

Aus dem Institut für klinische Neurowissenschaften und medizinische
Psychologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Alfons Schnitzler

NMDA-Rezeptor-abhängige Modulation der Wirkung von Etomidat
auf die hippokampale Netzwerkaktivität *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von
Anthony Nucaro
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Olga Sergeeva

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

*„Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt
werden, kann man etwas Schönes bauen.“*

- Johann Wolfgang von Goethe

I. Zusammenfassung

Multimorbide Patient:innen stellen Anästhesist:innen vor Herausforderungen. Etomidat, ein GABAerges Anästhetikum, zeigt wenig unerwünschte kardiovaskuläre Wirkungen. Seine Wirkung wird allerdings durch eine Hypofunktion des NMDA-Rezeptors beeinflusst. Solche Hypofunktionen können durch Medikamente oder Erkrankungen auftreten. Diese Arbeit untersucht die Rolle des NMDA-Rezeptors und dessen Einfluss auf die Wirksamkeit von Etomidat im hippokampalen Netzwerk.

Kulturen von hippokampalen Rattenneuronen wurden auf Mikroelektrodenarrays gezüchtet. Etomidat wurde in steigenden Konzentrationen mit oder ohne NMDA-Rezeptor-Modulatoren zu Zellkulturen hinzugegeben und die Aktionspotenzialfrequenz bestimmt. Folgende Modulatoren wurden benutzt: Magnesium (Mg^{2+}), Memantin (Mema), DAP5, Dextromethorphan (DXM), Dextrophan (DXO), Cyanquixaline (CNQX), CBR-5884 und N-Acetylaspartylglutamat (NAAG). Zudem wurde RNA-Interferenz benutzt, um NMDA-Rezeptoren zu modulieren. Die Expression der NMDA-Rezeptor-mRNA wurde mittels quantitativer PCR überprüft. Die Abnahme der Aktionspotenzialfrequenz wurde mittels Varianztestung mit der Kontrollgruppe im Ableitmedium ohne Magnesiumzusatz bzw. mit Magnesiumzusatz bei Versuchen mit NAAG verglichen. Die EC_{50} von Etomidat wurde mittels einer nichtlinearen Regression auf Grundlage der Aktionspotenzialfrequenz ermittelt und modelliert. Ein p-Wert von $< 0,05$ galt als statistisch signifikant.

Die Aktionspotenzialfrequenz nahm bei Zugabe von 5 und 10 μM Etomidat signifikant stärker ab, wenn Mg^{2+} , Mema, DAP5, DXM oder DXO in der Ableitlösung vorhanden waren. Die übrigen Stoffe, sowie die RNA-Interferenz zeigten keine signifikante Veränderung der Aktionspotenzialfrequenz. Die EC_{50} von Etomidat war 13,47 μM (95 % CI: 5,16 - 35,19 μM) in der Kontrollgruppe. Mg^{2+} , Mema, DAP5, DXM, DXO und CNQX führten zu einer Abnahme der EC_{50} bezogen auf die Aktionspotenzialfrequenz.

Die Interaktion zwischen NMDA- und GABA_A-Rezeptor scheint auch im neuronalen Netzwerk fortzubestehen. Weitere Untersuchungen *in vivo* sind vonnöten, um die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zu überprüfen.

II. Abstract

Multimorbid patients, especially those with pre-existing cardiac conditions, pose a challenge to anesthesiologists. Etomidate, a GABAergic anesthetic, shows few cardiovascular side effects. However, its effect is influenced by NMDA receptor hypofunction. This can be caused by drugs or certain diseases. This study investigates the role of the NMDA receptor and its influence on the efficacy of etomidate in the hippocampal network.

Cultures of rat hippocampal neurons were grown on microelectrode arrays. Etomidate was added in increasing concentrations with or without the presence of NMDA receptor modulators and action potentials per minute were recorded. The following modulators were used: Magnesium (Mg^{2+}), Memantine (Mema), DAP5, Dextromethorphan (DXM), Dextrorphan (DXO), Cyanquixaline (CNQX), CBR-5884 and N-acetylaspartylglutamate (NAAG). In addition, short interfering RNA interference was used to induce receptor hypofunction. The decrease in action potential frequency was compared to the control group (artificial cerebrospinal fluid without magnesium supplementation or with magnesium supplementation in experiments with NAAG) using Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney U test. The EC_{50} of etomidate with and without modulators was determined using a non-linear regression based on action potential frequency and modelled using a logistic Hill equation. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

The action potential frequency decreased significantly more with the addition of 5-10 μM etomidate when Mg^{2+} , Mema, DAP5, DXM or DXO were present in the solution. Other substances and addition of short interfering RNA showed no significant change. The EC_{50} of etomidate was 13.47 μM (95 % CI: 5.16 - 35.19 μM) in the control group. Mg^{2+} , Mema, DAP5, DXM, DXO and CNQX caused a reduction in the EC_{50} based on action potential frequency.

The interaction between NMDA and GABA_A receptors appears to persist in the neuronal network. Further *in vivo* studies are needed to determine the clinical relevance of these findings.

III. Abkürzungsverzeichnis

AD = Alzheimer-Demenz

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*

AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ANOVA = *analysis of variance*

AWP = Auswaschperiode

Beh = behandelte Kultur

bp = Basenpaare

CaMKII = Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

cDNA = *complementary DNA*

CI = *confidence interval*

CNQX = Cyanquixaline

CRIS = *Checklist for Reporting in vitro Studies*

Ct = *threshold cycle*

CYP = Cytochrom-P-450

DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate

Df = *degrees of freedom*

DXM = Dextromethorphan

DXO = Dextrorphan

E = Effizienz

eAP = extrazelluläres Aktionspotenzial

EC₅₀ = mittlere effektive Konzentration

EDTA = *ethylenediaminetetraacetic acid*

Eto = Etomidat

GABA = *gamma-amino-butyric-acid*

GCP II = Glykoprotein-Glutamat-Carboxypeptidase II

GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*

HHU = Heinrich-Heine-Universität

HEPES = (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HKG = *housekeeping-Gen*

KG = Körpergewicht

Kon = Kontrolle

LANUV = Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz

LTP = *long term potentiation*

MEA = Mikroelektrodenarray

MEM = *minimal essential medium*

Mema = Memantin

mRNA = *messenger RNA*

n = Anzahl an Experimenten

N = Anzahl an Rattenwürfen

NAAG = N-Acetylaspartylglutamat

nAChR = nikotinische
Acetylcholinrezeptoren

NBM = *neurobasal medium*

NCBI = *national center for
biotechnology information*

NMDA = N-Methyl-D-Aspartat

nob/min = *number of bursts per
minute*

nos/min = *number of spikes per
minute*

PBA = pseudobulbärer Affekt

PBS = *phosphate-buffered saline
solution*

PCP = Phencyclidin

PCR = *polymerase chain reaction*

PHGDH = 3-
Phosphoglyceratdehydrogenase

PKC = Proteinkinase C

qPCR = quantitative PCR

RNA = *ribonucleic acid*

RNAi = RNA-Interferenz

RPM = *revolutions per minute*

Sig. = Signifikanz

siRNA = *short interfering RNA*

SEM = *standard error of the mean*

USA = *United States of America*

vs = *versus*

ZETT = Zentrale Einrichtung für
Tierforschung und
Tierschutzaufgaben

ZNS = Zentralnervöses System

IV. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	
II.	Abstract.....	
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	
IV.	Inhaltsverzeichnis	
V.	Dissertationsschrift.....	1
1.	Einleitung	1
1.1	Wissenschaftlicher Hintergrund	1
1.2	Mikroelektrodenarrays	3
1.3	Etomidat.....	4
1.4	NMDA-Rezeptoren und die Magnesium-Blockade	5
1.5	NMDA-Rezeptor-Modulatoren	7
1.5.1	Memantin	7
1.5.2	DAP5	9
1.5.3	Dextromethorphan und Dextrorphan	9
1.5.4	CNQX	10
1.5.5	CBR-5884	11
1.5.6	NAAG	11
1.6	RNA-Interferenz und genetische Modulation des NMDA-Rezeptors ..	12
1.7	Ziele der Arbeit und Fragestellung	13
2.	Materialien und Methoden.....	15
2.1	Organentnahme und Präparation der Zellkulturen	15
2.2	Versuchsprotokolle bei Mikroelektrodenarrays-Messungen.....	16
2.3	Mikroelektrodenarrays und Messungen	18
2.4	Aktionspotenzialanalyse	21
2.5	Versuche mit RNA-Interferenz	23
2.5.1	Transfektion der siRNA.....	23

2.5.2	Messungen an siRNA-transfizierten Mikroelektrodenarrays	24
2.6	quantitative real-time PCR	24
2.6.1	Isolation der mRNA und Herstellung der cDNA	24
2.6.2	Protokoll der quantitativen <i>real-time polymerase chain reaction</i> ..	25
2.6.3	Fluoreszenzdetektion.....	26
2.6.4	Berechnung der Effizienz.....	29
2.6.5	Relative Quantifizierung.....	30
2.7	Statistische Auswertung.....	31
2.8	Liste der benutzten Substanzen und Geräte.....	32
3.	Ergebnisse	35
3.1	Übersicht der Ergebnisse.....	35
3.2	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat im ACSF ohne Magnesium.....	40
3.3	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat im ACSF mit Magnesium.....	44
3.4	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von Memantin.....	47
3.5	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von DAP5	51
3.6	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von Dextromethorphan oder Dextrorphan	53
3.7	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von CNQX.....	58
3.8	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat nach Inkubation mit CBR-5884.....	61
3.9	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von NAAG im Vergleich zu ACSF mit Magnesium.....	64
3.10	Veränderung der hippocampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat nach Inkubation mit siRNA	67

4.	Diskussion.....	73
4.1	Überblick der Ergebnisse.....	73
4.2	Vorangegangene Arbeiten	74
4.2.1	Rolle des NMDA-Rezeptors in der Anästhesie	74
4.2.2	NMDA- und GABA _A -Rezeptor Interaktion	76
4.3	Vergleich der Daten zur Literatur	78
4.4	Limitationen und Stärken der Arbeit.....	82
4.4.1	Limitationen der Arbeit.....	82
4.4.2	Stärken der Arbeit.....	83
4.5	Interpretation.....	84
4.6	Ausblick	84
5.	Literaturverzeichnis.....	85
VI.	Danksagung	95

V. Dissertationsschrift

1. Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Der demographische Wandel bringt mit steigendem Alter auch eine steigende Krankheitslast, die sog. Morbidität. Durch die Entwicklung von neuen und besseren Therapieoptionen können Menschen auch bei multiplen, gravierenden Vorerkrankungen ihr Leben fortführen. Dieser Umstand sorgt allerdings für immer wachsende Herausforderungen bei der Patientenversorgung, welche insbesondere in kritischen Umgebungen wie im Operationssaal oder der Intensivstation zum Tragen kommen. Oftmals sehen sich somit Anästhesist:innen mit diesen Herausforderungen konfrontiert. Multimorbide und vor allem kardial vorerkrankte Patient:innen benötigen besonderes Augenmerk bei der Wahl der benutzten Verfahren und Medikamente zur Narkoseeinleitung- und -aufrechterhaltung. Gebräuchliche Hypnotika wie z. B. Propofol können für eine ausgeprägte Hypotonie sorgen, welche es, besonders bei schwerkranken Patient:innen, zu vermeiden gilt. Eine Alternative zu Propofol bildet Etomidat, welches ebenfalls zur Narkoseeinleitung benutzt werden kann, aber im Gegensatz zu Propofol weniger unerwünschte kardiovaskuläre Wirkungen verursacht (1). Auf Grund einer Suppression der adrenokortikalen Achse ist Etomidat nicht zur Narkoseaufrechterhaltung zugelassen, aber es findet in der heutigen Medizin vor allem zur Einleitung kardiochirurgischer Eingriffe noch Gebrauch (2).

Es gibt zahlreiche Belege für eine *gamma-amino-butyric-acid* (GABA)-erge Vermittlung der anästhetischen Wirkung durch Etomidat und Propofol (3, 4). Dennoch sind einige Wechselwirkungen bislang ungeklärt. So konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass die gleichzeitige Infusion des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (auch Dizocilpine genannt) die Potenz von Etomidat um ca. 50 % verstärken kann (5). Des Weiteren konnte bei elektrophysiologischen Experimenten unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass die Potenz von Etomidat zunimmt, wenn Magnesium im Ableitmedium vorhanden ist (Prof. Dr. O. Sergeeva 2021, nicht publizierte Daten). Da dieses

Ion ein physiologischer Antagonist des NMDA-Rezeptors ist, scheint eine Interaktion zwischen Etomidat und besagtem Rezeptor denkbar. Eine mögliche Erklärung ist eine wechselseitige Beziehung zwischen den NMDA- und GABA_A-Rezeptoren. An dissoziierten hippokampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors eine Verringerung der GABAergen Ströme zur Folge hat (6). Somit wäre eine umgekehrte Interaktion ebenfalls plausibel. Eine Wirkvermittlung von Etomidat über den NMDA-Rezeptor scheint nach aktueller Datenlage hingegen unwahrscheinlich.

Inwieweit ist also der NMDA-Rezeptor an der Vermittlung der Anästhesie beteiligt? Trotz vieler Untersuchungen ist diese Frage nicht abschließend geklärt. Am wahrscheinlichsten ist, dass der NMDA-Rezeptor eine indirekte, modulatorische Funktion bei der Vermittlung von Hypnose, Analgesie und Immobilität übernimmt (7).

Eine NMDA-Rezeptor-Hypofunktion könnte sich also auf die Wirkung von bestimmten Anästhetika wie Etomidat auswirken. Im klinischen Alltag gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie eine solche Hypofunktion eintreten kann. Naheliegend ist eine gleichzeitige Einnahme oder Verabreichung von Etomidat mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Am gebräuchlichsten ist das zur Analgesie und Narkoseeinleitung verwendete Ketamin (8), welches die Kanalpore des NMDA-Rezeptors blockiert (9). Ein weiteres, weniger gebräuchliches Medikament ist Memantin, welches als Antidementivum zur Therapie der Alzheimer-Demenz (AD) zugelassen ist (10-12). Auch Dextromethorphan (DXM), was z.T. als Beisatz in frei verkäuflichen Hustenmitteln Verwendung findet (13), entfaltet seine Wirkung über eine Inhibierung des NMDA-Rezeptors. Es besteht also auch die Möglichkeit einer Einnahme von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, ohne Wissen der behandelnden Anästhesist:innen.

Eine seltenere, aber dafür umso wichtigere Erscheinung der NMDA-Rezeptor-Hypofunktion ist die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis. Bei dieser seltenen Autoimmunerkrankung bildet der Organismus Antikörper gegen den hirneigenen Rezeptor, was zu einer (Meningo-) Enzephalitis mit verschiedenen, z.T. diffusen Symptomen führen kann (14). Aktuell gibt es keine großen klinischen Studien oder Übersichtsarbeiten zur Narkoseeinleitung und -führung in diesem

Patientenkollektiv. Der Konsensus in der Literatur spricht allerdings gegen eine Verwendung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Ketamin und für GABAerge Anästhetika wie Propofol oder Etomidat (15-17).

Es scheint also, als könnte eine Wechselwirkung zwischen NMDA- und GABA_A-Rezeptoren klinisch bedeutsam sein, z.B. in Situationen, in denen eine Hypofunktion des NMDA-Rezeptors gegeben ist, aber eine Narkose nicht umgangen werden kann. Zugleich könnte solch eine Wirkverstärkung benutzt werden, um Dosis einzusparen und die Rate an unerwünschten Wirkungen zu reduzieren. Dies könnte auch einen Schritt in Richtung individualisierter, patientenzentrierter Anästhesie darstellen. Daher ist es einerseits wichtig, mögliche Wechselwirkungen zwischen Medikamenten zu verstehen, um die Sicherheit der Anwendung zu erhöhen. Andererseits kann ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus gängiger Anästhetika den Weg ebnen, um Substanzen mit einem besseren kardialen Wirkungsprofil herzustellen.

In dieser Arbeit soll die modulatorische Rolle des NMDA-Rezeptors in der Anästhesie untersucht werden, indem der Einfluss des NMDA-Rezeptors auf die Wirksamkeit des GABAergen Anästhetikums Etomidat in einem *in vitro* Neuronenmodell hippokampaler Zellen untersucht wird.

1.2 Mikroelektrodenarrays

Die ursprünglichen Beobachtungen einer möglichen Interaktion von Etomidat und Magnesium in unserer Arbeitsgruppe fanden an Mikroelektrodenarrays (MEA) statt. Diese elektrophysiologischen Messinstrumente sind seit ca. 1970 in Gebrauch (18) und können, im Gegensatz zu Einzelzell-Ableitungen wie die *patch-clamp*-Technik, die Aktivität eines vollständigen Neuronennetzwerks ableiten (19). Auf Grund der sehr guten örtlichen und zeitlichen Auflösung können dennoch einzelne Aktionspotenziale erkannt werden.

Für MEA-Ableitungen werden neuronale Kulturen direkt auf einer Elektrodenplatte gezüchtet. Durch den Einsatz von Materialien ohne zytotoxischen Effekt können diese Kulturen mehrere Monate kultiviert werden und erlauben wiederholte Experimente. So kann die Anzahl benötigter

Versuchstiere minimiert werden. Dies ist wichtig, weil für solche Kulturen nur embryonale oder neonatale Zellen in Frage kommen.

Ein Vorteil der Benutzung von MEAs liegt in der einfachen Bedienung: So können schnell Ableitungen vorgenommen werden, ohne dafür vorher komplizierte Versuchsaufbauten vorbereiten zu müssen. Die Systeme können Veränderungen des Aktivitätsmusters registrieren und zum Beispiel Wirkorte genauer ermitteln (20). Weitere Einsatzgebiete sind die Identifizierung von Stoffen, welche neurologische Symptome verursachen können (21-23), oder die Entwicklung von Feedback-Systemen, welche in der Lage sind auf äußere Reize zu reagieren und sich anzupassen (24, 25).

1.3 Etomidat

Etomidat (chemisch R-1-(1-Ethylphenyl)imidazole-5-ethylester) ist ein Hypnotikum, welches zur Einleitung von Narkosen *via* intravenöse Applikation benutzt wird. Etomidat fand nach Feststellung seiner hypnotischen Wirksamkeit 1972 (26) schnell Einzug in die klinische Praxis. Dies lag zum großen Teil an dessen günstigem kardiovaskulären Risikoprofil: Etomidat sorgt zwar für eine Abnahme von Herzzeitvolumen, Schlagvolumen und Blutdruck, aber in einem schwächeren Umfang als zum Beispiel Propofol, welches ebenfalls zur Einleitung der Anästhesie mittels intravenöser Gabe benutzt wird (1, 27).

Im Jahrzehnt nach seiner Entdeckung wurde Etomidat in der Klinik zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie benutzt. 1983 kamen allerdings erste Berichte einer erhöhten Mortalität bei kritisch kranken Patient:innen auf (28-30), wonach die Benutzung dieses Präparats stark zurückging. Diese beschriebene erhöhte Mortalität ist auf eine Hemmung der adrenokortikalen Achse – insbesondere über eine Hemmung der 11- β -Hydroxylase - zurückzuführen, was zu derselben Zeit in präklinischen Studien gezeigt wurde (4, 30, 31). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist Etomidat in Deutschland sowie der Europäischen Union nicht mehr zur Narkoseaufrechterhaltung zugelassen.

Heutzutage wird Etomidat vor allem zur Einleitung herzchirurgischer Eingriffe benutzt (2, 32). Auch bei Blitzeinleitungen und kurzen Eingriffen, bei welchen eine einmalige Hypnotikumgabe genügt, findet Etomidat Verwendung (33-35).

Etomidat entfaltet seine hypnotische Aktivität durch eine positive allosterische Modulation des GABA_A-Rezeptors, insbesondere der β_2 - und β_3 -Untereinheiten, d.h. der Effekt einer GABA-Bindung an den Rezeptor wird verstärkt. Die sedierende Wirkung wird in großen Teilen durch eine Potenzierung an der β_2 -Untereinheit erreicht. Die immobilisierende Komponente von Etomidat beruht hingegen größtenteils auf einer Aktivierung der β_3 -Untereinheit (36, 37). Diese Potenzierung des Rezeptors sorgt für eine Stabilisation der Offen-Konfiguration und eine Verstärkung des Anionenstroms durch den Kanal, was wiederum zu einer Hyperpolarisation der entsprechenden Zelle führt. Diese Hyperpolarisation hat eine Hemmung der synaptischen Transmission zur Folge, da so die Schwelle zum Erreichen eines Aktionspotenzials gesteigert wird (38). Diese Selektivität für die β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors sorgt dafür, dass Effekte über andere Wirkorte größtenteils ausgeschlossen werden können.

Derzeit befinden sich verschiedene Etomidat-Analoga wie Methoxycarbonyl-Etomidat und Carboetomidat in der Entwicklung. Diese Stoffe sollen ein ähnlich günstiges Wirkungsprofil wie Etomidat aufweisen, dabei aber weniger mit der 11- β -Hydroxylase und damit der adrenokortikalen Achse interagieren (39-42). Es besteht die Hoffnung, mit diesen Stoffen neue Möglichkeiten der Narkoseeinleitung bei kardiovaskulär vorerkrankten Patient:innen zu finden.

1.4 NMDA-Rezeptoren und die Magnesium-Blockade

NMDA-Rezeptoren sind ubiquitär exprimierte ionotrope Glutamat-Rezeptoren, welche eine Vielzahl besonderer Eigenschaften aufweisen. Sie spielen in vielen Prozessen des zentralnervösen Systems (ZNS) eine Schlüsselrolle.

NMDA-Rezeptoren sind hochaffin für L-Glutamat, den wichtigsten exzitatorischen Transmitter des ZNS, sind aber nicht an der basalen synaptischen Transmission beteiligt (43). Dies hat mehrere Gründe: Einerseits wird Glutamat durch Transporter in der Präsynapse und den nahegelegenen Astrozyten schnell und effizient aus dem synaptischen Spalt entfernt. Andererseits gibt es eine starke, spannungsabhängige Magnesium-Blockade des

Kanals bei basaler Erregung. Die Mg^{2+} -Ionen können bei Ruhemembranpotenzialen in die Kanalpore gelangen und den Kanal blockieren (44). Diese Blockade wird erst aufgehoben, wenn bei ausreichend hoher Depolarisation der Membran das Mg^{2+} aus der Bindung entfernt werden kann.

Gemeinsam sorgen diese beiden Mechanismen dafür, dass NMDA-Rezeptoren im ZNS als sogenannte „Koinzidenzdetektoren“ fungieren können, d.h. sie werden erst aktiviert, wenn verschiedene Inputs an einer Synapse gebündelt werden. Für eine länger andauernde Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ist eine Glutamat-Bindung an den Rezeptor bei gleichzeitiger Membrandepolarisation notwendig. Die alleinige Glutamatbindung reicht jedoch bei depolarisierter Membran nicht aus, um diese Kanäle zu aktivieren: Dafür ist zusätzlich die Bindung eines Co-Agonisten wie Glyzin (45) oder D-Serin vonnöten (46).

Die Bindung von Agonisten und Antagonisten ist von der Konstellation an Untereinheiten des Rezeptors abhängig. NMDA-Rezeptoren können aus drei verschiedenen Untereinheiten bestehen: GluN1 (veraltet auch NR1 genannt), GluN2 (alt: NR2) und GluN3 (alt: NR3). Die GluN1-Untereinheit beinhaltet die Bindungsstelle für Glyzin am NMDA-Rezeptor und ist für die Funktion des Rezeptors unerlässlich. Die GluN2-Untereinheit hingegen ist Bindungsort für Glutamat und kann wiederum in verschiedene Isoformen unterteilt werden: GluN2A-D. Diese verschiedenen Isoformen weisen allesamt unterschiedliche Affinitäten für Glutamat auf und bestimmen weitere Eigenschaften des Rezeptors wie Permeabilität und Kinetik (47, 48). Die GluN3-Untereinheit weist ebenfalls eine Glyzin-Bindungsstelle auf, übernimmt aber im Gegensatz zu der GluN1-Untereinheit eine inhibitorische Funktion des NMDA-Rezeptors (49, 50). Diese Untereinheiten bilden gemeinsam Heterotetramere, welche meistens aus zwei GluN1- und zwei GluN2-Untereinheiten bestehen (51).

NMDA-Rezeptoren und insbesondere die GluN2B-Untereinheit sind verantwortlich für die neuronale Kalziumpermeabilität. Sie sind maßgeblich am Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Postsynapse beteiligt (52), welcher verschiedene Signalwege auslösen kann und somit zu Veränderungen der Rezeptordichte und sogar der Struktur der Synapse führen kann (53). Übermäßiger Ca^{2+} -Einstrom kann aber auch Signalkaskaden der Excitotoxizität aktivieren (54). Dieser, durch

die Aktivierung von Glutamaterezeptoren bedingte Zustand ist an dem neuronalen Untergang bei Pathologien wie ischämische Schlaganfälle, Epilepsien und Schädel-Hirn-Traumata beteiligt (55).

Wie bereits erwähnt, wurde der Beitrag der NMDA-Rezeptoren in der Anästhesie von einigen Arbeitsgruppen ausgiebig untersucht. Anfängliche tierexperimentelle Studien ließen eine Vermittlung des anästhetischen Effektes durch diese Rezeptoren vermuten, da bei NMDA-Rezeptor-*knockout* GABAerge Anästhetika wie Pentobarbital ihre Wirksamkeit verloren (56). Allerdings scheint dieser Effekt auf eine Überexpression des monoaminergen Systems zurückzuführen zu sein, welche kompensatorisch im Falle eines NMDA-Rezeptor-Mangels auftritt (57, 58). Obwohl die Rolle des NMDA-Rezeptors bei der Vermittlung von Hypnose, Anästhesie und Immobilisation nicht abschließend geklärt ist, scheint dessen Funktion am ehesten modulatorischer Natur zu sein (7).

1.5 NMDA-Rezeptor-Modulatoren

1.5.1 Memantin

Memantin (3,5-Dimethyl-adamantan-1-ylamin) ist ein Antidementivum, welches in Deutschland zuerst 1989 und in den frühen 2000er sowohl in der Europäischen Union als auch in den *United States of America* (USA) zugelassen wurde (12). Obwohl Memantin vorwiegend zur Behandlung der AD eingesetzt wird (59), gibt es präklinische, sowie klinische Evidenz bezüglich dessen Verwendung zur Behandlung bei anderen Erkrankungen wie Schizophrenie, Depression und Demenz anderer Ursachen wie Parkinson, Diabetes, Durchblutungsstörungen oder hormonellen Störungen (10, 60).

Memantin wirkt über eine Blockade des NMDA-Rezeptors, genauer über eine nicht-kompetitive Hemmung, einen sog. *open-channel-block* (11), ähnlich dem Wirkmechanismus von Magnesium (61). Durch Bindung im Kanalinneren des NMDA-Rezeptors unterbindet Memantin den Ionenstrom, wodurch auch die Neurotoxizität des Rezeptors unterbunden wird (62-64). Solch eine Bindung ist jedoch nur möglich, wenn der NMDA-Rezeptor sich in seinem „offen“-Zustand

befindet: So kann Memantin in die Kanalpore eintreten und bei Schluss des Kanals in dessen Innerem festgehalten werden (61).

Abgesehen von der Wirkung an NMDA-Rezeptoren beeinflusst Memantin auch eine Vielzahl anderer molekularer Ziele: In höheren Konzentrationen (10-500 μM) werden Serotonin- und Dopamin-*reuptake*-, nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR), Serotoninrezeptoren, Sigma-1-Rezeptoren und spannungsabhängige Natriumkanäle beeinflusst (61). Parsons und Kollegen beschreiben in einem Übersichtsartikel (65) außerdem auch eine schwache Inhibition von L-Typ-Kalziumkanälen, sowie eine milde Potenzierung von α -*amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA)-Rezeptoren. Einige dieser Interaktionen sind auch bei geringeren Konzentrationen schon zu beobachten, insbesondere bei bestimmten Kombinationen von Untereinheiten, wie zum Beispiel $\alpha 7$ -Homomere des nAChR (IC_{50} 5 (95 % Konfidenzintervall: (engl.: *confidence interval* (CI)) 3-8 μM) (66).

Memantin sorgt, im Gegensatz zu anderen NMDA-Rezeptor-Antagonisten, deutlich seltener für unerwünschte Wirkungen am ZNS (67), was die Substanz verträglicher macht. Als mögliche Gründe hierfür werden in der Literatur die niedrige Bindungsaffinität, und das damit verbundenen schnelle Auflösen der Rezeptor-Modulator Bindung, die ausgeprägte Spannungsabhängigkeit und die Abhängigkeit vom Rezeptorzustand genannt. Diese Faktoren werden in der sog. *signal-to-noise*-Hypothese zusammengefasst (65). Diese beschreibt, dass Memantin bei pathologischer Aktivierung des NMDA-Rezeptors im Kanalinneren gebunden bleibt und diese somit verhindert. Die physiologische Aktivierung des NMDA-Rezeptors kann jedoch unverändert ablaufen, da bei ausreichender Depolarisierung Memantin die Bindung auflöst (65).

Auf Grund des steigenden Alters der Allgemeinbevölkerung liegt die Vermutung nahe, dass immer mehr Menschen an Demenzen unterschiedlicher Ätiologien erkranken werden. Für viele dieser Menschen würde Memantin eine mögliche Therapieoption bedeuten. Es ist also denkbar, dass der therapeutische Einsatz von Memantin in den nächsten Jahren zunehmen wird.

1.5.2 DAP5

Kurz nach seiner Entdeckung Anfang der 1980er Jahre (68) wurde D-2-Amino-5-phosphonovalerate (DAP5) intensiv erforscht (69). Durch diesen potenten und selektiven Antagonisten des NMDA-Rezeptors konnte die Beteiligung des Rezeptors an der Langzeitpotenzierung (engl.: *long term potentiation*, LTP) und damit an der synaptischen Plastizität gezeigt werden (70). Später wurde die Relevanz des NMDA-Rezeptors für Lernprozesse festgestellt, wie im Morris-*Water-Maze*-Versuch gezeigt (71). Hierbei sollten Ratten eine Plattform in einem kleinen Pool mit trübem Wasser finden. Nach einer intraventrikulären Behandlung mit DAP5 schnitten Versuchstiere deutlich schlechter als die Kontrollen ab und verbrachten weniger Zeit im richtigen Quadranten des Pools. Ähnliche Effekte wurden für Kurz- und Langzeitgedächtnisprozesse (72) und operantes Lernen festgestellt (73).

Zusammenfassend ist DAP5 ein hoch potenter und selektiver Inhibitor des NMDA-Rezeptors. Es hat bereits stark zu der Erforschung dieses Rezeptors beigetragen und eignet sich für die gegebene Fragestellung auf Grund seiner hohen Selektivität.

1.5.3 Dextromethorphan und Dextrorphan

Dextromethorphan ist ein seit über 60 Jahren verwendetes, frei verkäufliches Antitussivum, welches in einer Vielzahl verschiedener Präparate verwendet wird. Seit 2013 ist es in Europa auch für die Behandlung des pseudobulbären Affekts (PBA) zugelassen (13). Der PBA geht mit einer übertriebenen oder inkongruenten emotionalen Reaktion auf Ereignisse einher und tritt häufig als Begleiterscheinung der amyotrophen Lateralsklerose, von Schlaganfällen, der AD und weiteren Krankheitsbildern auf (74). Zusätzlich zu diesen Indikationen wird DXM auf Wirksamkeit bei einer Vielzahl anderer Krankheitsbilder wie Depressionen oder chronischen Schmerzen untersucht (75). Außerdem wurden diese NMDA-Rezeptor-Antagonisten hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei der Behandlung von Diabetes Mellitus untersucht (76).

DXM ähnelt strukturell Opioiden, hat jedoch keine opioid-typischen Wirkungen und bindet auch nicht an den entsprechenden Rezeptoren (75). Vielmehr wird als Wirkmechanismus für die meisten therapeutischen Indikationen das

Zusammenspiel von NMDA-Rezeptor-Antagonismus und Sigma-1-Rezeptor-Agonismus vermutet (75). Außerdem beeinflusst DXM noch weitere Ziele wie zum Beispiel Serotonin- und Noradrenalin-*reuptake*-Transporter, nAChR und spannungsabhängige Natriumkanäle – ähnlich wie auch Memantin (77). Eine weitere Ähnlichkeit zu Memantin zeigt DXM auch in der Art und Weise, den NMDA-Rezeptoren zu blockieren: DXM bindet im Kanallinneren, verhindert so eine Passage von Ionen durch die Pore und wird bei Depolarisation der Membran aus der Bindungsstelle gelöst, um eine physiologische Aktivierung des Rezeptors zu erlauben (78).

DXM ist ein gut verträgliches Medikament und sorgt in therapeutisch üblichen Dosierungen kaum für unerwünschte Wirkungen, auch wenn höhere Dosen ähnliche Effekte wie Ketamin und Phencyclidin (PCP) haben, d.h. zu Dissoziation und Halluzination führen (79, 80). Hinzu kommen gastrointestinale Beschwerden sowie Schläfrigkeit und Schwindel, welche z.T. auch bei niedrigeren Dosierungen auftreten können (13).

Im menschlichen Körper wird DXM mithilfe der Cytochrom-P-450-(CYP)-Enzyme schnell zu Dextrorphan (DXO) metabolisiert, was vermutlich ebenfalls die therapeutische Aktivität des Medikaments vermittelt und auch der stärkere NMDA-Rezeptor-Antagonist zu sein scheint (81-83). Auf Grund interindividueller Unterschiede im CYP-System bauen Menschen DXM unterschiedlich schnell zu DXO um. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen dieser Arbeit sowohl DXM als auch DXO getestet.

1.5.4 CNQX

Cyanquixaline (chemisch 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX) ist ein kompetitiver AMPA-Rezeptor-Inhibitor. AMPA-Rezeptoren sind, wie NMDA-Rezeptoren auch, ionotrope Glutamaterezeptoren. AMPA-Rezeptoren sind aber in erster Linie an der basalen synaptischen Transmission beteiligt (84). CNQX wird in der Wissenschaft oft benutzt, um die exzitatorische synaptische Transmission zu beeinflussen: Der Antagonist bewirkt die Endozytose von AMPA-Rezeptoren und verschiebt somit das synaptische Gleichgewicht in Richtung Inhibition. Außerdem inhibiert CNQX auch Kainat-Rezeptoren (85) und ist ein nichtkompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist (86). Somit isoliert CNQX die

GABA-erge Transmission des ZNS. Die EC_{50} für die Inhibierung von AMPA-Rezeptoren ist mit $0,3 \mu\text{M}$ vom Hersteller Abcam (Cambridge, UK) angegeben; Für die Inhibierung von NMDA-Rezeptoren hingegen sind $25 \mu\text{M}$ beschrieben (87, 88). Folglich sollte die benutzte Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ausreichen, um die AMPA-Rezeptorfunktion, aber nicht die NMDA-Rezeptorfunktion, vollständig zu hemmen.

1.5.5 CBR-5884

Wie bereits oben beschrieben, benötigen NMDA-Rezeptoren zusätzlich zur Bindung von Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter auch einen Co-Agonisten wie Glyzin oder D-Serin (46). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die NMDA-Rezeptor-Aktivierung durch D-Serin durch die 3-Phosphoglyceratdehydrogenase (PHGDH) beeinflusst wird (89). Dieses Schlüsselenzym der Serinsynthese wird durch CBR-5884 nicht-kompetitiv inhibiert (90). Seit der Entdeckung dieses Effekts wurde CBR-5884 *in vitro* zur Behandlung verschiedener Krankheiten wie Ovarial- und Magenkarzinome, aber auch Candida-Infektionen erprobt (91-93). Durch die Nutzung dieses Moleküls kann die metabolische Modulation des NMDA-Rezeptors durch D-Serin untersucht werden.

1.5.6 NAAG

Das neuronale Dipeptid N-Acetylaspartylglutamat (NAAG) ist ein in Säugetieren durch das gesamte ZNS verbreitete Transmitterpeptid (94, 95). Es konnte gezeigt werden, dass NAAG in Neuronen durch die NAAG-Synthetase hergestellt (96, 97) und in Astrozyten durch die Glykoprotein-Glutamat-Carboxypeptidase II (GCP II) abgebaut wird (98, 99).

Die GCP II bestimmt maßgeblich die Wirkweise von NAAG: Bei der basalen synaptischen Transmission wird nur wenig GCP II ausgeschüttet und somit wenig NAAG gespalten. Das Peptid kann so seine Rolle als Inhibitor des NMDA-Rezeptors sowie verschiedener anderer glutamaterger Rezeptoren wahrnehmen (100, 101). Bei hoher synaptischer Aktivität wird allerdings die Expression von GCP II zusammen mit der Ausschüttung an NAAG hochreguliert, wodurch vermehrt NAAG zu N-Acetylaspartat und Glutamat abgebaut wird. Letzteres kann über eine (vermutlich allosterische) Modulation (102) des NMDA-Rezeptors

diesen aktivieren und, infolgedessen, eine verstärkte Excitotoxizität verursachen (100, 101). Daher wird NAAG als möglicher Auslöser verschiedener Pathologien wie z.B. Schizophrenie (103, 104) in Betracht gezogen. Es konnte auch eine Neuroprotektion durch erhöhte Konzentrationen an NAAG nachgewiesen werden, was Gegenstand aktueller Forschung ist (101). Außer der GCP II haben auch der pH-Wert und verschiedene NMDA-Rezeptoruntereinheiten einen Einfluss auf die Wirkweise von NAAG (105).

1.6 RNA-Interferenz und genetische Modulation des NMDA-Rezeptors

Ribonukleinsäuren (engl.: *ribonucleic acid* (RNA))-Interferenz (RNAi) ist ein physiologischer Prozess zur genetischen Regulation der Expression von Proteinen. Die Entdeckung von *short interfering RNA* (siRNA) und des Zusammenhangs mit der Genexpression erbrachte den Entdeckern (106) kurze Zeit nach der Veröffentlichung ihrer Arbeit einen Nobelpreis. Bei siRNA handelt es sich um kurze Abschnitte doppelsträngiger RNA von 20-24 Basenpaaren (bp) Länge (107) mit einem *sense*- und einem *anti-sense*-Strang. Nach Degradation des *sense*-Strangs durch den *RNA-induced silencing complex* (RISC) (108) kann der *anti-sense*-Strang an *messenger RNA* (mRNA) binden und die Proteinbiosynthese unterbrechen (109, 110). Durch diesen sehr spezifischen Wirkansatz können siRNAs benutzt werden um die Synthese körpereigener Proteine zu unterbinden (111); gleichzeitig sorgt dieser Ansatz aber nicht für eine permanente Änderung des Genoms und hat sich daher in Sicherheitsaspekten bewährt (112).

Das *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1* (GRIN1)-Gen codiert für die GluN1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, welche für dessen Funktion unabdingbar ist (s.o.)(113). Obwohl es bisher noch wenig Forschung zur Runterregulierung des NMDA-Rezeptors mittels siRNA gibt, konnten verschiedene Studien dieses Prinzip erfolgreich belegen (114, 115). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Modulation des NMDA-Rezeptors möglich ist und klinisch nachweisbare Effekte hervorruft, ohne die weitere Funktion der Versuchstiere einzuschränken (116). Ein Vorteil der genetischen Modulation mit siRNA gegenüber alternativen Methoden zeigt sich in der größtenteils normalen

Entwicklung von Versuchstieren, auch nach Regulation von ansonsten lebensnotwendigen Genen wie GRIN1 (117). Der globale *knockout* der NMDA-Rezeptor-Untereinheit GluN1 führt zu erheblichen Veränderungen im Neurotransmitterhaushalt, was die Entwicklung der Versuchstiere beeinflusst (57, 118).

1.7 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Es gibt verschiedene Belege für eine Wechselwirkung zwischen den GABA_A-Rezeptoren und den NMDA-Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der NMDA-Rezeptoren eine Abnahme der GABAergen Ströme *in vitro* zur Folge hat (6, 119). Ebenfalls zeigte sich im Tiermodell, dass eine gleichzeitige NMDA-Rezeptor-Blockade eine Abnahme der EC₅₀ von Etomidat zur Folge hat (5). Die Auswirkung dieser Interaktion wurde allerdings bisher kaum erforscht. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die Wechselwirkung zwischen NMDA- und GABA_A-Rezeptoren im hippokampalen Netzwerk besser zu verstehen.

Die Arbeit testet die Hypothese, dass eine pharmakologische Blockade und genetische Herunterregulierung der NMDA-Rezeptoren im hippokampalen Netzwerk eine gesteigerte Potenz von Etomidat im Sinne einer stärkeren Abnahme der Aktionspotenzialfrequenz *in vitro* verursacht.

Abbildung 1.1 stellt die NMDA- und GABA_A-Rezeptoren und deren Interaktion dar, im oberen Teil bei aktivem NMDA-Rezeptor, im unteren Teil bei inaktivem Rezeptor. Auf der rechten Seite sind die Bindungsstellen verschiedener verwendeter Substanzen dargestellt.

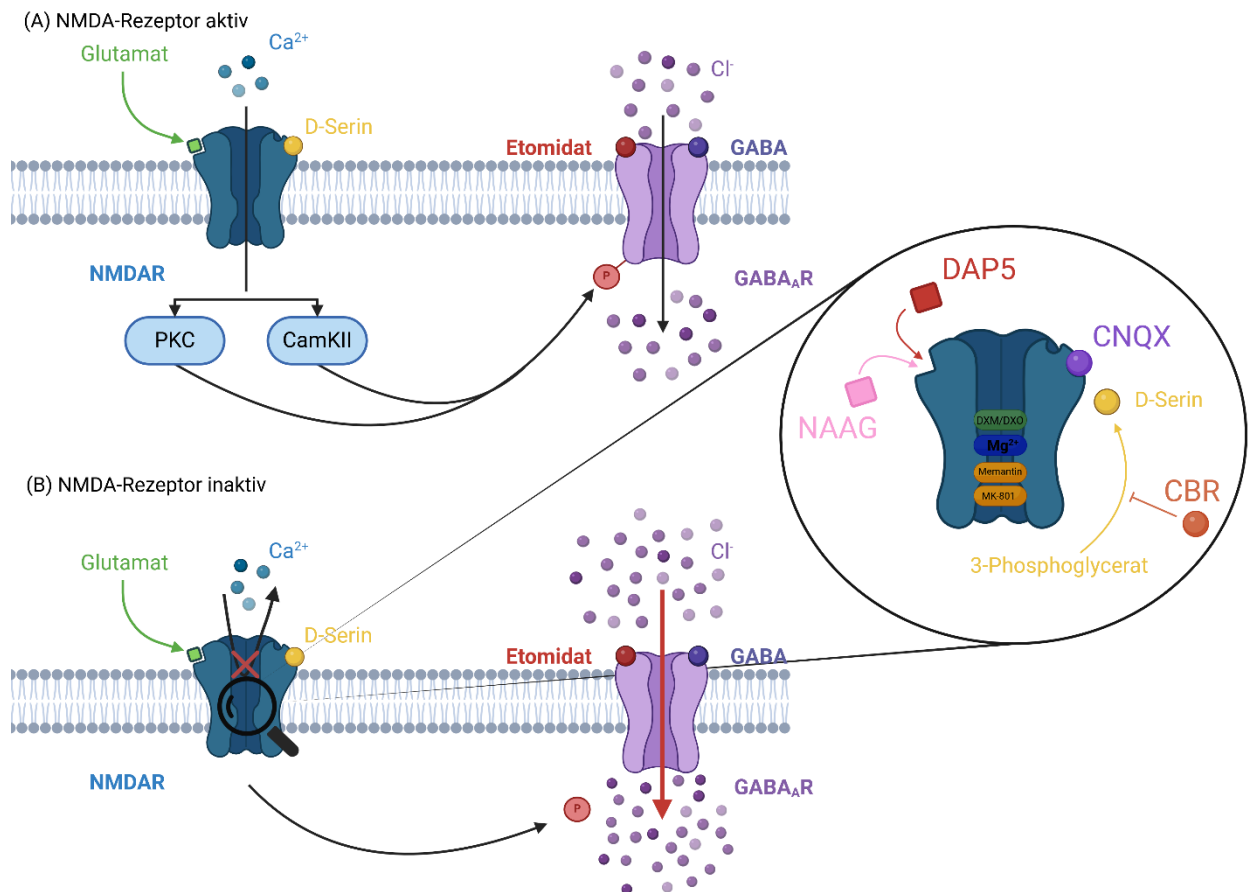


Abbildung 1.1: NMDA- und GABA_A-Rezeptoren Interaktion

Abb. 1.1: NMDA- und GABA_A-Rezeptoren Interaktion. (A) zeigt den aktiven Zustand des NMDA-Rezeptors mit nachfolgender Phosphorylierung des GABA_A-Rezeptors durch die Proteinkinase C (PKC) und die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). (B) zeigt den inhibierten NMDA-Rezeptor. Der GABA_A-Rezeptor wird daraufhin nicht mehr phosphoryliert und weist eine stärkere Aktivierung auf. Auf der rechten Seite sind die benutzten Modulatoren abgebildet, so wie ihre Bindungsstellen, bzw. ihren Angriffspunkt in den Metabolismus des NMDA-Rezeptors.

Erstellt mithilfe von BioRender.com ©.
 CaMKII = Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; GABA = *gamma-amino-butyric-acid*; NAAG = N-Acetylaspartylglutamat; NMDA = N-Methyl-D-Aspartat; PKC = Proteinkinase C

2. Materialien und Methoden

Diese Arbeit ist nach der *Checklist for Reporting in vitro Studies (CRIS) guidelines* geschrieben worden (120).

2.1 Organentnahme und Präparation der Zellkulturen

Die Experimente wurden bei der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität angemeldet (Aktenzeichen O58/91) und befolgen die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

Alle Experimente wurden an Kulturen aus primären Zellen von neonatalen Ratten durchgeführt. Die Versuchstiere wurden aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität bezogen. Diese wurden fachgerecht dekapitiert, die Gehirne herauspräpariert und in sterile, phosphatgepufferte Lösung (engl.: *phosphate-buffered saline solution* (PBS)) gegeben. Unter mikroskopischer Sicht wurde der Hippocampus präpariert, von der Arachnoidea befreit und auf einen Objektträger mit 0,05 % Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (Invitrogen, Cat.Nr. 25300-054) (engl.: *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA)) gegeben, wo dieser mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert wurde. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurde das Gemisch bei 37 °C und leichter Schüttelbewegung in einem Heizblock (HLC HTM 130, Ditabis, Pforzheim) für 20 min inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS und zweimaligem Waschen mit einem Nährstoff-Medium (im Weiteren MV10 genannt) bestehend aus 10 % fetales Kälberserum, 89 % *minimal essential medium* (MEM), 2 mM Glutamin, 0,1 U/ml Insulin und 10 mM (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) wurden die Zellen im Medium suspendiert und für drei Minuten (min) ruhen gelassen. Der Überstand (eine Zellsuspension gesunder Zellen) wurde abgenommen und in ein sauberes Gefäß überführt, welches bei 1300 Umdrehungen pro Minute (engl.: *revolutions per minute* (RPM)) für sechs min zentrifugiert wurde (Microstar 12, VWR, Rednor, Pennsylvania, USA). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen erneut in 120-420 µl MV10 suspendiert und auf

Polyethylenimin-beschichtete (Cat.Nr. P3143, Sigma-Aldrich) MEAs (Multi Channel Systems, Reutlingen, Cat.Nr.890953) bzw. entsprechende Trägermedien ausplattiert (Zelldichte $1-2 \times 10^5$ pro cm^2). Die Kulturen wurden in einen Brutschrank (Heracell Vios 250, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 37°C , sowie 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO_2 -Sättigung inkubiert. Vier bis acht Stunden (h) nach Ausplattierung der Zellen wurde diesen Kulturen *neurobasal medium* (NBM) mit den Zusätzen 2 % B-27 und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin hinzugegeben, um ein finales Volumen von 1,6 ml zu erreichen. Das Kulturmedium wurde einmal wöchentlich gewechselt. Am Tag des Mediumwechsels und zwei Tage darauf wurden keine Messungen mit den Kulturen vorgenommen.

2.2 Versuchsprotokolle bei Mikroelektrodenarrays-Messungen

In Vorbereitung auf eine Messung wurde den Kulturen das Kulturmedium entzogen, aufbewahrt und durch 1 ml auf 37°C vorgewärmten künstlichen Liquor cerebrospinalis (engl.: *artificial cerebrospinal fluid* (ACSF)) ersetzt, welcher folgende Bestandteile enthielt: NaCl (150 mM), KCl (3,7 mM), CaCl_2 (2,0 mM), MgCl_2 (0 oder 0,5 mM), HEPES (10 mM), Glucose (10 mM) und einen pH von 7,4 hatte. Nach einer Eingewöhnungszeit von 15 min, die dazu dienen sollte, die transport- und mediumwechselbedingten hydromechanischen Artefakte zu minimieren, wurden die ersten zwei Messungen für jeweils 120 Sekunden (s) durchlaufen. Nach Ende dieser Zeitperiode wurde 1 μl Etomidat hinzugegeben, um eine Konzentration von 0,1 μM Etomidat zu erreichen. Nach einer erneuten Wartezeit von etwa einer min wurde eine 120 s dauernde Messung durchgeführt und die Flüssigkeit im Reservoir durch frisches ACSF ersetzt. So wurde vorgegangen, bis die gesamte Konzentrationsreihe von Etomidat gemessen worden war (0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM und 50 μM). Nach der letzten Messung mit Etomidat wurden erneut zwei Kontrollmessungen über 120 s durchgeführt und den Zellkulturen dann ihr ursprüngliches Kulturmedium zurückgegeben.

Für Messungen in Anwesenheit von Magnesium wurde ein zweiter Ansatz hergestellt, der ACSF mit 500 µM Magnesiumchlorid enthielt und so vorgegangen wie oben beschrieben.

Für Ableitungen in Anwesenheit von pharmakologischen Modulatoren der NMDA-Rezeptoren wurden keine separaten Lösungen hergestellt, sondern die Stoffe im Rahmen der Messungen in den Glaszylinder der MEAs zu der ursprünglichen Ableitlösung ohne Magnesium gegeben. Dies erlaubte es, die Substanzen bis kurz vor Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren zu lagern, um eventuelle Degradationen zu verhindern. Da die Hypothese aufgestellt wurde, dass unter den vorliegenden Bedingungen NAAG den NMDA-Rezeptor aktivieren würde, wurden diese Messungen in ACSF mit 500 µM Magnesiumzusatz durchgeführt. Durch die magnesiumbedingte NMDA-Rezeptor-Blockade sollte so die NAAG-bedingte Aktivierung deutlicher werden. Vor den Messungen in Anwesenheit von CBR-5884 wurden die Kulturen 1-2 h mit diesem Stoff inkubiert, um die Serinsynthese zu hemmen.

Für Memantin, DAP5, DXM, DXO, CNQX und NAAG wurden den anfänglichen zwei Messungen im ACSF zwei weitere Messungen im Beisein des NMDA-Rezeptor-Antagonisten nachgeschaltet, bevor Etomidat hinzugegeben wurde, um so die Aktivitätsveränderung im Netzwerk ohne Anästhetikum bewerten zu können. Um stabile Aktivitätsmuster zu gewährleisten, wurde nach Zugabe eines Modulators 3-7 min gewartet, bevor Messungen aufgenommen wurden. Es wurden 16 Versuchsansätze im ACSF ohne Magnesium durchgeführt, 17 im ACSF mit Magnesium, 19 in Anwesenheit von Memantin, 13 in Anwesenheit von DAP5, jeweils 10 und 9 in Anwesenheit von DXM und DXO und 7 in Anwesenheit von CNQX. Es wurden außerdem insgesamt 3 Versuche mit NAAG, 3 Versuche mit CBR-5884 und 8 Versuche nach Transfektion mit siRNA durchgeführt.

Eine schematische Darstellung der Protokolle findet sich in Abbildung 2.1.

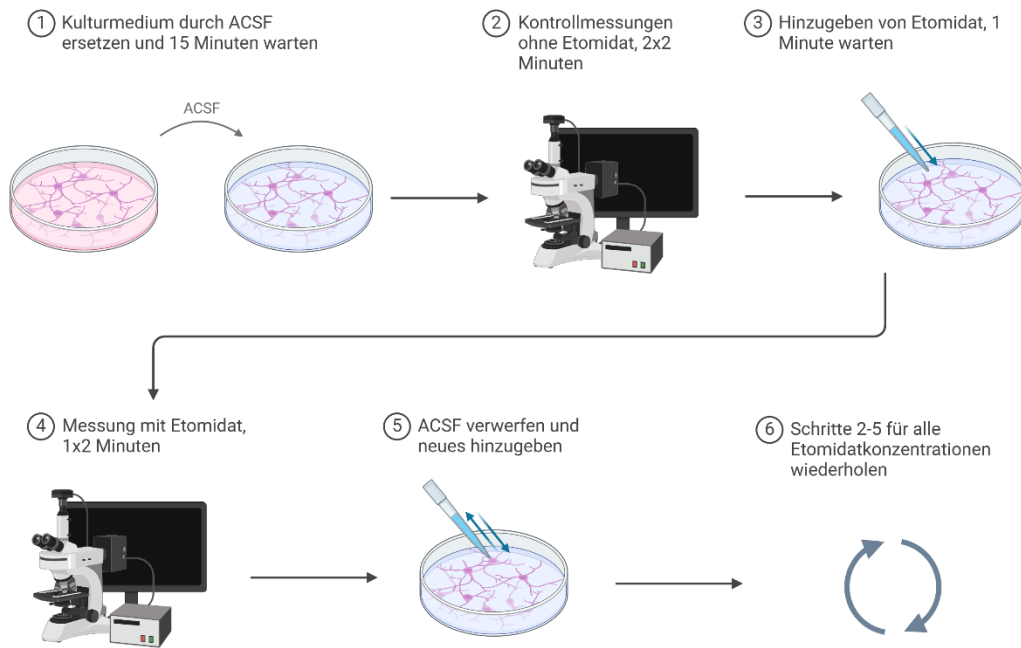


Abbildung 2.1: Schematisches Versuchsprotokoll

Abb. 2.1: Schematisches Versuchsprotokoll der Messungen in ACSF ohne Magnesium. Erstellt mithilfe von BioRender.com ©.
 ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*

Insgesamt wurden 21 Messungen benutzt, um die Versuchsprotokolle zu etablieren und Konzentrationen benutzter Substanzen zu erproben. Diese sind nicht in die Auswertung eingeflossen. Alle Messungen sind fortlaufend ab 1 nummeriert worden.

Experimente im ACSF mit oder ohne Magnesium, mit Memantin, DAP5, DXM, DXO oder CNQX werden als „Hauptexperimente“ zusammengefasst, da hierbei deutlich mehr Versuchsansätze durchgeführt worden sind als in den übrigen Gruppen.

2.3 Mikroelektrodenarrays und Messungen

Die verwendeten apparativen Vorrichtungen entsprechen den von Fleischer (121) beschriebenen Bedingungen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten MEAs besitzen 60 Elektroden aus einer Titan-Titannitrat-Legierung, welche mit Siliciumnitrid isoliert sind. Die Elektroden sind in einem 8x8 quadratischen Muster auf dem Objektträger angebracht und einer Nummer zugeordnet, welche ihre Position in der Matrix widerspiegelt. Eine einzelne Elektrode hat einen Durchmesser von 30 Mikrometer (μm) und die Elektroden sind in einem Abstand von 200 μm zueinander angebracht. Über den Elektroden ist ein 1,2 Zentimeter (cm) hoher Glaszylinder angebracht, welcher als Behältnis für Medien und eingesetzte Testsubstanzen dient (s. Abb. 2.2.).

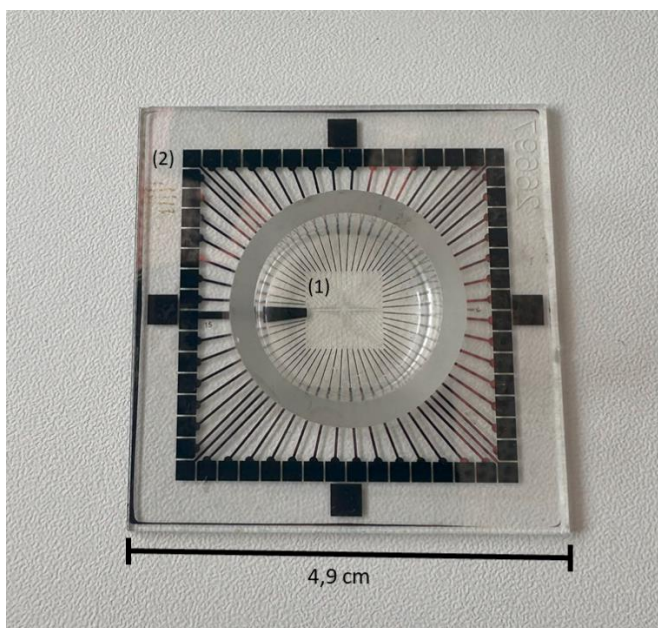


Abbildung 2.2: MEA-Elektrodenplatte mit Glaszylinder

Abb. 2.2: Ein im Rahmen der Untersuchungen benutzter MEA mit Glaszylinder. (1) markiert die eigentlichen Elektroden der MEA, links im Elektrodenfeld ist die Referenzelektrode als dicker schwarzer Balken zu sehen. Mit (2) sind die Kontaktflächen der Elektroden zu der MEA-Verstärkereinheit markiert (s. Abb. 2.3).
MEA = Mikroelektrodenarray

Die besondere Anordnung der Elektroden in zahlreichen Säulen sorgt für eine deutliche Oberflächenvergrößerung und somit für eine bessere Signalauflösung und geringere Rauschamplitude. Die Elektroden sind jeweils einem Messkanal (engl.: *channel*) zugeordnet.



Abbildung 2.3: Messvorrichtung exemplarisch

Abb. 2.3: Es ist exemplarisch ein Arbeitsplatz für MEA-Messungen gezeigt. (1) zeigt ein Mikroskop zur optischen Betrachtung der Zellkulturen. Mit (2) ist die MEA-Verstärkereinheit mit Heizelement markiert, der Pfeil deutet auf die Nische zur Einlage einer MEA-Elektrodenplatte (s. Abb. 2.2). Die Einheit ist an eine MC-Card angeschlossen (3), welche wiederum an einen herkömmlichen PC (4) angeschlossen ist. Die MC-Card dient der Digitalisierung der zellulären Aktionspotenziale.

MEA = Mikroelektrodenarray

Jede Elektrode ist mittels Leiterbahnen aus Titan mit Siliziumnitrid-Isolierung mit dem äußeren Feld des Glasbehältnisses verbunden, wo sich Kontaktplatten für die Verstärkereinrichtung befinden. Der zweiteilige Verstärker besitzt Kontakte, die dank einer Federung den Kontaktplatten aufliegen und so die Signale aus den Zellkulturen abtasten können. Der Verstärker gibt die Signale wiederum an eine MC-Card weiter (TC 02, Multi Channel Systems, Reutlingen), welche ihrerseits an einen handelsüblichen PC angeschlossen ist. In dem Verstärker ist außerdem noch ein Heizelement (Multi Channel Systems, Reutlingen) integriert, welches die Temperatur der Zellkulturen während der Messungen konstant bei

37 °C halten kann. Abbildung 2.3 zeigt einen Arbeitsplatz mit MEA-Verstärkereinheit auf einem Mikroskop. Daneben eine MC-Card, welche an einem PC angeschlossen ist.

Die digitalisierten Datenströme wurden mit der Software MC_Rack (Version 3.9.1, Multi Channel Systems, Reutlingen) dargestellt und gespeichert.

2.4 Aktionspotenzialanalyse

Nach der Speicherung der Daten erfolgte die Analyse mit dem Programm SpAnNer (Version 3.6, RESULT Medizinische Analyseverfahren GmbH, Tönisvorst, Deutschland). Hierbei wurde zu Beginn einer Messung die Schwelle zur Detektion eines Aktionspotenzials für jeden Kanal individuell festgelegt. Dies ist notwendig, weil einzelne Elektroden ein unterschiedlich starkes „Hintergrundrauschen“ aufweisen können. So wurde in dieser Lernphase die achtfache Standardabweichung des Mittelwerts der Rauschamplitude bestimmt und als Schwelle für die Detektion der „*spikes*“ (die digitalen Korrelate der Aktionspotenziale) festgelegt. Die *spikes* dürfen maximal 2 ms lang sein und eine Refraktärzeit von 4 ms nicht unterschreiten.

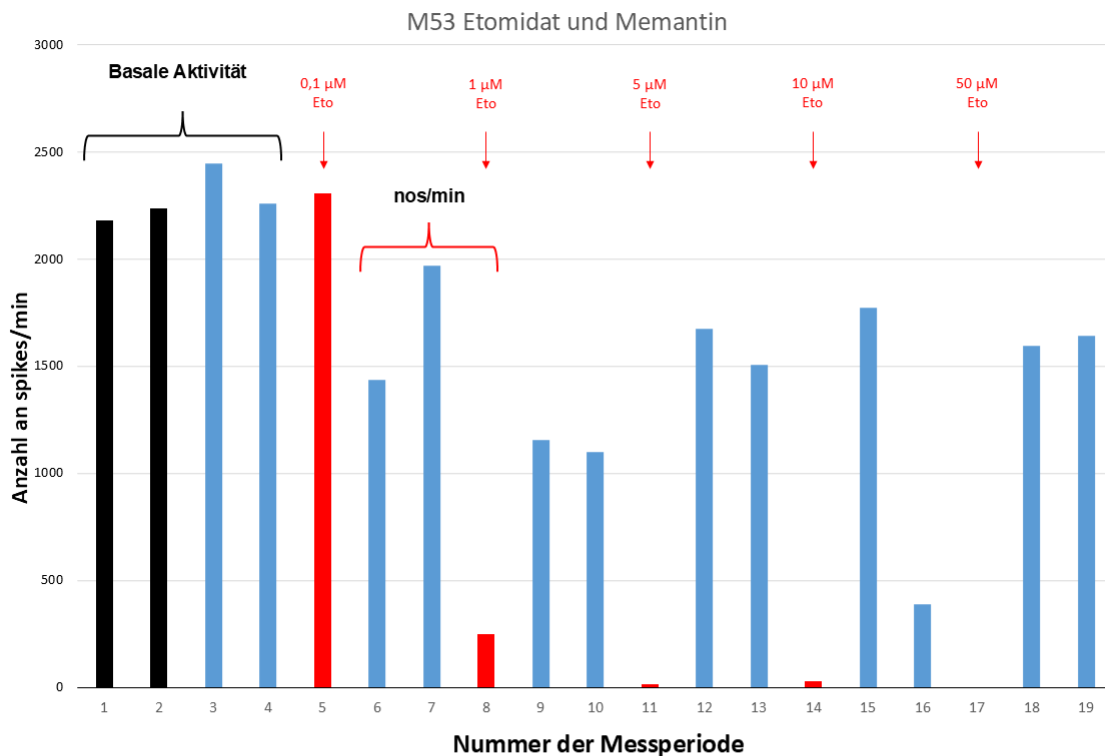
Drei oder mehr *spikes* in enger zeitlicher Abfolge wurden als „*burst*“ gewertet.

Hauptvariable der Untersuchungen war die mittlere prozentuale Änderung der Anzahl an *spikes*/min (engl.: *number of spikes per minute* (nos/min)), d.h. das Verhältnis zwischen den *spikes* in Anwesenheit einer bestimmten Konzentration Etomidat und dem Mittelwert der beiden vorangegangenen Kontrollmessungen (insgesamt 240 s). In gleicher Art und Weise wurde auch die mittlere prozentuale Änderung an *bursts*/min berechnet (nob/min) (121, 122).

Weiterhin wurde bei bestimmten Substanzen die Änderung der basalen Aktivität untersucht, also die Änderung der Aktivität nach Zugabe der Substanz gegenüber zwei vorangegangenen Messungen im reinen ACSF.

Die Berechnung der verwendeten Variablen ist anhand von Abbildung 2.4 erläutert. Hier sind die *spikes* aus Messung 53 gezeigt, wo erst Memantin und dann Etomidat in aufsteigenden Dosierungen zu der getesteten Zellkultur

gegeben wurde. Auf der x-Achse sind die Messperioden während des Versuchs aufgetragen; jede Messperiode beträgt 120 s. Schwarze Balken zeigen Messperioden nur im ACSF, blaue Balken zeigen Messperioden in Anwesenheit von Memantin; Rote Balken zeigen Messperioden an, in denen Etomidat und Memantin im ACSF vorhanden waren. Zur Berechnung der basalen Aktivität wurde dann der Quotient aus dem Mittelwert der *spikes* der ersten beiden Messperioden (nur ACSF) und der dritten und vierten Messperiode (ACSF mit Memantin) gebildet. Die Variable *nos/min* bezeichnet die Anzahl an *spikes* in einer Messperiode mit Etomidat im Verhältnis zu den beiden vorangegangenen Messperioden. Diese beiden Berechnungen sind im unteren Teil der Abbildung als Formeln gezeigt. Für die übrigen Substanzen wurde analog verfahren.



Basale Aktivität:

$$\text{Restaktivität in \%} = \frac{\text{Mittelwert (spikes/min}_1, \text{spikes/min}_2)}{\text{Mittelwert (spikes/min}_3, \text{spikes/min}_4)}$$

nos/min:

$$\text{nos/min} = \frac{\text{spikes/min}_8}{\text{Mittelwert (spikes/min}_6, \text{spikes/min}_7)} \times 100$$

Abbildung 2.4: Berechnung der Variablen

Abb. 2.4: Veranschaulichung der Berechnung von verschiedenen Variablen am Beispiel von Messung 53. Hier wurde erst Memantin und dann Etomidat in aufsteigenden Dosierungen zu der Kultur gegeben. Die Dosierungen sind anhand der roten Pfeile oberhalb der Balken gekennzeichnet. Die x-Achse zeigt in fortlaufender Nummerierung die Messperioden, jede Messperiode ist 120 s lang. Auf der y-Achse ist die Anzahl an *spikes/min* aufgetragen. Messperioden ohne Zusatz von Substanzen sind durch schwarze Balken markiert, bei blau markierten Messperioden wurde Memantin zum ACSF hinzugegeben, rote Balken bedeuten eine Zugabe von Memantin und Etomidat zum ACSF. Am unteren Bildrand sind die Formeln zur Berechnung der basalen Aktivität sowie der *nos/min* gezeigt. Eto = Etomidat; M53 = Messung 53; *nos/min* = *number of spikes/min*

2.5 Versuche mit RNA-Interferenz

2.5.1 Transfektion der siRNA

Zur genetischen Modulation der NMDA-Rezeptoren wurde GRIN1-*short interfering* RNA von Ambion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet (Cat.-Nr 4457287 (*in-vivo* Negativkontrolle #1 siRNA) und Cat.Nr. 4390771, ID: S127804 (GRIN1-siRNA)).

In Vorbereitung auf die Transfektion wurden MEAs selektiert, welche sich zwischen dem elften und 14. Tag *in vitro* befanden und noch für keine anderen Messungen benutzt worden waren. MEAs die ein ähnliches Aktivitätsprofil aufwiesen wurden in Paaren zusammengelegt. Ein Tag vor der Gabe der siRNA wurde das verwendete Kulturmedium durch 400 µl *neurobasal medium plus* ohne Antibiotikazugabe ersetzt, um etwaige Interaktionen zwischen den RNA-Molekülen und Antibiotika zu verhindern und so einen uneingeschränkten *knockdown* der NMDA-Rezeptoren zu erreichen.

Zu Beginn wurden 100 µl OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Cat. Nr. 31985-062) zu 10 µl Lipofectamin 2000 (Cat. Nr. 11668-019) hinzugegeben. Durch das Lipofectamin wird die Permeabilität der Zellmembranen erhöht und der Eintritt der siRNA in die Zellen gewährleistet. Gleichzeitig wurden 2-5 µl siRNA in 100 µl OPTI-MEM aufgelöst und daraufhin in die Lipofectamin-enthaltenden Röhrchen gegeben und exakt 10 min lang bei Raumtemperatur sanft in einem Heizblock (HLC HTM 130, Ditabis, Pforzheim) geschüttelt.

Danach wurden die Gemische zu den vorher ausgewählten MEAs gegeben, um ein Volumen von 500 µl pro MEA zu erhalten.

Von den, vorher in Paaren zusammengelegten, MEAs erhielt eine die GRIN1-siRNA und die andere, also die Kontrolle, sogenannte *scrambled siRNA* (NC1), die für kein Gen kodiert und damit keinen Effekt auf die neuronale Aktivität haben sollte.

Um siRNA transfizierte Zellkulturen in *wells* herzustellen, wurde analog zu dem vorher beschriebenen Verfahren vorgegangen, pro Träger erhielten die Kulturen jedoch 50 µl Medium und entweder 50 µl GRIN1-siRNA oder *scrambled*-siRNA (NC1: *in-vivo* Negativkontrolle #1 siRNA).

2.5.2 Messungen an siRNA-transfizierten Mikroelektrodenarrays

Da laut Herstellerangaben der maximale Effekt der siRNA 48 h nach Zugabe erreicht wird, wurden diese Experimente frühestens 48 h nach Transfektion durchgeführt. Dabei wurde Standardableitlösung ohne Magnesium benutzt und so vorgegangen wie bei den übrigen Messungen ohne Magnesium. Der Ablauf der Experimente war wie oben beschrieben (s. Abb. 2.1).

2.6 quantitative real-time PCR

2.6.1 Isolation der mRNA und Herstellung der cDNA

Die Isolation der mRNA erfolgte aus den vorher hergestellten Kulturen mithilfe des „*Dynabeads mRNA DIRECT MicroKit*“ nach den Herstellerangaben. Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmt.

Die Lyse der Zellen erfolgte mittels 35 µl Extraktionspuffer; danach wurden diese bis zur Verwendung tiefgefroren. Nachfolgend wurden die lysierten Zellen mit 70 µl TRIS-HCl (10 mM, pH 7,4) durch Pipettieren gemischt und eine min lang bei 10000 RPM zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde dieser zu den vorgewaschenen *Dynabeads* gegeben und zehn min auf einem Heizblock (HLC HTM 130, Ditabis, Pforzheim) bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Bindung der mRNA an die *Dynabeads* zu ermöglichen.

Das Röhrchen wurde auf einem Magneten platziert und gemäß den Herstellerangaben wurde der *Dynabeads*-mRNA-Komplex je zweimal mit Waschpuffer A und B gewaschen. Anschließend wurde die mRNA in 8,4 µl sterilem, RNase-freiem Wasser eluiert. Nach zweiminütigem Schütteln bei 65 °C wurde das Gefäß erneut auf dem Magneten platziert.

Zur Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (engl.: *desoxyribonucleic acid* (DNA)) (cDNA) mittels reverser Transkription wurde der Überstand zusammen mit 7 µl *cDNA first strand synthesis kit* (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) in ein neues Röhrchen gegeben, welches bei 37 °C für mindestens zwei h inkubiert wurde. Das cDNA-Syntheseprodukt wurde bei -80 °C eingefroren, um die reverse Transkription zu beenden. Die Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Protokoll der quantitativen *real-time polymerase chain reaction*

Um das Ausmaß der Expression des NMDA-Rezeptors nach Zugabe der siRNA zu quantifizieren, wurde eine quantitative *real-time polymerase chain reaction* (PCR) durchgeführt. Die *real-time* oder quantitative PCR (qPCR) beruht (so wie die herkömmliche PCR auch) auf dem Prinzip der Amplifikation der DNA. In dieser Arbeit wurde GRIN1 als Zielgen und β-Aktin als *housekeeping*-Gen (HKG) benutzt. Die qPCR-Versuche wurden in optischen 96-*well-MicroAmp* Platten (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt, welche 10 µl Volumen pro *well* fassten. Die finale Mischung in den *wells* bestand zu 1/3 aus SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA) und zu 2/3 aus nukleasefreiem Wasser, cDNA (100-150 ng) und den entsprechenden Primern.

Die Experimente wurden an einer *StepOne Plus real-time* PCR-Maschine der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Das initiale Thermalprotokoll sah wie folgt aus:

1. Inkubation für 2 min bei 50 °C, um die Uracil-DNA-Glykosidase zu aktivieren
2. 10 min bei 95 °C, um die Uracil-DNA-Glykosidase wieder zu hemmen und die AmpliTaq Gold Polymerase zu aktivieren.

Die Uracil-DNA-Glykosidase im PCR-Ansatz wird benötigt, um Kontaminationen durch DNA-Fragmente aus vorherigen Ansätzen zu verhindern. So werden zu Beginn des Thermalprotokolls Uracilbausteine durch Hydrolyse von n-glykosidischen Bindungen entfernt und deren erneute Amplifikation verhindert.

Danach wurden 40 Zyklen in der folgenden Rotation angeschlossen:

1. 15 s bei 95 °C zur Denaturierung
2. 2 min bei 50 °C zum *annealing*
3. 1 min bei 60 °C zur Elongation

2.6.3 Fluoreszenzdetektion

Zur Fluoreszenzdetektion wurde SYBR *Green Master mix kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) benutzt. Dieses ist ein Cyanin-Farbstoff und kann in doppelsträngige DNA interkalieren. Durch diese Interkalation wird ein Komplex gebildet, welcher blaues Licht absorbiert ($\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$) und grünes Licht emittiert ($\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$) (123). Der Komplex fluoresziert proportional mehr, je mehr PCR-Produkte vorhanden sind. Da aber so nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterschieden werden kann, wurde immer auch eine Schmelzkurvenanalyse zum Ausschluss unspezifischer Bindungen und Primerdimerisierungen durchgeführt. In den durchgeführten Versuchen zeigte die Schmelzkurve stets einen einzelnen *peak* über 76 °C (s Abb. 2.5).

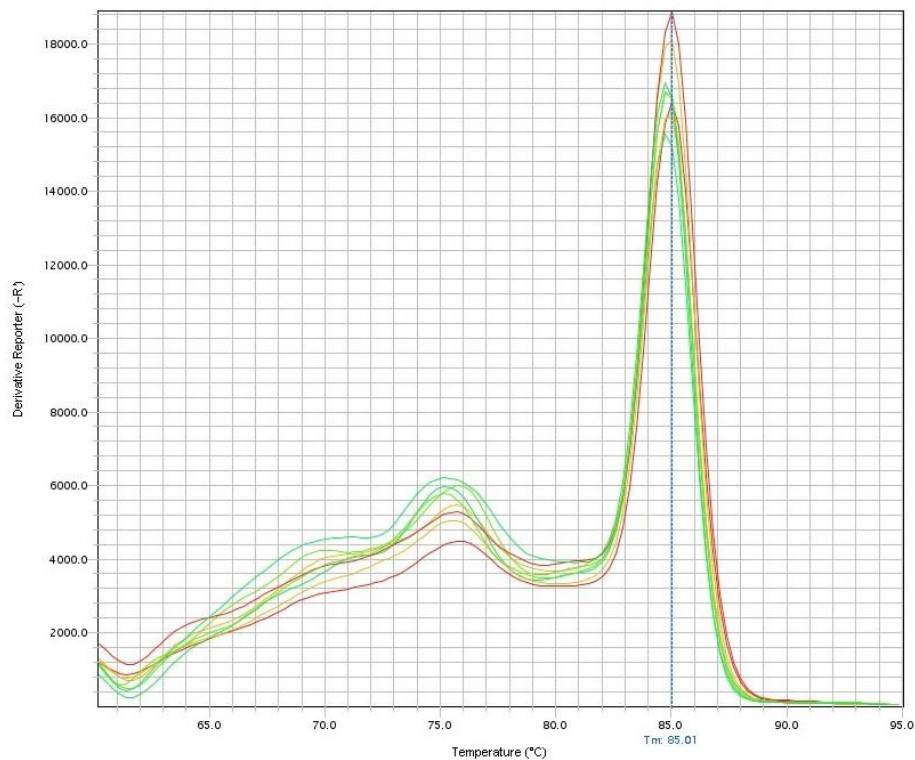


Abbildung 2.5: Schmelzkurvenanalyse der qPCR-Amplifikationsprodukte

Abb. 2.5: Schmelzkurve nach Amplifikation des cDNA-Fragments von GRIN1. Auf der x-Achse ist die Temperatur aufgetragen, auf der y-Achse die Fluoreszenzänderung pro Zeit ($\Delta F/\Delta T$). Das Produkt wurde kontinuierlich auf bis zu 95 °C erhitzt; die entstehende Fluoreszenz wurde durch das Gerät detektiert. Die Bildung eines einzelnen Peaks bei etwa 85 °C (sog. Schmelzpunkt) deutet auf ein spezifisches PCR-Produkt ohne unspezifische Amplifikationen oder Primer-Dimere hin. Die geringe Variabilität zwischen den Kurven der technischen Replikate unterstreicht die Reproduzierbarkeit und Spezifität der Reaktion. Die zusätzlichen, niedrigeren Peaks bei etwa 75 °C deuten auf geringe Mengen unspezifischer Nebenprodukte oder Primerartefakten hin, welche aber nicht die Hauptamplifikation beeinflussen. cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure; GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor N-methyl-D-aspartate type subunit 1*; PCR = *polymerase chain reaction*; qPCR = *quantitative polymerase chain reaction*

Die Schmelzkurvenanalyse zeigte die Anwesenheit von PCR-Produkten mit einer Länge > 100 bp am Ende der Amplifikation. Diese weisen typischerweise einen Schmelzpunkt auf, welcher höher als 76 °C liegt. Die Schmelzkurvenanalyse ist allerdings ungeeignet, um die Größe der PCR-Produkte nachzuweisen. Daher wurde eine Gel-Elektrophorese angeschlossen. Hierfür wurden repräsentative Proben zusammen mit einem DNA-size-marker, welches eine Länge von 100 bp aufweist, auf 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Durch das Verwenden des DNA-

size-markers kann die PCR-Produktgröße bestimmt werden. Abbildung 2.6 zeigt die Ergebnisse einer Gelelektrophorese, welche die PCR-Produktgrößen für β -Aktin und GRIN1 (Primer für GluN1) nachweisen.

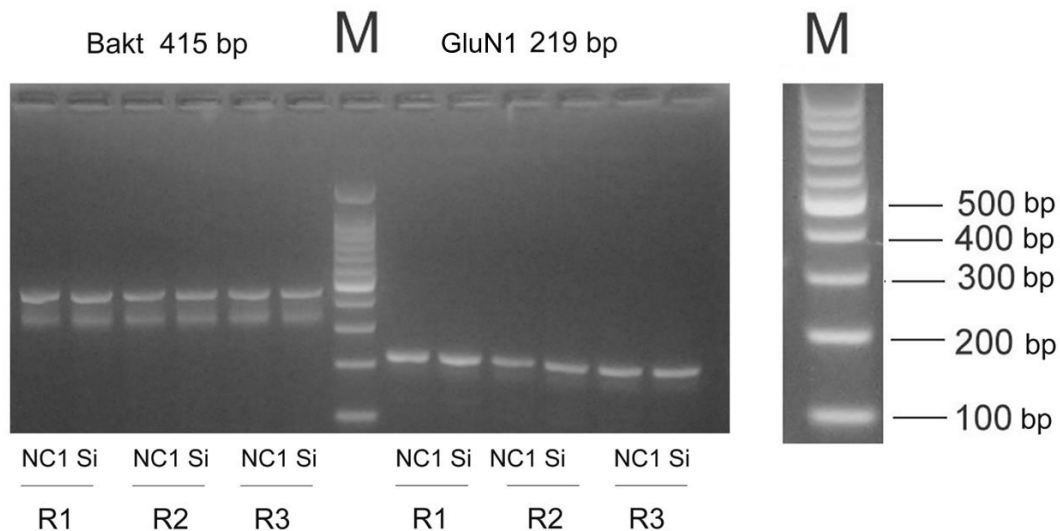


Abbildung 2.6: Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Abb. 2.6: Darstellung einer Gelelektrophorese. M bezeichnet einen kommerziellen *DNA-size-marker*. Dieser Marker enthält Banden in 100-bp-Schritten und dient so als Referenz zur Abschätzung der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente. Der Marker ist rechts hervorgehoben. Die erwartete Produktgröße ist neben den Namen der entsprechenden Gene angegeben. Über der Abbildung stehen die Abkürzungen der Produktnamen (Bakt = β -Aktin; GluN1 = erste Untereinheit des NMDA-Rezeptors), sowie die erwartete Länge der Produkte. Alle Ansätze stammen aus Kulturen welche mit NC1-siRNA behandelt wurden (NC1 Si = *negative control 1 siRNA* (engl.: Negativkontrolle 1 siRNA (s.o.))). Durch die Verwendung des DNA-size-markers kann gezeigt werden, dass die amplifizierten Produkte ungefähr die erwartete Länge besitzen. Bakt = β -Aktin; bp = Basenpaare; DNA = Desoxyribonukleinsäure; M = DNA-size-marker; NC1 Si = *negative control 1 siRNA*; PCR = *polymerase chain reaction*; R = Rattenwurf

Die Gelelektrophorese ist allerdings nicht in der Lage, die Identität der Produktsequenzen zu verifizieren. Um diese mit bekannten Transkripten in der Gen-Datenbank des *national center for biotechnology information* (NCBI) zu vergleichen, wurde eine Sanger-Sequenzierung angewandt. Die PCR-Produkte wurden mittels *PCR-purification kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) in nukleasefreiem Wasser aufgereinigt. Die höchste Übereinstimmung wurde mit

den NCBI-Sequenzen gefunden, welche in der Primer-Tabelle (Tab. 2.1) aufgeführt sind.

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Primer

Gen	bp	Sequenz	GenBank ID
β -Aktin	415	CGTGAAAAGATGACCCAGATCATGTT	NM_031144.3 (124)
β -Aktin (reverse)		GCTCGTTGCCAATAGTGATGACCTG	NM_031144.3 (124)
GRIN1	219	GCTGTACCTGCTGGACCGCT	NM_001287423.1 (125)
GRIN1 (reverse)		GCAGTGAGGAAGCCACTATGATC	NM_001287423.1 (125)

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Primer mit Angabe der Basenpaar-Länge, Sequenzen und GenBank ID nach NCBI.

bp = Basenpaare; GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*

2.6.4 Berechnung der Effizienz

Um die Effizienz (E) der PCR zu bestimmen, wurde die absolute Quantifizierung benutzt. Für jedes verwendete Primerpaar wurde hierbei eine Standardkurve erstellt (s. Abb. 2.7).

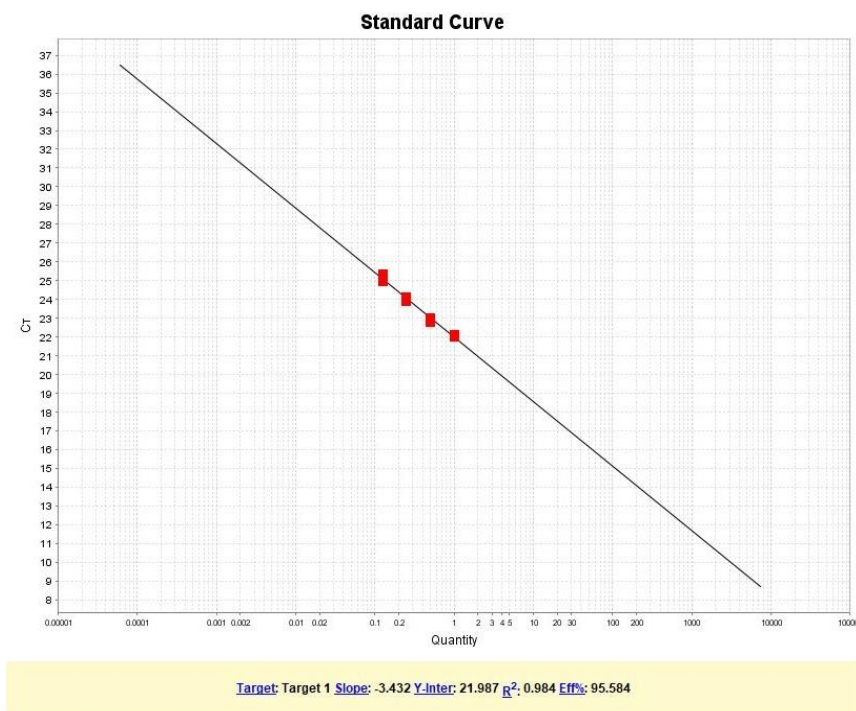


Abbildung 2.7: Standardkurve für die Expression von GRIN1

Abb. 2.7: Standardkurve der Expression von GRIN1. Die Standardkurve ergibt sich aus der seriellen Verdünnungsreihe der Proben (1:8; 1:16; 1:32; 1:64). Aufgetragen ist der quantifizierte

Ct-Wert auf der y-Achse, sowie die logarithmierte Ausgangsmenge der GRIN1-DNA. Im gelben Kasten unter der Kurve ist die Steigung (engl.: *slope*) angegeben, welche -3,432 ist. Danach ergibt sich eine Amplifikationseffizienz von etwa 95,5 % nach der Formel $E = 10^{(1/-\text{Steigung})}$. Der y-Achsenabschnitt ist bei 21,987. Außerdem zeigt die Regressionsgerade eine hohe Linearität ($R^2 = 0,984$), was auf eine konsistente Amplifikation über den gesamten Verdünnungsbereich hinweist.

Die DNA-Proben wurden schrittweise bis zu einer Konzentration von 1:64 verdünnt und in Duplikaten amplifiziert. Pro Primerpaar wurden je zwei Standardkurvenbestimmungen durchgeführt. Zur Berechnung der Standardkurven wurden die *cycle threshold* (Ct)-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen herangezogen. Der Ct-Wert gibt die Anzahl an Zyklen an, welche benötigt werden, damit das „echte“ Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen übersteigt (123, 126). In der exponentiellen Phase der PCR (zwischen Start- und Plateauphase) kann, unter optimalen Verhältnissen, ein Anstieg der DNA pro Zyklus um etwa den Faktor 2 beobachtet werden. In der Regel gelten Werte zwischen 1,8 und 2,2 als gut (127). Der zu Beginn der exponentiellen Phase gemessene Wert wird zur Quantifizierung genutzt und als Ct-Wert beschrieben (123, 126). Die Effizienz der qPCR kann anhand der Steigung (engl.: *slope*) der Standardkurve mithilfe der Formel $E = 10^{(1/-\text{Steigung})}$ berechnet werden (128). Für β -Aktin betrug $E = 1,98$; für GRIN1 $E = 1,96$. Der lineare Regressionskoeffizient R^2 betrug $> 0,95$ für jedes verwendete Primerpaar.

2.6.5 Relative Quantifizierung

Der relative Expressionslevel von GRIN1 gegenüber β -Aktin wurde mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet, wie auch an anderer Stelle beschrieben (127-130). Die Expression des Zielgens GRIN1 wurde mit der Expression des *housekeeping*-Gens (HKG) verglichen und relativ zu dieser normalisiert. Das HKG ist eine molekulare Referenz, die ubiquitär und homogen exprimiert wird. Es ist außerdem leicht zu detektieren und wird nur sehr geringgradig durch äußere Einflüsse wie zellulären Stress oder Medikamenteneinnahme beeinflusst. Durch die relative Normalisierung des Zielgens werden interindividuelle Unterschiede in der Expression und Variationen in der Menge der Ausgangs-DNA ausgeglichen.

Um die relative Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit GluN1 zu berechnen, wurde die Differenz zwischen der Expression des *housekeeping*- und

des Zielgens berechnet, also zwischen Kontrolle (Kon) und behandelter Kultur (Beh). Die Expression der Kontrolle wurde hierbei als 100 % angegeben. Mithilfe der folgenden Formel wurde die relative Expression berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(CT\text{-Zielgen} - CT\text{-HKG}) Beh - (CT\text{-Zielgen} - CT\text{-HKG}) Kon}$$

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten sind, wenn nicht anders erwähnt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (engl.: *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Die statistischen Analysen wurden mittels Excel (Version 2405, Redmond, WA, USA) oder GraphPad Prism (Versionen 7 oder 10, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Um den Unterschied in basaler Aktivität nach Zugabe von NMDA-Rezeptor Modulatoren zu errechnen, wurden die *spikes/min* in den Messungen ohne Modulator ermittelt und als *baseline* (100 %) festgelegt. Dann wurden die *spikes/min* in Beisein des Modulators bestimmt und als prozentualer Anteil der *baseline* ausgedrückt. Nach einer Prüfung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test wurde ein Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test angeschlossen.

Um Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen in Bezug auf *nos/min* und *nob/min* festzustellen, wurde auch hier zunächst eine Prüfung auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk durchgeführt. Waren alle Gruppen normalverteilt, wurde eine einfaktorielle *One-Way-Analysis of Variance* (ANOVA) mit einem *post-hoc*-Mehrfachvergleich nach Tukey angeschlossen. War eine oder mehrere Gruppen nicht normalverteilt, so wurde stattdessen ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, mit anschließender Korrektur für Mehrfachvergleiche nach Dunn. Die Werte hier sind wie folgt angegeben $H(df, n) = x, p = y$. Df steht für Freiheitsgrade (engl.: *degrees of freedom*), n für die Anzahl an Experimenten. Die NAAG- und Mg^{2+} -Gruppen, sowie GRIN1- und NC1-Gruppen wurden untereinander mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Hier gilt für die Werte U ($p = x; n = y$).

Die Berechnung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) erfolgte mittels einer nichtlinearen Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate anhand der Veränderung der *nos/min*. So wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit drei

Parametern anhand einer logistischen Hill-Gleichung modelliert. Es wurde keine Gewichtung der Datenpunkte eingesetzt, um *bias* zu vermeiden. Zusätzlich wurden 95 %ige Konfidenzintervalle berechnet, um die Genauigkeit der berechneten Parameter einzuschätzen. Die Ergebnisse sind als EC₅₀-Wert (95 % Konfidenzintervall: x-y) angegeben.

Die relative Expression der NMDA-Rezeptor-mRNA über die PCR wurde ebenfalls mittels *One-Way-ANOVA* errechnet, mit anschließendem Tukey *post-hoc* Test. Die Ergebnisse sind wie oben beschrieben dargestellt.

Für die gesamte Arbeit wurde ein Niveau von $p < 0,05$ als signifikant gewertet. In Abbildungen ist das Erreichen dieses Signifikanzniveaus mit einem (*) angezeigt.

Wenn nicht anders erwähnt gibt (n) die Anzahl an Experimenten und (N) die Anzahl an Rattenwürfen an.

2.8 Liste der benutzten Substanzen und Geräte

Alle benutzten Substanzen sind im Folgenden tabellarisch gelistet.

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller, Stadt, Land
<i>phosphate-buffered saline solution</i>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>minimal essential medium</i>	Life Technologies, Eugene, USA
fetales Kälberserum	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
B-27®	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Glutamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Insulin	Life Technologies, Eugene, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin	Life Technologies, Eugene, USA
Streptomycin	Life Technologies, Eugene, USA
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Etomidat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Memantin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DAP5	Abcam, Cambridge, UK
DXM	zur Verfügung gestellt durch Dr. Okka Scholz, Institut für Stoffwechselphysiologie, HHU

DXO	zur Verfügung gestellt durch Dr. Okka Scholz, Institut für Stoffwechselphysiologie, HHU
CNQX	Abcam, Cambridge, UK
NAAG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CBR-5884	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipofectamin	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
siRNA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl-Puffer	Merck Millipore, Burlington, USA

Tab. 2.2: Angabe der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Hersteller, sowie Hauptsitz des Herstellers.

CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; HEPES = (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; NAAG = N-Acetylaspartylglutamat; siRNA = *short interfering RNA*; Tris-HCl-Puffer = Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid-Puffer; UK = *United Kingdom*; USA = *United States of America*

Tabelle 2.3: Übersicht über verwendete Fertig-Kits

Kit	Hersteller, Stadt, Land
<i>Dynabeads mRNA DIRECT MicroKit</i>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
<i>cDNA first strand synthesis kit</i>	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
<i>Quickprep Micro mRNA Purification kit</i>	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Tab. 2.3: Angabe der in dieser Arbeit verwendeten Fertig-Kits mitsamt Hersteller und Hauptsitz des Herstellers

cDNA = *complementary deoxyribonucleic acid*; mRNA = *messenger ribonucleic acid*, UK = *United Kingdom*; USA = *United States of America*

Tabelle 2.4: Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller	Hauptsitz
Mikroelektrodenarray	60MEA200/10iR-Ti-gr	Multi Channel Systems	Reutlingen, Deutschland
MEA-Verstärkerelement	MEA2100-Mini-60-System	Multi Channel Systems	Reutlingen, Deutschland
MC_Card	TC 02	Multi Channel Systems	Reutlingen, Deutschland
Mikroskop	Labovort FS	Leitz	Stuttgart, Deutschland
Heizblock	HLC HTM 130	Ditabis	Pforzheim, Deutschland
Brutschrank	Heracell Vios 250	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

Zentrifuge	Microstar 12	VWR	Rednor, PA, USA
PCR-Gerät	StepOne Plus	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA

Tab. 2.4: Liste der Geräte, welche für diese Arbeit benutzt worden sind. Es sind Modelle und Hersteller mit Hauptsitz dargestellt. CA = California; MA = Massachusetts; MEA= Mikroelektrodenarray; PA = Pennsylvania; PCR = *polymerase chain reaction*; USA = *United States of America*

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht der Ergebnisse

Insgesamt wurden 105 MEA-Messungen eingeschlossen. Es wurden Kulturen von 11 verschiedenen Rattenwürfen benutzt, pro Wurf entstanden so etwa 4-8 ableitbare MEA-Kulturen. Im Durchschnitt waren die untersuchten Kulturen 28 ± 11 Tage alt (11-102 Tage). Um die benötigte Anzahl an Kulturen und Versuchstieren zu minimieren, wurden MEAs wiederholt gemessen; dabei wurde immer mindestens ein Abstand von 3 Tagen eingehalten.

Im Folgenden ist eine Übersicht aller Experimente tabellenweise gegeben. Die Wertigkeit einzelner Experimente und das Verhältnis zwischen Substanzen und hippocampaler Netzwerkaktivität ist in den folgenden Kapiteln für einzelne Substanzen im Detail angegeben.

Die Tabellen 3.1-3.3 zeigen die Ergebnisse verschiedener Tests in den Hauptexperiment-Gruppen bezogen auf die Variable nos/min. Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse der Prüfung auf Normalverteilung bei allen Etomidatkonzentrationen mittels Shapiro-Wilk-Test. Hierbei waren bei keiner Konzentration alle Substanzgruppen normalverteilt. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests gelistet. Alle verwendeten Substanzen wurden mit der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium verglichen und entsprechend als signifikant oder nicht signifikant markiert. Tabelle 3.3 zeigt schließlich die Teststatistik, die Freiheitsgrade und den p-Wert aus dem Kruskal-Wallis-Test.

Tabelle 3.1: Entscheidung über Normalverteilung der nos/min mittels Shapiro-Wilk-Test bei den Hauptexperimenten

[Etomidat]		Kon	Mg ²⁺	Mema	DAP5	DXM	DXO	CNQX
0,1 μ M	p-Wert	0,518	0,149	0,075	0,234	0,693	0,036	0,984
	n	16	17	19	13	10	10	7
	normalverteilt?	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
1 μ M	p-Wert	0,253	0,188	0,041	0,018	0,275	0,133	0,879
	n	16	17	19	13	10	10	7
	normalverteilt?	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
5 μ M	p-Wert	0,505	0,005	0,046	< 0,001	0,219	0,076	0,562

	n	16	17	19	12	10	10	7
	normalverteilt?	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
10 μ M	p-Wert	0,194	< 0,001	0,003	0,010	0,403	0,001	0,236
	n	16	17	19	13	10	10	7
	normalverteilt?	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja
50 μ M	p-Wert	0,001	0,003	< 0,001	0,047	< 0,001	< 0,001	0,002
	n	7	7	7	9	10	10	7
	normalverteilt?	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

Tab. 3.1: Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests bezüglich nos/min bei den Hauptexperiment-Gruppen. Für jede Etomidatkonzentration und Gruppe sind der p-Wert, die Anzahl an Experimenten (n) und die Entscheidung über eine vorliegende Normalverteilung angegeben. Bei keiner Etomidatkonzentration waren alle Gruppen normalverteilt. CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; Kon = Kontrolle; Mema = Memantin; Mg^{2+} = Magnesium; n = Anzahl an Experimenten

Tabelle 3.2: Übersicht der Ergebnisse aus Kruskal-Wallis-Tests für nos/min in den Hauptexperimenten

Testsubstanzen		0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
ACSF ohne Magnesium	nos/min (%)	100,2 \pm 3,3	99,6 \pm 6,1	78,5 \pm 9,3	50,2 \pm 6,9	5,1 \pm 3,7
	n	16	16	16	16	7
ACSF mit Magnesium	nos/min (%)	97,3 \pm 5,4	71,2 \pm 9,3	30,0 \pm 8,2	10,9 \pm 5,0	1,2 \pm 0,8
	n	17	17	17	17	7
	Sig.	ns	ns	*	*	ns
Memantin	nos/min (%)	85,4 \pm 7,5	41,8 \pm 7,8	17,7 \pm 3,5	15,0 \pm 3,8	2,0 \pm 2,0
	n	19	19	19	19	7
	Sig.	ns	*	*	*	ns
DAP5	nos/min (%)	90,6 \pm 9,7	35,7 \pm 9,3	23,2 \pm 10,9	14,7 \pm 4,4	3,4 \pm 1,1
	n	13	13	12	13	9
	Sig.	ns	*	*	*	ns
DXM	nos/min (%)	85,6 \pm 10,3	54,9 \pm 12,6	14,4 \pm 3,7	11,8 \pm 3,0	4,0 \pm 2,9
	n	10	10	10	10	10
	Sig.	ns	*	*	*	ns
DXO	nos/min (%)	88,5 \pm 6,6	33,8 \pm 6,1	14,1 \pm 4,3	8,4 \pm 3,4	1,5 \pm 0,9
	n	10	10	10	10	10
	Sig.	ns	*	*	*	ns
CNQX	nos/min (%)	95,1 \pm 7,9	53,2 \pm 8,5	27,3 \pm 8,2	17,7 \pm 5,9	1,5 \pm 1,0
	n	7	7	7	7	7
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 3.2: Übersicht der Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test bezüglich der Variable nos/min bei den Hauptexperimenten, gegliedert nach Etomidatkonzentration. Es werden nos/min, Anzahl an

Experimenten (n) und statistische Signifikanz angegeben. Gruppen, welche sich signifikant von der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium unterscheiden sind mit „*“ markiert, andere mit „ns“ (nicht signifikant). Statistische Signifikanz ist außerdem durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben.

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; Kon = Kontrolle; Mg²⁺ = Magnesium; n = Anzahl an Experimenten; nos/min = *number of spikes per minute*; ns = nicht signifikant; Sig. = Signifikanz

Tabelle 3.3: Übersicht der statistischen Kennwerte aus dem Kruskal-Wallis-Test für nos/min in den Hauptexperimenten

[Etomidat]	H	Freiheitsgrade	p-Wert
0,1 µM	7,03	6	0,318
1 µM	32,57	6	< 0,0001
5 µM	26,10	6	< 0,001
10 µM	22,25	6	< 0,01
50 µM	6,309	6	0,390

Tab. 3.3: Angabe von Teststatistik (H), Freiheitsgraden und p-Wert des Kruskal-Wallis-Test der nos/min für die Hauptexperimente, gegliedert nach verwendeter Etomidatkonzentration.

Die nachfolgenden Tabellen 3.4-3.6 sind analog zu den vorangehenden aufgebaut, allerdings für die Variable nob/min. Tabelle 3.4 zeigt die Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests für die Variable nob/min bei den Hauptexperimenten an. In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test gelistet, sowie die Angaben zur Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium. Tabelle 3.6 zeigt die statistischen Kennwerte des Kruskal-Wallis-Tests.

Tabelle 3.4: Entscheidung über Normalverteilung der nob/min mittels Shapiro-Wilk-Test bei den Hauptexperimenten

[Etomidat]		Kon	Mg ²⁺	Mema	DAP5	DXM	DXO	CNQX
0,1 µM	p-Wert	0,065	0,010	< 0,001	0,220	0,211	0,200	0,327
	n	16	17	19	13	10	9	7
	normalverteilt?	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
1 µM	p-Wert	0,215	0,896	0,003	< 0,001	0,096	0,583	0,470
	n	16	17	19	13	10	9	7
	normalverteilt?	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
5 µM	p-Wert	0,293	< 0,001	0,033	< 0,001	< 0,001	0,078	0,238

	n	16	17	19	18	10	9	7
	normalverteilt?	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
10 μ M	p-Wert	0,600	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,034	< 0,001	0,003
	n	16	17	19	13	10	9	7
	normalverteilt?	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
	p-Wert	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001
50 μ M	n	7	7	7	9	9	9	7
	normalverteilt?	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

Tab. 3.4: Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests bezüglich nob/min bei den Hauptexperiment-Gruppen. Für jede Etomidatkonzentration und Gruppe sind der p-Wert, die Anzahl an Experimenten (n) und die Entscheidung über eine vorliegende Normalverteilung angegeben. Bei keiner Etomidatkonzentration waren alle Gruppen normalverteilt. CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; Kon = Kontrolle; Mema = Memantin; Mg^{2+} = Magnesium; n = Anzahl an Experimenten

Tabelle 3.5: Übersicht der Ergebnisse aus dem Kruskal-Wallis-Tests für nob/min in den Hauptexperimenten

Testsubstanzen		0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
ACSF ohne Magnesium	nob/min (%)	104,4 \pm 3,7	101,5 \pm 6,7	109,4 \pm 12,3	64,3 \pm 11,5	6,6 \pm 5,2
	n	16	16	16	16	7
ACSF mit Magnesium	nob/min (%)	99,2 \pm 4,1	86,4 \pm 11,9	56,6 \pm 26,5	7,2 \pm 2,5	1,1 \pm 0,9
	n	17	17	17	17	7
	Sig.	ns	ns	*	*	ns
Memantin	nob/min (%)	98,5 \pm 15,0	40,6 \pm 9,7	10,6 \pm 2,2	8,7 \pm 2,7	0,8 \pm 0,8
	n	19	19	19	19	7
	Sig.	ns	*	*	*	ns
DAP5	nob/min (%)	89,8 \pm 16,2	39,1 \pm 19,8	18,3 \pm 14,7	5,2 \pm 2,3	0,9 \pm 0,5
	n	13	13	12	13	9
	Sig.	ns	*	*	*	ns
DXM	nob/min (%)	86,3 \pm 14,9	36,8 \pm 9,6	9,9 \pm 5,3	3,0 \pm 1,1	3,5 \pm 3,3
	n	10	10	10	10	9
	Sig.	ns	*	*	*	ns
DXO	nob/min (%)	87,3 \pm 12,9	24,0 \pm 4,9	5,2 \pm 1,9	3,9 \pm 2,5	1,0 \pm 0,9
	n	9	9	9	9	9
	Sig.	ns	*	*	*	ns
CNQX	nob/min (%)	88,3 \pm 7,7	58,5 \pm 10,6	33,1 \pm 12,1	12,0 \pm 7,5	1,1 \pm 0,8
	n	7	7	7	7	7
	Sig.	ns	ns	ns	*	ns

Tab. 3.5: Übersicht der Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test bezüglich der Variable nob/min bei den Hauptexperimenten, gegliedert nach Etomidatkonzentration. Es werden nob/min, Anzahl an Experimenten (n) und statistische Signifikanz angegeben. Gruppen, welche sich signifikant von der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium unterscheiden sind mit „*“ markiert, andere mit „ns“ (nicht signifikant). Statistische Signifikanz ist außerdem durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben.

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; Kon = Kontrolle; Mema = Memantin; Mg^{2+} = Magnesium; n = Anzahl an Experimenten; nob/min = *number of bursts per minute*; ns = nicht signifikant; Sig. = Signifikanz

Tabelle 3.6: Übersicht der statistischen Kennwerte aus dem Kruskal-Wallis-Test für nob/min in den Hauptexperimenten

[Etomidat]	H	Freiheitsgrade	p-Wert
0,1 μ M	5,95	6	0,429
1 μ M	37,05	6	< 0,0001
5 μ M	37,55	6	< 0,0001
10 μ M	25,27	6	< 0,001
50 μ M	3,17	6	0,787

Tab. 3.6: Angabe von Teststatistik (H), Freiheitsgraden und p-Wert des Kruskal-Wallis-Test der nob/min für die Hauptexperimente, gegliedert nach verwendeter Etomidatkonzentration.

In Tabelle 3.7 sind die EC_{50} -Werte von Etomidat in Anwesenheit der verschiedenen benutzen Substanzen mit entsprechenden Konfidenzintervallen angegeben. Diese sind anhand der Veränderung der nos/min berechnet.

Tabelle 3.7: Übersicht der Testsubstanzen, EC_{50} -Werten basierend auf die nos/min mit Konfidenzintervallen

Testsubstanzen	EC_{50}	95 % CI
ACSF ohne Mg^{2+}	13,47	5,16 – 35,19
ACSF mit Mg^{2+}	1,79	0,56 – 5,82
Memantin	0,67	0,17 – 2,58
DAP5	0,43	0,08 – 2,33
DXM	1,04	0,13 – 8,53
DXO	0,49	0,25 – 0,97
CNQX	1,04	0,37 – 3,09
CBR 5584	6,79	1,59 – 51,79
GRIN1	2,20	0,32 – 13,67
NC1	8,20	1,60 – 137,60

Tab. 3.7: Übersicht über die EC₅₀-Werte von Etomidat in den Experimenten unter verschiedenen Bedingungen. Diese Werte basieren auf die Veränderung der nos/min. Es ist zudem das 95%ige Konfidenzintervall angegeben (Ausnahme: CBR-5884. Hier ist das 90 %ige Konfidenzintervall angegeben).

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; EC₅₀ = mittlere effektive Konzentration; CI = *confidence interval*; CNQX = Cyanquixaline; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; DXM = Dextromethorphan; DXO = Dextrorphan; GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*; NC1 = *negative control 1 siRNA*

3.2 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat im ACSF ohne Magnesium

Die Wirkung von Etomidat im ACSF ohne Magnesium galt in den vorliegenden Versuchen als Kontrollgruppe. Um die Datengewinnung zu illustrieren sind in Abbildungen 3.1 und 3.2 Originalableitungen aus dem *capture*-Programm MC_Rack gezeigt. Abbildung 3.1 zeigt Messung 25, in ACSF ohne Magnesium. Es sind die Kanalströme aus allen Kanälen der verwendeten MEA gezeigt. Abbildung 3.2 zeigt ebenfalls Messung 25 (ACSF ohne Magnesium). Hier sind drei verschiedene Ströme über Kanal 66 gezeigt (also dem Kanal an der Position 6 vertikal und horizontal der MEA-Matrix), vor, während und nach der Applikation von 1 µM Etomidat. Kanal 66 wurde auf Grund seiner stabilen Aktivität über alle drei Phasen der Applikation ausgewählt.

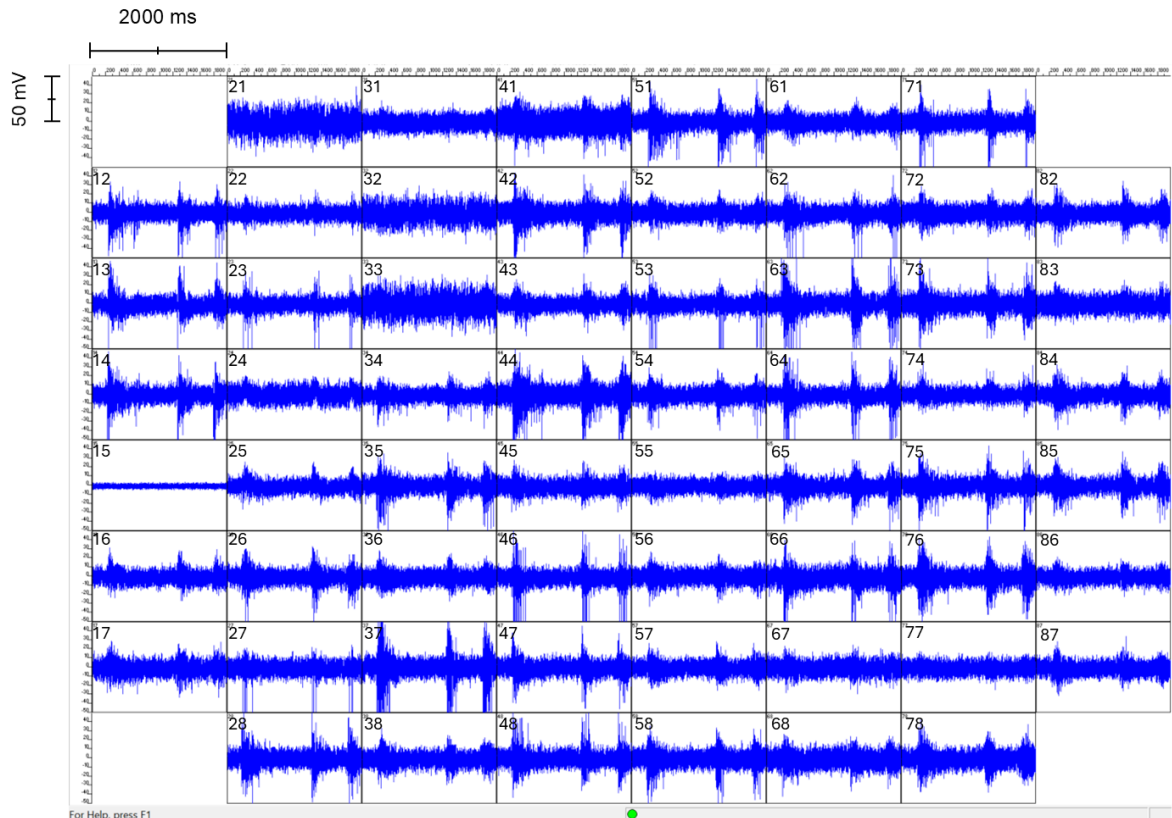


Abbildung 3.1: Originalableitung Messung 25 im ACSF ohne Magnesium, alle Kanäle

Abb. 3.1: Originaldarstellung der Datengewinnung aus dem verwendeten *capture*-Programm MC_Rack mit Darstellung aller Kanäle der MEA. MC_Rack dient der Umwandlung der Aktionspotenziale auf Zellebene in digitale Datenströme, sowie derer Verbildlichung. Es ist Messung 25 aus der Kontrollgruppe dargestellt, d.h. im ACSF ohne Magnesium. Zum dargestellten Zeitpunkt ist kein Etomidat in der Ableitlösung vorhanden. Man sieht über alle Kanäle ein Grundrauschen (außer Kanal 15, hier ist die Referenzelektrode der MEA konnektiert). Die sichtbaren Ausschläge oberhalb des Grundrauschens sind *bursts* an Aktionspotenzialen, d.h. Ansammlungen von mindestens 3 Aktionspotenzialen in schneller Abfolge. Die *bursts* sind über große Teile der MEA - und damit der Zellkultur - synchron. MEA = Mikroelektrodenarray; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*

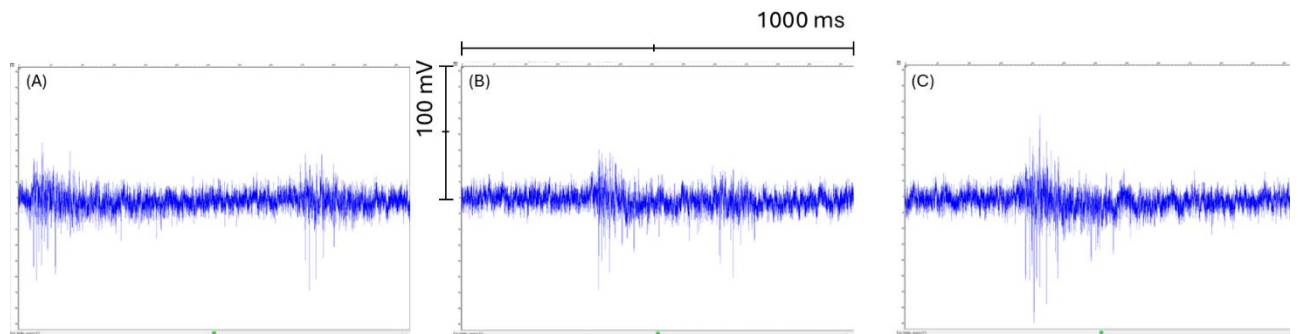


Abbildung 3.2: Originalableitung von Kanal 66 aus Messung 25 in ACSF ohne Magnesium vor, während und nach Applikation von 1 µM Etomidat

Abb. 3.2: Originaldarstellung der Datengewinnung aus dem verwendeten *capture*-Programm MC_Rack. Es sind Ströme über Kanal 66 (Position 6 vertikal und horizontal im Gitternetz der MEA-Matrix) dargestellt, die während Messung 25 im ACSF ohne Magnesium aufgenommen wurde. Es sind drei Phasen der Etomidatapplikation abgebildet: vor Applikation (A), während der Applikation von 1 µM Etomidat (B) und während der Auswaschperiode nach Applikation von Etomidat (C). Alle 3 Kanalableitungen zeigen ein gewisses Grundrauschen, sowie Ausschläge im Sinne von *spikes* und *bursts*, also Aktionspotenzialen und Ansammlungen von 3 Aktionspotenzialen in schneller Abfolge. Es ist nur eine geringfügige Änderung der Aktivität nach Zugabe von 1 µM Etomidat zu erkennen, sowie eine leichtgradig wiederkehrende Aktivität während der Auswaschperiode.
 ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; MEA = Mikroelektrodenarray

Die Veränderungen der nos/min durch die Zugabe von Etomidat zum ACSF ohne Magnesium sind im Folgenden beschrieben. 0,1 und 1 µM Etomidat zeigten keine Wirkung auf die Spikefrequenz. Nach Zugabe von 5 µM Etomidat war eine Abnahme der nos/min auf im Mittel $78,5 \pm 9,3$ % der Kontrollbedingungen erkennbar; nach Zugabe von 10 µM Etomidat war die Abnahme noch ausgeprägter auf im Mittel $50,2 \pm 6,9$ % der Kontrollbedingungen. Wurden 50 µM Etomidat zum ACSF ohne Magnesium hinzugegeben sank die nos/min auf $5,1 \pm 3,7$ % der Kontrollbedingungen.

Das Burstverhalten der Kulturen zeigte ein ähnliches Muster. 0,1 und 1 µM Etomidat zeigten ebenfalls keine Wirkung auf die nob/min. Die Zugabe von 5 µM Etomidat zum ACSF ohne Magnesium sorgte für eine geringgradige Steigerung der nob/min auf $109,4 \pm 12,3$ % der Kontrollbedingungen. Eine Erhöhung der

Etomidatkonzentration auf 10 μM führte zu einer Abnahme der nob/min auf $64,3 \pm 11,5 \%$ der Kontrollbedingungen, während eine zusätzliche Erhöhung der Konzentration auf 50 μM zu einer Abnahme der nob/min auf $6,6 \pm 5,3 \%$ der Kontrollbedingungen führte.

Die EC_{50} von Etomidat basierend auf der Veränderung der nos/min betrug in der Kontrollgruppe 13,47 μM (95 % CI: 5,16 – 35,19 μM) (s. Dosis-Wirkungs-Kurve in Abb. 3.3, (F)).

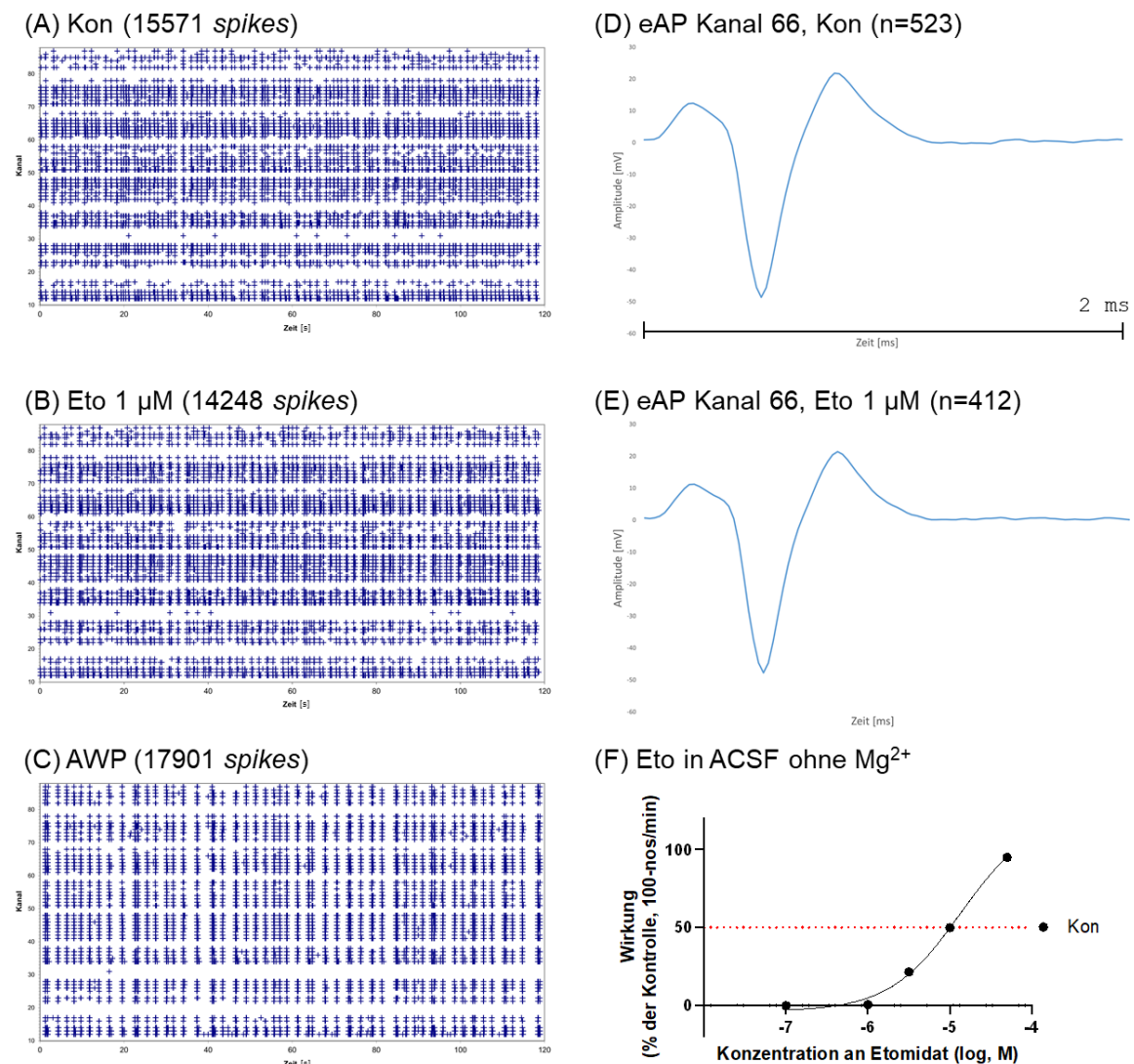


Abbildung 3.3: Spike-Raster-Plots, extrazelluläre Aktionspotenziale und Dosis-Wirkungs-Kurve in der Kontrollgruppe

Abb. 3.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontrollgruppe. In (A)-(C) sind Spike-Raster-Plots abgebildet, welche die Kanäle einer MEA über die Zeit aufrufen. Ein Kreuz entspricht

einem Aktionspotenzial. (A) zeigt ein Spike-Raster-Plot während der Kontrolle, (B) bei Applikation von 1 μM Etomidat und (C) in der Auswaschperiode. Die Anzahl an Aktionspotenzialen (*spikes*) in Anwesenheit von Etomidat, welche oberhalb der Plots angegeben ist, deutet auf eine leichte Senkung der Aktivität hin. (D) und (E) zeigen den Mittelwert der extrazellulär abgeleiteten Aktionspotentiale über Kanal 66 (Position 6 vertikal und horizontal auf der MEA-Matrix) während der Kontrolle und der Messung mit 1 μM Etomidat. In beiden Messungen zeigen sich hier stabile eAP, was auf eine gute Datenqualität hindeutet. Die n-Angaben in diesen beiden Teilabbildungen gibt die Anzahl an *spikes* an, welche an diesem Kanal gemessen worden sind. (F) zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve von Etomidat im ACSF ohne Magnesium. Diese beträgt hier etwa 13,47 μM . Kon = Kontrolle; eAP = extrazelluläres Aktionspotenzial; Eto = Etomidat; AWP = Auswaschperiode; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; Mg^{2+} = Magnesium; MEA = Mikroelektrodenarray

Zusammenfassend zeigte Etomidat im ACSF ohne Magnesium erst ab einer Konzentration von ca. 5 μM eine Wirkung im Sinne einer Abnahme der Aktivität. Allerdings war die nob/min bei 5 μM Etomidat erhöht anstatt erniedrigt.

3.3 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat im ACSF mit Magnesium

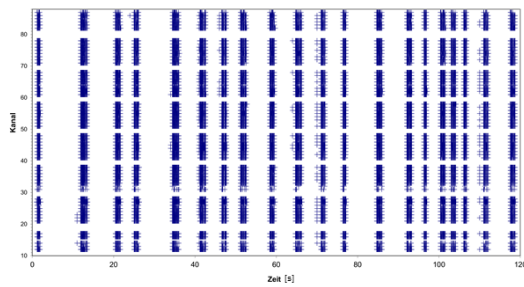
Magnesium ist ein starker physiologischer Inhibitor des NMDA-Rezeptors und bindet im Kanalinneren (44). Diese Substanz wurde untersucht, weil Sie ein körpereigener und spezifischer Blocker des Rezeptors ist. Die verwendete Konzentration an Magnesium war 500 μM .

Im ACSF mit Magnesium zeigte sich bei Zugabe von 0,1 oder 1 μM Etomidat kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei Erhöhung der Etomidatkonzentration auf 5 μM zeigte sich eine signifikante Abnahme der nos/min gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) (s. Abb. 3.4, (D)). Auch bei 10 μM Etomidat gab es einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe in der nos/min ($p < 0,001$). Die Zugabe von 50 μM Etomidat führte zwar zu einer starken Abnahme der nos/min, diese unterschied sich aber nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sind auch in Tabelle 3.2 dargestellt.

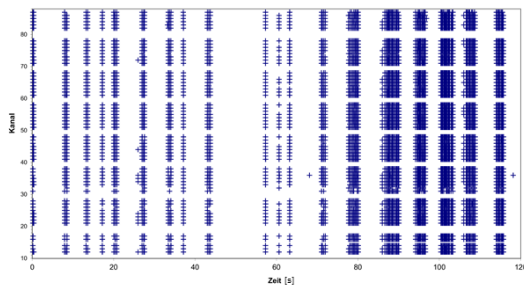
Das Burstverhalten im ACSF mit Magnesium verhielt sich in ähnlicher Weise. Weder bei Zugabe von 0,1 μM noch bei Zugabe von 1 μM Etomidat gab es einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Eine signifikante Änderung gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich bei Zugabe von 5 μM Etomidat ($p < 0,01$) (s. Abb. 3.4, (E)). Auch eine Etomidatkonzentration von 10 μM sorgte für einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Bei Steigerung der Etomidatkonzentration auf 50 μM war der signifikante Unterschied aufgehoben. Tabelle 3.5 zeigt eine detaillierte Übersicht dieser und weiterer Ergebnisse.

Die EC_{50} von Etomidat im ACSF mit Magnesium basierend auf der Veränderung der nos/min betrug 1,79 μM (95 % CI: 0,56 – 5,82 μM) (s. Dosis-Wirkungs-Kurven in Abb. 3.4, (F)).

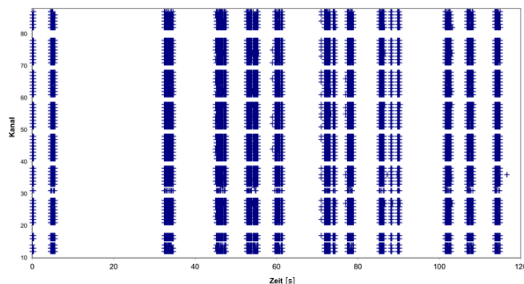
(A) Kon (40270 spikes)



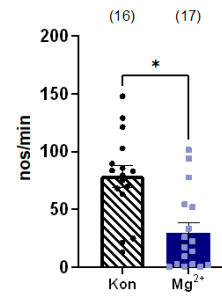
(B) Eto 1 μ M (18343 spikes)



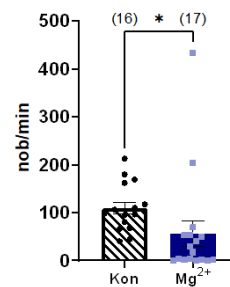
(C) AWP (33181 spikes)



(D) nos/min bei 5 μ M Eto



(E) nob/min bei 5 μ M Eto



(F) Eto in ACSF mit und ohne Mg^{2+}

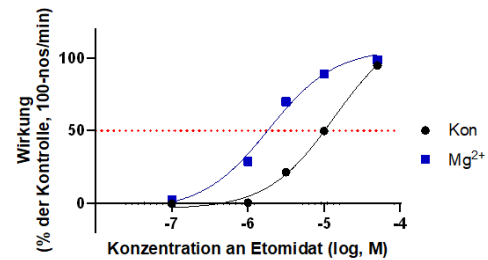


Abbildung 3.4: Spikes-Raster-Plots, Veränderungen des Spike- und Burstverhaltens und EC_{50} im ACSF mit Magnesium

Abb. 3.4: Die linke Seite zeigt Spike-Raster-Plots für Kontrollbedingungen (A), Applikation von 1 μ M Etomidat (B) und Auswaschperiode (C). In diesen Plots sind die Kanäle einer MEA (x-Achse) gegen die Zeit aufgetragen (y-Achse) und ein Kreuz entspricht einem Aktionspotenzial. Hier erkennt man eine deutlich synchrone Aktivität der Zellkultur über alle drei Perioden. Es ist auch deutlich erkennbar, dass die Spikedichte bei Applikation von 1 μ M Etomidat deutlich zurückgeht und während der AWP wieder ansteigt. (D) zeigt die Abnahme der nos/min nach Zugabe von 5 μ M Etomidat mit Magnesium im Ableitmedium; (E) zeigt die Abnahme der nob/min nach Zugabe von 5 μ M Etomidat. In beiden Fällen ist die Abnahme signifikant stärker als im ACSF ohne Magnesium (schwarz). Bei den Dosis-Wirkungs-Kurven (F) zeigt sich eine Linksverschiebung der blauen Kurve (ACSF mit Magnesium) gegenüber der Kurve unter Kontrollbedingungen (schwarz, ACSF ohne Magnesium). Diese Linksverschiebung ist nicht

statistisch signifikant (s. Konfidenzintervalle in Tabelle 3.7). Die EC_{50} von Etomidat im ACSF mit Magnesium beträgt etwa 1,79 μM . Die Anzahl an Experimenten ist in (D) und (E) in Klammern angegeben. Der Asteriskus (*) weist auf statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) hin.

Kon = Kontrolle; nos/min = *number of spikes per minute*; Eto = Etomidat; nob/min = *number of bursts per minute*; AWP = Auswaschperiode; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; EC_{50} = mittlere effektive Konzentration; MEA = Mikroelektrodenarray

Zusammenfassend zeigte die Zugabe von 500 μM Magnesium zum ACSF signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sowohl in der nos/min als auch in der nob/min im Bereich zwischen 5 und 10 μM Etomidat.

3.4 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von Memantin

Memantin ist ein *open-channel* Blocker des NMDA-Rezeptors und findet seine Anwendung als Antidementivum und bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie oder ADHS. In dieser Arbeit sollte es als pharmakologischer Inhibitor des NMDA-Rezeptors dienen. In Abbildung 3.5 ist eine Originalableitung aller Kanäle der MEA aus Messung 27 gezeigt, welche in Anwesenheit von Memantin im ACSF durchgeführt wurde. Es ist eine geringe Aktivität mit vereinzelt Bursts erkennbar.

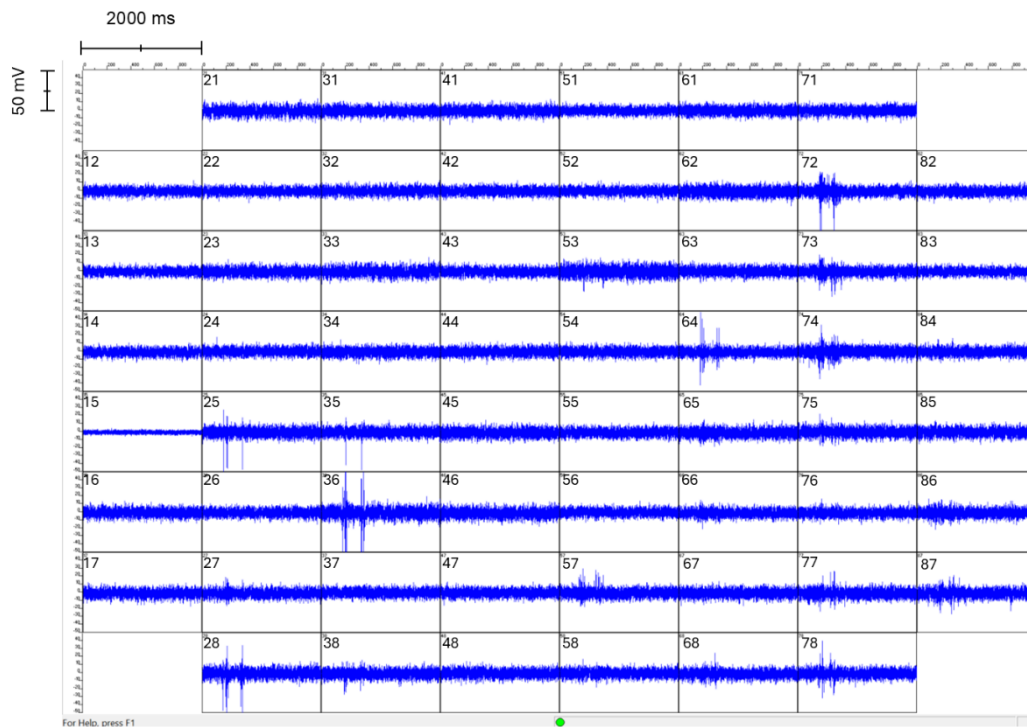


Abbildung 3.5: Originalableitung aus Messung 27 in ACSF mit Memantin, alle Kanäle

Abb. 3.5: Originaldarstellung der Messung 27 aus dem verwendeten *capture*-Programm MC_Rack mit Darstellung aller Kanäle der MEA. Hier wurde Memantin zum ACSF hinzugegeben. MC_Rack dient der Umwandlung der Aktionspotenziale auf Zellebene in digitale Datenströme. Zum dargestellten Zeitpunkt ist kein Etomidat im ACSF vorhanden. Man erkennt hier bei fast allen Kanälen ein Grundrauschen an elektrischer Aktivität, wohingegen nur wenige Kanäle tatsächliche Aktionspotenziale bzw. *bursts* (also Ansammlungen von mindestens 3 Aktionspotenzialen) zeigen.

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; MEA = Mikroelektrodenarray

Die Zugabe von 10 μM Memantin zum ACSF ohne Magnesium führte zu einer Abnahme der basalen Spikefrequenz auf $68,8 \pm 15,9$ % der vorausgegangenen Messperioden, was im Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test statistische Signifikanz mit einem *two-tailed* p-Wert von 0,018 ($n = 16$) erreichte.

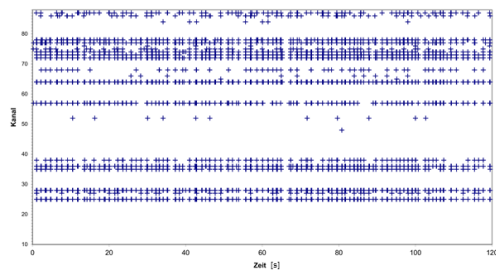
Bei einer Etomidatkonzentration von 0,1 μM in Anwesenheit von Memantin zeigte sich kein Unterschied der nos/min zur Kontrollgruppe. Wurde die Etomidatkonzentration auf 1 μM erhöht, zeigte sich hingegen eine signifikant stärkere Abnahme der nos/min gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Auch bei einer Konzentration von 5 oder 10 μM Etomidat war ein signifikanter

Unterschied zur Kontrollgruppe in der nob/min ($p < 0,001$ für 5 μM bzw. $p < 0,01$ für 10 μM ; Abb. 3.6, (D)) zu beobachten. Bei Zugabe von 50 μM Etomidat zum ACSF mit Memantin war kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr erkennbar.

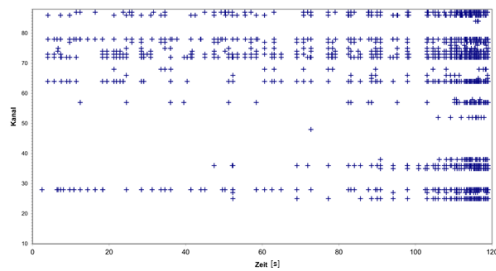
Die nob/min zeigte nach Hinzufügen von 0,1 μM Etomidat keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Eine Erhöhung der Etomidatkonzentration auf 1 μM sorgte für eine Abnahme der nob/min auf $40,6 \pm 9,7$ % der Anfangsaktivität ($p < 0,001$). Etomidatkonzentrationen von 5 oder 10 μM sorgten zusammen mit Memantin im ACSF für eine signifikant stärkere Abnahme der nob/min gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$ bzw. $< 0,01$; s. Abb. 3.6, (E)). Bei einer Etomidatkonzentration von 50 μM war kein signifikanter Unterschied in der nob/min zwischen Memantin- und Kontrollgruppe zu beobachten.

Die EC_{50} von Etomidat im ACSF ohne Magnesium mit 10 μM Memantin war 0,67 μM (95 % CI: 0,17 – 2,58 μM , errechnet aus der Veränderung der nob/min). Die entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abbildung 3.6, (F) zu sehen.

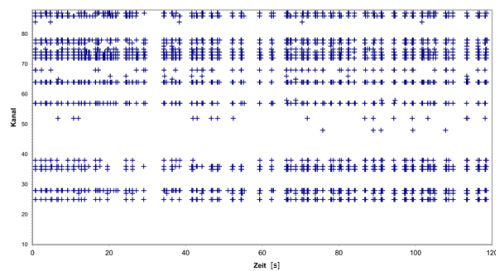
(A) Kon (4000 spikes)



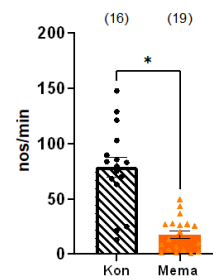
(B) Eto 1 μ M (1340 spikes)



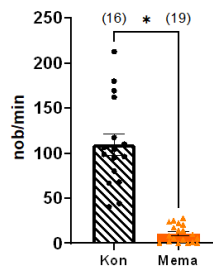
(C) AWP (3371 spikes)



(D) nos/min bei 5 μ M Eto



(E) nob/min bei 5 μ M Eto



(F) Eto in ACSF und mit Memantin

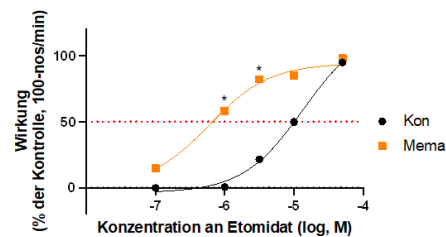


Abbildung 3.6: Spikes-Raster-Plots, Veränderungen des Spike- und Burstverhaltens und EC_{50} im ACSF mit Memantin

Abb. 3.6: In (A)-(C) sind Spike-Raster-Plots abgebildet. Auf der x-Achse sind die Kanäle der MEA aufgetragen, auf der y-Achse die Zeit während der Messperiode. Jedes Kreuz entspricht einem Aktionspotenzial. (A) zeigt einen Spike-Raster-Plot vor Applikation von Etomidat, (B) während der Applikation von 1 μ M Etomidat (B) und (C) während der Auswaschperiode bei Anwesenheit von Memantin im ACSF. Hier sind bereits vor Applikation des Hypnotikums nicht alle Kanäle aktiv, die Applikation senkt die Spikefrequenz nochmals. In der AWP erholt sich die Spikefrequenz nahezu. (D) und (E) zeigen die Änderung der nos/min und nob/min nach Zugabe von 5 μ M Etomidat als Mittelwert \pm SEM. Die Abnahme ist signifikant größer als in der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben. (F) zeigt eine signifikante Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Etomidat in Kombination mit Memantin (orange) gegenüber den Kontrollbedingungen (schwarz). Die EC_{50} von Etomidat in Anwesenheit von Memantin beträgt ca. 0,67 μ M. Signifikante Änderungen gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$) sind mit einem Asteriskus („*“) markiert.

Kon = Kontrolle; nos/min = *number of spikes per minute*; Eto = Etomidat; nob/min = *number of bursts per minute*; AWP = Auswaschperiode; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid* (Deutsch: künstlicher Liquor cerebrospinalis); MEA = Mikroelektrodenarray; SEM = *standard error of the mean*; EC₅₀= effektive mittlere Konzentration

Insgesamt bewirkte Memantin eine Abnahme der basalen Zellkulturaktivität, sowie eine deutliche Verstärkung der Wirkung von Etomidat auf die hippokampale Netzwerkaktivität. Etomidat zeigte in Anwesenheit von Memantin eine signifikant stärkere Wirkung auf das Spike- und Burstverhalten der Kulturen im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 µM. Dies zeigte sich auch in der signifikanten Abnahme der EC₅₀ von Etomidat.

3.5 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von DAP5

DAP5 ist ein hochselektiver, kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors. Es bindet an der Glutamatbindungsstelle des NMDA-Rezeptors auf der GluN2A oder GluN2B-Untereinheit (131). DAP5 diente hier dazu, den NMDA-Rezeptor möglichst selektiv zu inhibieren und die Vermittlung der Wirkung über andere Rezeptoren auszuschließen.

Bei Zugabe von 10 µM DAP5 zum ACSF ohne Magnesium zeigte sich eine Abnahme der mittleren basalen Aktivität auf $70,8 \pm 11,6$ %. Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test war diese Abnahme statistisch signifikant mit einem *two-tailed* p-Wert von 0,023 (n = 19).

In Anwesenheit von DAP5 zeigte 0,1 µM Etomidat keinen signifikant unterschiedlichen Effekt zur Kontrollgruppe in Bezug auf die nos/min. Bei Zugabe von 1, 5 oder 10 µM Etomidat zum ACSF mit DAP5 zeigte sich hingegen eine signifikant stärkere Abnahme der nos/min gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$ für 1 µM und $p < 0,05$ für 5 und 10 µM; s. Abb. 3.7, (D)).

Die Burstfrequenz zeigte nach Zugabe von 0,1 μM Etomidat zum ACSF mit DAP5 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 μM Etomidat konnten signifikante Unterschiede zwischen DAP5- und Kontrollgruppe ($p < 0,0001$ für 1 und 5 μM und $p < 0,01$ für 10 μM , s. Abb. 3.7, (E)) beobachtet werden. Bei Erhöhung der Etomidatkonzentration auf 50 μM waren keine signifikanten Unterschiede zwischen DAP5- und Kontrollgruppe zu beobachten.

Die EC_{50} von Etomidat in Anwesenheit von 10 μM DAP5 im ACSF basierend auf der Veränderung der nos/min betrug 0,43 μM (95 % CI: 0,08 – 2,33 μM). Abbildung 15 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für DAP5. Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat sind in Abbildung 3.7 (E) dargestellt.

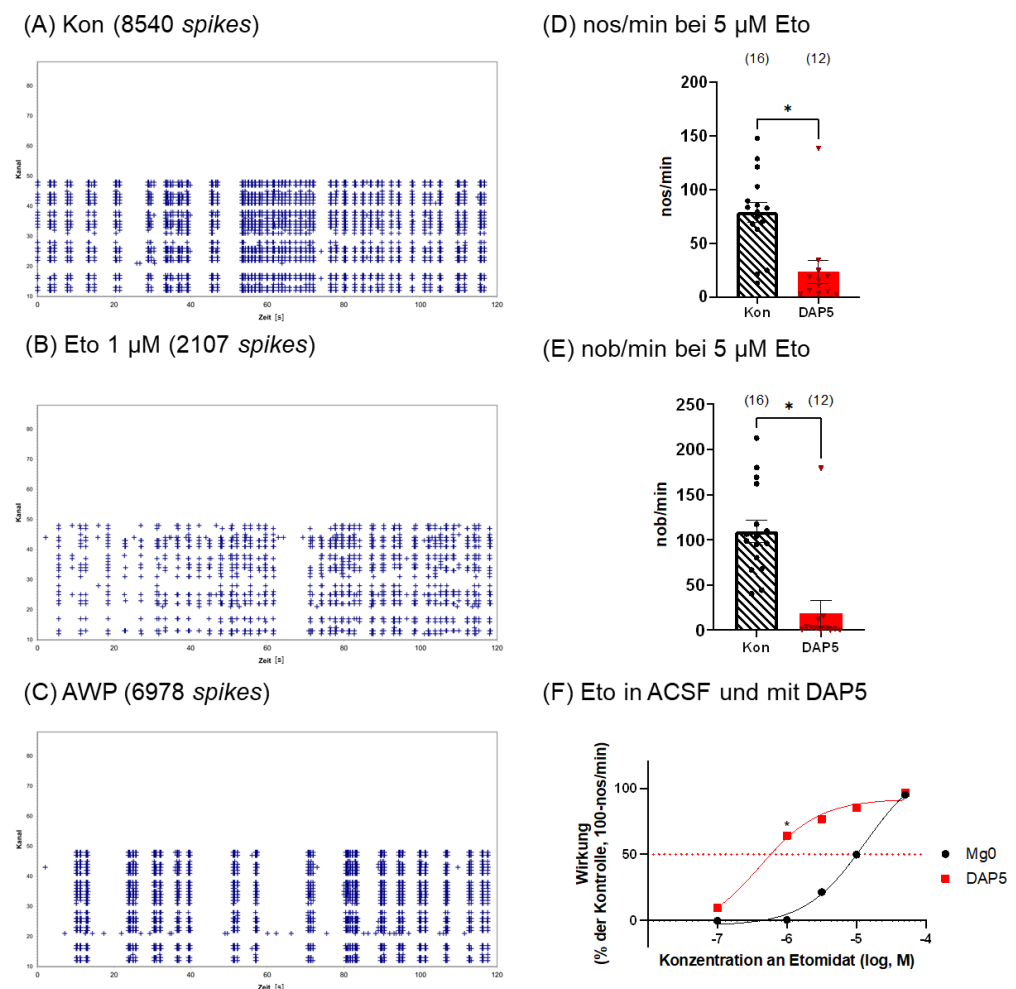


Abbildung 3.7: Spikes-Raster-Plots, Veränderungen des Spike- und Burstverhaltens und EC_{50} im ACSF mit DAP5

Abb. 3.7: Die Spike-Raster-Plots (A)-(C) tragen die Kanäle der MEA (y-Achse) gegen die Zeit der Messperiode auf (x-Achse). Jedes Kreuz steht für ein Aktionspotenzial. (A) zeigt eine Messung im ACSF mit DAP5 vor Applikation von Etomidat, (B) während der Applikation von 1 μM Etomidat und (C) während der Auswaschperiode nach Etomidatgabe. Man erkennt, dass die Kanäle 50-80 inaktiv sind. Außerdem nimmt die Spikefrequenz bei Zugabe von 1 μM Etomidat deutlich ab (über den Spike-Raster-Plots angegeben) und erholt sich in der Auswaschperiode. (D) und (E) zeigen die Änderung der nos/min und nob/min bei Zugabe von 5 μM Etomidat als Mittelwerte \pm SEM. Die Abnahme der nos/min und nob/min mit DAP5 ist signifikant stärker als in der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium. (F) zeigt Dosis-Wirkungs-Kurven für Etomidat mit (rot) und ohne Zusatz (schwarz) von DAP5 im Ableitmedium. Die Dosis-Wirkungs-Kurve ist signifikant nach links verschoben. Die EC_{50} von Etomidat in Anwesenheit von DAP5 ist etwa 0,43 μM . Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl an Experimenten an. Signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) sind mit einem Asteriskus („*“) gekennzeichnet.

Kon = Kontrolle; nos/min = *number of spikes*; Eto = Etomidat; nob/min = *number of bursts*; AWP = Auswaschperiode; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; DAP5 = D-2-Amino-5-phosphonovalerate; SEM = *standard error of the mean*; EC_{50} = mittlere effektive Konzentration

Insgesamt reduzierte DAP5 die basale Aktivität der Zellkulturen. Im Bereich zwischen 1 und 10 μM Etomidat sorgte das Vorhandensein von DAP5 im ACSF für eine signifikant stärkere Abnahme der Spike- und Burstfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die EC_{50} von Etomidat zeigte die größte Abnahme in Anwesenheit von DAP5 gegenüber allen anderen untersuchten Substanzen.

3.6 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von Dextromethorphan oder Dextrorphan

DXM ist ein frei verkäufliches Antitussivum, welches seine Wirkung über eine nicht-kompetitive Blockade des NMDA-Rezeptors entfaltet. Es wirkt an der PCP/MK801-Bindestelle innerhalb der Kanalpore (77) nahe der Magnesiumbindestelle und damit ähnlich wie Memantin. Der Metabolit DXO, welcher aus DXM entsteht, wirkt in ähnlicher Weise, ist allerdings potenter als das nicht metabolisierte DXM. DXM wurde ausgewählt, weil es frei verkäuflich ist

und es somit möglich ist, dass Patient:innen mit diesem Medikament prämediziert sind, ohne, dass die behandelnden Anästhesist:innen dies wissen.

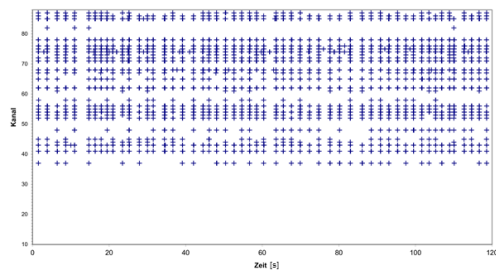
Die Zugabe von 10 μM DXM ins Ableitmedium veränderte die basale Spikeaktivität gegenüber den vorausgegangenen Messperioden nicht signifikant. Der *two-tailed* p-Wert war im Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test 0,232; $n = 10$.

Bei Zugabe von 0,1 μM Etomidat ins ACSF mit DXM zeigte sich, in Bezug auf die nos/min, kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei Zugabe von 1, 5 und 10 μM Etomidat ins ACSF mit DXM war eine signifikante Abnahme der nos/min ($p < 0,05$) zu beobachten (s. Abb. 3.8, (D)).

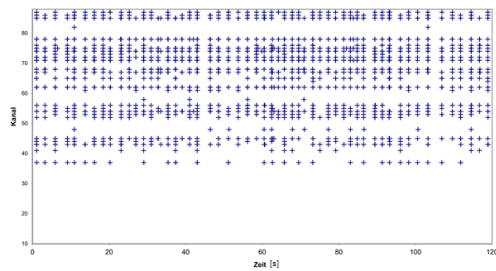
Die nob/min zeigte bei einer Etomidatkonzentration von 0,1 μM in Anwesenheit von DXM keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Ab einer Konzentration von 1 μM Etomidat konnte hingegen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($p < 0,01$; s. Abb. 3.8, (E)). Eine Etomidatkonzentration von 5 μM sorgte im ACSF mit DXM für eine signifikante Abnahme der nob/min mit $p < 0,0001$, eine Konzentration von 10 μM Etomidat sorgte für eine stärkere Abnahme der nob/min ($p < 0,001$). 50 μM Etomidat verursachten weder bei nos/min noch bei nob/min einen signifikanten Unterschied zwischen der DXM- und der Kontrollgruppe.

Die EC_{50} von Etomidat (errechnet anhand der Veränderung der nos/min) war im ACSF ohne Magnesium mit DXM 1,04 μM mit einem 95 %igen Konfidenzintervall von 0,13 – 8,53 μM . Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat sind in Abb. 3.8 (F) gezeigt.

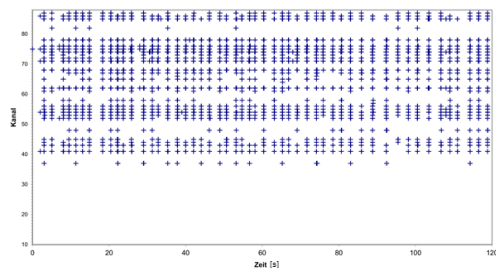
(A) Kon (4201 spikes)



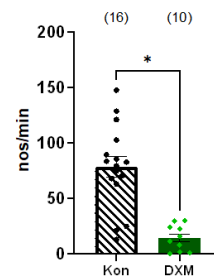
(B) Eto 1 μ M (2054 spikes)



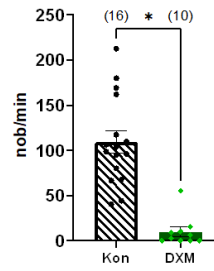
(C) AWP (3930 spikes)



(D) nos/min bei 5 μ M Eto



(E) nob/min bei 5 μ M Eto



(F) Eto in ACSF und mit DXM

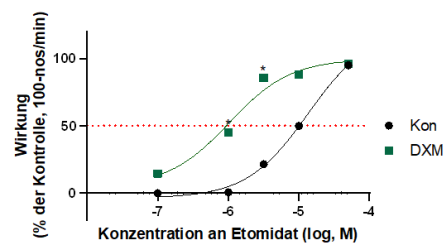


Abbildung 3.8: Spikes-Raster-Plots, Veränderungen des Spike- und Burstverhaltens und EC₅₀ im ACSF mit DXM

Abb. 3.8: (A)-(C) zeigen Spike-Raster-Plots welche MEA-Kanäle (y-Achse) gegen die Zeit der Messperiode aufragen (x-Achse). Jedes Kreuz entspricht einem Aktionspotenzial. (A) zeigt ein Spike-Raster-Plot im ACSF mit DXM vor Applikation von Etomidat, (B) während und (C) nach Applikation von 1 μ M Etomidat. Es ist erkennbar, dass die Kanäle 1 bis ca. 37 nicht aktiv sind. Gleichzeitig wird die Spikefrequenz durch die Zugabe von Etomidat etwa halbiert, in der AWP erholt sich die Frequenz auf den Ausgangswert (Anzahl an *spikes* ist oberhalb der Spike-Raster-Plots angegeben). Rechts zeigt (D) die Änderung der nos/min nach Zugabe von 5 μ M Etomidat, (E) zeigt ein entsprechendes Diagramm für die Änderung der nob/min. Hier sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Die Abnahme der beiden Variablen ist in Anwesenheit von DXM signifikant stärker als in der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben. (F) zeigt Dosis-Wirkungs-Kurven für Etomidat in Beisein von DXM (dunkelgrün) und in der Kontrollgruppe (schwarz). In Anwesenheit von DXM kommt es zu einer Linksverschiebung, diese ist nicht signifikant. Die EC₅₀ von Etomidat in Anwesenheit von DXM ist 1,04 μ M.

Kon = Kontrolle; nos/min = *number of spikes*; Eto = Etomidat; nob/min = *number of bursts*; AWP = Auswaschperiode; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; DXM = Dextromethorphan; SEM = *standard error of the mean*; EC₅₀ = mittlere effektive Konzentration

DXO veränderte die Wirkung von Etomidat in ähnlicher Weise wie DXM.

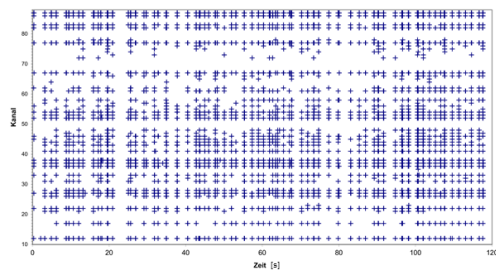
Die basale Aktivität der Kulturen blieb nach Zugabe von 10 µM DXO unverändert. Hier war der two-tailed p-Wert = 0,910 (n = 10) im Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test:

Die nos/min zeigte bei einer Konzentration von 0,1 µM Etomidat keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Wurde die Konzentration auf 1-10 µM erhöht, konnte eine signifikant stärkere Abnahme der nos/min im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (p < 0,001 für 1 und 5 µM; p < 0,01 für 10 µM; s. Abb. 3.9, (D)).

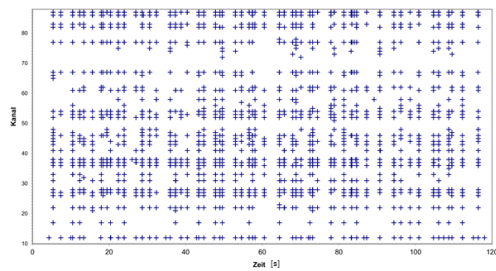
Auch die nob/min zeigten bei Zugabe von 0,1 µM Etomidat keinen Unterschied zwischen DXO- und Kontrollgruppe. Und auch hier zeigten Etomidatkonzentrationen zwischen 1 und 10 µM eine signifikant stärkere Abnahme der nob/min in der DXO-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe (p < 0,001 für 1 µM, p < 0,0001 für 5 µM und p < 0,01; s. Abb. 3.9, (E)).

Bei Anwesenheit von 10 µM DXO im ACSF ohne Magnesium betrug die EC₅₀ von Etomidat basierend auf die Veränderung der nos/min 0,49 µM (95 % CI: 0,25 – 0,97; s. Abb. 3.9, (F)).

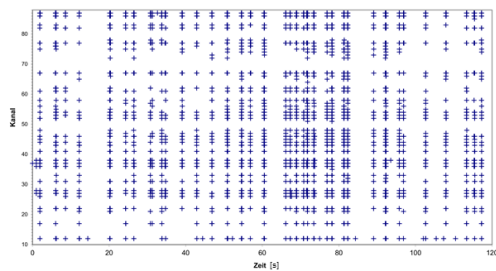
(A) Kon (5163 spikes)



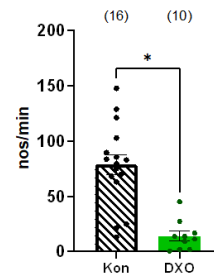
(B) Eto 1 μ M (1864 spikes)



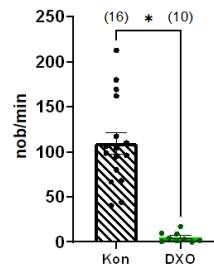
(C) AWP (3769 spikes)



(D) nos/min bei 5 μ M Eto



(E) nob/min bei 5 μ M Eto



(F) Eto in ACSF und mit DXO

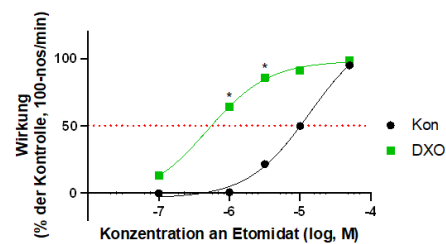


Abbildung 3.9: Spikes-Raster-Plots, Veränderungen des Spike- und Burstverhaltens und EC₅₀ im ACSF mit DXO

Abb. 3.9: (A)-(C) zeigen Spike-Raster-Plots, welche MEA-Kanäle (y-Achse) gegen die Zeit der Messperiode aufragen (x-Achse). Jedes Kreuz entspricht einem Aktionspotenzial. (A) zeigt eine Messung in ACSF mit DXO vor Applikation von Etomidat, (B) die gleiche Messung während der Applikation von 1 μ M Etomidat und (C) während der AWP. Man erkennt eine Abnahme der Spikefrequenz bei Applikation des Hypnotikums, welche sich während der AWP nicht vollständig auf das Ausgangsniveau erholt. (D) und (E) zeigen die Änderung der nos/min bzw. der nob/min bei Zugabe von 5 μ M Etomidat als Mittelwerte \pm SEM; die Anzahl an Experimenten ist hier in Klammern angegeben. Die Abnahme der nos/min und nob/min ist in Anwesenheit von DXO signifikant stärker als in der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium. Die Dosis-Wirkungskurven von Etomidat mit (hellgrün) und ohne (schwarz) DXO sind in (F) gezeigt. Hier ist die hellgrüne Kurve signifikant linksverschoben; die EC₅₀ von Etomidat in Anwesenheit von DXO beträgt ca. 0,49 μ M.

Kon = Kontrolle; nos/min = *number of spikes*; Eto = Etomidat; nob/min = *number of bursts*; AWP

= Auswaschperiode; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; DXO = Dextrorphan; EC₅₀ = mittlere effektive Konzentration

Der NMDA-Rezeptor-Antagonist DXM und dessen Metabolit DXO zeigten beide keine Veränderung der basalen Zellkulturaktivität. Beide Substanzen sorgten für eine signifikant stärkere Abnahme der Spike- und Burstfrequenz in den Kulturen nach Zugabe von 1-10 µM Etomidat im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die EC₅₀ von Etomidat war in Anwesenheit beider Substanzen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

3.7 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von CNQX

CNQX ist in erster Linie ein AMPA und Kainat-Rezeptor-Antagonist, welcher aber auch in bedeutendem Maße den NMDA-Rezeptor inhibiert. Dies erfolgt über eine Interaktion mit der Glyzinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors auf der GluN1-Untereinheit (86). Abbildung 3.10 zeigt eine Originalableitung aller Kanäle aus Messung 112, welche in Beisein von CNQX durchgeführt wurde.

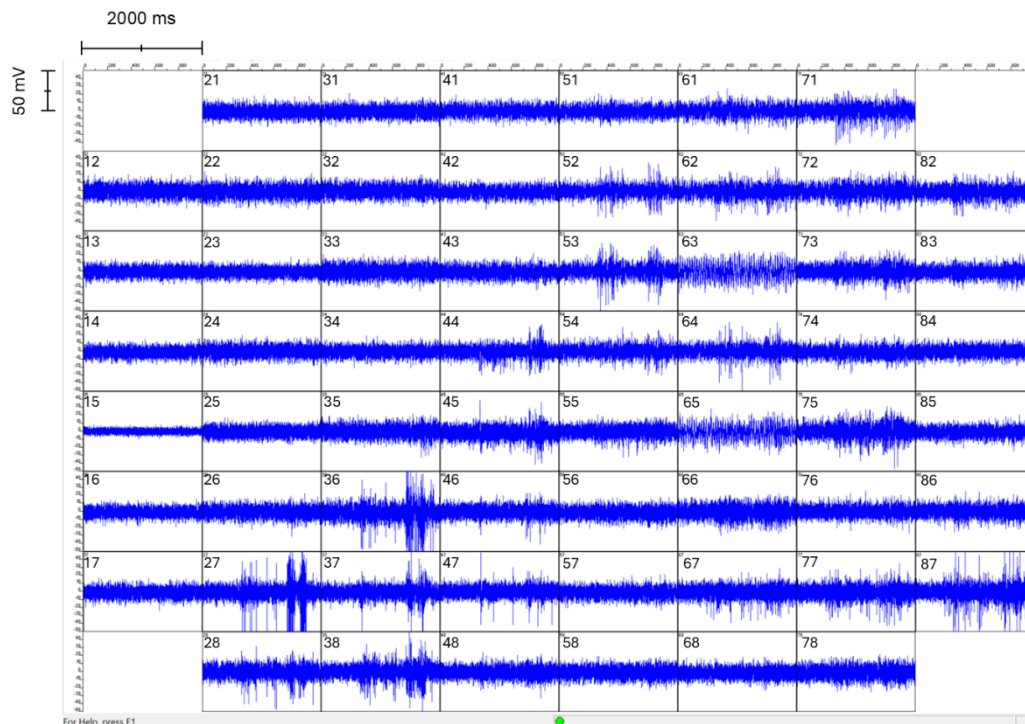


Abbildung 3.10: Originalableitung von Messung 112 im Beisein von CNQX im ACSF, alle Kanäle

Abb. 3.10: Originaldarstellung aus dem *capture*-Programm MC_Rack mit Darstellung aller Kanäle der MEA. MC_Rack dient der Umwandlung der Aktionspotenziale auf Zellebene in digitale Datenströme. Es ist Messung 112 im ACSF mit CNQX dargestellt. Zum dargestellten Zeitpunkt ist kein Etomidat im ACSF vorhanden. Alle Kanäle (außer Kanal 15, Referenzelektrode) weisen ein Grundrauschen auf. Die sichtbaren Ausschläge oberhalb des Grundrauschens sind *bursts* an Aktionspotenzialen, d.h. Ansammlungen von mindestens 3 Aktionspotenzialen in schneller Abfolge. In der Darstellung herrscht mäßige Synchronität der Ausschläge. CNQX = Cyanquixaline; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*

Eine Zugabe von 10 μM CNQX ins ACSF ohne Magnesium ergab im Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test keine statistisch signifikante Veränderung der basalen Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe. Der *two-tailed* p-Wert war 0,219 (n =7).

In Bezug auf die nos/min zeigte die CNQX-Gruppe bei keiner benutzten Etomidatkonzentration einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (s. Abb. 3.11, (D)).

CNQX zeigte bei der nob/min ähnliche Aktivitätsmuster, mit einer Ausnahme: Bei Zugabe von 10 μM Etomidat im ACSF mit CNQX konnte eine signifikant stärkere Abnahme der Burstfrequenz gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) beobachtet werden.

Die EC_{50} von Etomidat (errechnet anhand der Veränderung der nos/min) betrug bei Zugabe von CNQX ins Ableitmedium 1,04 μM (95 % CI: 0,37 – 3,09 μM). Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat sind in Abbildung 3.11 (F) dargestellt.

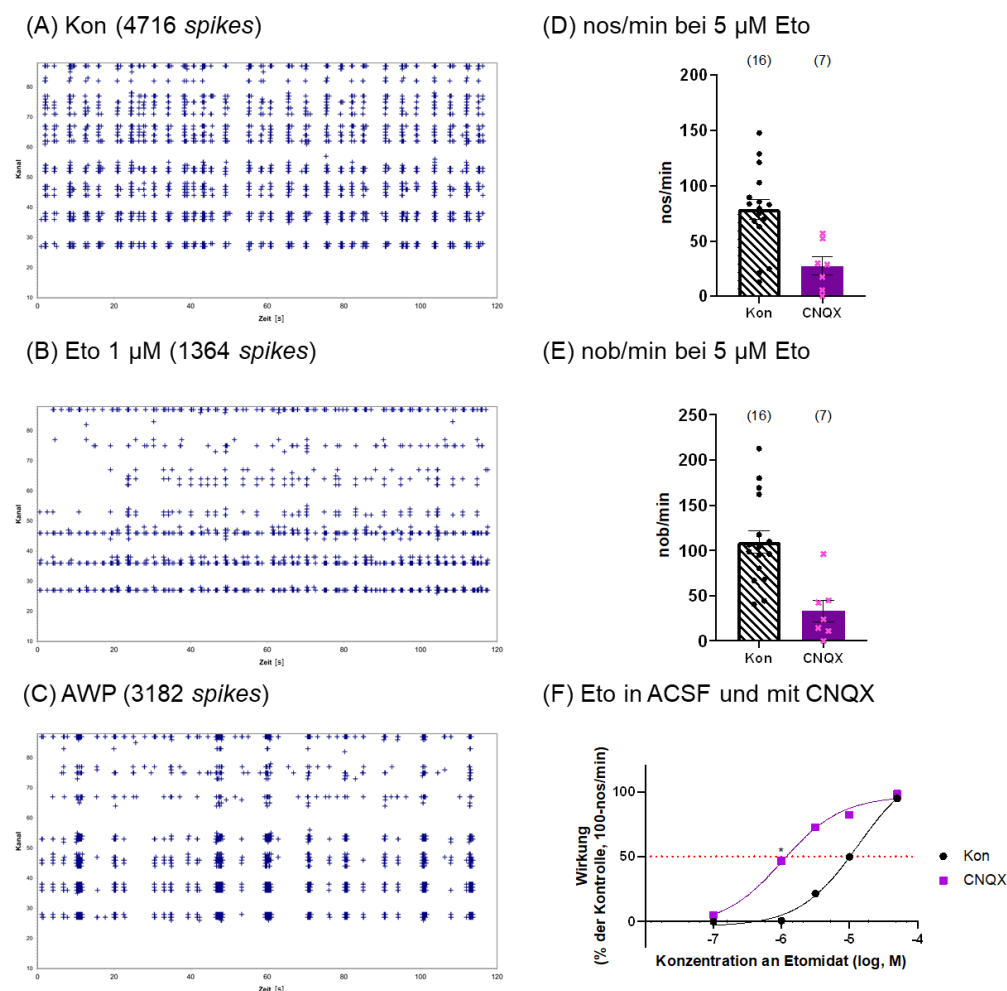


Abbildung 3.11: Spikes-Raster-Plots, Veränderungen des Spike- und Burstverhaltens und EC_{50} im ACSF mit CNQX

Abb. 3.11: (A)-(C) zeigen Spike-Raster Plots, welche die Kanäle einer MEA (auf der y-Achse) gegen die Zeit in einer Messperiode auftragen (x-Achse). Jedes Kreuz entspricht einem Aktionspotenzial. (A) zeigt einen Spike-Raster-Plot vor, (B) während und (C) nach der Applikation von 1 μ M Etomidat. Man erkennt eine Abnahme an Aktionspotenzialen bei (B). Bei (C) erholt sich die Aktionspotenzialfrequenz und nimmt auch an Synchronität zu. (D) zeigt die Änderung an nos/min, (E) die Änderung von nob/min nach Zugabe von 1 μ M Etomidat. In diesen Diagrammen sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Die Anzahl an Experimenten ist hier in Klammern angegeben. Die Veränderungen sind nicht statistisch signifikant. In (F) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für Etomidat gezeigt. Die lila Kurve zeigt die Wirkung von Etomidat in Kombination mit CNQX an, die schwarze die Wirkung unter Kontrollbedingungen. Es ist eine Linksverschiebung der lila Kurve erkennbar, welche aber nicht signifikant ist. ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; AWP = Auswaschperiode; CNQX = Cyanquixaline; EC_{50} = mittlere effektive Konzentration; Eto = Etomidat; Kon = Kontrolle; nob/min = *number of bursts*; nos/min = *number of spikes*; MEA = Mikroelektrodenarray; SEM = *standard error of the mean*

Insgesamt zeigte die Zugabe von CNQX zum ACSF keine Änderung der basalen Aktivität der Zellkulturen. Keine der verwendeten Etomidatkonzentrationen sorgte in Anwesenheit von CNQX für eine signifikant von der Kontrollgruppe unterschiedliche Spike- oder Burstfrequenz. Die EC_{50} von Etomidat in Anwesenheit von CNQX war mit 1,04 μ M signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

3.8 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat nach Inkubation mit CBR-5884

CBR-5884 ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der PHGDH, welches wiederum das Schlüsselenzym der Serinsynthese ist (90). Ohne Serin ist die Funktion des NMDA-Rezeptors erheblich eingeschränkt. Die Inkubation mit diesem Stoff sollte Hinweise auf weitere Möglichkeiten der NMDA-Rezeptor-Inhibition geben und eventuell Rückschlüsse auf serinassoziierte Pathologien ermöglichen.

Allerdings zeigte CBR-5884 weder bei der nos/min, noch bei der nob/min einen statistisch signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe, unabhängig von der Konzentration an Etomidat (s. Abb. 3.12 (A-B)). Eine genaue Auflistung der Kennwerte findet sich in den Tabellen 3.8 und 3.9.

Tabelle 3.8: Übersicht der Ergebnisse und Signifikanz für nos/min bei CBR-5884

Testsubstanzen		0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
ACSF ohne Magnesium	nos/min (%)	100,2 \pm 3,3	99,6 \pm 6,1	78,5 \pm 9,3	50,2 \pm 6,9	5,1 \pm 3,7
	n	16	16	16	16	7
CBR-5884	nos/min (%)	105,1 \pm 9,3	112,0 \pm 1,1	75,5 \pm 2,5	27,0 \pm 12,9	0,4 \pm 0,4
	n	3	3	3	3	3
	p-Wert	0,712	0,171	0,793	0,171	0,792

Tab. 3.8: Übersicht der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für nos/min bei den Experimenten mit CBR-5884, gegliedert nach benutzter Etomidatkonzentration. Es werden nos/min, Anzahl an Experimenten (n) und die p-Werte angegeben. Bei keiner Konzentration wurde statistische Signifikanz erreicht.
ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; n = Anzahl an Experimenten; nos/min = *number of spikes per minute*

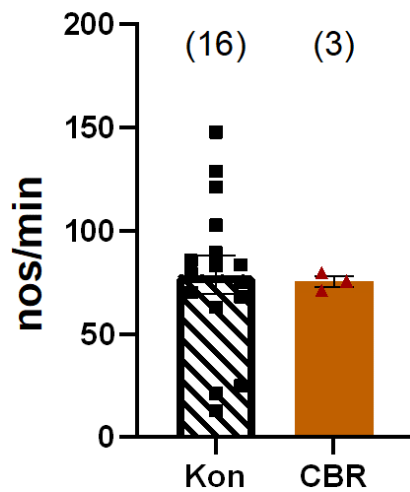
Tabelle 3.9: Übersicht der Ergebnisse und Signifikanz für nob/min bei CBR-5884

Testsubstanzen		0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
ACSF ohne Magnesium	nob/min (%)	104,4 \pm 3,7	101,5 \pm 6,7	109,4 \pm 12,3	64,3 \pm 11,5	6,6 \pm 5,2
	n	16	16	16	16	7
CBR-5884	nob/min (%)	104,4 \pm 3,7	127,9 \pm 2,7	81,5 \pm 7,5	29,3 \pm 15,1	0,08 \pm 0,08
	n	3	3	3	3	3
	p-Wert	> 0,999	0,084	0,303	0,217	0,500

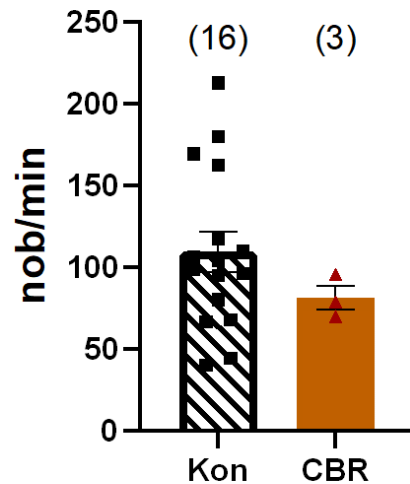
Tab. 3.9: Übersicht der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für nob/min bei den Experimenten mit CBR-5884, gegliedert nach benutzter Etomidatkonzentration. Es werden nob/min, Anzahl an Experimenten (n) und die p-Werte angegeben. Bei keiner Konzentration wurde statistische Signifikanz erreicht.
ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; n = Anzahl an Experimenten; nos/min = *number of spikes per minute*

Die, anhand der Veränderung der nos/min errechnete, EC₅₀ von Etomidat betrug hier 6,79 μ M. Das 90 %ige Konfidenzintervall ist 1,59 – 51,79 μ M; Abbildung 3.12 (C) zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven für Etomidat in dieser Gruppe.

(A) nos/min bei 5 μ M Eto



(B) nob/min bei 5 μ M Eto



(C) Eto in ACSF und mit CBR-5884

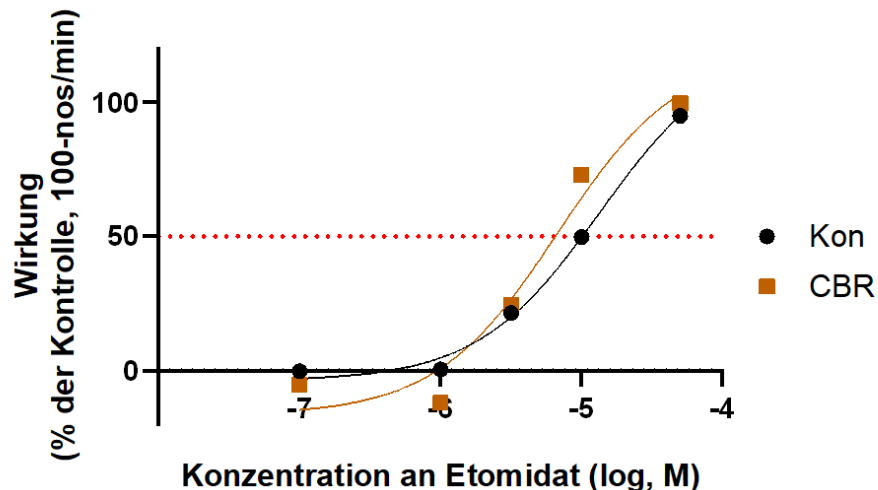


Abbildung 3.12: Veränderung der *spikes* und *bursts*, sowie Dosis-Wirkungs-Kurven nach Inkubation mit CBR-5884

Abb. 3.12: (A) und (B) zeigen die Änderung an nos/min und nob/min im Vergleich zur Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium. Hier sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Bei keiner Variable gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei (C) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat mit (braun) und ohne CBR-5884 (schwarz) abgebildet. Man erkennt nur einen geringfügigen Unterschied zwischen dem Verlauf beider Kurven. Die EC_{50} von Etomidat nach Inkubation mit CBR-5884 war 6,79 μ M und unterschied sich nicht signifikant von der EC_{50} in der Kontrollgruppe. Die Anzahl an Experimenten ist in Klammern angegeben. ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; EC_{50} = mittlere effektive Konzentration; Eto = Etomidat;

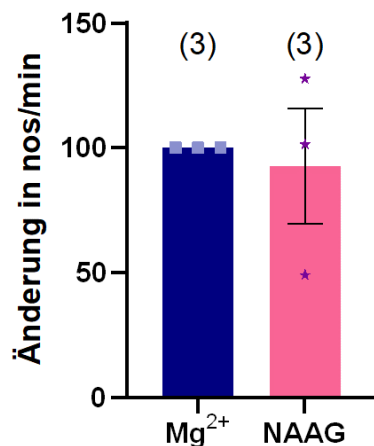
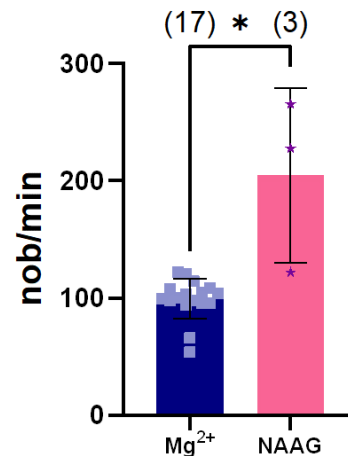
nob/min = *number of bursts per minute*; nos/min = *number of spikes per minute*; SEM = standard error of the mean

CBR-5884 zeigte in keinem der untersuchten Parameter einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die EC₅₀ von Etomidat war in Anwesenheit von CBR-5884 geringer als in der Kontrollgruppe, allerdings mit einem breiten Konfidenzintervall und keiner Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve.

3.9 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat in Anwesenheit von NAAG im Vergleich zu ACSF mit Magnesium

NAAG ist ein Peptid, welches abhängig vom Aktivierungsstatus des NMDA-Rezeptors diesen entweder potenzieren oder inhibieren kann. Bei geringer synaptischer Aktivität bleibt die Struktur des Stoffs erhalten und NAAG inhibiert den NMDA-Rezeptor über die Glutamatbindungsstelle, während bei erhöhter synaptischer Aktivität vermehrt GCP II ausgeschüttet wird, welches NAAG zu Glutamat spaltet und so den Rezeptor aktiviert (100, 101). Im Rahmen dieser Arbeit wurde vermutet, dass NAAG den NMDA-Rezeptor aktiviert. Daher wurde hier als Kontrolle die Gruppe in ACSF mit Magnesium gewählt.

(A) Basale Aktivität

(B) nob/min bei 0,1 μ M Eto

(C) Eto in ACSF mit Magnesium und mit NAAG

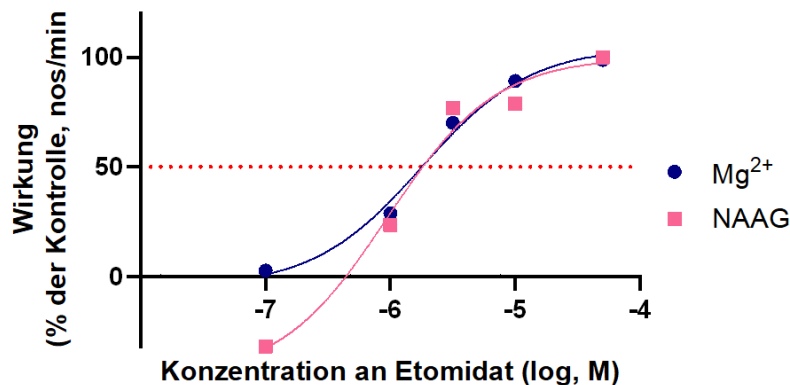


Abbildung 3.13: Veränderung der basalen Netzwerkaktivität, der *bursts* und der EC₅₀ von Etomidat durch NAAG

Abb. 3.13: (A) Änderung der basalen Aktivität der Zellkulturen nach Zugabe von 20 μ M NAAG im Vergleich zur Magnesiumgruppe; (B) Änderung der nob/min nach Zugabe von 0,1 μ M Etomidat im Beisein von NAAG. Es sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Die Anzahl an Experimenten ist hier in Klammern angegeben. (C) Zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven für Etomidat im ACSF mit Magnesium (blau) und mit Magnesium und NAAG (rosa). ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; Eto = Etomidat; NAAG = N- Acetylaspartylglutamat; nob/min = *number of bursts per minute*; nos/min = *number of spikes per minute*; SEM = *standard error of the mean*

Nach Hinzufügen des Peptids ins ACSF mit Magnesium war keine statistisch signifikante Veränderung der basalen Kulturaktivität im Vergleich zu den beiden vorausgegangenen Messperioden zu beobachten (s. Abb. 3.13, (A)). Im

Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test betrug der *two-tailed* p-Wert > 0,999 (n = 3).

Auch im *two-tailed* Mann-Whitney-U-Test zeigte NAAG für die nos/min bei keiner Etomidatkonzentration einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (ACSF + 500 µM Magnesium). Kennwerte sind in Tabelle 3.10 gelistet.

Tabelle 3.10: Übersicht der Ergebnisse und Signifikanz für nos/min bei NAAG

Testsubstanzen		0,1 µM	1 µM	5 µM	10 µM	50 µM
ACSF mit Magnesium	nos/min (%)	97,3 ± 5,4	71,2 ± 9,3	30,0 ± 8,2	10,9 ± 5,0	1,2 ± 0,8
	n	17	17	17	17	7
NAAG	nos/min (%)	132 ± 22,6	76,4 ± 32	23,1 ± 13	21,3 ± 19,	0,2 ± 0,2
	n	3	3	3	3	3
	p-Wert	0,093	0,842	0,991	> 0,999	0,350

Tab. 3.10: Übersicht der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für nos/min bei den Experimenten mit NAAG gegliedert nach Etomidatkonzentration. Es werden nos/min, Anzahl an Ergebnissen (n) und p-Werte angegeben. Bei keiner Konzentration wurde statistische Signifikanz erreicht.

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; n = Anzahl an Experimenten; NAAG = N-Acetylaspartylglutamat; nos/min = *number of spikes per minute*

Bei den nob/min konnte im *two-tailed* Mann-Whitney-U-Test bei einer Etomidatkonzentration von 0,1 µM ein signifikanter Unterschied zwischen NAAG- und Kontrollgruppe beobachtet werden (s. Abb. 3.10, (B)). Hierbei war die nob/min in der NAAG-Gruppe signifikant höher als in der Kontrolle. Bei höheren Etomidatkonzentrationen war kein Unterschied mehr festzustellen. Die nob/min und statistischen Kennwerte sind in Tabelle 3.11 aufgelistet.

Tabelle 3.11: Übersicht der Ergebnisse und Signifikanz für nob/min bei NAAG

Testsubstanzen		0,1 µM	1 µM	5 µM	10 µM	50 µM
ACSF mit Magnesium	nob/min (%)	99,2 ± 4,1	86,4 ± 11,9	56,6 ± 26,5	7,2 ± 2,5	1,1 ± 0,9
	n	17	17	17	17	7
NAAG	nob/min (%)	204,9 ± 43,0	88,0 ± 34,8	34,7 ± 26,6	21,4 ± 20,6	0,0 ± 0,0
	n	3	3	3	3	3
	p-Wert	< 0,01	0,921	0,615	0,171	0,250

Tab. 3.11: Übersicht der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für nob/min bei den Experimenten mit NAAG gegliedert nach Etomidatkonzentration. Es werden nos/min, Anzahl an Ergebnissen (n) und p-Werte angegeben. Bei keiner Konzentration wurde statistische Signifikanz erreicht.

ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; n = Anzahl an Experimenten; NAAG = N-Acetylaspartylglutamat; nob/min = *number of bursts per minute*

Die EC₅₀ von Etomidat basierend auf die Veränderung der nos/min in Anwesenheit von 20 µM NAAG betrug 0,94 µM (95 % CI: 0,01-5,51 µM). In Abbildung 3.13 (C) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat dargestellt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass NAAG die basale Aktivität der Kulturen nicht beeinflusste. Auch die nos/min war nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (ACSF + 500 µM Magnesium) verändert, unabhängig von der Etomidatkonzentration. Die nob/min war nur bei Zugabe von 0,1 µM Etomidat signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die EC₅₀ von Etomidat war in Anwesenheit von NAAG nicht geringer als im ACSF mit Magnesium.

3.10 Veränderung der hippokampalen Netzwerkaktivität durch Etomidat nach Inkubation mit siRNA

Gezielte *knockdowns* bestimmter Gene durch RNAi sind innovative Möglichkeiten der Einflussnahme in biologische Prozesse. Hierbei wird die doppelsträngige siRNA degradiert, wonach der anti-sense Strang an die mRNA einer Zelle binden kann, um die Proteinbiosynthese zu arretieren. Mithilfe dieser Methode soll eine möglichst spezifische Inhibierung des NMDA-Rezeptors erreicht werden, ohne durch pharmakologische Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren beeinflusst zu werden.

Die *real-time* PCR zeigte eine mangelhafte Wirkung der GRIN1-siRNA zur Runterregulierung des NMDA-Rezeptors. Die relative Expression der Rezeptor-mRNA war zwar höher in Ansätzen, welche mit GRIN1-siRNA statt NC1-siRNA behandelt worden waren (13 ± 11 %; n = 4), diese beiden Ansätze unterschieden sich aber im *paired* T-test nicht voneinander (p = 0,12; s. Abb. 3.14, (A)).

Die Ergebnisse der Prüfung auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk sind in den Tabellen 3.12 und 3.14 gezeigt.

Tabelle 3.12: Prüfung auf Normalverteilung der nos/min bei den siRNA-Experimenten.

Etomidatkonzentration		Kontrolle	NC1	GRIN1
0,1 μ M	p-Wert	0,518	0,859	0,6290
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Ja
1 μ M	p-Wert	0,253	0,339	0,165
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Ja
5 μ M	p-Wert	0,505	0,403	0,542
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Ja
10 μ M	p-Wert	0,194	0,956	0,011
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Nein
50 μ M	p-Wert	0,001	0,193	0,045
	n	7	4	4
	normalverteilt?	Nein	Ja	Nein

Tab. 3.12: Prüfung auf Normalverteilung der nos/min nach Shapiro-Wilk bei Kontroll-, NC1- und GRIN1-Gruppe. Für jede Etomidatkonzentration und Gruppe sind der p-Wert, die Anzahl an Experimenten (n) und die Entscheidung über Normalverteilung angegeben. Normalverteilte Gruppen sind durch fettgedruckte Zeichen hervorgehoben. GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*; n = Anzahl an Experimenten; NC1 = *negative control 1 siRNA*

Im Vergleich zwischen der NC1- und der GRIN1-Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in der nos/min, unabhängig von der verwendeten Etomidatkonzentration (s. Abb. 3.14, (C)). Im Vergleich zwischen der Kontroll- und der GRIN1-Gruppe sorgte eine Zugabe von 1 μ M Etomidat für eine signifikant stärkere Abnahme der nos/min in der GRIN1-Gruppe im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.14, (C)). Die übrigen untersuchten Etomidatkonzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Eine Auflistung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 3.13 zu finden.

Tabelle 3.13: Übersicht über Ergebnisse und Signifikanz bei nos/min im Vergleich zwischen Kontrollgruppe, NC1- und GRIN1-Gruppe

Testsubstanzen		0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
ACSF ohne Magnesium	nos/min (%)	100,2 \pm 3,3	99,6 \pm 6,1	78,5 \pm 9,3	50,2 \pm 6,9	5,1 \pm 3,7
	n	16	16	16	16	7
	p-Wert	0,999	< 0,05	0,299	0,200	0,198

NC1	nos/min (%)	99,3 ± 2,4	91,0 ± 10,4	61,2 ± 17,7	42,5 ± 14,1	0,0 ± 0,0
	n	4	4	4	4	7
	p-Wert	0,996	0,254	0,841	0,813	0,899
GRIN1	nos/min (%)	100,0 ± 5,2	62,3 ± 14,8	46,1 ± 22,1	18,0 ± 15,1	0,0 ± 0,0
	n	4	4	4	4	4

Tab. 3.13: Übersicht der Ergebnisse der ANOVA- und Kruskal-Wallis-Tests für nos/min in der Kontrollgruppe, sowie in der NC1- und GRIN1-Gruppe, gegliedert nach verwendeter Etomidatkonzentrationen. Es werden nos/min, Anzahl an Experimenten (n) und p-Werte gezeigt. Bei Zugabe von 1 µM Etomidat unterschied sich GRIN1 signifikant von der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium. ANOVA = *analysis of variance*; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*; n = Anzahl an Experimenten; NC1 = *negative control 1 siRNA*; nos/min = *number of spikes per minute*

Tabelle 3.14: Prüfung auf Normalverteilung der nob/min bei den siRNA-Experimenten nach Shapiro-Wilk

Etomidatkonzentration		Kontrolle	NC1	GRIN1
0,1 µM	p-Wert	0,065	0,023	0,884
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Nein	Ja
1 µM	p-Wert	0,215	0,167	0,689
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Ja
5 µM	p-Wert	0,293	0,936	0,264
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Ja
10 µM	p-Wert	0,600	0,769	0,003
	n	16	4	4
	normalverteilt?	Ja	Ja	Nein
50 µM	p-Wert	0,000	> 0,999	> 0,999
	n	7	4	4
	normalverteilt?	Nein	Nein	Nein

Tab. 3.14: Prüfung auf Normalverteilung der nob/min nach Shapiro-Wilk bei Kontroll-, NC1- und GRIN1-Gruppe. Für jede Etomidatkonzentration und Gruppe sind der p-Wert, die Anzahl an Experimenten (n) und die Entscheidung über Normalverteilung angegeben. Normalverteilte Gruppen sind durch fettgedruckte Zeichen hervorgehoben. GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*; n = Anzahl an Experimenten; NC1 = *negative control 1 siRNA*

Die nob/min zeigte bei allen verwendeten Etomidatkonzentrationen keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und siRNA-Gruppen (s. Abb. 3.14, (D)). Tabelle 3.15 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse.

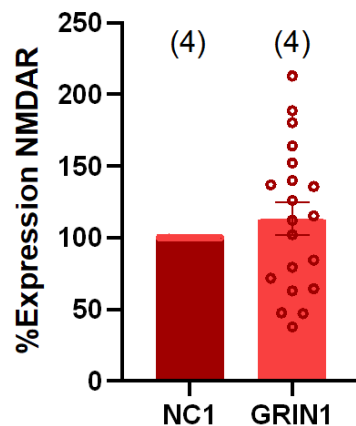
Tabelle 3.15: Übersicht über Ergebnisse und Signifikanz bei nob/min im Vergleich zwischen Kontrollgruppe, NC1- und GRIN1-Gruppe

Testsubstanzen		0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
ACSF ohne Magnesium	nob/min (%)	104,4 \pm 3,7	101,5 \pm 6,7	109,4 \pm 12,3	64,3 \pm 11,5	6,6 \pm 5,2
	n	16	16	16	16	7
	p-Wert	> 0,999	0,997	0,254	0,451	0,149
NC1	nob/min (%)	107,0 \pm 6,4	120,8 \pm 19,0	89,4 \pm 25,1	54,2 \pm 17,6	0,0 \pm 0,0
	n	4	4	4	4	4
	p-Wert	> 0,999	0,558	0,731	> 0,999	> 0,999
GRIN1	nob/min (%)	101,3 \pm 10,8	100,3 \pm 8,7	60,9 \pm 36,2	26,9 \pm 24,7	0,0 \pm 0,0
	n	4	4	4	4	4
	p-Wert	> 0,999	0,558	0,731	> 0,999	> 0,999

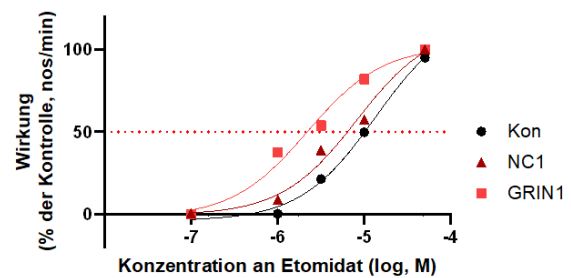
Tab. 3.15: Übersicht über Ergebnisse der ANOVA- und Kruskal-Wallis-Tests für nob/min in der NC1- und GRIN1-Gruppe, gegliedert nach verwendeter Etomidatkonzentrationen. Es werden nob/min, Anzahl an Experimenten (n) und p-Werte berichtet. Keine der untersuchten Gruppen erreichte statistische Signifikanz.
 ANOVA = *analysis of variance*; ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*; n = Anzahl an Experimenten; NC1 = *negative control 1 siRNA*; nob/min = *number of bursts per minute*

Die EC₅₀ von Etomidat in der GRIN1-Gruppe betrug 2,2 μ M (95 % CI: 0,32 – 13,47 μ M); In der NC1-Gruppe betrug die EC₅₀ von Etomidat 8,2 μ M (95 % CI: 1,6 – 137,6 μ M). Die EC₅₀-Werte wurden anhand der Veränderung der nob/min errechnet. Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat nach Behandlung mit siRNA sind in Abbildung 3.14 (B) gezeigt.

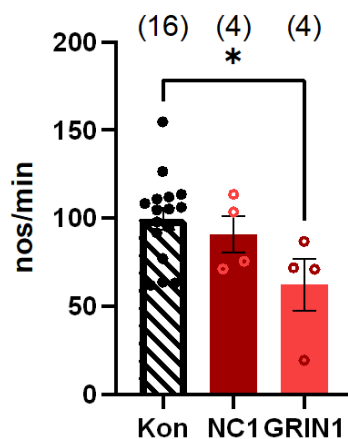
(A) Expression NMDA-Rezeptor



(B) Eto in ACSF, NC1 oder GRIN1



(C) nos/min bei 1 μ M Eto



(D) nob/min bei 1 μ M Eto

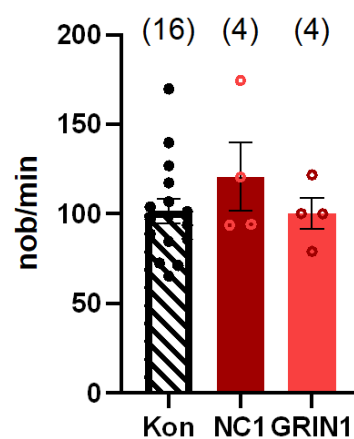


Abbildung 3.14: Veränderung der NMDA-Rezeptor-Expression sowie der Etomidatwirkung nach Inkubation mit siRNA

Abb. 3.14: Bei (A) ist die relative Expression der NMDA-Rezeptor mRNA nach Inkubation mit siRNA gezeigt. Es ist eine leicht erhöhte relative Expression im GRIN1-Ansatz erkennbar, allerdings unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. Die Expression des Rezeptors bei den NC1-Ansätzen galt als Referenz. In Klammern ist die Anzahl an Rattenwürfen gezeigt, anhand welcher die Expression berechnet wurde. (B) zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven von Etomidat unter verschiedenen Bedingungen. Schwarz entspricht der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium, hellrot nach Inkubation mit GRIN1-siRNA, dunkelrot nach Inkubation mit NC1-siRNA. Es ist eine leichte Linksverschiebung der GRIN1-Kurve zu erkennen; diese unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von den übrigen beiden. (C) zeigt die nos/min in den drei Gruppen bei Zugabe von 1 μ M Etomidat: Hier ist die nos/min in der GRIN1-Gruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe im ACSF ohne Magnesium. Einen

Unterschied zur NC1-Gruppe gibt es hier nicht. Zuletzt zeigt (D) ein entsprechendes Diagramm für die nob/min. Bei dieser Variable gab es keine signifikanten Unterschiede. Es sind Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Für (C) und (D) ist die Anzahl an Experimenten in Klammern angegeben, Asterisken (*) weisen auf statistische Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe hin. ACSF = *artificial cerebrospinal fluid*; Eto = Etomidat; GRIN1 = *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*; NC1 = *negative control 1 siRNA*; NMDA = N-methyl-D-Aspartat; NMDAR = N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor; nob/min = *number of bursts per minute*; nos/min = *number of spikes per minute*; SEM = *standard error of the mean*

Zusammenfassend zeigte sich durch die Behandlung mit siRNA keine signifikante Veränderung der Etomidatwirkung. Die relative Expression der NMDA-Rezeptor-mRNA zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen GRIN1- und NC1-Ansätzen. Im Vergleich zwischen GRIN1- und NC1-Ansätzen zeigte sich weder im Spike- noch im Burstverhalten ein signifikanter Unterschied. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium sorgte 1 μ M Etomidat nach Behandlung mit GRIN1-siRNA für eine signifikant geringere nos/min. Die EC_{50} von Etomidat zeigte nach Behandlung mit GRIN1-siRNA keinen signifikanten Unterschied zur NC1-Gruppe oder der Kontrollgruppe (ACSF ohne Magnesium).

4. Diskussion

4.1 Überblick der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Mikroelektrodenarrays benutzt, um den Einfluss verschiedener Substanzen und Ableitmedien auf die Wirkung von Etomidat auf die hippokampale Netzwerkaktivität *in vitro* zu bestimmen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Hypofunktion des NMDA-Rezeptors die Wirkung von Etomidat auf die hippokampale Netzwerkaktivität *in vitro* verstärkt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Aktionspotenzial- (nos/min) und Burstfrequenzveränderung (nob/min) durch Etomidat betrachtet. Es wurde ebenfalls die Veränderung der basalen Zellkulturaktivität durch NMDA-Rezeptor-Hypofunktion untersucht. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht der Ergebnisse gegeben werden.

Die basale Aktivität der Zellkulturen wurde nur durch Zugabe von Memantin oder DAP5 signifikant gesenkt.

In Bezug auf die nos/min zeigte sich in Anwesenheit von keinem NMDA-Rezeptor-Modulator eine signifikant stärkere Abnahme durch 0,1 μM Etomidat als in der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium. Bei Zugabe von 1 μM Etomidat kam es zu einer signifikant stärkeren Abnahme der *spikes* gegenüber der Kontrollgruppe, wenn Memantin, DAP5, DXM oder DXO im Ableitmedium vorhanden waren. Wurden 5 oder 10 μM Etomidat hinzugegeben, kam es in den Gruppen ACSF mit Magnesium, Memantin, DAP5, DXM und DXO zu einer signifikant stärkeren Abnahme der nos/min im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Bei Zugabe von 50 μM Etomidat zeigte keine der untersuchten Substanzen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Bei der Betrachtung der nob/min zeigte sich nur in Anwesenheit von NAAG eine signifikant höhere Burstdichte pro Minute als in der Kontrollgruppe bei Zugabe von 0,1 μM Etomidat ($n = 3$). Alle anderen Substanzen zeigten keine Zunahme der nob/min. Bei Zugabe von 1 μM Etomidat kam es in Anwesenheit von Memantin, DAP5, DXM oder DXO zu einer signifikant stärkeren Abnahme der nob/min als in der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium. Wurden 5 μM Etomidat zum ACSF hinzugegeben, zeigten die Gruppen ACSF mit Magnesium,

Memantin, DAP5, DXM und DXO eine signifikant stärkere Abnahme der nob/min als in der Kontrollgruppe. Bei Erhöhung der Konzentration auf 10 μM sorgte Etomidat in Anwesenheit von Magnesium, Memantin, DAP5, DXM, DXO, sowie CNQX für eine signifikante Abnahme der nob/min. Bei Zugabe von 50 μM Etomidat zeigte keine Substanz einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Inkubation mit GRIN1-siRNA sorgte nicht für eine signifikante Reduktion der relativen NMDA-Rezeptor-mRNA-Expression, wie die qPCR-Ergebnisse zeigen konnten. Weder in Bezug auf nos/min noch auf nob/min zeigten sich zwischen den NC1- und GRIN1-Gruppen signifikante Unterschiede. Bei Zugabe von 1 μM Etomidat war die nos/min in der GRIN1-Gruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe in ACSF ohne Magnesium. Die nob/min zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen GRIN1- und Kontrollgruppe.

Die EC_{50} von Etomidat betrug in der Kontrollgruppe 13,47 μM (95 % CI: 5,16-35,19 μM). Alle hinzugegebenen Substanzen veränderten die EC_{50} von Etomidat; für Memantin-, DAP5-, DXO- und CNQX-Gruppen war die EC_{50} von Etomidat signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

4.2 Vorangegangene Arbeiten

4.2.1 Rolle des NMDA-Rezeptors in der Anästhesie

Damit ein Rezeptor als molekulares Ziel eines Anästhetikums in Frage kommen kann, müssen, nach Franks (132), drei Kriterien erfüllt werden. Zunächst muss eine Interaktion zwischen dem untersuchten Rezeptor und dem untersuchten Anästhetikum *in vitro* nachgewiesen worden sein. Im Falle des NMDA-Rezeptors wurde zwar für viele Anästhetika wie Ketamin (133) und volatile Anästhetika wie Halothan, Isofluran und Enfluran eine Interaktion nachgewiesen (134), für Etomidat gibt es allerdings keine solchen Belege.

Das zweite Kriterium, um als Ziel von Anästhetika in Frage zu kommen, ist die Expression an einer Lokalisation des ZNS, durch welche ein Teilaspekt der Anästhesie (Hypnose, Immobilisation oder Amnesie) vermittelt werden kann. Da

der NMDA-Rezeptor ubiquitär im ZNS exprimiert wird (135), ist dieses Kriterium als erfüllt zu werten.

Das dritte und letzte Kriterium besagt, dass die Elimination eines vermeintlichen Zielmoleküls die Effektivität des untersuchten Anästhetikums *in vivo* verringern muss. Auf Grund der zentralen Rolle des NMDA-Rezeptors in der Gehirnfunktion ist es allerdings nur begrenzt möglich, NMDA-Rezeptor-*knockout*-Tiere zu kreieren. GluN1-*knockout*-Tiere sind nach der Geburt nicht überlebensfähig, während GluN2B-*knockout*-Tiere zwar lebensfähig sind, aber auf künstliche Ernährung angewiesen sind. Realisierbar ist lediglich der GluN2A-*knockout*.

Tiere mit einem GluN2A-*knockout* zeigten zwar tatsächlich eine Resistenz gegenüber Ketamin (56, 136), allerdings auch gegenüber Pentobarbital, einem Barbiturat, welches als GABA_A-Rezeptor-Agonist wirkt. Die veränderte Potenz von Ketamin ist also wahrscheinlich eher auf einen sekundären Effekt des GluN2A-*knockouts* zurückzuführen und nicht auf die NMDA-Rezeptor-Hypofunktion. Tatsächlich konnte, nach Vorbehandlung mit Serotonin- und Dopamin-Rezeptor-Antagonisten, kein Unterschied zwischen Wildtyp- und GluN2A-*knockout*-Tieren in Bezug auf den Effekt inhalativer Anästhetika beobachtet werden (58). Hier scheint also eine Fehlfunktion des monoaminergen Systems ursächlich für die veränderte Anästhetikawirkung zu sein, weswegen dieses letzte Kriterium nach aktueller Lage der Literatur nicht erfüllt wird.

Eine Theorie bezüglich der Rolle des NMDA-Rezeptors in der Anästhesie stellten 1998 Flohr und Kollegen auf (137). Diese beschreiben die vier folgenden Hypothesen: I) Der Zustand des Bewusstseins hängt von vorübergehenden, selbstreferentiellen mentalen Repräsentationen höherer Ordnung ab. Der Verlust dieses Zustandes tritt ein, wenn die Fähigkeit zur Repräsentation des Gehirns unter eine kritische Schwelle fällt. II) Die Bildung dieser mentalen Repräsentationen wird durch neuronale Zellverbände bedingt. III) Die Bildung solcher Verbände erfordert die Aktivierung des NMDA-Rezeptors und der Aktivierungszustand dieses Rezeptors bestimmt die Geschwindigkeit, mit welcher die Verbände gebildet werden. IV) Die Veränderung der NMDA-abhängigen Berechnungsprozesse des Gehirns ist die gemeinsame Endstrecke von Anästhetika. Somit haben Substanzen, die den NMDA-Rezeptor direkt

beeinflussen eine anästhetische Potenz, wohingegen Substanzen, welche diesen nicht direkt beeinflussen, ihre anästhetische Wirkung ausüben, indem sie NMDA-abhängige Prozesse hemmen.

Auch Petrenko *et al* formulierten in einem Übersichtsartikel (7) Hypothesen zur Rolle des NMDA-Rezeptors. Sie fassten dessen Funktionen wie folgt zusammen: Ketamin und die volatilen Anästhetika vermitteln vermutlich einen Teil ihrer anästhetischen Wirkung über den NMDA-Rezeptor, gleichzeitig sind diese aber wahrscheinlich nicht die primären und auch nicht die einzigen Zielmoleküle. NMDA-Rezeptoren vermitteln keinen akuten Schmerz, sind aber bei der Entstehung von chronischen Schmerzzuständen beteiligt und könnten hier analgetisch wirksam werden. Bei der Entstehung von Amnesie sind NMDA-Rezeptoren ebenfalls nur bei der Ketaminwirkung beteiligt.

In der täglichen anästhesiologischen Praxis findet sich die Frage nach der Rolle des NMDA-Rezeptors nur selten. Ein Krankheitsbild, welches hierbei von Bedeutung sein könnte, ist die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis, welche eine autoimmune Form der Enzephalitis darstellt. Diese Erkrankung betrifft vermehrt junge Frauen und ist häufig mit Teratomen vergesellschaftet, welche zum Teil operativ entfernt werden müssen. Die Literatur über Narkose bei diesem Patientenkollektiv ist spärlich, aber viele Autoren versuchten NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei ihrer Narkoseführung zu umgehen (15-17, 138).

Zusammenfassend lässt sich also die Rolle des NMDA-Rezeptors in der Vermittlung der anästhetischen Teilaspekte Hypnose, Immobilisation und Analgesie anhand der bis *dato* vorhandenen Literatur nicht klar definieren. Einige Autoren schreiben diesem Rezeptor eine zentrale, andere eine modulatorische Funktion zu. Trotz geringer Literaturdichte scheint aber eine Interaktion von Etomidat mit dem NMDA-Rezeptor unwahrscheinlich. Somit scheint der Grund für die Beobachtungen eine Interaktion zwischen dem NMDA- und dem GABA_A-Rezeptor zu sein.

4.2.2 NMDA- und GABA_A-Rezeptor Interaktion

Wenn also NMDA-Rezeptoren nicht selbst den anästhetischen Zustand vermitteln, sondern nur modulatorisch an dessen Entstehung beteiligt sind,

müssen sekundäre Stoffwechselkaskaden die beobachteten Effekte verursachen.

Eine Interaktion zwischen NMDA-Rezeptor und GABA_A-Rezeptor ist lange bekannt. Bereits früh wurde klar, dass der Phosphorylierungszustand des GABA_A-Rezeptors entscheidend für die Rezeptorfunktion ist (139). Kurz darauf konnte auch gezeigt werden, dass ein vermehrter intrazellulärer Ca²⁺-Einstrom für eine Reduktion der GABAergen Ströme sorgt. Vermuteter Akteur der beiden genannten Mechanismen war die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige-Phosphatase (CaMKII) (140). Es sollte noch betont werden, dass ein Ca²⁺-Einstrom lediglich über NMDA-Rezeptoren, nicht aber über spannungsabhängige Kalziumkanäle, eine Auswirkung auf die GABA_A-Rezeptorfunktion zu haben scheint. Eine intrazelluläre Perfusion mit einer aktivierten Form der CaMKII verursachte eine Reduktion der GABAergen Ströme. Proteinkinasen A und C hatten keinen vergleichbaren Effekt (6).

Alle zuvor erwähnten Beobachtungen wurden an dissoziierten hippokampalen Zellen gemacht. Dieser Zusammenhang wurde aber auch in Granulosazellen des Cerebellums festgestellt (119). Hierbei scheint es eine duale Wirkweise der Interaktion zu geben: Einerseits wird durch den Ca²⁺-Einstrom die NO-Synthase induziert, wodurch vermehrt NO entsteht. Dieses aktiviert wiederum die Proteinkinase G, welche dann die β-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors phosphoryliert und somit dessen Aktivität mindert. Andererseits wird durch den Ca²⁺-Einstrom auch Calcineurin (auch als Proteinphosphatase 3 bekannt) aktiviert, welches dann für eine Dephosphorylierung des Rezeptors an anderer Stelle sorgt. Zusätzlich zur direkten Dephosphorylierung am Rezeptor gibt es auch Belege für eine Wirkung von Calcineurin an den Mikrotubuli des Zytoskeletts. Durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors wird eine Ablösung und Dispersion der sonst in der Zellmembran verankerten GABA_A-Rezeptoren gefördert (141).

Auch in Zellen des inferioren Colliculus wurde eine Inhibition des GABA_A-Rezeptors durch den NMDA-Rezeptor nachgewiesen. Gleichzeitig konnte hier eine Umkehrung dieses Verhältnisses bei Aktivierung des GABA_A-Rezeptors gezeigt werden. Die Blockade des GABA_A-Rezeptors war in diesen

Untersuchungen durch DAP5 blockiert worden (142). Die Interaktion zwischen den Rezeptoren zeigt sich also nicht nur im Hippocampus, sondern auch in anderen Hirnarealen.

Darüber hinaus wurde im Tierversuch festgestellt, dass die EC_{50} von Etomidat durch eine Modulation des NMDA-Rezeptors beeinflusst wird. Eger und Kollegen stellten fest, dass die EC_{50} von Etomidat etwa um 50 % gesenkt wird, wenn die Versuchstiere mit MK-801, einem NMDA-Rezeptorantagonisten, vorbehandelt wurden (5).

Anhand dieser Datenlage scheint es also wahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte auf eine Interaktion zwischen dem NMDA- und dem $GABA_A$ -Rezeptor basieren, welcher durch den Ca^{2+} -Einstrom über den NMDA-Rezeptor reguliert wird. Das intrazelluläre Kalzium sorgt dann über drei verschiedene Mechanismen für eine nachfolgende Hypofunktion des $GABA_A$ -Rezeptors. Beteiligt scheinen dabei die CaMKII, Calcineurin und die NO-Synthase.

4.3 Vergleich der Daten zur Literatur

In dieser Arbeit zeigte sich nur bei Zugabe von Memantin oder DAP5 zum ACSF eine Abnahme der basalen Aktivität. In der Literatur gibt es hingegen verschiedene Belege zur Wirksamkeit von NMDA-Rezeptor-Modulatoren auf die neuronale Netzwerkaktivität. Es konnte, vor allem an hippocampalen Kulturen, gezeigt werden, dass eine Zugabe von 10 μM DAP5 zu einer Abnahme der Aktionspotenzialfrequenz, -amplitude und -dauer führt (143, 144). Auch für Memantin konnten ähnliche Effekte in hippocampalen CA1-Neuronen festgestellt werden: Die neuronale Feuerrate nahm bei Memantin-Zugabe in dosisabhängiger Weise ab (145). Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass dieser Effekt nur bei gesunden Neuronen besteht; in einem AD-Modell war der Effekt aufgehoben (146). Die Anwendung von CNQX auf Hirnschnitte der rostroventralen Medulla oblongata hatte ebenfalls eine Abnahme der neuronalen Aktivität zur Folge (147); dieser Effekt konnte für hippocampale Zellen nicht gezeigt werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls dem NMDA-Rezeptor zugeordnet werden.

Die stärkere Wirkung von Etomidat auf die Spike- und Burstfrequenz bei gleichzeitiger NMDA-Rezeptor-Blockade, welche sich in der vorliegenden Arbeit durch eine stärkere Abnahme des nos/min und nob/min bei Zugabe von Etomidat äußerte, scheint aus einer Interaktion zwischen GABA_A- und NMDA-Rezeptor hervorzugehen (s.o.).

Verschiedene Autoren konnten ähnliche Beobachtungen machen. Eger und Kollegen (5) konnten zeigen, dass eine Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK-801 eine Abnahme der EC₅₀ von Etomidat um etwa 50 % zur Folge hat (von $21,0 \pm 7,6 \mu\text{g/ml}$ auf $10,2 \pm 4,0 \mu\text{g/ml}$). Die Autoren schließen hier ebenfalls auf eine Beteiligung des NMDA-Rezeptors, aber auch hier wird dem Rezeptor eine modulatorische Funktion bei der Vermittlung der Anästhesie zugeschrieben. Auch Gabaculin, welches den Abbau von GABA im Gehirn reduziert und somit für eine verstärkte hemmende Transmission im Gehirn sorgt, wird in seiner Wirkungsweise durch eine NMDA-Rezeptor-Blockade verstärkt: Bei gleichzeitiger Applikation von Ketamin und Gabaculin wurde die Antwort auf Schmerzreiz im Tierversuch stärker unterdrückt als bei einzelner Gabe (148). Weiterhin gibt es Belege für eine verstärkte Potenz von Pentobarbital (einem GABAergen Anästhetikum) bei gleichzeitiger Gabe von MK-801, PCP oder Ketamin (149). Abzugrenzen hiervon sind die Funde von Petrenko *et al* (56), in welchen gezeigt werden konnte, dass GluN2A-defiziente Tiere (die also einer NMDA-Rezeptor-Hypofunktion ausgesetzt sind) eine geringere Sensitivität für Pentobarbital aufweisen. Hierbei scheint aber eine kompensatorische, überschießende Ausbildung des monoaminergen Systems ursächlich zu sein (150).

Verschiedene der von uns untersuchten Substanzen zeigten außerdem bemerkenswerte Effekte, die im Folgenden näher beleuchtet werden sollen. Bei der Untersuchung von DXM und DXO zeigte DXO eine stärkere Senkung der EC₅₀ von Etomidat (DXM: $1,04 \mu\text{M}$ vs. DXO: $0,49 \mu\text{M}$). Dies steht in Einklang mit Berichten in der Literatur, in welchen DXO als der potentere Inhibitor des NMDA-Rezeptors genannt wird (81-83).

CNQX zeigte widersprüchliche Effekte. CNQX ist in erster Linie ein AMPA- und Kainatrezeptorantagonist, weist aber auch eine Wirkung am NMDA-Rezeptor auf

(86, 88). Trotzdem zeigte sich in unseren Untersuchungen kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der CNQX-Gruppe. Eine mögliche Erklärung könnte eine zu geringe Potenz unserer Analyse sein ($n = 7$), die z.T. nur knapp über dem Signifikanzniveau befindlichen p-Werte könnten hier ein Hinweis sein. Andererseits könnte aber auch die benutzte Dosis CNQX ($10 \mu\text{M}$) nicht ausreichend gewesen sein, um den NMDA-Rezeptor ausreichend zu inhibieren.

Auch die Anwendung des Serinsynthesehemmers CBR-5884 zeigte nicht die erwarteten Ergebnisse. D-Serin ist ein endogener Ligand des NMDA-Rezeptors, der für die normale Rezeptorfunktion essenziell ist (46). Verschiedene Studien konnten die Wirksamkeit von CBR-5884 auf die Serinsynthese belegen (89, 90, 93), die optimale Inkubationsdauer ist allerdings nicht klar. Einige Gruppen konnten Ergebnisse bereits nach weniger als 24 h Inkubationszeit zeigen (151), andere nutzten aber deutlich längere Protokolle $>72 \text{ h}$ (152). Auch wenn es Berichte von deutlich kürzeren Inkubationszeiten gibt, könnte es sein, dass unsere Inkubation über 1-2 h nicht ausreichend war, um eine Hypofunktion des NMDA-Rezeptors auszulösen. Eine andere Erklärung wäre auch hier eine mangelnde Potenz der Analyse bei $n = 3$.

Das Peptid NAAG stellt einen Sonderfall dar: Auf Grund seiner dualen Wirkung als Agonist und Antagonist des NMDA-Rezeptors ist seine Wirkung schwer vorherzusagen (101). Die Wirkung dieses Stoffs auf den NMDA-Rezeptor wird durch die GCP II bestimmt, welche NAAG in seine Bestandteile N-Acetylaspartat und Glutamat spaltet. Bei basaler synaptischer Transmission wird nur wenig GCP II ausgeschüttet, NAAG bleibt in seiner Form erhalten und kann den NMDA-Rezeptor inhibieren. Wird die basale Transmissionsrate erhöht kommt es zu einer vermehrten GCP II Ausschüttung und zu einer vermehrten Spaltung von NAAG. Das daraus resultierende Glutamat kann dann den NMDA-Rezeptor aktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde NAAG im ACSF mit $500 \mu\text{M}$ Magnesium untersucht (also einem Zustand der physiologischen NMDA-Rezeptorunterfunktion), da seine Rolle als Aktivator des NMDA-Rezeptors untersucht werden sollte. Die NAAG-Gruppe zeigte zwar eine höhere nob/min als die Kontrollgruppe nach Zugabe von $0,1 \mu\text{M}$ Etomidat, weitere Unterschiede zur Kontrollgruppe gab es allerdings nicht. Es wäre denkbar, dass bei der geringen Etomidatkonzentration die basale Transmissionsrate ausreicht, um das Peptid zu

spalten und eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors zu erreichen, allerdings spiegelt sich diese Aktivierung weder in der nos/min noch in der basalen Aktivität der Zellkultur wider, weswegen die Möglichkeit von hydromechanischen Artefakten bedacht werden muss.

Schließlich zeigten auch die siRNA-Versuche nicht die erwarteten Ergebnisse. Es konnte keine signifikante Abnahme der relativen NMDA-Rezeptor-mRNA-Expression durch die siRNA-Interferenz beobachtet werden und auch die Wirkung von Etomidat auf nos/min und nob/min war in der NC1- und GRIN1-Gruppe gleich. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Einbringen der siRNA in die Neuronen durch die Lipofectamin-Transfektion (s. S. 22) nicht funktionierte und die siRNA damit ihre Wirkung nicht entfalten konnte. Die Möglichkeit einer viralen Transduktion war mangels notwendiger Voraussetzungen (insbesondere des Arbeitsplatzes in einem S2-Labor) nicht gegeben.

Es soll zudem noch kurz auf die Auswahl der nutzbaren Zellkulturen eingegangen werden. In dieser Arbeit wurden Kulturen zwischen dem elften und dem 104. Tag *in vitro* benutzt, im Durchschnitt aber 28 ± 11 Tage. Es gibt verschiedene Berichte, die eine reduzierte Zellkulturaktivität jenseits des 28. Tages *in vitro* zeigen konnten (153, 154), was die Qualität unserer Daten beeinflusst haben könnte. Um dem entgegenzuwirken, wurde Kulturen nach Messungen eine „Ruhephase“ von mindestens 24 h gegeben. Gleichzeitig wurden Kulturen vor Messungen optisch am Mikroskop untersucht und es wurden nur Kulturen mit einer ausreichenden Restaktivität gemessen. Dies sollte dabei helfen die Unterschiede zwischen Kulturen in den Messungen zu minimieren. Gleichzeitig ist es, bei steigender Ressourcenknappheit und aus ökologischen Gesichtspunkten nicht vertretbar, noch funktionstüchtige und aktive Kulturen nicht weiter in die Untersuchungen einzubinden.

Insgesamt scheinen unsere Beobachtungen im Einklang mit der Literatur zu stehen. Es gibt verschiedene Hinweise auf eine Senkung der basalen Aktivität durch Memantin und DAP5, sowie andere NMDA-Rezeptorantagonisten, auch wenn dies in unserer Studie nur bedingt reproduziert werden konnte. Eine Interaktion zwischen dem NMDA- und dem GABA_A-Rezeptor ist ebenfalls an

diversen Stellen gezeigt worden und gibt einen möglichen Erklärungsweg für unsere Beobachtungen. Der Wirkmechanismus scheint hierbei auf einer Phosphorylierung des GABA_A-Rezeptors zu beruhen, welche über PKC und CaMKII bei Ca²⁺-Einstrom über den NMDA-Rezeptor passiert.

In unserer Arbeit gab es vor allem bei den Stoffen CNQX, NAAG, CBR-5884 und bei den siRNA-Versuchen unklare oder unerwartete Ergebnisse, welche sich zum Teil anhand unzureichender *power*, zum anderen Teil aber auch aus methodischen Schwächen erklären lassen.

4.4 Limitationen und Stärken der Arbeit

4.4.1 Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit unterliegt verschiedenen Limitationen. Zunächst sollte erwähnt werden, dass Mikroelektrodenarrays kein weit verbreitetes elektrophysiologisches Verfahren sind, weswegen die Datenlage hierzu dünn und die externe Validität eingeschränkt ist. Des Weiteren konnte auf Grund von Zeit- und Materialbegrenzungen nur eine bestimmte Anzahl von Versuchen pro Testsubstanz und Etomidatkonzentration durchgeführt werden. Die Möglichkeit, dass Effekte erst ab einer größeren Anzahl von Versuchen erkennbar werden, lässt sich nicht ausschließen. Insbesondere bei NAAG, CBR-5884 und den siRNA-Versuchen stehen nur drei bis fünf Versuche zur statistischen Auswertung zur Verfügung, wodurch einige Effekte übersehen werden könnten. Zudem ist es denkbar, dass nicht nur die Anzahl an *spikes* und *bursts* durch Etomidat und den Interaktionen zu den Testsubstanzen reduziert werden, sondern auch weitere Parameter, wie z.B. das *Inter-Spike*-Intervall (19), welche nicht analysiert wurden. Weitere Parameter könnten allerdings im Rahmen einer weiteren Arbeit untersucht werden.

Eine weitere häufige Limitation pharmakologischer Arbeiten ist die mangelnde Selektivität verschiedener Substanzen. Stoffe wie etwa Memantin (61, 66) oder DXM (13) agieren nicht ausschließlich über den NMDA-Rezeptor. Daher ist eine Überprüfung der Hypothese mit solchen Substanzen nur eingeschränkt möglich. Da allerdings auch Substanzen wie DAP5 getestet wurden, welche weitaus

selektiver für den Rezeptor sind und die gemeinsame Schnittmenge der untersuchten Substanzen die Inhibition des NMDA-Rezeptors ist, sollte diese Limitation *in summa* geringer ausfallen.

Darüber hinaus wurde als Detektionsschwelle für Aktionspotenziale stets die achtfache Standardabweichung des in der Lernphase gemessenen Rauschens gewählt. Dies könnte aber in einigen Experimenten zu Messunsicherheiten geführt haben. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Fleischer 2024, unveröffentlichte Daten) konnte gezeigt werden, dass für einige Experimente eine Schwelle der sechsfachen Standardabweichung besser geeignet ist, um die Aktionspotenziale zu detektieren. Um die Ergebnisse uniform zu halten, wurden im Rahmen dieser Arbeit die vorher festgelegten Parameter verwendet.

Die wichtigste Einschränkung dieser Arbeit ist jedoch das *in vitro*-Modell. Solche Modelle können immer nur einen Teil der physiologischen Umstände abbilden. Die Diffusionszeit von Etomidat im Hirngewebe wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, welche durch die axonnahe Applikation nur simuliert werden kann. Trotzdem bieten solche Experimente Möglichkeit zum tieferen Verständnis. Somit können künftige *in vivo* Experimente gezielter ausgerichtet werden, um so die Anzahl benötigter Versuchstiere zu minimieren.

4.4.2 Stärken der Arbeit

Diese Arbeit verfügt aber auch über einige Stärken, welche noch umrissen werden sollen.

Die Benutzung von MEAs erlaubt Rückschlüsse über Neuronenverbände, welche in herkömmlichen, Einzelzellexperimenten der Elektrophysiologie wie die *patch-clamp*-Technik nicht abgebildet werden können.

Außerdem bietet die große Spannbreite an untersuchten Substanzen eine solide Argumentationsgrundlage für die Hypothese. Die Heterogenität dieser Substanzen in Struktur und Wirkweise ist eindeutig; gemeinsam ist ihnen nur die Inhibition des NMDA-Rezeptors. Folglich können solide Rückschlüsse über die Interaktionen dieser Substanzen mit Etomidat gezogen werden.

Zum Schluss sollte noch genannt werden, dass EC_{50} -Werte in pharmakologischen Untersuchungen häufig benutzt werden, was die externe Validität dieser Studie erhöht.

4.5 Interpretation

Zusammenfassend, scheint anhand der hier vorliegenden Ergebnisse und der vorhandenen Literatur bei Hypofunktion des NMDA-Rezeptors eine verstärkte Wirkung von Etomidat *in vitro* in Bezug auf die Spike- und Burstdichte zu verursachen. Diese Wirkungsverstärkung basiert vermutlich auf einer Interaktion zwischen NMDA- und GABA_A-Rezeptoren. Es lässt sich vermuten, dass bei Ausbleiben einer NMDA-Rezeptor-Aktivierung der Kalziumeinstrom über diesen Rezeptor unterbunden wird und die nachfolgenden Phosphorylierungsprozesse verändert werden. Dadurch könnte die Aktivität des GABA_A-Rezeptors zunehmen, und der Effekt von Etomidat verstärkt werden.

4.6 Ausblick

Die beobachtete Wirkungsverstärkung von Etomidat könnte klinische Tragweite besitzen. Um diese Tragweite festzustellen, sind allerdings weitere Untersuchungen vonnöten. Im nächsten Schritt sollten *in-vivo*-Untersuchungen in einem ähnlichen Modell mit vergleichbarer Fragestellung durchgeführt werden.

Ein möglicher Zusammenhang von NMDA-Rezeptorfunktion und GABAergen Anästhetika könnte vorhandene Paradigmen in Frage stellen: Durch bewusste Nutzung dieser Interaktion könnte für Patient:innen mit bereits vorhandener NMDA-Rezeptor-Hypofunktion eine geringere Dosis und damit eine erhöhte Sicherheit in der Anwendung von Anästhetika gewährleistet werden. Gleichzeitig ist es denkbar, durch vorherige Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten die benötigte Dosis zu reduzieren und so eine individualisierte, patientenzentrierte Anästhesie voranzutreiben.

5. Literaturverzeichnis

1. Criado A, Maseda J, Navarro E, Escarpa A, Avello F. Induction of anaesthesia with etomidate: haemodynamic study of 36 patients. *Br J Anaesth*. 1980;52(8):803-6.
2. Basciani RM, Rindlisbacher A, Begert E, Brander L, Jakob SM, Etter R, et al. Anaesthetic induction with etomidate in cardiac surgery: A randomised controlled trial. *European journal of anaesthesiology*. 2016;33(6):417-24.
3. Krasowski MD, Harrison NL. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(10):1278-303.
4. Valk BI, Struys M. Etomidate and its Analogs: A Review of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 2021.
5. Eger EI, 2nd, Liao M, Laster MJ, Won A, Popovich J, Raines DE, et al. Contrasting roles of the N-methyl-D-aspartate receptor in the production of immobilization by conventional and aromatic anesthetics. *Anesthesia and analgesia*. 2006;102(5):1397-406.
6. Chen QX, Wong RK. Suppression of GABAA receptor responses by NMDA application in hippocampal neurones acutely isolated from the adult guinea-pig. *J Physiol*. 1995;482 (Pt 2)(0022-3751 (Print)):353-62.
7. Petrenko AB, Yamakura T, Sakimura K, Baba H. Defining the role of NMDA receptors in anesthesia: are we there yet? *European journal of pharmacology*. 2014;723:29-37.
8. Barrett W, Buxhoeveden M, Dhillon S. Ketamine: a versatile tool for anesthesia and analgesia. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2020;33(5):633-8.
9. Zhang Y, Ye F, Zhang T, Lv S, Zhou L, Du D, et al. Structural basis of ketamine action on human NMDA receptors. *Nature*. 2021;596(7871):301-5.
10. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 1999;38(6):735-67.
11. Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology*. 1993;32(12):1337-50.
12. Witt A, Macdonald N, Kirkpatrick P. Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(2):109-10.
13. Oh SR, Agrawal S, Sabir S, Taylor A. Dextromethorphan. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
14. Lynch DR, Rattelle A, Dong YN, Roslin K, Gleichman AJ, Panzer JA. Anti-NMDA Receptor Encephalitis: Clinical Features and Basic Mechanisms. *Adv Pharmacol*. 2018;82:235-60.
15. Pryzbylowski PG, Dunkman WJ, Liu R, Chen L. Case report: Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis and its anesthetic implications. *Anesthesia and analgesia*. 2011;113(5):1188-91.
16. Liu H, Jian M, Liang F, Yue H, Han R. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with an ovarian teratoma: two cases report and anesthesia considerations. *BMC Anesthesiol*. 2015;15:150.

17. Sato M, Yasumoto H, Arai T. General anesthesia with propofol for ovarian teratoma excision associated with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *JA Clin Rep.* 2018;4(1):14.
18. Gross GW, Rieske E, Kreutzberg GW, Meyer A. A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. *Neurosci Lett.* 1977;6(2-3):101-5.
19. Antkowiak B. Different actions of general anesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the GABA(A) receptor. *Anesthesiology.* 1999;91(2):500-11.
20. Gramowski A, Jugelt K, Weiss DG, Gross GW. Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *Eur J Neurosci.* 2004;19(10):2815-25.
21. Gortz P, Hoinkes A, Fleischer W, Otto F, Schwahn B, Wendel U, et al. Implications for hyperhomocysteinemia: not homocysteine but its oxidized forms strongly inhibit neuronal network activity. *J Neurol Sci.* 2004;218(1-2):109-14.
22. Klusmann A, Fleischer W, Waldhaus A, Siebler M, Mayatepek E. Influence of D-arabitol and ribitol on neuronal network activity. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(6):1181-3.
23. Otto F, Kieseier BC, Görtz P, Hartung HP, Siebler M. The pentapeptide QYNAD does not inhibit neuronal network activity. *Can J Neurol Sci.* 2005;32(3):344-8.
24. Demarse TB, Wagenaar DA, Blau AW, Potter SM. The Neurally Controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies. *Auton Robots.* 2001;11(3):305-10.
25. Wagenaar DA, Madhavan R, Pine J, Potter SM. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2005;25(3):680-8.
26. Doenicke A. Etomidate, a new intravenous hypnotic. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1974;25(3):307-15.
27. Folino TB, Muco E, Safadi AO, Parks LJ. Propofol. *StatPearls. Treasure Island (FL)2021.*
28. Ledingham IM, Watt I. Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet.* 1983;1(8336):1270.
29. Watt I, Ledingham IM. Mortality amongst multiple trauma patients admitted to an intensive therapy unit. *Anaesthesia.* 1984;39(10):973-81.
30. Preziosi P, Vacca M. Adrenocortical suppression and other endocrine effects of etomidate. *Life Sci.* 1988;42(5):477-89.
31. Allolio B, Stuttmann R, Leonhard U, Fischer H, Winkelmann W. Adrenocortical suppression by a single induction dose of etomidate. *Klin Wochenschr.* 1984;62(21):1014-7.
32. Wagner CE, Bick JS, Johnson D, Ahmad R, Han X, Ehrenfeld JM, et al. Etomidate use and postoperative outcomes among cardiac surgery patients. *Anesthesiology.* 2014;120(3):579-89.
33. Williams LM, Boyd KL, Fitzgerald BM. Etomidate. *StatPearls. Treasure Island (FL)2021.*
34. Stollings JL, Diedrich DA, Oyen LJ, Brown DR. Rapid-sequence intubation: a review of the process and considerations when choosing medications. *Ann Pharmacother.* 2014;48(1):62-76.

35. Upchurch CP, Grijalva CG, Russ S, Collins SP, Semler MW, Rice TW, et al. Comparison of Etomidate and Ketamine for Induction During Rapid Sequence Intubation of Adult Trauma Patients. *Ann Emerg Med.* 2017;69(1):24-33 e2.
36. Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta 3 subunit. *Faseb J.* 2002;16(14):250-+.
37. Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(9):709-20.
38. Schuttler J, Wilms M, Lauven PM, Stoeckel H, Koenig A. [Pharmacokinetics of etomidate in man (author's transl)]. *Anaesthesist.* 1980;29(12):658-61.
39. Shanmugasundararaj S, Zhou X, Neunzig J, Bernhardt R, Cotten JF, Ge R, et al. Carboetomidate: an analog of etomidate that interacts weakly with 11 β -hydroxylase. *Anesthesia and analgesia.* 2013;116(6):1249-56.
40. Yang J, Kang Y, Wang B, Yang L, Liu J, Zhang W. Metabolite-inactive etomidate analogues alleviating suppression on adrenal function in Beagle dogs. *Eur J Pharm Sci.* 2017;99:343-9.
41. Cotten JF, Husain SS, Forman SA, Miller KW, Kelly EW, Nguyen HH, et al. Methoxycarbonyl-etomidate: a novel rapidly metabolized and ultra-short-acting etomidate analogue that does not produce prolonged adrenocortical suppression. *Anesthesiology.* 2009;111(2):240-9.
42. Wang B, Yang J, Chen J, Kang Y, Yang LH, Liu J, et al. An Etomidate Analogue With Less Adrenocortical Suppression, Stable Hemodynamics, and Improved Behavioral Recovery in Rats. *Anesthesia and analgesia.* 2017;125(2):442-50.
43. Blanke ML, VanDongen AMJ. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor.* Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL)2009.
44. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 1984;307(5950):462-5.
45. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1988;241(4867):835-7.
46. Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, et al. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(9):4926-31.
47. Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology.* 1995;34(10):1219-37.
48. Monaghan DT, Jane DE. Pharmacology of NMDA Receptors. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor.* Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL)2009.
49. Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA. Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1995;15(10):6498-508.
50. Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works

- in a dominant-negative manner. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(23):RC185.
51. Schorge S, Colquhoun D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(4):1151-8.
 52. Kovalchuk Y, Eilers J, Lisman J, Konnerth A. NMDA receptor-mediated subthreshold Ca^{2+} signals in spines of hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(5):1791-9.
 53. Kennedy MB, Beale HC, Carlisle HJ, Washburn LR. Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):423-34.
 54. Daniele SG, Trummer G, Hossmann KA, Vrselja Z, Benk C, Gobeske KT, et al. Brain vulnerability and viability after ischaemia. *Nat Rev Neurosci*. 2021;22(9):553-72.
 55. Lewerenz J, Maher P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci*. 2015;9:469.
 56. Petrenko AB, Yamakura T, Fujiwara N, Askalany AR, Baba H, Sakimura K. Reduced sensitivity to ketamine and pentobarbital in mice lacking the N-methyl-D-aspartate receptor GluR5 subunit. *Anesthesia and analgesia*. 2004;99(4):1136-40, table of contents.
 57. Petrenko AB, Yamakura T, Kohno T, Sakimura K, Baba H. Reduced immobilizing properties of isoflurane and nitrous oxide in mutant mice lacking the N-methyl-D-aspartate receptor GluR5 subunit are caused by the secondary effects of gene knockout. *Anesthesia and analgesia*. 2010;110(2):461-5.
 58. Petrenko AB, Yamakura T, Kohno T, Sakimura K, Baba H. Increased brain monoaminergic tone after the NMDA receptor GluN2A subunit gene knockout is responsible for resistance to the hypnotic effect of nitrous oxide. *European journal of pharmacology*. 2013;698(1-3):200-5.
 59. Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ, et al. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1333-41.
 60. Czarnecka K, Chuchmacz J, Wójtowicz P, Szymański P. Memantine in neurological disorders - schizophrenia and depression. *J Mol Med (Berl)*. 2021;99(3):327-34.
 61. Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(1):61-7.
 62. Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1992;12(11):4427-36.
 63. Weller M, Finiels-Marlier F, Paul SM. NMDA receptor-mediated glutamate toxicity of cultured cerebellar, cortical and mesencephalic neurons: neuroprotective properties of amantadine and memantine. *Brain Res*. 1993;613(1):143-8.
 64. Weller M, Marini AM, Finiels-Marlier F, Martin B, Paul SM. MK-801 and memantine protect cultured neurons from glutamate toxicity induced by glutamate carboxypeptidase-mediated cleavage of methotrexate. *European journal of pharmacology*. 1993;248(4):303-12.

65. Parsons CG, Stoffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*. 2007;53(6):699-723.
66. Maskell PD, Speder P, Newberry NR, Bermudez I. Inhibition of human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors by open channel blockers of N-methyl-D-aspartate receptors. *Br J Pharmacol*. 2003;140(7):1313-9.
67. Di Iorio G, Baroni G, Lorusso M, Montemitro C, Spano MC, di Giannantonio M. Efficacy of Memantine in Schizophrenic Patients: A Systematic Review. *J Amino Acids*. 2017;2017:7021071.
68. Davies J, Francis AA, Jones AW, Watkins JC. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci Lett*. 1981;21(1):77-81.
69. Lodge D, Watkins JC, Bortolotto ZA, Jane DE, Volianskis A. The 1980s: D-AP5, LTP and a Decade of NMDA Receptor Discoveries. *Neurochem Res*. 2019;44(3):516-30.
70. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. 1983;334:33-46.
71. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986;319(6056):774-6.
72. Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 1988;27(6):653-6.
73. Tonkiss J, Morris RG, Rawlins JN. Intra-ventricular infusion of the NMDA antagonist AP5 impairs performance on a non-spatial operant DRL task in the rat. *Exp Brain Res*. 1988;73(1):181-8.
74. Miller A, Pratt H, Schiffer RB. Pseudobulbar affect: the spectrum of clinical presentations, etiologies and treatments. *Expert Rev Neurother*. 2011;11(7):1077-88.
75. Nguyen L, Thomas KL, Lucke-Wold BP, Cavendish JZ, Crowe MS, Matsumoto RR. Dextromethorphan: An update on its utility for neurological and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Ther*. 2016;159:1-22.
76. Marquard J, Otter S, Welters A, Stirban A, Fischer A, Eglinger J, et al. Characterization of pancreatic NMDA receptors as possible drug targets for diabetes treatment. *Nature medicine*. 2015;21(4):363-72.
77. Taylor CP, Traynelis SF, Siffert J, Pope LE, Matsumoto RR. Pharmacology of dextromethorphan: Relevance to dextromethorphan/quinidine (Nuedexta(R)) clinical use. *Pharmacol Ther*. 2016;164:170-82.
78. Ferrer-Montiel AV, Merino JM, Planells-Cases R, Sun W, Montal M. Structural determinants of the blocker binding site in glutamate and NMDA receptor channels. *Neuropharmacology*. 1998;37(2):139-47.
79. Logan BK, Goldfogel G, Hamilton R, Kuhlman J. Five deaths resulting from abuse of dextromethorphan sold over the internet. *J Anal Toxicol*. 2009;33(2):99-103.
80. Logan BK, Yeakel JK, Goldfogel G, Frost MP, Sandstrom G, Wickham DJ. Dextromethorphan abuse leading to assault, suicide, or homicide. *J Forensic Sci*. 2012;57(5):1388-94.

81. Braga PC, Fossati A, Vimercati MG, Caputo R, Guffanti EE. Dextrophan and dextromethorphan: comparative antitussive effects on guinea pigs. *Drugs Exp Clin Res.* 1994;20(5):199-203.
82. Szekely JI, Sharpe LG, Jaffe JH. Induction of phencyclidine-like behavior in rats by dextrophan but not dextromethorphan. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;40(2):381-6.
83. Dematteis M, Lallement G, Mallaret M. Dextromethorphan and dextrophan in rats: common antitussives--different behavioural profiles. *Fundam Clin Pharmacol.* 1998;12(5):526-37.
84. Honore T, Lauridsen J, Krosgaard-Larsen P. The binding of [3H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid, to rat brain membranes. *J Neurochem.* 1982;38(1):173-8.
85. Brickley SG, Farrant M, Swanson GT, Cull-Candy SG. CNQX increases GABA-mediated synaptic transmission in the cerebellum by an AMPA/kainate receptor-independent mechanism. *Neuropharmacology.* 2001;41(6):730-6.
86. Lester RA, Quarum ML, Parker JD, Weber E, Jahr CE. Interaction of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione with the N-methyl-D-aspartate receptor-associated glycine binding site. *Mol Pharmacol.* 1989;35(5):565-70.
87. Honore T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, et al. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science.* 1988;241(4866):701-3.
88. Long SK, Smith DA, Siarey RJ, Evans RH. Effect of 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline (CNQX) on dorsal root-, NMDA-, kainate- and quisqualate-mediated depolarization of rat motoneurons in vitro. *Br J Pharmacol.* 1990;100(4):850-4.
89. Neame S, Safory H, Radzishewsky I, Touitou A, Marchesani F, Marchetti M, et al. The NMDA receptor activation by d-serine and glycine is controlled by an astrocytic Phgdh-dependent serine shuttle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(41):20736-42.
90. Mullarky E, Lucki NC, Beheshti Zavareh R, Anglin JL, Gomes AP, Nicolay BN, et al. Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(7):1778-83.
91. Zhao X, Fu J, Tang W, Yu L, Xu W. Inhibition of Serine Metabolism Promotes Resistance to Cisplatin in Gastric Cancer. *Onco Targets Ther.* 2020;13:4833-42.
92. Gong K, Huang Y, Zheng Y, Zhu Y, Hao W, Shi K. Preclinical efficacy of CBR-5884 against epithelial ovarian cancer cells by targeting the serine synthesis pathway. *Discov Oncol.* 2024;15(1):154.
93. Zhou Y, Phelps GA, Mangrum MM, McLeish J, Phillips EK, Lou J, et al. The small molecule CBR-5884 inhibits the *Candida albicans* phosphatidylserine synthase. *mBio.* 2024;15(5):e0063324.
94. Miyake M, Kakimoto Y, Sorimachi M. A gas chromatographic method for the determination of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl-alpha-aspartylglutamic acid and beta-citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals. *J Neurochem.* 1981;36(3):804-10.
95. Blakely RD, Robinson MB, Thompson RC, Coyle JT. Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate: subcellular and regional distribution, ontogeny, and the effect of lesions on N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase activity. *J Neurochem.* 1988;50(4):1200-9.

96. Becker I, Lodder J, Gieselmann V, Eckhardt M. Molecular characterization of N-acetylaspartylglutamate synthetase. *J Biol Chem.* 2010;285(38):29156-64.
97. Lodder-Gadaczek J, Becker I, Gieselmann V, Wang-Eckhardt L, Eckhardt M. N-acetylaspartylglutamate synthetase II synthesizes N-acetylaspartylglutamylglutamate. *J Biol Chem.* 2011;286(19):16693-706.
98. Cassidy M, Neale JH. N-acetylaspartylglutamate catabolism is achieved by an enzyme on the cell surface of neurons and glia. *Neuropeptides.* 1993;24(5):271-8.
99. Fuhrman S, Palkovits M, Cassidy M, Neale JH. The regional distribution of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system. *J Neurochem.* 1994;62(1):275-81.
100. Vornov JJ, Hollinger KR, Jackson PF, Wozniak KM, Farah MH, Majer P, et al. Still NAAG'ing After All These Years: The Continuing Pursuit of GCP II Inhibitors. *Adv Pharmacol.* 2016;76:215-55.
101. Khacho P, Wang B, Bergeron R. The Good and Bad Sides of NAAG. *Adv Pharmacol.* 2016;76:311-49.
102. Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol.* 2009;157(8):1301-17.
103. Tsai G, Passani LA, Slusher BS, Carter R, Baer L, Kleinman JE, et al. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch Gen Psychiatry.* 1995;52(10):829-36.
104. Tkachev D, Mimmack ML, Huffaker SJ, Ryan M, Bahn S. Further evidence for altered myelin biosynthesis and glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007;10(4):557-63.
105. Khacho P, Wang B, Ahlskog N, Hristova E, Bergeron R. Differential effects of N-acetyl-aspartyl-glutamate on synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are subunit- and pH-dependent in the CA1 region of the mouse hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2015;82:580-92.
106. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-11.
107. Raja MAG, Katas H, Amjad MW. Design, mechanism, delivery and therapeutics of canonical and Dicer-substrate siRNA. *Asian J Pharm Sci.* 2019;14(5):497-510.
108. Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *J Mol Biol.* 2017;429(17):2619-39.
109. Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4(9):e252.
110. Svoboda P. Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference. *Front Plant Sci.* 2020;11:1237.
111. Ranasinghe P, Addison ML, Dear JW, Webb DJ. Small interfering RNA: Discovery, pharmacology and clinical development-An introductory review. *Br J Pharmacol.* 2023;180(21):2697-720.
112. Resnier P, Montier T, Mathieu V, Benoit JP, Passirani C. A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials.* 2013;34(27):6429-43.

113. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 1992;256(5060):1217-21.
114. Taniguchi T, Endo KI, Tanioka H, Sasaoka M, Tashiro K, Kinoshita S, et al. Novel use of a chemically modified siRNA for robust and sustainable in vivo gene silencing in the retina. *Sci Rep*. 2020;10(1):22343.
115. Matta C, Juhasz T, Fodor J, Hajdu T, Katona E, Szucs-Somogyi C, et al. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression and function is required for early chondrogenesis. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):166.
116. Tan PH, Yu SW, Lin VC, Liu CC, Chien CC. RNA interference-mediated gene silence of the NR1 subunit of the NMDA receptor by subcutaneous injection of vector-encoding short hairpin RNA reduces formalin-induced nociception in the rat. *Pain*. 2011;152(3):573-81.
117. Miskevich F, Doench JG, Townsend MT, Sharp PA, Constantine-Paton M. RNA interference of *Xenopus* NMDAR NR1 in vitro and in vivo. *J Neurosci Methods*. 2006;152(1-2):65-73.
118. Sato Y, Kobayashi E, Murayama T, Mishina M, Seo N. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor epsilon1 subunit gene disruption of the action of general anesthetic drugs in mice. *Anesthesiology*. 2005;102(3):557-61.
119. Robello M, Amico C, Cupello A. A dual mechanism for impairment of GABAA receptor activity by NMDA receptor activation in rat cerebellum granule cells. *Eur Biophys J*. 1997;25(3):181-7.
120. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *J Conserv Dent*. 2014;17(4):301-4.
121. Fleischer W. Entwicklung von striatalen Neuronen zu funktionellen Netzwerken in vitro. Heinrich-Heine-Universität. 2006.
122. May AC. Charakterisierung der Benzodiazepinbindungsstelle an hypothalamischen GABAA-Rezeptoren. Heinrich-Heine-Universität. 2014.
123. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in Unserer Zeit*. 2007;37:120-6.
124. Sergeeva OA, Chepkova AN, Gorg B, Rodrigues Almeida F, Bidmon HJ, Haas HL, et al. Histamine-induced plasticity and gene expression in corticostriatal pathway under hyperammonemia. *CNS Neurosci Ther*. 2020;26(3):355-66.
125. Chepkova AN, Schonfeld S, Sergeeva OA. Age-related alterations in the expression of genes and synaptic plasticity associated with nitric oxide signaling in the mouse dorsal striatum. *Neural Plast*. 2015;2015:458123.
126. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue ansätze zur exakten mRNA quantifizierung. *BioSpektrum*. 2004;1(10):4.
127. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
128. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
129. Sergeeva OA, Chepkova AN, Doreulee N, Eriksson KS, Poelchen W, Monnighoff I, et al. Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: role of transporters. *J Physiol*. 2003;550(Pt 3):911-9.
130. Yanovsky Y, Li S, Klyuch BP, Yao Q, Blandina P, Passani MB, et al. L-Dopa activates histaminergic neurons. *J Physiol*. 2011;589(Pt 6):1349-66.

131. Morris RG. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1989;9(9):3040-57.
132. Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(5):370-86.
133. Sleigh. Ketamine - More mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2014.
134. Martin DC, Plagenhoef M, Abraham J, Dennison RL, Aronstam RS. Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(6):809-17.
135. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 1992;258(5082):597-603.
136. Sato Y, Kobayashi E, Hakamata Y, Kobahashi M, Wainai T, Murayama T, et al. Chronopharmacological studies of ketamine in normal and NMDA epsilon1 receptor knockout mice. *Br J Anaesth*. 2004;92(6):859-64.
137. Flohr H, Glade U, Motzko D. The role of the NMDA synapse in general anesthesia. *Toxicol Lett*. 1998;100-101:23-9.
138. Hwang YH, Shon Y, Yoon YJ, Yeom JH. Anesthesia for ovarian teratoma resection using remimazolam and remifentanyl in a patient with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis -two case reports. *Korean J Anesthesiol*. 2022;75(6):530-5.
139. Stelzer A, Kay AR, Wong RK. GABAA-receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science*. 1988;241(4863):339-41.
140. Chen QX, Stelzer A, Kay AR, Wong RK. GABAA receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurones. *J Physiol*. 1990;420:207-21.
141. Muir J, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Smith KR, Griffin LD, Kittler JT. NMDA receptors regulate GABAA receptor lateral mobility and clustering at inhibitory synapses through serine 327 on the gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(38):16679-84.
142. Cong D, Tang Z, Li L, Huang Y, Wang J, Chen L. Cross-talk between NMDA and GABA(A) receptors in cultured neurons of the rat inferior colliculus. *Sci China Life Sci*. 2011;54(6):560-6.
143. Taylor DC, Gayton RJ, Miley HE, Cross NP, Parton MP. The effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor agonists and antagonists on hypothalamic neurones in the anaesthetized rat which respond to changes in scrotal skin temperature. *Neurosci Lett*. 1995;201(3):259-61.
144. Teplov IY, Zinchenko VP, Kosenkov AM, Gaidin SG, Nenov MN, Sergeev AI. Involvement of NMDA and GABA(A) receptors in modulation of spontaneous activity in hippocampal culture: Interrelations between burst firing and intracellular calcium signal. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;553:99-106.
145. Szegedi V, Juhasz G, Parsons CG, Budai D. In vivo evidence for functional NMDA receptor blockade by memantine in rat hippocampal neurons. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010;117(10):1189-94.
146. Zamani N, Moazedi AA, Afarinesh Khaki MR, Pourmehdi Boroujeni M. Effects of Memantine on the Spontaneous Firing Frequency of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in Intact and Alzheimer Rat Model: An Electrophysiological Study. *Basic Clin Neurosci*. 2022;13(5):661-74.

147. Zhao L, Liu T, Xu R, He L, Duan M, Xu D. Mechanism of neuronal activity and synaptic transmission in rostral ventrolateral medulla. *J Clin Neurosci.* 2017;42:167-71.
148. Irifune M, Katayama S, Takarada T, Shimizu Y, Endo C, Takata T, et al. MK-801 enhances gabaculine-induced loss of the righting reflex in mice, but not immobility. *Can J Anaesth.* 2007;54(12):998-1005.
149. Daniell LC. The noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists, MK-801, phencyclidine and ketamine, increase the potency of general anesthetics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;36(1):111-5.
150. Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T. Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Journal of Neuroscience.* 2001;21(2):750-7.
151. Zhang X, Sun M, Jiao Y, Lin B, Yang Q. PHGDH Inhibitor CBR-5884 Inhibits Epithelial Ovarian Cancer Progression via ROS/Wnt/beta-Catenin Pathway and Plays a Synergistic Role with PARP Inhibitor Olaparib. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:9029544.
152. Kaplan E, Zubedat S, Radzishevsky I, Valenta AC, Rechnitz O, Sason H, et al. ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain d-serine and neurodevelopment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(38):9628-33.
153. Wagenaar DA, Pine J, Potter SM. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci.* 2006;7:11.
154. Chiappalone M, Bove M, Vato A, Tedesco M, Martinoia S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res.* 2006;1093(1):41-53.

VI. Danksagung

Diese Arbeit ist über etwas mehr als vier Jahre entstanden, und hat mich unzählige Stunden gekostet. Kaum etwas hat mir mehr abverlangt und macht mich so glücklich, jetzt wo es (fast) fertig ist. Ohne den Beistand von vielen Menschen in meinem Leben wäre diese Arbeit allerdings nicht möglich gewesen, daher möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Olga Sergeeva für die fachliche Begleitung der Arbeit danken. Ich habe in dieser Zeit viel gelernt – sowohl wissenschaftlich als auch persönlich.

Außerdem gebührt Frau Prof. Inge Bauer großen Dank: als Mediatorin hat sie dabei geholfen viele Hürden zu meistern und ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit an der einen oder der anderen Stelle wahrscheinlich gescheitert.

Ihnen beiden vielen Dank. Es war sicherlich manchmal nicht einfach, aber wir haben es geschafft.

Des Weiteren möchte ich Frau Anette Scherer für die Herstellung von Zellkulturen danken, sowie Frau Dr. Okka Scholz, welche Dextromethorphan und Dextrorphan bereitstellte und obendrein unterstützende Worte fand.

Ganz besonders zum Dank verpflichtet bin ich auch gegenüber Sebastian Roth und René M'Pembele. Auch wenn das gar nicht ihre Aufgabe war haben sie sich oft mein Gejammer angehört und standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Sie haben mich auch in schwierigen Phasen dazu motiviert diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Ein Riesendankeschön gebührt außerdem meinen Freunden. Auch sie mussten sich wiederholte Male mein Gejammer über diese Arbeit anhören und haben mich trotzdem immer unterstützt und nie den Glauben verloren. An Leon, Jana, Kati, Emma, Wlad, Elisa, Tim (plural) und Ella und auch an alle die ich hier nicht nennen kann: Danke euch, ihr bedeutet mir die Welt.

Und abschließend möchte ich mir selbst danken. Es war ein ganzes Stück Arbeit, aber mit genug Dickkopf und viel Biss kann man Berge versetzen.

Danke an alle die mitgewirkt und unterstützt haben, motivierende und mitfühlende Worte gefunden haben, Ideen eingebracht haben und sich ehrlich und aufrichtig gefreut haben, meinen Fortschritt zu sehen.

In viel Liebe,

Anthony