem Wasser aufgelöst.

Anschließend konnte die auf diese Weise isolierte RNA erneut bei -80°C gelagert werden.

Die Reinheit der isolierten RNA wurde danach durch das Nanodrop 1000-Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) gemessen. Durch Absorptionmessung bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge war es möglich die Reinheit der RNA zu bestimmen.

Bevor durch die *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) die zu untersuchende DNA amplifiziert werden konnte, musste die in den vorherigen Schritten isolierte RNA zu cDNA transkribiert werden. Dies erfolgte durch reverse Transkription. Hierzu wurden sogenannte *Random Primer* (Promega Technical Bulletin Part #099, Madison, WI, USA), also unspezifische Oligonukleotide, benutzt.

Dazu wurden zunächst 6 µg RNA mit 1,5 µl *Random Primer* für 5 Minuten auf 70° C erhitzt.

Anschließend wurde dieser RNA-Mix wie folgt pipettiert:

M.MLV 5 x Puffer	15 µl
dNTPs (je 10mM)	3,75 µl
RNase-Inhibitor	2,25 µl
M-MLV-Reverse-Transkriptase	3 µl

(alle Produkte, Promega, Madison, WI, USA)

Dieses Gemisch wurde dann zu der RNA und dem *Random Primer* hinzugegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 75 µl aufgefüllt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit lief die reverse Transkription ab. Die dabei entstehende cDNA konnte nun für die PCR benutzt werden.

Die klassische PCR besteht aus drei aufeinander folgenden Schritten: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation.

Zunächst werden bei 94° C die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Einzelstränge getrennt. Die DNA liegt anschließend in Einzelsträngen vor. Danach wird das Gemisch auf 55° C abgekühlt. Nun binden die spezifischen *Primer* an die bekannten Nukleotidsequenzen der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte.

Folgende Primersequenzen wurden verwendet:

- hNAT: 5'-GGATTGATGCCGCAACTCAGA-3'
- hNAT_rev: 5'-GGCCTCTGGATACAGGATGA-3' (306 bp, 35 Zyklen)
- NMDA-R NR1-Untereinheit: 5'-AACCTGCAGAACCGCAAG-3'
- NMDA-R NR1-Untereinheit_rev: 5'-GCTTGATGAGCAGGTCTATGC-3' (333bp, 35 Zyklen)
- GAPDH: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
- GAPDH_rev: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGT-3' (451 bp, 25 Zyklen)

Die *Primer* dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt zur Synthese des Komplementärstranges.

Der Versuchsansatz für die PCR wurde wie folgt pipettiert:

10x EZ Puffer	2,5 µl
dNTP (2,5 mM) (Axon, Kaiserslautern)	1 µl
Taq-Polymerase (Axon, Kaiserslautern)	0,25 µl
Magnesiumchlorid (25mM) (Axon, Kaiserslautern)	2 µl
<i>Primer forward</i>	0,5 µl
<i>Primer reverse</i>	0,5 µl
DNA	1 µl
RNase-freies Wasser	auf 25 µl

Anschließend wurde die PCR im Thermozykler (C1000, Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt:

<i>Initial Step</i>	95° C	15 min	
<i>Melt</i>	95° C	30 sec	<i>Wiederholung</i>
<i>Anneal</i>	59° C	30 sec	<i>In</i>
<i>Extend</i>	72° C	45 sec	<i>25 - 35 Zyklen</i>
<i>Final Step</i>	72° C	10 min	

Es wurden 35 Zyklen für die hNAT und NMDA-R-NR1-Untereinheit und 25 Zyklen für die GAPDH durchgeführt.

Als letzter Schritt erfolgte die Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte in 1,5%igen Agarose-Gel. Dazu wurde das Gel durch Aufkochen von Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer hergestellt. Anschließend wurde Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen.

Nun Verdünnung von 25 µl der PCR-Produkte mit 5 µl Orange G. Danach wurden die PCR-Produkte auf das Gel aufgetragen und in TAE-Puffer bei 80 V aufgetrennt.

Das Ergebnis wurde unter UV-Licht mit einer Digitalkamera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) dokumentiert.

Gel-Herstellung

Agarose (Carl Roth, Karlsruhe)	1 g
1x TAE Puffer	50 ml
Ethidiumbromid	1 µl

Marker

10 kbp-Marker (Carl Roth, Karlsruhe)	1 µl
Orange G (Chroma/Waldeck, Münster)	2 µl
H ₂ O	9 µl

10 x TAE Puffer

Sigma 7-9 0.04 M	48,4 g
EDTA Na-Salz 0.001 M	4,16 g
Eisessig	11,42 ml
Aqua dest.	auf 1000 ml

(autoklavieren, für 1x TAE Puffer 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnen)

3.3 Western Blot

Neben des RT-PCR Nachweises der Rezeptor- und Transporterexpression der Zellen wurde auch eine Western Blot-Untersuchung zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt.

Für den Western Blot wurde zunächst eine Ganzzelleextraktion durchgeführt. Das nach Zellablösung gewonnene Zellpellet wurde mit einem Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der hierbei verwendete Lysepuffer besteht aus 10 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Sigma 7-9), 1mM Na-EDTA, 400 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5% NP40, 40µl/ml Complete und 1 mM DTT.

Nach der Lysierung der Zellen wurde die Lösung für 10 Minuten bei 4°C und 16060 G zentrifugiert und anschließend der Überstand weiter bearbeitet. Nun erfolgte die Bestimmung des Proteinanteils nach Lowry zur Normalisierung der Proben ⁸⁰.

Dazu wurden drei Lösungen angesetzt. Reagenz A besteht aus 10 g Na₂CO₃ und 2 g NaOH in 500 ml Aqua dest., entsprechend einer 0,1M NaOH-Lösung, Reagenz B aus 2 g K-Na-Tartrat in 100 ml Aqua dest. und Reagenz C aus 1 g Cu-Sulfat (CuSO₄ x 5 H₂O) in 100 ml Aqua dest.

Nun wurde eine Lösung bestehend aus 20 ml Reagenz A und je 20 µl Reagenz B und C hergestellt. Anschließend erstellte man eine Eichreihe, basierend auf 20 µg/ml bovinem Serumalbumin in aufsteigender Verdünnungsreihe als Standard. Anschließend wurden die Proben 1:100 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend je 100 µl Probe mit 500 µl der oben beschriebenen Lösung gemischt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Proben mit 50 µl einer zweiten Lösung, bestehend aus einem 1:1 Gemisch aus Folins-Reagens und Aqua dest., gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Proben auf eine 96-Well-Platte übertragen und im Plate Reader (Synergy 2; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ausgelesen. Die Gelelektrophorese der Proteine erfolgte nun in der Methode nach Lämmli ⁸¹. Dazu wurden je 50 µg Protein auf ein 10%iges SDS-Page-Elektrophoresegel aufgetragen. Zuvor wurden die Proben 1:2 mit *Loading Buffer* verdünnt und anschließend 1:10 mit Mercaptoethanol durchmischt und 5 Minuten bei 95°C

denaturiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 400 mA bis zum Erreichen einer Laufstrecke von 8 cm. Als Marker zur Molekülgewichtsreferenz wurde die *Biotinylated Protein Ladder* von Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) verwendet, welche eine Skalierung von 9 – 200 kDa bietet.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) in Western Blot-Transferpuffer für 60 Minuten bei einer Stromstärke von 220 mA und einer Temperatur von 4°C. Anschließend wurde die Membran in einer 5%igen *Blocking Solution* (50 g Trockenmilchpulver in 1000 ml TBS-T) für mindestens 2 h blockiert.

Danach wurde die Membran über 12 h unter ständiger Bewegung mit dem 1. Antikörper in 1%iger *Blocking Solution* inkubiert. Nach dem Abschluss dieser Inkubationszeit wurde die Membran aus der Lösung mit dem 1. Antikörper entfernt, dreimalig für 10 Minuten mit TBS-T bei 4°C gewaschen und anschließend der 2. Antikörper hinzugegeben, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist.

Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde auch diese Reagenz entfernt und die Membran erneut dreimalig für 10 Minuten bei 4°C mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einer ECL-Reagenz (Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland) bedeckt und nach einer Minute im Geldokumentationssystem abgelichtet.

3.4 Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden zwei Zelllinien der *human embryonic kidney cells* (HEK 293) verwendet. Zum einen die Wildtypvariante (HEK 293 wt) und zum anderen eine Zelllinie, welche nach Transfizierung den humanen Noradrenalintransporter (hNAT) stabil überexprimiert (HEK 293 hNAT).

Des Weiteren wurden die humanen Neuroblastom-Zellen SH-SY5Y (ATCC® Nummer CRL-2266) eingesetzt. Alle Zellkulturen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kultiviert.

Das Medium wurde ergänzt durch den Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2mM L-Glutamin und je 50µg/ml Penicillin und Streptomycin.

HEK 293-Zellen, welche NMDA-Rezeptor-defizient sind, wurden im Wildtyp und der hNAT-überexprimierenden Form bereits charakterisiert^{82,83}. Ebenso sind die NMDA-Rezeptor und hNAT exprimierenden SH-SY5Y-Zellen⁸⁴ bereits charakterisiert worden.

Eine Möglichkeit SH-SY5Y-Zellen durch weitere Ausdifferenzierung neuronalen Zellen in ihrem biologischen Verhalten anzunähern besteht darin, dem Kulturmedium 1 µM all-trans-Retinsäure hinzu zu fügen^{85, 86}. Im Verlauf der Vorversuche zeigte sich, dass die derart vorbehandelten Zellen bessere Untersuchungsbedingungen für die Versuche boten, so dass für die Hauptversuche alle SH-SY5Y-Zellen mit dieser Methode vorbehandelt wurden. Die Zellkulturen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37°C, konstanter Luftfeuchtigkeit und einem Kohlenstoffdioxidanteil von 5% kultiviert.

3.5 Xenonapplikation

Alle beschriebenen Experimente mit Xenonapplikation wurden in einer speziell entwickelten und bereits zuvor publizierten Kammer durchgeführt⁸⁷.

Das Gas strömte in dieser Kammer durch multiple Einlässe von der Unterseite her ein und wurde durch einen Ventilator gleichmäßig verteilt. Der Gasabfluss geschah durch einen Schlauch im oberen Bereich der Kammer. Dort erfolgte auch die Probenentnahme zur Bestimmung der Gaskonzentrationen (Capnomatic Ultima, Datex, Helsinki, Finnland).

Da mit diesem Gerät keine direkte Messung der Xenonkonzentration in der Abluft möglich war, wurden die O₂- und CO₂-Konzentrationen gemessen und als indirekter Nachweis der korrekten Xenonkonzentration innerhalb der Kammer angesehen. Da die von der Firma Air Liquide gefertigten Gasmischungen jeweils einen definierten Anteil von 5 % CO₂ und 30 % O₂ aufwiesen, haben wir den Nachweis von exakt diesen CO₂- und O₂-Konzentrationen im Ausstromtrakt der Kammer als indirekten Nachweis dafür angesehen, dass die Xenonkonzentration ebenfalls dem gewünschten Wert entspricht. Durch ein initiales „flushen“ der Kammer jeweils zu Beginn der

Vorinkubations- und Inkubationsphase mit einem hohen *Flow* (>10l/min) konnten die gewünschten Gaskonzentrationen innerhalb kurzer Zeit erreicht werden.

Für die Versuche wurden vorgefertigte Gasmischungen mit Xenon (Xe 65%, O₂ 30% und CO₂ 5%) und ohne Xenon (N₂ 65%, O₂ 30% und CO₂ 5%) verwendet. Diese wurden von Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf bereitgestellt.

Zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurden weitere Gasmischungen mit 32,5% (Xe 32,5%, O₂ 30% und CO₂ 5%, N₂ 32,5%) und 50% Xenon (Xe 50%, O₂ 50%) verwendet.

Die Temperatur innerhalb der Kammer wurde durch eine Heizplatte an der Unterseite konstant bei 37°C gehalten. Reguliert wurde die Temperatur mit einem Thermometer in der Kammer, welches an eine Temperaturregulierung (Model T48; Red Lion Controls, York, PA, USA) angeschlossen war.

3.6 Fluoreszenz-basierte Untersuchungen der hNAT-Aktivität

Um die Aktivität des humanen Noradrenalintransporters zu untersuchen, wurde ein fluoreszenz-basiertes Verfahren mit dem Neurotransmitter-Uptake-Assay-Kit der Firma Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) verwendet.

Dieses Verfahren basiert darauf, dass ein fluoreszierendes Pseudosubstrat durch die Monoamintransporter in die Zelle transportiert wird. Im extrazellulären Milieu zeigt das Pseudosubstrat keine Fluoreszenz, da es an ein weiteres Molekül gebunden ist, welches die Fluoreszenz verhindert.

Über den Transporter wird nun ausschließlich das Pseudosubstrat transportiert, so dass der intrazellulär gelegene Anteil des Pseudosubstrates fluoresziert.

Somit korreliert die Fluoreszenzintensität mit der intrazellulären Konzentration des Pseudosubstrates und daher ebenfalls mit der Aktivität der Monoamintransporter.

Diese Untersuchungsmethode ist gut als Screeningmethode geeignet, allerdings ist die Spezifität für die Aktivität des hNAT nicht besonders gut, da auch die weiteren Monoamintransporter wie z.B. der hSERT und der hDAT das Pseudosubstrat transportieren, so dass zur Bestätigung der Ergebnisse weitere Untersuchungen nötig werden.

Zur Vorbereitung wurden 96-Well-Platten mit abgedunkelten Seitenwänden mit 100 µl einer Poly-D-Lysin-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in PBS über 12-24 h bei 4°C vorbehandelt, um eine bessere Adhärenz der Zellen an den Gefäßwänden zu erreichen. Anschließend wurden die Wells zweimalig mit PBS gespült, bevor die Zellen inkubiert wurden.

Vor dem Versuch wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen unter dem Mikroskop auf Vitalität überprüft.

Anschließend begann die Vorbereitung der Zellen auf den Versuch. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS vorsichtig gewaschen. Danach wurde auch das PBS entfernt und die Zellen durch Hinzugabe von 3 ml 0,25%-Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für 3 Minuten inkubiert und somit von den Zellkulturflaschen abgelöst und in eine Suspension überführt. Danach erfolgte die Resuspendierung der Zellen mit 3 ml DMEM.

Anschließend wurden die Zellen bei 1300 rpm und 21°C zentrifugiert, der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit neuem DMEM resuspendiert und gezählt. Abschließend wurden nun auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml adjustiert und je 100 µl dieser Zellsuspension pro Well aufgetragen, so dass eine Zelldichte von $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well vorlag. Danach wurden die 96-Well-Platten im Inkubator unter den oben beschriebenen Standardbedingungen für 12-24 h inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen am nächsten Tag erneut unter dem Mikroskop auf Vitalität und Zelldichte überprüft. Anschließend wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit je 50 µl der Versuchslösungen, bestehend aus einer Negativkontrolle ohne Zusätze (Kontrolle), Ketamin (2 mmol/l), N-Methyl-D-Aspartat (50 µmol/l)/ Glycin (20 µmol/l), MK-801 (2 µmol/l) und Desipramin (5 µmol/l) in *Hank's balanced salt solution (HBSS)* mit 0,1% bovines Serumalbumin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Diese Konzentrationen wurden der Literatur entnommen und sind wirksame Konzentrationen bei Zellkulturversuchen mit diesen Substanzen⁸⁸⁻⁹¹.

Bei der Auswahl der Konzentrationen sind die verschiedenen pharmakodynamischen Eigenschaften der Substanzen zu beachten gewesen. Da die Wirkung der Substanzen zum Zeitpunkt der Aufnahme des fluoreszierenden Pseudosubstrates entscheidend ist, kommt der Unterscheidung zwischen reversibel bindenden, kompetitiv agierenden

Substanzen und nicht-kompetitiver Hemmung eine große Bedeutung zu. Ketamin und NMDA/Glycin wirken kompetitiv am NMDA-Rezeptor, wohingegen MK-801 und Desipramin irreversibel den NMDA-Rezeptor bzw. den hNAT hemmen. Somit müssen MK-801 und Desipramin von Beginn des Experimentes an in der Zielkonzentration vorliegen, während die Zielkonzentration von Ketamin und NMDA/Glycin erst nach dem Zuführen des Farbstoffes erreicht werden sollte, so dass am Beginn des Experimentes die doppelte Konzentration in den Wells vorliegen muss.

Anschließend wurden die Wells mit Folie abgeklebt, die nicht mit Xenon sondern mit Raumluft inkubiert werden sollen und danach die 96-Well-Platten mit der vorbereiteten Farbstofflösung zusammen in die Xenonapplikationskammer gestellt.

Nun begann die Vorinkubationsphase mit Xenon. Über eine Dauer von 20 Minuten wurden die Zellen und der Farbstoff mit Xenon in der Kammer vorinkubiert. Nach Ablauf dieser 20 Minuten wurde jedem Well 50 µl der Farbstofflösung zugegeben und sofort danach die zweite Inkubationsphase mit Xenon begonnen. Während dieser Zeit nahmen die Zellen den fluoreszierenden Farbstoff auf. Nach Ablauf der 20 minütigen Inkubation wurden die 96-Well-Platten umgehend mit dem Plate Reader (Synergy 2; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ausgemessen. Dabei wurde die Fluoreszenz als Maß für die intrazelluläre Konzentration des Pseudosubstrates bei einer Wellenlänge von 520 nm nach Anregung mit 440 nm Wellenlänge detektiert.

3.7 Messung der [³H]-Noradrenalin-Aufnahme

Durch die unselektive Aufnahme des Pseudosubstrates durch alle Monoamintransporter verursacht, ist die Spezifität dieser Methode unzureichend, um die Effekte von Xenon auf den hNAT untersuchen zu können. Die Messung der Noradrenalinaufnahme in die Zellen mit Hilfe von [³H]-markiertem Noradrenalin ermöglichte nun die exakte Messung und damit die hochspezifische Bestätigung der Messergebnisse der fluoreszenz-basierten Untersuchung.

Analog zu den Vorbereitungen der 96-Well-Platte wurden nun große 6-Well-Platten mit 1000 µl Poly-D-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) bei 4°C über 12-24 h

vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben aus den Zellkulturflaschen in Suspension überführt, gezählt und auf eine Zellzahl von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml adjustiert. Von dieser Lösung wurden nun 4 ml/Well aufgetragen, so dass eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well vorlag. Anschließend wurden die Zellen für 12-24 h unter Standardbedingungen inkubiert.

Zur Vorbereitung der Zellen auf den Versuch wurden nach Ablauf der Inkubationszeit das Medium abgesaugt und die Wells mit D-PBS gewaschen.

Anschließend wurde das D-PBS abgesaugt und je 500 μ l der Versuchslösungen in die Wells appliziert.

Als Negativkontrolle diente eine Lösung aus selbsthergestelltem Krebs-Hepes-Puffer ohne weitere Zusätze (Kontrolle), eine Lösung mit MK-801 (2 μ mol/l), eine Gemisch aus NMDA (37,5 μ mol/l) und Glycin (15 μ mol/l) und eine Lösung mit Desipramin (5 μ mol/l).

Danach werden die Proben in das Labor der Klinik für Gastroenterologie überführt, um die Versuche mit [3 H]-Noradrenalin durchführen zu können. Nun wurden die Proben zeitgleich entweder unter 65% Xe, 30% O₂ und 5% CO₂ oder unter Raumluftbedingungen für 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe von Infusionsschläuchen die direkte Zuführung von 75 μ l der Noradrenalin-haltigen Lösung, bestehend aus 99,5% kaltem und 0,5 % radioaktiv-markiertem Noradrenalin, und anschließendes Nachspülen der Schläuche mit 175 μ l Krebs-Hepes-Puffer.

Danach erfolgte eine Inkubationsphase von 5 Minuten. Die Inkubationszeit war bei den Versuchen mit [3 H]-markiertem Noradrenalin kürzer als bei den Versuchen mit dem fluoreszenz-basiertem Verfahren, da die Aufnahme der Zellen mit einer schnelleren Kinetik stattfand. Durch entsprechende Vorversuche wurde die optimale Inkubationszeit empirisch ermittelt.

Während dieser Zeit nahmen die Zellen das radioaktiv markierte Noradrenalin auf, welches anschließend gemessen werden sollte.

Danach wurde die Inkubation beendet und durch schnellstmögliches Absaugen der Noradrenalin-haltigen Lösung und waschen der Zellen mit 1 ml eiskühlem D-PBS die weitere Aufnahme von [3 H]-Noradrenalin nach intrazellulär unterbrochen.

Anschließend wurden die Zellen mit 1000 μ l Triton-Lysepuffer behandelt und für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrfach mit einer Pipette

resuspendiert und anschließend in Messküvetten mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit überführt, für 30 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt und danach die Zerfallsrate pro Minute als Maß für die intrazelluläre [³H]-Noradrenalin-Konzentration über Nacht im Liquid Szintillation Counter (Tricarb 2100 TR; Packard, Berkshire, UK) ausgemessen.

3.8 Statistische Auswertungen

Alle Versuche, außer der RT-PCR- und der Western Blot-Untersuchungen, welche jeweils einmalig durchgeführt wurden, wurden mindestens mit einer Anzahl von n=4 durchgeführt. Während der endgültigen Versuche wurden jeweils durch simultane Doppelbestimmungen zwei Messwerte pro Versuchsdurchlauf ermittelt. Des Weiteren wurden die vier Messwerte aus der fluoreszenz-basierten Untersuchung der hNAT-Aktivität bei 65% Xenonkonzentration für die Messungen zur Konzentrations-Wirkungsbeziehung der hNAT-Hemmung durch Xenon übernommen und durch zwei weitere Werte zu n=6 erweitert.

In der fluoreszenz-basierten Untersuchung der hNAT-Aktivität und der Messung der [³H]-Noradrenalin-Aufnahme wurden die Werte, welche unter maximaler Hemmung des hNAT durch Einwirkung von 5 µmol/l Desipramin beobachtet wurden, als nicht beeinflussbare Hintergrundfluoreszenz bzw. Zerfallsrate gewertet und somit als Nullwert festgelegt.

Normalisiert wurden alle Werte auf die jeweilige Negativkontrolle (Kontrolle), also die Proben, welche weder zusätzlicher Substanzen noch einer Xenonkonzentration ausgesetzt waren.

Alle Werte werden als normalisierter Mittelwert [\pm Standardabweichung] dargestellt.

Die Daten wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) verglichen und durch den Bonferroni post hoc-Test analysiert.

Zur Auswertung wurde die Graph Pad Prism Software Version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet.

Bei einem $p < 0.05$ wurden die Unterschiede zwischen den Ergebnissen als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen der Expression des humanen Noradrenalintransporters und des NMDA-Rezeptors mittels RT-PCR und Western Blot

Zur Bestätigung der bereits vorbeschriebenen Charakterisierung der verwendeten Zelllinien wurden eine RT-PCR und eine Western Blot-Analyse der Proteinexpression durchgeführt.

Untersucht wurde die Expression des humanen Noradrenalintransporters und der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors.

Die RT-PCR zeigte eine stabile Expression des humanen Noradrenalintransporter in HEK 293 hNAT-Zellen und in den SH-SY5Y-Zellen, während HEK 293 Wildtyp-Zellen keine hNAT-Expression zeigten.

Die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wurde ausschließlich von SH-SY5Y-Zellen exprimiert, weder die HEK 293 Wildtyp-Zellen noch die HEK 293 hNAT-Zellen zeigten eine Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit.

Die anschließend durchgeführte qualitative Western Blot-Analyse der Proteinexpression bestätigte die Ergebnisse der RT-PCR.

Abbildung 3:

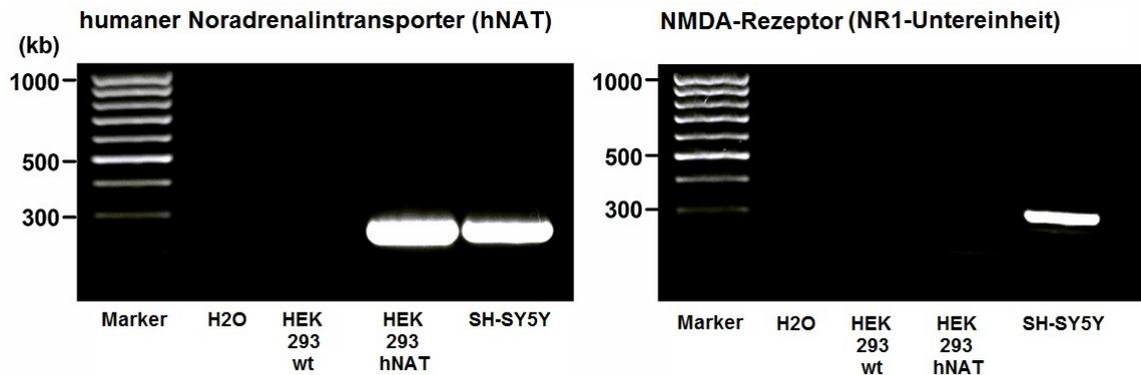


Abbildung 4:

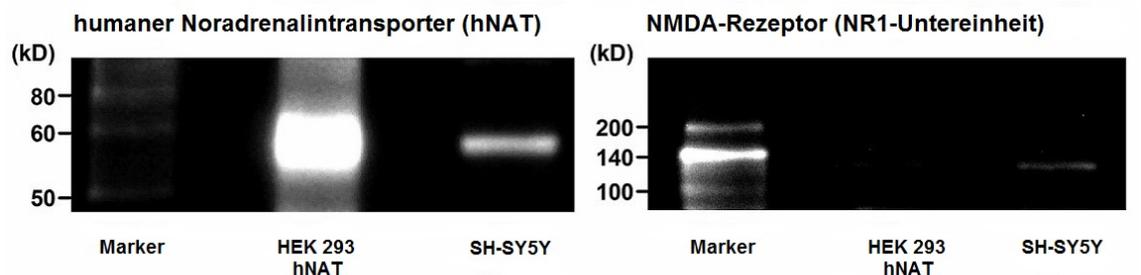


Abb. 3 und 4: RT-PCR und Western Blot-Analyse der hNAT- und NMDA-Rezeptor-Expression in HEK 293 Wildtyp-, hNAT- und SH-SY5Y-Zellen.

Abb. 3 zeigt auf der linken Seite die positiven Ergebnisse der RT-PCR bei stabil mit dem hNAT transfizierten HEK 293 hNAT-Zellen und SH-SY5Y-Zellen. HEK 293 Wildtyp-Zellen exprimieren keinen hNAT.

Auf der rechten Abbildung erkennt man die Ergebnisse der Untersuchung auf die Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1. Dort exprimieren lediglich die SH-SY5Y-Zellen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, wohingegen sowohl die HEK 293 Wildtyp-Zellen als auch die HEK 293 hNAT-Zellen keinen NMDA-Rezeptor exprimieren.

Abb. 4: Die qualitative Western Blot-Analyse bestätigt die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchung.

4.2 Fluoreszenz-basierte Untersuchung der hNAT-Aktivität

Als erste Untersuchung zur Evaluation des Effektes von Xenon auf die Noradrenalinaufnahme über den hNAT in vitro wurde die fluoreszenz-basierte Untersuchung mit dem *Neurotransmitter Uptake-Assay-Kit* durchgeführt.

In HEK 293 hNAT-Zellen, welche den hNAT aber keinen NMDA-Rezeptor exprimieren, wurde die Fluoreszenzintensität durch Ketamin mit ($53,0 \pm 4,5\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 5) und ohne Xenonkoapplikation ($47,3\% \pm 3,1\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 5) gleichermaßen reduziert.

Weder Xenon in einer Konzentration von 65% ($111,1\% \pm 2,7\%$), MK-801 ($95,4\% \pm 1,4\%$) noch NMDA ($25 \mu\text{mol/l}$)/ Glycin ($10 \mu\text{mol/l}$) ($95,7\% \pm 2,1\%$) veränderten die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur nicht mit weiteren Substanzen vorbehandelten Negativkontrolle.

Wie es aufgrund der Ergebnisse der RT-PCR und Western Blot-Analyse, welche keine Expression des hNAT in den HEK 293 Wildtyp-Zellen zeigen, zu erwarten gewesen war, kam es bei HEK 293 Wildtyp-Zellen zu keinem spezifischen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Damit liegt bei den HEK 293 Wildtyp-Zellen keine hNAT-Aktivität vor. Auf die graphische Darstellung dieser Ergebnisse wird verzichtet.

Abbildung 5:

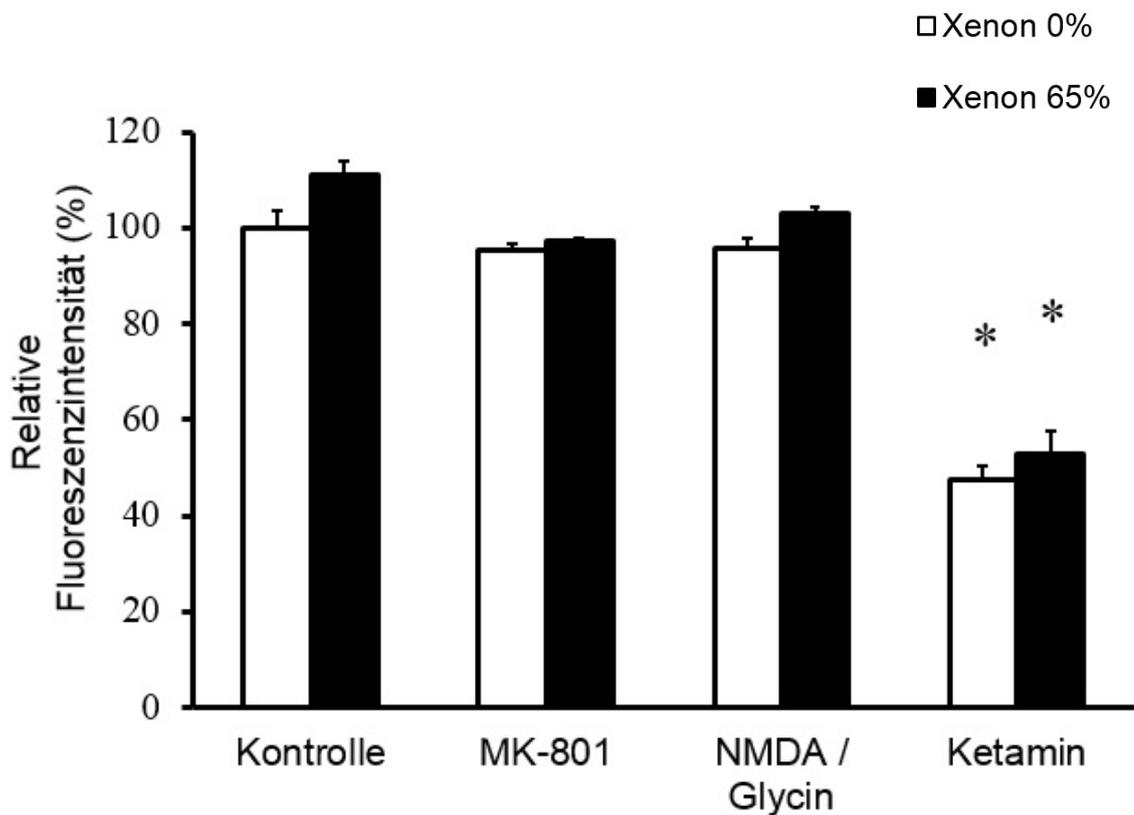


Abb. 5: Effekte von Xenon auf die hNAT-Aktivität in HEK 293 hNAT-Zellen (hNAT+, NMDAR -).

Bei der Untersuchung der hNAT-Aktivität an HEK 293 hNAT-Zellen, welche den humanen Noradrenalintransporter stabil exprimieren, jedoch keine NMDA-Rezeptor-Expression aufweisen, zeigt sich unabhängig von der Xenonapplikation eine Reduktion der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Negativkontrollen bei den mit Ketamin (1 mmol/l) vorbehandelten Zellen.

Inkubation der Zellen mit 65% Xenon zeigt keinen Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle. Ebenso zeigt sich kein Effekt bei Applikation von MK-801 (2 $\mu\text{mol/l}$) und NMDA (25 $\mu\text{mol/l}$) / Glycin (10 $\mu\text{mol/l}$), weder bei gleichzeitiger Koapplikation von 65% Xenon, noch ohne zeitgleiche Xenonapplikation.

* $p < 0.01$ vs. Negativkontrolle (n=4; two-way ANOVA und post-hoc Bonferroni-Test)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den HEK 293 hNAT-Zellen, bei denen sich keine Veränderung der hNAT-Aktivität durch Xenonapplikation zeigte, reduziert Xenon bei SH-SY5Y-Zellen, welche neben dem hNAT auch den NMDA-Rezeptor exprimieren, bei einer Konzentration von 65% die Fluoreszenzintensität signifikant ($65,6\% \pm 14,8\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 6) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen.

MK-801 hemmt, im Gegensatz zur Beobachtung bei den HEK 293 hNAT-Zellen, bei SH-SY5Y-Zellen die hNAT-Aktivität ohne Xenonapplikation ($62,3\% \pm 16,8\%$; $p < 0.01$).

Auch Ketamin ($12,8\% \pm 9,5\%$; $p < 0.01$) reduzierte die hNAT-Aktivität. Ein additiver Effekt bei Koapplikation von Xenon (65%) konnte weder für MK-801 ($54,1\% \pm 20,3\%$) noch für Ketamin ($19,2\% \pm 9,8\%$) beobachtet werden. Bei den mit der Kombination aus NMDA (25 $\mu\text{mol/l}$) und Glycin (10 $\mu\text{mol/l}$) vorbehandelten Zellen zeigt sich eine von der Xenonkoapplikation abhängige Hemmung der hNAT-Funktion. Ohne Xenon ist die Funktion nicht signifikant zu den Kontrollbedingungen verändert ($110,6\% \pm 8,1\%$). Bei Koapplikation von Xenon zeigt sich eine Hemmung der hNAT-Aktivität, angezeigt durch eine Reduktion der gemessenen Fluoreszenz. Jedoch wird der hemmende Effekt von Xenon nicht durch die agonistische Wirkung von NMDA und Glycin am NMDA-Rezeptor antagonisiert, es zeigt sich auch bei den mit NMDA und Glycin vorbehandelten Zellen eine signifikante Reduktion der hNAT-Aktivität bei Xenonapplikation ($77,2\% \pm 8,4\%$).

Abbildung 6:

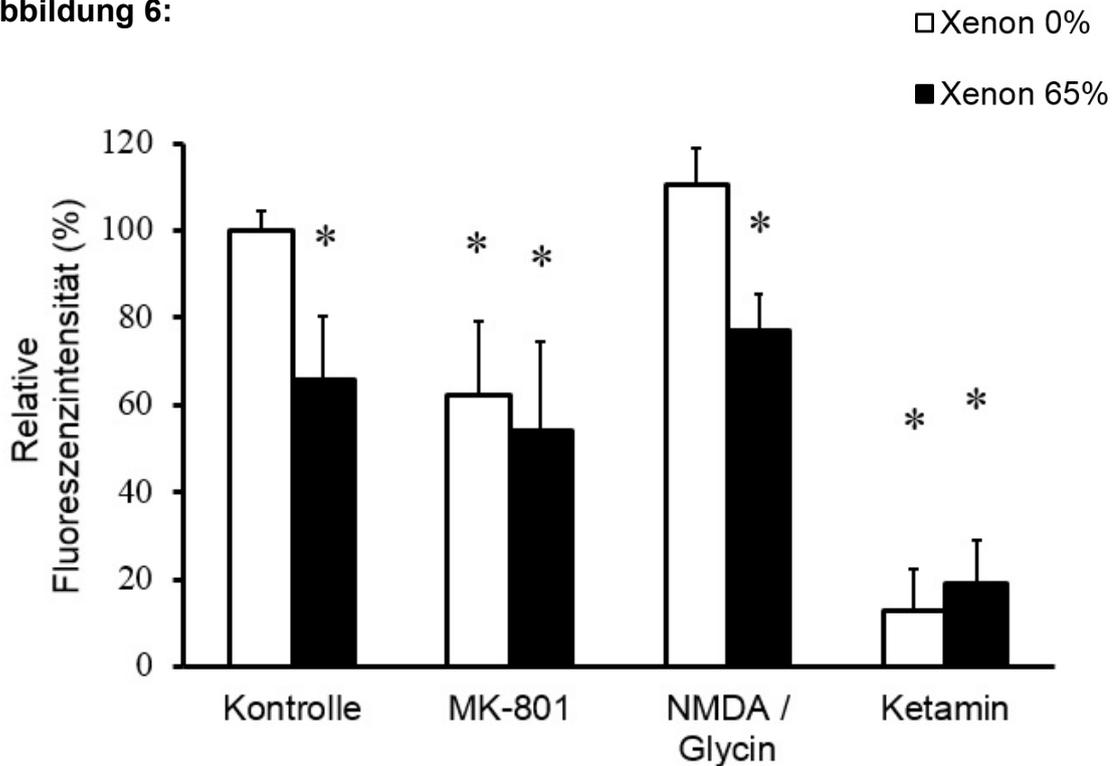


Abb. 6: Effekte von Xenon auf die hNAT-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen (hNAT+, NMDAR+).

Bei der Untersuchung der Effekte von Xenon auf die hNAT-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen, welche sowohl den hNAT als auch den NMDA-Rezeptor stabil exprimieren, zeigt sich eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität, und somit der hNAT-Aktivität, bei Applikation von 65% Xenon ($65,6\% \pm 14,8\%$; $p < 0.01$) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen.

Der spezifische NMDA-Rezeptorantagonist MK-801 ($2 \mu\text{mol/l}$) zeigt ohne Xenon denselben hemmenden Effekt auf die hNAT-Aktivität ($62,3\% \pm 16,8\%$; $p < 0.01$). Eine zusätzliche Applikation von Xenon zeigt keinen weiteren additiven Effekt ($54,1\% \pm 20,3\%$).

Ketamin (1 mmol/l) hemmt, mit einem größeren Effekt als bei den HEK 293 hNAT-Zellen beobachtet, unabhängig von der Xenonapplikation die hNAT-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen. Bei der Applikation von NMDA ($25 \mu\text{mol/l}$) und Glycin ($10 \mu\text{mol/l}$) zeigen sich abhängig von der Xenonapplikation unterschiedliche Ergebnisse, wobei die agonistische Wirkung von NMDA und Glycin nicht den hemmenden Effekt von Xenon zu antagonisieren vermag.

* $p < 0.01$ vs. Negativkontrolle ($n=4$; two-way ANOVA und post-hoc Bonferroni-Test)

4.3 Messung der [^3H]-Noradrenalin-Aufnahme

Um die, wegen des unspezifischen Transportes des fluoreszierenden Pseudosubstrates über alle Monoamintransporter, unspezifischen Ergebnisse aus der fluoreszenz-basierten Untersuchung zu validieren, wurde anschließend die Aufnahme von [^3H]-markiertem Noradrenalin in die Zellen untersucht, um

die vorherigen Ergebnisse mit Hilfe eines spezifisches Verfahrens bestätigen zu können.

Die so erhobenen Ergebnisse bestätigten die vorher gewonnen Daten vollständig.

Applikation von 65% Xenon hemmt die [³H]-Noradrenalin-Aufnahme in SH-SY5Y-Zellen signifikant ($72\% \pm 10\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 7) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen.

Auch MK-801 hemmt die [³H]-Noradrenalin-Aufnahme in die Zellen sowohl ohne ($33\% \pm 8\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 7) als auch mit Xenon ($38\% \pm 7\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 7), wobei sich auch hier, wie bereits bei den fluoreszenz-basierten Untersuchung, kein additiver Effekt von Xenon zeigt.

Interessanter Weise zeigte sich bei den Untersuchungen mit [³H]-markiertem Noradrenalin ein weiterer Effekt, welcher sich in der fluoreszenz-basierten Untersuchung nicht beobachten ließ.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit den am NMDA-Rezeptor agonistisch wirkenden Substanzen NMDA und Glycin ist in der Lage, den durch 65% Xenon vermittelten Effekt nahezu vollständig zu antagonisieren ($98\% \pm 11\%$; $p < 0.01$ im Vergleich zu Xe 65%; s. Abb. 7). NMDA und Glycin zeigen ohne Xenonapplikation keinen Einfluss auf die [³H]-Noradrenalin-Aufnahme im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ($84\% \pm 18\%$).

Abbildung 7:

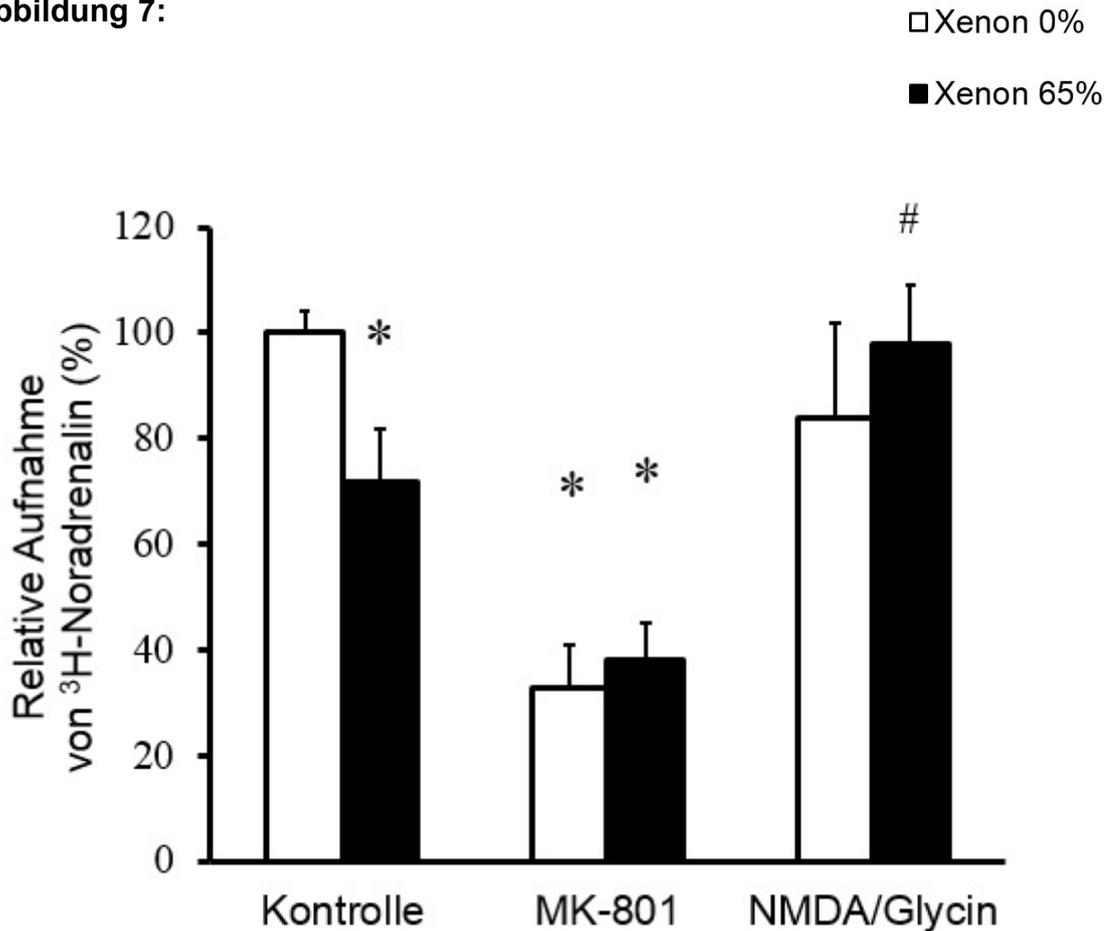


Abb. 7: Messung des Effektes von Xenon auf die [³H]-Noradrenalin-Aufnahme in SH-SY5Y-Zellen (hNAT+, NMDAR+).

Die Messung der [³H]-Noradrenalin-Aufnahme bestätigt die Ergebnisse der fluoreszenz-basierten Untersuchung dieses Effektes.

Xenon (65%) hemmt die [³H]-Noradrenalin-Aufnahme in die Zellen (72% ± 10%; p<0.01). Der spezifische NMDA-Rezeptorantagonist MK-801 (2 µmol/l) zeigt denselben Effekt (33% ± 8%; p<0.01). Zusätzliche Xenonapplikation zeigt keinen weiteren additiven Effekt (38% ± 7%; p<0.01).

Die Vorbehandlung der Zellen mit NMDA (25 µmol/l) und Glycin (10 µmol/l) ist in der Lage, den durch Xenon vermittelten Effekt im Vergleich zu den mit 65% Xenon behandelten Kontrollen zu antagonisieren (98% ± 11%; p<0.01 im Vergleich zu Kontrollbedingungen mit 65% Xenon).

*p<0.01 vs. Negativkontrolle; #p<0.01 vs. Kontrolle mit Xe 65% (n=6; two-way ANOVA und post-hoc Bonferroni-Test)

4.4 Messungen der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der hNAT-Hemmung durch Xenon

Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Effektes von Xenon auf die hNAT-Aktivität zu untersuchen, wurden weitere Versuche mit den Xenonkonzentrationen 0%, 32,5%, entsprechend einem halben MAC, 50% und mit der bisher benutzten Konzentration von 65% durchgeführt. Die Experimente zur Ermittlung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung erfolgten mit Hilfe der fluoreszenz-basierten Untersuchung der hNAT-Aktivität.

Die Ergebnisse zeigen eine klare Abhängigkeit des Ausmaßes der hNAT-Hemmung von der verwendeten Xenonkonzentration.

Bei einer Xenonkonzentration von 32,5% zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Effekt ($90,8\% \pm 6,4\%$). Eine Xenonkonzentration von 50% führte zu einer signifikanten Reduktion der hNAT-Aktivität ($68,9\% \pm 10,1\%$; $p < 0.05$; s. Abb. 8).

Bei weiterer Erhöhung der Xenonkonzentration auf 65% zeigte sich weiterhin eine signifikante Hemmung der hNAT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($71,3\% \pm 4,5\%$; $p < 0.01$; s. Abb. 8), allerdings ohne den beobachteten Effekt im Vergleich zu 50% Xenon weiter zu steigern.

Abbildung 8:

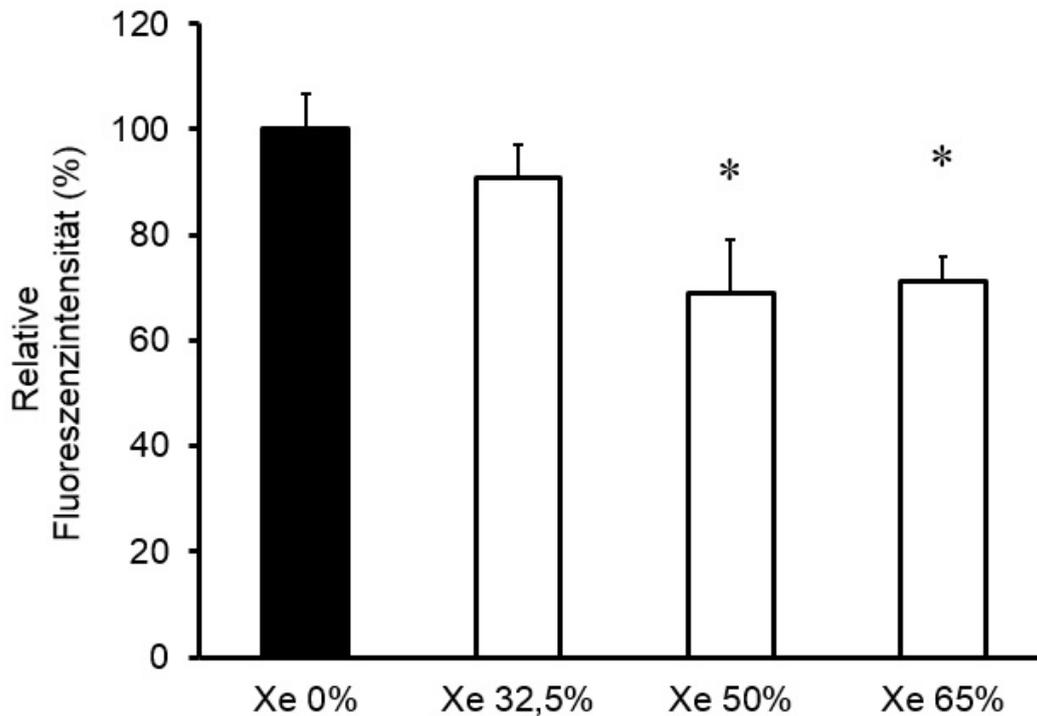


Abb. 8: Abhängigkeit der hNAT-Aktivität von der verwendeten Xenonkonzentration durch fluoreszenz-basierte Messung der hNAT-Aktivität bei SH-SY5Y-Zellen.

Der schwarze Balken im Diagramm stellt den Wert der Negativkontrolle ohne Xenonapplikation dar, während die weißen Balken die ermittelten Werte nach Applikation der angegebenen Xenonkonzentration abbilden.

Eine Xenonkonzentration von 32,5 % zeigt keinen signifikanten Effekt auf die hNAT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle mit 0% Xenon. Bei Applikation von 50% Xenon zeigt sich eine signifikante Reduktion der hNAT-Aktivität ($68,9\% \pm 10,1\%$; $p < 0.05$). Auch bei 65% Xenon ist die Aktivität im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ($71,3\% \pm 4,5\%$; $p < 0.01$), ohne den Effekt im Vergleich zu 50% Xenon weiter zu steigern.

* $p < 0.05$ vs. Negativkontrolle ($n=6$; two-way ANOVA und post-hoc Bonferroni-Test)

5. Diskussion

5.1 Xenon hemmt die Noradrenalinwiederaufnahme über einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Noradrenalinwiederaufnahme über den humanen Noradrenalintransporter in vitro.

Wie bereits in der Einleitung erklärt, könnte eine Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin zu einer Erhöhung der Noradrenalinkonzentration im Plasma führen und somit die beobachtete hämodynamische Stabilität der Patienten während einer Xenon-basierten Anästhesie erklären.

In der klinischen Studie von Neukirchen et al., welche die Ausgangssituation für diese experimentellen Untersuchungen ergeben hat, zeigen sich unter Xenon-Monoanästhesie trotz unveränderter muskulärer Sympathikusaktivität nahezu verdoppelte Noradrenalinkonzentrationen im Plasma der Probanden.

Da die muskuläre Sympathikusaktivität eng mit den renalen und kardialen sympathischen Efferenzen korreliert ^{61, 62}, ist es eher unwahrscheinlich, dass an diesen Organsystemen die sympathische Aktivität gesteigert sein sollte. Damit sollte eine generelle Steigerung der Aktivität des sympathischen, autonomen Nervensystems als Ursache der erhöhten Noradrenalinkonzentration auszuschließen sein.

Die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen an Zellkulturen demonstrieren eindeutig, dass Xenon in klinisch relevanter Konzentration von 65%, was einem MAC dieses Inhalationsanästhetikums entspricht, die Noradrenalinaufnahme in die Zellen in vitro hemmt. Diese Hemmung der Noradrenalinaufnahme um etwa ein Drittel kann allerdings nur in den NMDA-Rezeptor-positiven SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden, während bei den NMDA-Rezeptor-negativen HEK 293 hNAT-Zellen kein Effekt von Xenon auf die Noradrenalinaufnahme beobachtet werden kann.

Als Positivkontrolle für den Einfluss des NMDA-Rezeptors auf die Wiederaufnahme von Noradrenalin wurde der spezifische NMDA-Rezeptorantagonist MK-801 eingesetzt ⁹². Unter MK-801-Exposition verhält sich

die Aufnahme von Noradrenalin in die Zellen gleichsinnig wie unter Xenonapplikation.

Bei MK-801-Exposition zeigt sich, wie es bei NMDA-Rezeptor-negativen Zellen zu erwarten ist, kein Effekt auf die Aufnahme durch HEK 293 hNAT-Zellen, während sich die Aufnahme von Noradrenalin durch SH-SY5Y-Zellen Xenon-unabhängig durch MK-801 hemmen lässt.

Diese Beobachtungen lassen auf einen Einfluss des NMDA-Rezeptors auf die Funktion des hNAT schließen.

Weiterhin wichtig ist es an dieser Stelle zu erwähnen, dass für MK-801 auch ein direkter hemmender Effekt auf den hNAT beschrieben ist⁹³. Dieser wird allerdings erst bei Konzentrationen, welche deutlich über den hier verwendeten Konzentrationen von 2 µmol/l liegen, relevant.

Außerdem lässt sich an den Ergebnissen der HEK 293 hNAT-Zellen kein Effekt von MK-801 auf die Funktion des hNAT im Vergleich zu den unbehandelten Negativkontrollen zeigen. Somit zeigt sich bei dieser Untersuchung dieser direkte inhibitorische Effekt von MK-801 nicht, so dass er auch keinen Einfluss auf die Interpretation der vorgelegten Ergebnisse hat.

Vielmehr bestätigt dieses Ergebnis, dass die beobachtete Hemmung der Noradrenalinaufnahme einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus darstellt, da in den NMDA-Rezeptor-negativen HEK 293 hNAT-Zellen keine Inhibition der hNAT-Funktion gezeigt werden konnte. In den NMDA-Rezeptor-positiven SH-SY5Y-Zellen konnte dieser Effekt aber eindeutig gezeigt werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Xenon auf die hNAT-Aktivität mit Hilfe des [³H]-markierten Noradrenalins zeigte sich ein weiterer Effekt, welcher nicht durch das fluoreszenz-basierte Verfahren dargestellt werden konnte. Die am NMDA-Rezeptor agonistisch wirkende Kombination von NMDA und Glycin ist in der Lage, die durch Xenon vermittelte Inhibition der hNAT-Aktivität signifikant zu antagonisieren, so dass die Transporterfunktion wieder nahezu die Werte der Negativkontrolle annimmt. Auch diese Beobachtung ist als weiteres eindeutiges Indiz für die entscheidende Rolle der NMDA-Rezeptor-Inhibition durch Xenon bei der Hemmung der hNAT-Funktion zu sehen.

Die Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zeigt bei 32,5% Xenon keine signifikante Reduktion der Noradrenalinaufnahme, jedoch bei 50%

Xenon. Eine weitere Steigerung der Xenon-Konzentration von 50% auf 65% bewirkt keine weitere signifikante Zunahme des Effektes.

Anhand der erhobenen Daten lässt sich nicht zwischen einer kontinuierlichen Zunahme des Effektes bei steigender Xenonkonzentration oder einer „on/off-Charakteristik“ des Effektes mit einem Beginn der Wirkung zwischen 32,5% und 50% differenzieren. Dazu wäre eine differenziertere Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit zum einen enger gestaffelten und zum anderen auf höhere Werte (z.B. bis 80%) erweiterten Xenonkonzentrationen nötig.

Insgesamt sind die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung in der Lage, die erhöhten Konzentrationen von Noradrenalin im synaptischen Spalt und somit die von Yoshida et al. ⁷⁶ beobachteten Effekte von Xenon zu erklären.

In der 2010 veröffentlichten Arbeit wurde eine Erhöhung der extrazellulären Noradrenalin-Konzentration im limbischen System von Ratten in vivo, gemessen durch Mikrodialyse, und in vitro an neuronalen Zellen beobachtet.

Aus diesen Beobachtungen zogen die Autoren die Schlussfolgerung, dass der Erhöhung der extrazellulären Noradrenalin-Konzentration eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt zu Grunde liegen könnte. Da jedoch lediglich die extrazelluläre Noradrenalin-Konzentration gemessen und nicht die Art des Transportes über die Zellmembran untersucht wurde, lassen die Ergebnisse allerdings keine sichere Unterscheidung des zugrunde liegenden Mechanismus zu. Die Differenzierung zwischen einer Erhöhung der Ausschüttung aus präsynaptischen Vesikeln oder einer Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin über den hNAT ist nicht möglich.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Resultate von Yoshida et al. insofern, als dass sie sich mit den gemessenen erhöhten extrazellulären Konzentrationen von Noradrenalin plausibel decken.

Allerdings legen sie die Vermutung nahe, dass die Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin ein entscheidender Mechanismus zur Erklärung der erhöhten extrazellulären Noradrenalin-Konzentration sein dürfte, ohne allerdings eine mögliche Erhöhung der Noradrenalin-Freisetzung als weiteren Mechanismus ausschließen zu können, da lediglich die Effekte von

Xenon auf die Wiederaufnahme, nicht jedoch auf die Ausschüttung, untersucht wurden.

Um Aussagen über den Einfluss von Xenon auf die Ausschüttung von Noradrenalin treffen zu können, sind weitere zukünftige Untersuchungen nötig.

Nach Ausschüttung von Noradrenalin aus Vesikeln noradrenerger Neurone im ZNS und aus sympathischen Nervenendigungen im autonomen sympathischen Nervensystem werden rund 90% des Noradrenalins durch Wiederaufnahme in dieselbe Zelle durch den hNAT aus dem synaptischen Spalt entfernt. Nur etwa 10% des Noradrenalins verlassen den synaptischen Spalt nach extraneuronal und erreichen als *spillover* das Plasma.

Auch in Situationen stark erhöhter Exzitation der Zellen mit bis zu 10-facher Erhöhung der Noradrenalinfreisetzung ist der hNAT weiterhin in der Lage einen Großteil des freigesetzten Noradrenalins wieder aufzunehmen, so dass der *spillover* auch in dieser Situation nur geringfügig ansteigt ⁶⁵.

Die nun vorliegenden Daten zeigen, dass Xenon in klinisch relevanter Konzentration von 65% die Aktivität des hNAT um etwa ein Drittel reduziert. Basierend auf den physiologischen Erkenntnissen, dass nur etwa 10% des Noradrenalins als *spillover* in das Plasma entweicht, kann man abschätzen, dass eine Verringerung der hNAT-Aktivität um ein Drittel den extraneuronalen *spillover* auf das Vierfache ansteigen lässt. Eine solche Veränderung des extraneuronalen *spillovers* durch eine Veränderung der hNAT-Aktivität ist in der Lage die systemische NoradrenalinKonzentration signifikant und in klinischem Ausmaß relevant ansteigen zu lassen.

Dass eine Reduktion der hNAT-Aktivität sich in klinisch messbarer Weise manifestiert zeigt das Beispiel des posturalen Tachykardiesyndroms aus der Kardiologie. Dabei führt eine genetische Variante des hNAT zu einer Aktivitätsreduktion, was sich wiederum in erhöhten Noradrenalinplasmakonzentrationen und einer Tachykardie äußert ⁹⁴.

Demzufolge sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur in der Lage lokale Anstiege der extrazellulären NoradrenalinKonzentration, wie sie von Yoshida et al. beobachtet wurden, zu erklären, sondern vielmehr sind auch systemische Auswirkungen dieses Effektes nachvollziehbar.

Somit kann die beobachtete NMDA-Rezeptor-abhängige Hemmung der Noradrenalinwiederaufnahme über den hNAT als ein entscheidender

Mechanismus zur Erhöhung der Noradrenalin-Konzentration im Plasma und dadurch als wichtiger Faktor für die hämodynamische Stabilität der Patienten während einer Xenonnarkose gewertet werden.

Eine wichtige Rolle in der Vermittlung der analgetischen und hypnotischen Effekte von Xenon spielt der bekannte antagonistische Effekt von Xenon am NMDA-Rezeptor^{48, 95, 96}.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, nehmen der NMDA-Rezeptor und die Hemmung der Aktivität des Rezeptors durch Xenon eine entscheidende Funktion in der Hemmung der Noradrenalinwiederaufnahme ein. Derselbe hemmende Effekt am NMDA-Rezeptor wird auch für Ketamin beschrieben und scheint ebenfalls eine wichtige Funktion in der Wirkweise dieses Medikamentes zu sein, sowohl in Bezug auf die hypnotische Wirkung, als auch auf die hämodynamischen Auswirkungen von Ketamin-basierter Anästhesie⁹⁷.

Ketamin in seiner Form als Racemat steigert, wie Xenon auch, die Noradrenalin-Konzentration im Plasma und hebt durch diesen Mechanismus den mittleren arteriellen Druck an.

Die Auswirkung von Ketamin auf die muskuläre Sympathikusaktivität unterscheiden sich zwischen dem S(+)-Ketamin-Enantiomer und dem Racemat. Während die muskuläre Sympathikusaktivität durch das Racemat bei erhöhten Noradrenalinplasmakonzentrationen reduziert ist kommt es unter dem S(+)-Enantiomer zu einer Steigerung der muskulären Sympathikusaktivität^{98, 99}.

Diese Reduktion der muskulären Sympathikusaktivität durch das Racemat lässt sich durch eine Inhibition des Baroreflexes aufgrund des gesteigerten arteriellen Mitteldrucks erklären. Eine medikamentöse Senkung des mittleren arteriellen Drucks auf das Ausgangsniveau vor Ketamingabe durch Gabe des Vasodilatators Natrium-Nitroprussid normalisiert die sympathischen Efferenzen der muskulären Sympathikusaktivität. Somit ist während einer Ketamin-basierten Anästhesie der Baroreflex vollständig erhalten. Diese Beobachtung des erhaltenen Baroreflexes gilt auch für das S(+)-Enantiomer. Auch der Sollwert für die zentrale Blutdruckregulation ist nicht verändert, wie die reflektorische Hemmung der muskulären Sympathikusaktivität durch das Racemat und deren Normalisierung durch medikamentöse Blutdrucksenkung eindrucksvoll demonstriert⁵⁸.

Die Verhältnisse während einer Xenonnarkose sind insofern sehr gut mit den Bedingungen während Ketamin-basierter Anästhesie zu vergleichen. Sowohl die klinischen Parameter im Sinne der hämodynamischen Stabilität und der erhaltenen Baroreflexreaktion, als auch der zugrunde liegende Mechanismus der hämodynamischen Stabilität, nämlich der erhöhten Noradrenalinplasmakonzentration sind gleich.

Einzig die Inhibition des Baroreflexes durch den erhöhten arteriellen Mitteldruck wird unter Xenon nicht beobachtet, obwohl der Baroreflex in seiner Reaktion auf Blutdruckschwankungen unter Xenon ebenfalls vollständig erhalten ist. Diese Beobachtung lässt auf eine Veränderung der zentralnervösen Sollwerte der Blutdruckregulation schließen.

Durch eine zentrale sympathische Aktivierung werden die Sollwerte für die Blutdruckregulation angehoben und somit wird im Rahmen der Untersuchung der Baroreflex bei den beobachteten arteriellen Drücken nicht inhibiert. Spekulieren kann man, dass bei weiter gesteigerten arteriellen Drücken der Baroreflex gehemmt werden würde. Dieser Effekt bedarf allerdings weiterer Untersuchungen ⁶³.

Wie vermittelt nun Ketamin die Einflüsse auf das sympathische Nervensystem? Auch Ketamin wirkt nur indirekt auf die Funktion des sympathischen Nervensystems ein und zwar über eine Hemmung der Wiederaufnahme von Katecholaminen über den hNAT, also über denselben Mechanismus wie Xenon. Dieser Effekt wird teilweise durch eine direkte, nicht-kompetitive Hemmung der hNAT-Funktion vermittelt ¹⁰⁰, zum anderen ist auch ein Teil des Effektes abhängig von der NMDA-Rezeptorexpression der Zellen ¹⁰¹. Diese Beobachtung wird durch die hier vorgelegten Daten bestätigt.

Auch in den NMDA-Rezeptor-negativen HEK 293 hNAT-Zellen hemmt Ketamin die Aufnahme von Noradrenalin, so dass sich auch in diesen Ergebnissen der direkte Antagonismus von Ketamin am hNAT gezeigt werden kann.

Nach langer Exposition von Ketamin reguliert der Körper den hemmenden Effekt von Ketamin auf den hNAT gegen, indem es zu einer gesteigerten mRNA-Produktion und vermehrten Transporterexpression auf der Zellmembran kommt ⁸⁹. Über die Effekte einer Langzeit-Xenon-Exposition auf die mRNA-Produktion und Transporterexpression ist bisher nichts bekannt.

Somit gleichen sich nicht nur die klinischen Eigenschaften von Ketamin und Xenon-basierter Anästhesie, sondern auch die Mechanismen über welche die Effekte vermittelt werden.

Über die hNAT-Hemmung, sowohl ausgelöst durch Xenon als auch durch Ketamin, entgeht ein größerer Teil des freigesetzten Noradrenalins der Wiederaufnahme und daraus resultierend erreicht ein deutlich größerer Anteil als *spillover* aus dem synaptischen Spalt das Plasma und erhöht die Noradrenalin-Konzentration in der systemischen Zirkulation, wodurch die hämodynamischen Effekte von Ketamin¹⁰² und Xenon vermittelt werden. Im Gegensatz zu Ketamin, welches den hNAT sowohl direkt¹⁰³, als auch indirekt über einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus hemmt, wird die Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin durch Xenon nur in NMDA-Rezeptor-exprimierenden Zellen beobachtet, so dass hierbei von einem NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus ausgegangen werden kann.

Bis zu der Untersuchung der Effekte von Xenon-basierter Anästhesie auf das autonome, sympathische Nervensystem von Neukirchen et al.⁶³ wurde Xenon in Studien an Patienten stets in Kombination mit Opiaten verabreicht, so dass die ausschließlich von Xenon vermittelten Effekte auf die hämodynamische Situation nicht ausreichend evaluiert werden konnten.

Opiate haben selbst inhibitorische Einflüsse auf das sympathische Nervensystem und den Baroreflex, so dass es während balancierter Anästhesie zu einer Überlagerung der Opiat- und Xenoneffekte kommt¹⁰⁴. Die Kombination von Opiaten mit Xenon ist in der klinischen Situation gut geeignet zur balancierten Narkoseführung. Allerdings macht die Beeinflussung der Opiate eine Untersuchung der intrinsischen Effekte von Xenon unmöglich, so dass sich auch eine indifferente Datenlage in der bisher publizierten Literatur zeigt.

In Kombination mit Remifentanyl wurden während Xenonarkose sogar zum Teil erniedrigte Noradrenalin-Konzentrationen im Plasma der Patienten¹⁰⁵ gemessen, wohingegen bei Hunden diese, trotz derselben Medikation, erhöht waren⁵⁹.

Insgesamt zeigen diese Resultate ein unklares Bild und somit konnte die hämodynamische Stabilität bis zu der Untersuchung der Effekte von Xenon in

Monoanästhesie von Neukirchen et al. nicht eindeutig auf das sympathische Nervensystem zurückgeführt werden.

Erst durch das Ergebnis dieser Untersuchung konnten ein nicht durch die Xenonanästhesie beeinflusstes sympathisches Nervensystem, ein erhaltener Baroreflex und ein Anstieg der NoradrenalinKonzentration im Plasma als Ursache für die beobachtete hämodynamische Stabilität während Xenon-basierter Anästhesie ausgemacht und eindeutig auf die Wirkung von Xenon während Xenonmonoanästhesie zurückgeführt werden.

Aus welchen Organsystemen stammt nun das zusätzlich freigesetzte Noradrenalin und über welche intrazellulären Signalkaskaden wird die NMDA-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Noradrenalinwiederaufnahme reguliert?

Ein erhöhter zerebraler Noradrenalin-spillover, zum Beispiel aus dem Locus coeruleus, oder Veränderungen der peripheren Noradrenalinfreisetzung stellen mögliche Mechanismen dar.

Der Locus coeruleus und seine Efferenzen nehmen beispielsweise eine zentrale Rolle in der sympathisch kontrollierten Regulation der Hämodynamik ein. Die Aktivität des Locus coeruleus wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Unter anderem sind an dieser Regulierung NMDA-Rezeptoren beteiligt ¹⁰⁶. So erhöht eine Exposition des NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 die extrazelluläre NoradrenalinKonzentration der efferenten Bahnen des Locus coeruleus ¹⁰⁷. Diese Beobachtung deckt sich mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten. Die NMDA-Rezeptor-vermittelte Hemmung des hNAT führt ebenfalls zu einer Erhöhung der extrazellulären NoradrenalinKonzentration. Somit ist es sehr gut möglich, dass der von Tose et al. beschriebenen Erhöhung der extrazellulären NoradrenalinKonzentration eben dieser Mechanismus zu Grunde liegt.

Zum Ursprung des Noradrenalins und zu den intrazellulären Signalkaskaden finden sich in der Literatur jedoch noch keine Antworten, so dass kommende Untersuchungen nötig sein werden um diese Fragen zu klären.

Festzuhalten bleibt jedoch, dass - unabhängig vom Ursprungsort des Noradrenalins - die NMDA-Rezeptor-vermittelte hNAT-Hemmung ein schlüssiger Mechanismus ist, welcher die erhöhten NoradrenalinKonzentrationen im Plasma trotz unveränderter muskulärer Sympathikusaktivität zu erklären vermag.

Durch diesen Mechanismus wird die beschriebene hämodynamische Stabilität mit Erhöhung des Herzzeitvolumens und des totalen peripheren Widerstandes während einer Xenonnarkose vermittelt.

5.2 Bedeutung für die klinische Anästhesie

Diese beobachtete hämodynamische Stabilität und eine erhaltene linksventrikuläre Ejektionsfraktion können sogar bei herzinsuffizienten Patienten mit präoperativ-reduzierter linksventrikulärer Funktion, die zur Schrittmacherimplantation vorgesehen sind, beobachtet werden ⁵⁵.

Die Erhöhung der Katecholaminkonzentration im synaptischen Spalt und im Plasma ist auch in der Lage die positiven Effekte auf die Inotropie und auf die linksventrikuläre Funktion ¹⁰² während einer Xenonnarkose zu erklären, da diese Effekte durch eine Steigerung der Aktivität des sympathischen Nervensystems oder durch Erhöhung der Plasmakatecholamine vermittelt werden.

Sowohl bei kardiovaskulär gesunden Patienten als auch sogar bei Patienten, die eine koronararterielle Bypassoperation erhielten, lässt sich eine erhaltene linksventrikuläre Kontraktilität unter Xenonnarkose nachweisen ⁴⁹, wohingegen andere inhalative Anästhetika die Inotropie und das Herz-Zeit-Volumen beeinträchtigen ^{33,34}.

Ein großer Vorteil der Xenonnarkose ist es, dass der Baroreflex nicht gehemmt ist. Während, mit Ausnahme von Ketamin, die meisten anderen inhalativen und intravenösen Anästhetika mit dem Baroreflex interferieren ²³ ist der Baroreflex, sogar mit in Richtung höherer arterieller Mitteldrücke hin veränderter Sollwerte, während einer Xenonnarkose vollständig erhalten. Dadurch werden die physiologischen Reaktionen auf veränderte hämodynamische Situationen nicht durch die Anästhesie unterbunden. Somit bietet sich neben stabiler, da durch physiologische Mechanismen selbstständig regulierter, hämodynamischer Verhältnisse auch die Möglichkeit für den Patienten auf intra- und perioperative Veränderungen der hämodynamischen Situation adäquat zu reagieren und somit hypotensive Phasen weiterhin zu vermindern.

Solche Situationen können beispielsweise im Rahmen intraoperativer Hämorrhagien, hypovolämer Situationen oder lagerungsbedingter hämodynamischer Veränderungen, wie sie etwa im Rahmen laparoskopischer Chirurgie vorkommen, auftreten.

Es ist allerdings auf einen ausreichend stabilen Volumenstatus des Patienten während Xenon-basierter Anästhesie Wert zu legen, da durch die hämodynamische Stabilität während Xenon-basierter Anästhesie hypovoläme Zustände unerkannt bleiben, zu spät diagnostiziert werden und diese sich gegebenenfalls erst während der Narkoseausleitung demaskieren können⁴⁰.

Wie in der Einleitung beschrieben sind hypotensive Phasen während einer Narkoseführung häufig auftretende Situationen, welche mit einem erhöhten Risiko für postoperative kardiovaskuläre Ereignisse und akutes Nierenversagen eng korreliert sind¹⁰⁸.

Mit der Dauer der hypotensiven Episoden steigt die Inzidenz schwerwiegender postoperativer Komplikationen wie etwa dem akuten Nierenversagen, Myokardischämien und perioperativer zerebraler Ischämien¹⁰. Somit ist es ein hohes Ziel guter Narkoseführung hypotensive Phasen schnellstmöglich zu beenden und den Patienten zurück zu normotensiven Verhältnissen zu führen. Dies geschieht in der Regel durch unverzügliche und falls nötig wiederholte Gabe vasopressorischer Medikamente wie Theodrenalin/ Cafedrin oder Noradrenalin.

Besser wäre es, wenn möglich, das Auftreten hypotensiver Phasen von vornherein zu verhindern. Dieses Ziel lässt sich teilweise durch eine gut geplante und gezielte Auswahl des Narkoseverfahrens und der verwendeten Medikamente, welche die Vorerkrankungen des Patienten berücksichtigen, und die Steuerung der Narkosetiefe erreichen.

Da alle Anästhetika, welche für die intraoperative Narkoseführung gebräuchlich sind, die Funktion des sympathischen Nervensystems in mehr oder weniger großem Ausmaß beeinträchtigen, ist mit diesem Vorgehen nur eine Verringerung der Häufigkeit und Schwere intraoperativer Hypotensionen möglich.

Besser scheint sich die Situation bei Verwendung von Xenon als inhalativen Anästhetikum darzustellen^{49, 51}, da Phasen intraoperativer Hypotension unter Xenon-basierter Anästhesie eine niedrigere Inzidenz aufweisen.

5.3 Ausblick

Ob sich die im Gegensatz zu anderen inhalativen und intravenösen Anästhetika verbesserte hämodynamische Situation der Patienten während einer Xenonnarkose auch in Bezug auf niedrigere postoperative Mortalität und Morbidität nachweisen lässt ist bisher unklar.

Zumindest theoretisch sollte sich ein Effekt zeigen, da die Dauer intraoperativer hypotensiver Phasen mit der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten postoperativer Komplikationen eng korreliert ist ¹⁰.

Die tatsächlichen Effekte der hämodynamischen Stabilität von Xenon-basierter Anästhesie auf die Prävention schwerwiegender postoperativer Komplikationen müssen noch im Rahmen derzeit stattfindender, großangelegter klinischer Studien evaluiert werden (NCT 01120405 und NCT00919126).

Ebenfalls von Interesse für die klinische Anästhesie sollten die beschriebenen neurotoxischen Effekte von Xenon sein. Bei einer Konzentration von einem MAC, entsprechend einer Konzentration von 65% Xenon, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, löst Xenon neuronalen Zelluntergang bei neuronalen Zellen von neugeborenen Ratten aus. Der Effekt ist jedoch genauso stark ausgeprägt, wie es von den inhalativen Anästhetika Sevo- und Isoflurane bekannt ist. Somit ist Xenonnarkose vermutlich in dieser Hinsicht den konventionellen inhalativen Anästhetika nicht unterlegen, ein Vorteil besteht allerdings ebenfalls nicht.

Interessanterweise kann der neurotoxische Effekt von Xenon durch eine Präkonditionierung der Zellen mit subtoxischen Konzentrationen von Isoflurane in vitro aufgehoben werden ¹⁰⁹.

Es werden auch neuroprotektive Effekte von Xenon beschrieben. So ist das Risiko für eine postoperative kognitive Dysfunktion zumindest im Tierexperiment reduziert ¹¹⁰. Ursächlich scheint auch in diesem Fall der bekannte Antagonismus am NMDA-Rezeptor zu sein. Ob sich diese neuroprotektiven Effekte auch an Patienten zeigen lassen ist Teil derzeitiger klinischer Studien. Bisher war es noch nicht möglich, diesen Effekt auch an Patienten nachvollziehen zu können ¹¹¹.

Des Weiteren ist es bekannt, dass NMDA-Rezeptoren und auch zentrales Noradrenalin als Neurotransmitter wichtige Mediatoren der zentralen Schmerzverarbeitung sind ¹¹².

So ermutigen die Ergebnisse zu weiteren Untersuchungen der spinalen antinozizeptiven Effekte von Xenon.

Inzwischen wird auch der postoperative Einsatz von Xenon zur Schmerztherapie diskutiert. Durch die potente Inhibierung des NMDA-Rezeptors wird die zentrale Schmerzverarbeitung vor allem in den Neuronen der Hinterhörner des Rückenmarks gehemmt ¹¹³. Diese nehmen die zentrale Position in der Weiterleitung der epikritischen und protopathischen Sensibilität aus dem Rückenmark in den Thalamus ein. Somit bewirkt eine Hemmung dieser Neurone eine potente Reduktion der Schmerzwahrnehmung des Patienten. Xenon könnte auch in niedrigeren Dosierungen als Teil eines postoperativen Analgesieschemas Verwendung finden ^{114, 115}.

Zusätzlich zu den beschriebenen hämodynamischen Effekten von Xenon-basierter Anästhesie könnte die Erhöhung der agonistischen Effekte von Noradrenalin am α_2 -Rezeptor, ausgelöst durch die erhöhten extrazellulären NoradrenalinKonzentrationen während einer Xenonanästhesie, wichtige Auswirkungen für die klinische Anästhesie haben.

α_2 -Rezeptor-Agonisten haben analgetische, anxiolytische und sympatholytische Eigenschaften und sind gut zu antagonisieren ¹¹⁶. In der klinischen Anästhesie werden sie unter anderem zusätzlich zu anderen Anästhetika verabreicht und reduzieren den Bedarf von Opiaten oder Lokalanästhetika ¹¹⁷. Inwiefern die beschriebenen analgetischen Effekte von Xenon auf einen α_2 -Rezeptor-agonistischen Effekt zurückzuführen sind, welcher zusätzlich zum bekannten NMDA-Rezeptorantagonismus die zentrale Schmerzverarbeitung beeinflussen könnte, ist ein interessanter Aspekt, der durch zukünftige Untersuchungen zu klären wäre.

Somit bietet Xenon neben den positiven hämodynamischen Effekten weitere positive Eigenschaften für die klinische Anästhesie und weitere interessante Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen.

5.4 Methodenkritik

Einschränkend muss man zur Interpretation der Ergebnisse beachten, dass das verwendete *Neurotransmitter Uptake Assay Kit* der Firma Molecular Devices nicht ausschließlich die Aufnahme von Noradrenalin über den hNAT, sondern vielmehr den gesamten Transport aller Katecholamine über die Zellmembran nach intrazellulär misst ¹¹⁸.

Ursächlich dafür ist, dass das fluoreszierende Pseudosubstrat von allen Transportern aus der Monoamintransporterfamilie transportiert wird. Somit wird, neben der hNAT-Funktion, auch die Aktivität des hDAT und des hSERT gleichzeitig mitbestimmt ¹¹⁹. Durch diese Problematik verursacht sind die Ergebnisse des fluoreszenz-basierten Verfahrens zwar richtungsweisend, aber nicht spezifisch genug, um präzise Aussagen zur Beeinflussung der hNAT-Funktion und des Noradrenalintransportes durch Xenon zu können.

Ein Vorteil des fluoreszenz-basierten Verfahrens gegenüber der Bestimmung der Noradrenalinaufnahme durch die Verwendung [³H]-markierten Noradrenalins ist jedoch die verhältnismäßig unproblematische Durchführung der Versuche. Man benötigt kein spezielles Labor, welches für die Arbeit mit radioaktivem Material zugelassen ist.

Daher eignet sich dieser Versuchsaufbau sehr gut als primärer Screeningtest. Da dieses Messverfahren allerdings aufgrund der beschriebenen Einschränkungen sehr unspezifisch ist, ist es als alleiniges Verfahren zur validen Untersuchung der Effekte von Xenon auf die hNAT-Funktion nicht ausreichend.

Um die beobachtete Hemmung des hNAT durch Xenon zu bestätigen, war es nötig, die Ergebnisse der fluoreszenz-basierten Untersuchung der hNAT-Funktion durch ein spezifischeres Verfahren zu validieren.

Dazu eignet sich in diesem Fall die Messung der Aufnahme von [³H]-markiertem Noradrenalin in die Zellen, da mit Hilfe dieses Verfahrens sehr präzise und spezifisch die Noradrenalinaufnahme in die Zellen gemessen werden kann. Wie die vorgelegten Daten zeigen, bestätigen die durchgeführten Versuche mit [³H]-markiertem Noradrenalin die Ergebnisse der fluoreszenz-basierten Untersuchung, so dass in Zusammenschau der Resultate eine

NMDA-Rezeptor-abhängige Hemmung der hNAT-Funktion durch Xenon anzunehmen ist.

Weitere Mechanismen, welche der Erhöhung der Plasmakatecholamine zu Grunde liegen könnten, können durch die vorgestellten Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

So könnte zusätzlich auch eine gesteigerte Noradrenalinfreisetzung, wie es von Yoshida et al. vermutet wird,⁷⁶ eine Rolle spielen oder auch eine Einschränkung der intraneuralen oder extraneuralen und hepatischen Metabolisierung¹²⁰ der Katecholamine könnte zu den erhöhten Plasmakonzentrationen beitragen.

Des Weiteren ist es, wie bereits erwähnt, nicht möglich anhand der durchgeführten Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen einer kontinuierlichen Zunahme des Effektes bei steigender Xenonkonzentration oder einer „on/off-Charakteristik“ des Effektes mit einem Einsetzen des Effektes zwischen einer Xenonkonzentration von 32,5% und 50% zu unterscheiden. Hierzu wäre eine weiterführende und differenziertere Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nötig.

Darüber hinaus bleibt unklar, welche Effekte eine längerfristigen Xenonexposition in Hinblick auf die Funktion und Expression von Noradrenalintransportern und andere Wirkorte von Xenon hat.

6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Xenon in klinisch relevanter Konzentration von 65%, entsprechend einer Konzentration von einem MAC, die Noradrenalinaufnahme in vitro hemmt.

Klinisch lässt sich während einer Xenon-basierten Allgemeinanästhesie beobachten, dass die Patienten eine beeindruckende hämodynamische Stabilität im Verhältnis zu anderen inhalativen Anästhetika und Injektionsnarkotika aufweisen.

Diese hämodynamische Stabilität ist am ehesten durch erhöhte Konzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin im Serum der Patienten ausgelöst.

Die Erhöhung der Plasmakonzentrationen der Katecholamine kommt zustande, obwohl die Aktivität des sympathischen Nervensystems unverändert ist, wie mikroneurographische Messungen der muskulären Sympathikusaktivität während Xenon-Monoanästhesie eindeutig zeigten. Auch ist die Baroreflexantwort auf Blutdruckveränderungen nicht unterdrückt.

Somit muss die Erhöhung der Plasmakonzentrationen der Katecholamine durch einen anderen Mechanismus als die Erhöhung der Aktivität des sympathischen Nervensystems ausgelöst werden.

Bei Betrachtung der physiologischen Mechanismen des Katecholaminmetabolismus kommen Veränderungen der Ausschüttung und Wiederaufnahme der Katecholamine als mögliche Mechanismen in Frage.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen eindeutig auf, dass Xenon in klinisch relevanter Konzentration von 65% die Noradrenalinaufnahme in vitro über den humanen Noradrenalintransporter hNAT um etwa ein Drittel hemmt. Dieser Effekt ist abhängig von einer NMDA-Rezeptorexpression der Zellen. In Zellen ohne eine Expression des NMDA-Rezeptors hat Xenon keinerlei Auswirkungen auf die Noradrenalinaufnahme. Auch Substanzen welche die Aktivität des NMDA-Rezeptors beeinflussen, wie etwa NMDA und MK-801, verändern die Noradrenalinaufnahme in diesen Zellen nicht.

Bei neuronalen Zellen, welche neben dem humanen Noradrenalintransporter auch den NMDA-Rezeptor exprimieren, wird durch Xenon die Noradrenalinaufnahme gehemmt. Dieser Effekt kann durch MK-801 simuliert

werden und durch NMDA und Glycin antagonisiert werden, so dass von einer Beteiligung des NMDA-Rezeptors an diesem Mechanismus ausgegangen werden kann. Der intrazelluläre Signalweg bleibt unklar und sollte durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden.

Das Krankheitsbild des posturalen Tachykardiesyndroms zeigt, dass eine Veränderung der Aktivität des humanen Noradrenalintransporters deutliche Auswirkungen auf die systemischen NoradrenalinKonzentrationen und vor allem auch auf hämodynamische Parameter hat.

Die Schlussfolgerung dieser Arbeit ist es, dass Xenon den Noradrenalintransporter durch einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus hemmt.

Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der extrazellulären und systemischen NoradrenalinKonzentration. Diese erhöhte NoradrenalinKonzentration im Plasma ist wiederum ein plausibler Mechanismus, der für die beobachtete hämodynamische Stabilität der Patienten während einer Xenon-basierten Anästhesie verantwortlich sein könnte.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Monk TG, Saini V, Weldon BC, Sigl JC. Anesthetic management and one-year mortality after noncardiac surgery. *Anesth Analg (Anesthesia and analgesia)* 2005; 100: 4–10
2. Kheterpal S, O'Reilly M, Englesbe MJ, *et al.* Preoperative and intraoperative predictors of cardiac adverse events after general, vascular, and urological surgery. *Anesthesiology* 2009; 110: 58–66
3. Franck M, Radtke FM, Prahs C, *et al.* Documented intraoperative hypotension according to the three most common definitions does not match the application of antihypotensive medication. *The Journal of international medical research* 2011; 39: 846–56
4. Warner MA, Monk TG. The impact of lack of standardized definitions on the specialty. *Anesthesiology* 2007; 107: 198–9
5. Bijker JB, van Klei, Wilton A, Kappen TH, van Wolfswinkel L, Moons, Karel G M, Kalkman CJ. Incidence of intraoperative hypotension as a function of the chosen definition: literature definitions applied to a retrospective cohort using automated data collection. *Anesthesiology* 2007; 107: 213–20
6. Aronson S, Phillips-Bute B, Stafford-Smith M, *et al.* The Association of Postcardiac Surgery Acute Kidney Injury with Intraoperative Systolic Blood Pressure Hypotension. *Anesthesiology research and practice* 2013; 2013: 174091
7. Bijker JB, Persoon S, Peelen LM, *et al.* Intraoperative hypotension and perioperative ischemic stroke after general surgery: a nested case-control study. *Anesthesiology* 2012; 116: 658–64
8. Kertai MD, White WD, Gan TJ. Cumulative duration of "triple low" state of low blood pressure, low bispectral index, and low minimum alveolar

- concentration of volatile anesthesia is not associated with increased mortality. *Anesthesiology* 2014; 121: 18–28
9. Myles PS. Untangling the triple low: causal inference in anesthesia research. *Anesthesiology* 2014; 121: 1–3
10. Walsh M, Devereaux PJ, Garg AX, *et al.* Relationship between intraoperative mean arterial pressure and clinical outcomes after noncardiac surgery: toward an empirical definition of hypotension. *Anesthesiology* 2013; 119: 507–15
11. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology* 1902; 28: 220–31
12. Harper AM. Autoregulation of cerebral blood flow: influence of the arterial blood pressure on the blood flow through the cerebral cortex. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1966; 29: 398–403
13. Schwartz AE. Cerebral and renal blood flow autoregulation. *Anesthesiology* 2014; 120: 1281
14. Lienhart A, Auroy Y, Péquignot F, *et al.* Survey of anesthesia-related mortality in France. *Anesthesiology* 2006; 105: 1087–97
15. Theissen IL, Meissner A. Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. *Der Anaesthesist* 1996; 45: 643–52
16. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological reviews* 2008; 88: 1009–86
17. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological reviews* 2001; 53: 319–56

18. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiological reviews* 1994; 74: 323–64
19. Eckberg DL, Rea RF, Andersson OK, *et al.* Baroreflex modulation of sympathetic activity and sympathetic neurotransmitters in humans. *Acta physiologica Scandinavica* 1988; 133: 221–31
20. Fagius J, Wallin BG, Sundlöf G, Nerhed C, Englesson S. Sympathetic outflow in man after anaesthesia of the glossopharyngeal and vagus nerves. *Brain : a journal of neurology* 1985; 108 (Pt 2): 423–38
21. Crystal GJ, Salem MR. The Bainbridge and the "reverse" Bainbridge reflexes: history, physiology, and clinical relevance. *Anesthesia and analgesia* 2012; 114: 520–32
22. Selldén H, Sjövall H, Wallin BG, Häggendal J, Ricksten SE. Changes in muscle sympathetic nerve activity, venous plasma catecholamines, and calf vascular resistance during mechanical ventilation with PEEP in humans. *Anesthesiology* 1989; 70: 243–50
23. Neukirchen M, Kienbaum P. Sympathetic nervous system: evaluation and importance for clinical general anesthesia. *Anesthesiology* 2008; 109: 1113–31
24. Coetzee A, Fourie P, Coetzee J, *et al.* Effect of various propofol plasma concentrations on regional myocardial contractility and left ventricular afterload. *Anesthesia and analgesia* 1989; 69: 473–83
25. Lepage JY, Pinaud ML, Hélias JH, *et al.* Left ventricular function during propofol and fentanyl anesthesia in patients with coronary artery disease: assessment with a radionuclide approach. *Anesthesia and analgesia* 1988; 67: 949–55

26. Lepage JY, Pinaud ML, Helias JH, Cozian AY, Le Normand Y, Souron RJ. Left ventricular performance during propofol or methohexital anesthesia: isotopic and invasive cardiac monitoring. *Anesthesia and analgesia* 1991; 73: 3–9
27. Goodchild CS, Serrao JM. Cardiovascular effects of propofol in the anaesthetized dog. *British journal of anaesthesia* 1989; 63: 87–92
28. Ahn HJ, Chung S, Dhong H, *et al.* Comparison of surgical conditions during propofol or sevoflurane anaesthesia for endoscopic sinus surgery. *British journal of anaesthesia* 2008; 100: 50–4
29. Jacobi KE, Böhm BE, Rickauer AJ, Jacobi C, Hemmerling TM. Moderate controlled hypotension with sodium nitroprusside does not improve surgical conditions or decrease blood loss in endoscopic sinus surgery. *Journal of clinical anesthesia* 2000; 12: 202–7
30. Rouby JJ, Andreev A, Léger P, *et al.* Peripheral vascular effects of thiopental and propofol in humans with artificial hearts. *Anesthesiology* 1991; 75: 32–42
31. Ebert TJ, Muzi M, Berens R, Goff D, Kampine JP. Sympathetic responses to induction of anesthesia in humans with propofol or etomidate. *Anesthesiology* 1992; 76: 725–33
32. Ebert TJ. Cardiovascular and autonomic effects of sevoflurane. *Acta anaesthesiologica Belgica* 1996; 47: 15–21
33. Park WK, Kim MH, Ahn DS, *et al.* Myocardial depressant effects of desflurane: mechanical and electrophysiologic actions in vitro. *Anesthesiology* 2007; 106: 956–66

34. Warltier DC, Pagel PS. Cardiovascular and respiratory actions of desflurane: is desflurane different from isoflurane? *Anesthesia and analgesia* 1992; 75: S17-29; discussion S29-31
35. Muzi M, Ebert TJ. A comparison of baroreflex sensitivity during isoflurane and desflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology* 1995; 82: 919–25
36. Cullen SC, Gross EG. The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. *Science (New York, N.Y.)* 1951; 113: 580–2
37. Nakata Y, Goto T, Morita S. Comparison of inhalation inductions with xenon and sevoflurane. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 1997; 41: 1157–61
38. Goto T, Saito H, Shinkai M, Nakata Y, Ichinose F, Morita S. Xenon provides faster emergence from anesthesia than does nitrous oxide-sevoflurane or nitrous oxide-isoflurane. *Anesthesiology* 1997; 86: 1273–8
39. Stoppe C, Rimek A, Rossaint R, *et al.* Xenon consumption during general surgery: a retrospective observational study. *Medical gas research* 2013; 3: 12
40. Höcker J, Grünewald M, Bein B. Xenonnarkosen - Klinische Besonderheiten, Vor- und Nachteile sowie mögliche Einsatzgebiete. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 2012; 47: 374–80
41. Coburn M, Kunitz O, Apfel CC, Hein M, Fries M, Rossaint R. Incidence of postoperative nausea and emetic episodes after xenon anaesthesia compared with propofol-based anaesthesia. *British journal of anaesthesia* 2008; 100: 787–91
42. Lachmann B, Armbruster S, Schairer W, *et al.* Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anaesthetic. *Lancet* 1990; 335: 1413–5

43. Schäfer MS, Neukirchen M, Reyle-Hahn M, Kienbaum P. Predictors for Postoperative Nausea and Vomiting and Efficacy of Antiemetic Prophylaxis After Xenon Anesthesia. ASA Annual Meeting 2014
44. Nakata Y, Goto T, Ishiguro Y, *et al.* Minimum alveolar concentration (MAC) of xenon with sevoflurane in humans. *Anesthesiology* 2001; 94: 611–4
45. Goto T, Nakata Y, Morita S. The minimum alveolar concentration of xenon in the elderly is sex-dependent. *Anesthesiology* 2002; 97: 1129–32
46. Salmi E, Laitio RM, Aalto S, *et al.* Xenon does not affect gamma-aminobutyric acid type A receptor binding in humans. *Anesthesia and analgesia* 2008; 106: 129-34, table of contents
47. Franks NP, Dickinson R, de Sousa, S L, Hall AC, Lieb WR. How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 1998; 396: 324
48. Dickinson R, Peterson BK, Banks P, *et al.* Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. *Anesthesiology* 2007; 107: 756–67
49. Wappler F, Rossaint R, Baumert J, *et al.* Multicenter randomized comparison of xenon and isoflurane on left ventricular function in patients undergoing elective surgery. *Anesthesiology* 2007; 106: 463–71
50. Preckel B, Weber NC, Sanders RD, Maze M, Schlack W. Molecular mechanisms transducing the anesthetic, analgesic, and organ-protective actions of xenon. *Anesthesiology* 2006; 105: 187–97
51. Baumert JH, Hein M, Hecker KE, Satlow S, Schnoor J, Rossaint R. Autonomic cardiac control with xenon anaesthesia in patients at cardiovascular risk. *British journal of anaesthesia* 2007; 98: 722–7

52. Preckel B, Schlack W. Editorial III: xenon--cardiovascularly inert? *British journal of anaesthesia* 2004; 92: 786–9
53. Picker O, Schindler AW, Schwarte LA, *et al.* Xenon increases total body oxygen consumption during isoflurane anaesthesia in dogs. *British journal of anaesthesia* 2002; 88: 546–54
54. Kozhevnikov VA, Sandrikov VA, Fedulova SV, *et al.* [Changes in cerebral circulation in patients with coronary heart disease during myocardial revascularizing operations under combined xenon anesthesia]. *Anesteziologija i reanimatologija* 2006: 25–8
55. Baumert J, Falter F, Eletr D, Hecker KE, Reyle-Hahn M, Rossaint R. Xenon anaesthesia may preserve cardiovascular function in patients with heart failure. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2005; 49: 743–9
56. Tweed WA, Minuck M, Mymin D. Circulatory responses to ketamine anesthesia. *Anesthesiology* 1972; 37: 613–9
57. Takki S, Nikki P, Jäättelä A, Tammisto T. Ketamine and plasma catecholamines. *British journal of anaesthesia* 1972; 44: 1318–22
58. Kienbaum P, Heuter T, Michel MC, Peters J. Racemic ketamine decreases muscle sympathetic activity but maintains the neural response to hypotensive challenges in humans. *Anesthesiology* 2000; 92: 94–101
59. Francis RCE, Reyle-Hahn MS, Hohne C, *et al.* The haemodynamic and catecholamine response to xenon/remifentanil anaesthesia in Beagle dogs. *Laboratory animals* 2008; 42: 338–49
60. Champlain J de, Farley L, Cousineau D, van Ameringen, M R. Circulating catecholamine levels in human and experimental hypertension. *Circulation research* 1976; 38: 109–14

61. Wallin BG, Esler M, Dorward P, *et al.* Simultaneous measurements of cardiac noradrenaline spillover and sympathetic outflow to skeletal muscle in humans. *J Physiol. (The journal of physiology)* 1992; 453: 45–58
62. Wallin BG, Thompson JM, Jennings GL, Esler MD. Renal noradrenaline spillover correlates with muscle sympathetic activity in humans. *J Physiol. (The journal of physiology)* 1996; 491: 881–7
63. Neukirchen M, Hipp J, Schaefer MS, *et al.* Cardiovascular stability and unchanged muscle sympathetic activity during xenon anaesthesia: role of norepinephrine uptake inhibition. *British journal of anaesthesia* 2012; 109: 887–96
64. Lympelopoulos A. Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Frontiers in physiology* 2013; 4: 240
65. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev. (Pharmacological reviews)* 2004; 56: 331–49
66. Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M, Eisenhofer G. Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiological reviews* 1990; 70: 963–85
67. Bönisch H, Runkel F, Roubert C, Giros B, Brüss M. The human desipramine-sensitive noradrenaline transporter and the importance of defined amino acids for its function. *Journal of autonomic pharmacology* 1999; 19: 327–33
68. Brüss M, Kunz J, Lingen B, Bönisch H. Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Human genetics* 1993; 91: 278–80

69. Sung U, Blakely RD. Calcium-dependent interactions of the human norepinephrine transporter with syntaxin 1A. *Molecular and cellular neurosciences* 2007; 34: 251–60
70. Schroeder C, Jordan J. Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2012; 303: H1273-82
71. Roukoz H, Benditt DG. NET-NET: are norepinephrine transport inhibitors a potentially useful therapy for vasovagal syncope? *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2013; 24: 804–5
72. Armstrong MD, McMillan A, Shaw KN. 3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. *Biochimica et biophysica acta* 1957; 25: 422–3
73. Eisenhofer G, Aneman A, Hooper D, Holmes C, Goldstein DS, Friberg P. Production and metabolism of dopamine and norepinephrine in mesenteric organs and liver of swine. *The American journal of physiology* 1995; 268: G641-9
74. Eisenhofer G, Aneman A, Hooper D, Rundqvist B, Friberg P. Mesenteric organ production, hepatic metabolism, and renal elimination of norepinephrine and its metabolites in humans. *Journal of neurochemistry* 1996; 66: 1565–73
75. Mårdh G, Luehr CA, Vallee BL. Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the oxidation of glycols in the metabolism of norepinephrine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985; 82: 4979–82
76. Yoshida H, Kushikata T, Tose R, Kudo M, Kudo T, Hirota K. Nitrous oxide and xenon increase noradrenaline release in the cerebral cortex in vivo and in vitro. *Neuroscience letters* 2010; 469: 199–203

77. Shahani SK, Lingamaneni R, Hemmings HC. General anesthetic actions on norepinephrine, dopamine, and gamma-aminobutyric acid transporters in stably transfected cells. *Anesthesia and analgesia* 2002; 95: 893-9, table of contents
78. Werdehausen R, Kremer D, Brandenburger T, *et al.* Lidocaine metabolites inhibit glycine transporter 1: a novel mechanism for the analgesic action of systemic lidocaine? *Anesthesiology* 2012; 116: 147–58
79. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987; 162: 156–9
80. Redmile-Gordon MA, Armenise E, White RP, Hirsch PR, Goulding, K W T. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil biology & biochemistry* 2013; 67: 166–73
81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–5
82. Scholze P, Nørregaard L, Singer EA, Freissmuth M, Gether U, Sitte HH. The role of zinc ions in reverse transport mediated by monoamine transporters. *J Biol Chem. (The journal of biological chemistry)* 2002; 277: 21505–13
83. Domingues A, Almeida S, da Cruz e Silva, E F, Oliveira CR, Rego AC. Toxicity of beta-amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Neurochemistry international* 2007; 50: 872–80
84. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res. (Cancer research)* 1978; 38: 3751–7

85. Pählman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell differentiation* 1984; 14: 135–44
86. El Andaloussi-Lilja J, Lundqvist J, Forsby A. TRPV1 expression and activity during retinoic acid-induced neuronal differentiation. *Neurochemistry international* 2009; 55: 768–74
87. Weber NC, Kandler J, Schlack W, Grueber Y, Frädorf J, Preckel B. Intermittent pharmacologic pretreatment by xenon, isoflurane, nitrous oxide, and the opioid morphine prevents tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Anesthesiology* 2008; 108: 199–207
88. Ring A, Tanso R. Measurements with fluorescent probes in primary neural cultures; improved multiwell techniques. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2007; 56: 300–7
89. Hara K, Minami K, Ueno S, *et al.* Up-regulation of noradrenaline transporter in response to prolonged exposure to ketamine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2002; 365: 406–12
90. Nishimura M, Sato K, Okada T, *et al.* Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Anesthesiology* 1998; 88: 768–74
91. Fried G, Hammarström M, Dahlin I. Reduced uptake of noradrenaline into storage vesicles from the pregnant uterus. *Acta physiologica Scandinavica* 1985; 123: 311–6

92. Woodruff GN, Foster AC, Gill R, Kemp JA, Wong EH, Iversen LL. The interaction between MK-801 and receptors for N-methyl-D-aspartate: functional consequences. *Neuropharmacology* 1987; 26: 903–9
93. Nishimura M, Sato K, Okada T, Schloss P, Shimada S, Tohyama M. MK-801 blocks monoamine transporters expressed in HEK cells. *FEBS Lett. (FEBS letters)* 1998; 423: 376–80
94. Shannon, JR, Flattem NL, Jordan J, *et al.* Orthostatic intolerance and tachycardia associated with norepinephrine-transporter deficiency. *N Engl J Med. (The New England journal of medicine)* 2000; 342: 541–9
95. Sanders RD, Franks NP, Maze M. Xenon: no stranger to anaesthesia. *British journal of anaesthesia* 2003; 91: 709–17
96. Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Eckle V, Zieglgansberger W, Rammes G. Xenon reduces N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Anesthesiology* 2008; 109: 998–1006
97. Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *British journal of pharmacology* 1983; 79: 565–75
98. Kienbaum P, Heuter T, Michel MC, Peters J. Racemic ketamine decreases muscle sympathetic activity but maintains the neural response to hypotensive challenges in humans. *Anesthesiology* 2000; 92: 94–101
99. Kienbaum P, Heuter T, Pavlakovic G, Michel MC, Peters J. S(+)-ketamine increases muscle sympathetic activity and maintains the neural response to hypotensive challenges in humans. *Anesthesiology* 2001; 94: 252–8

100. Hara K, Yanagihara N, Minami K, *et al.* Ketamine interacts with the noradrenaline transporter at a site partly overlapping the desipramine binding site. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology) 1998; 358: 328–33
101. Lundy PM, Lockwood PA, Thompson G, Frew R. Differential effects of ketamine isomers on neuronal and extraneuronal catecholamine uptake mechanisms. *Anesthesiology* 1986; 64: 359–63
102. Cook DJ, Carton EG, Housmans PR. Mechanism of the positive inotropic effect of ketamine in isolated ferret ventricular papillary muscle. *Anesthesiology* 1991; 74: 880–8
103. Nishimura M, Sato K, Okada T, *et al.* Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Anesthesiology* 1998; 88: 768–74
104. Kienbaum P, Heuter T, Michel MC, Scherbaum N, Gastpar M, Peters J. Chronic mu-opioid receptor stimulation in humans decreases muscle sympathetic nerve activity. *Circulation* 2001; 103: 850–5
105. Boomsma F, Ruprecht J, Man in 't Veld AJ, Jong FH de, Dzoljic M, Lachmann B. Haemodynamic and neurohumoral effects of xenon anaesthesia. A comparison with nitrous oxide. *Anaesthesia* 1990; 45: 273–8
106. Kaehler ST, Sinner C, Philippu A. Release of catecholamines in the locus coeruleus of freely moving and anaesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats: effects of cardiovascular changes and tail pinch. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2000; 361: 433–9
107. Tose R, Kushikata T, Yoshida H, *et al.* Interaction between orexinergic neurons and NMDA receptors in the control of locus coeruleus-cerebrocortical noradrenergic activity of the rat. *Brain research* 2009; 1250: 81–7

108. Singh A, Antognini JF. Perioperative hypotension and myocardial ischemia: diagnostic and therapeutic approaches. *Annals of cardiac anaesthesia* 2011; 14: 127–32
109. Brosnan H, Bickler PE. Xenon neurotoxicity in rat hippocampal slice cultures is similar to isoflurane and sevoflurane. *Anesthesiology* 2013; 119: 335–44
110. Ma D, Yang H, Lynch J, Franks NP, Maze M, Grocott HP. Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology* 2003; 98: 690–8
111. Höcker J, Stapelfeldt C, Leiendecker J, *et al.* Postoperative neurocognitive dysfunction in elderly patients after xenon versus propofol anesthesia for major noncardiac surgery: a double-blinded randomized controlled pilot study. *Anesthesiology* 2009; 110: 1068–76
112. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Progress in neurobiology* 2006; 80: 53–83
113. Miyazaki Y, Adachi T, Utsumi J, Shichino T, Segawa H. Xenon has greater inhibitory effects on spinal dorsal horn neurons than nitrous oxide in spinal cord transected cats. *Anesthesia and analgesia* 1999; 88: 893–7
114. Genov PG, Smirnova OV, Timerbaev VK. [Xenon for postoperative analgesia: why not?]. *Anesteziologija i reanimatologija* 2011: 74–7
115. Giacalone M, Abramo A, Giunta F, Forfori F. Xenon-related analgesia: a new target for pain treatment. *The Clinical journal of pain* 2013; 29: 639–43
116. Maze M, Tranquilli W. Alpha-2 adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology* 1991; 74: 581–605

117. Park J, Forrest J, Kolesar R, Bhola D, Beattie S, Chu C. Oral clonidine reduces postoperative PCA morphine requirements. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie* 1996; 43: 900–6
118. Jørgensen S, Nielsen EØ, Peters D, Dyhring T. Validation of a fluorescence-based high-throughput assay for the measurement of neurotransmitter transporter uptake activity. *Journal of neuroscience methods* 2008; 169: 168–76
119. Whone AL, Kemp K, Sun M, Wilkins A, Scolding NJ. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain Res. (Brain research)* 2012; 1431: 86–96
120. Iber T, Hecker K, Vagts DA, *et al.* Xenon anesthesia impairs hepatic oxygenation and perfusion in healthy pigs. *Minerva Anesthesiol. (Minerva anesthesiologica)* 2008; 74: 511–9

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Kienbaum, Herrn Dr. med. Robert Werdehausen und Herrn Dr. med. Martin Neukirchen möchte ich für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die gute Betreuung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Robert Werdehausen für die sehr engagierte Unterstützung und die optimale Betreuung während der gesamten Dauer des Projektes.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Anästhesiologie der Universitätsklinik Düsseldorf unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die Unterstützung während der Versuchsdurchführung.

Unabhängig von dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Berthold Gerdes für seine langjährige Unterstützung sowie die Vermittlung der Faszination für das Fach Chirurgie bedanken.

Zuletzt geht mein besonderer Dank an meine Freunde und meine Familie.

Meinen Eltern, Ute und Reinhard Hipp, danke ich von ganzem Herzen für ihre fortwährende Unterstützung meiner Ziele.

Katharina Ziegler danke ich für ihren liebevollen Rückhalt, sowohl während der Examensvorbereitung im vergangenen Jahr, als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 18.12.2014

Julian Hipp