

**Kinetische und Pharmakologische Charakterisierung der molekularen Effekte  
von Halothan auf Humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

**Abraham Mbe Enyeji**

**aus**

**Yaoundé/Kamerun**

**2009**

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Privatdozent Dr. M. Barann
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. I. von Kügelgen

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.11.2009

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor Herr Professor Dr. A. Hoeft

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern,  
die mich während meines Studiums mit Geduld begleitet und  
mir viele Möglichkeiten eröffnet haben.



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1. Anästhesie.....	7
1.2. Volatile Anästhetika .....	8
1.3. Halothan .....	9
1.4. Emesis.....	10
1.5. Der Serotonin (5-HT) <sub>3A</sub> -Rezeptor.....	11
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit .....	12
<b>2. Material und Methodik.....</b>	<b>13</b>
2.1. Stabile Transfektion .....	13
2.2. Zellkultur .....	14
2.3. Elektrophysiologie.....	14
2.5. Das Perfusionssystem .....	19
2.6. Datenanalyse.....	22
2.7. Herstellung von Halothan-Lösungen.....	24
2.8. Gaschromatographie .....	25
2.9. Verwendete Substanzen.....	27
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1. Charakterisierung der 5-HT-induzierten Ströme .....	28
3.2. Strom-Spannungs-Kennlinie.....	29
3.3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT .....	31
3.4. Halothan-Effekte .....	32
3.5. Einfluss der Applikationsart auf die Unterdrückung .....	33
3.6. Einfluss von Halothan auf die Stromkinetiken.....	41
3.7. Kinetische Charakterisierung der Halothan-Effekte .....	43
3.8. Pharmakologische Charakterisierung der Halothan-Effekte .....	46
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>55</b>
4.1. Validierung der Daten .....	56
4.2. Allgemeine Auswirkungen von Anästhetika auf 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren .....	56
4.3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Halothan .....	57
4.4. Ein- und Auswaschkinetiken der Halothan-Effekte .....	59
4.5. Kompetitivitätstest.....	61
4.6. Konzentrationssprung (Halothan Einfluss).....	62
4.7. Interpretation der Halothandaten .....	62
4.8. Bedeutung der Ergebnisse für PONV .....	62
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>

<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Lebenslauf.....</b>	<b>70</b>

### **Abkürzungsverzeichnis**

cDNA: .....„complementary“ DNA

5-HT: .....5-Hydroxytryptamin

h5-HT<sub>3A</sub>: ...Humaner 5-Hydroxytryptamin-3A-Rezeptor

HEK 293:..„Human embryonic Kidney“ Zellen 293

HEPES: ....2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

ECS: .....Extracellular Solution

AP: .....Area Postrema.

ICS: .....„Intracellular Solution“ ( Interne Lösung der Messpipette )

SEM: .....Standard error of the Mean.

n.s.: .....nicht signifikant

MAC: .....Minimal alveolare Konzentration: Alveolare Konzentration, bei der 50% aller Patienten auf die Hautinszision nicht mehr mit Abwehrbewegung reagieren.

EC<sub>50</sub>:.....Mittlere effektive Konzentration, die halbmaximale Effekte bewirkt

IC<sub>50</sub>:.....Mittlere inhibitorische Konzentration, die eine Reduktion des Effektes um die Hälfte bewirkt

PONV:.... „postoperative Nausea and Vomiting“ – Postoperative Übelkeit und Erbrechen

ZNS:.....Zentralnervensystem

Ca<sub>2+</sub>.....Calcium

KOH.....Kaliumhydroxid

τ.....Zeitkonstante

SD .....Standardabweichung

pA.....Picoampere ( $10^{-12}$ )

mM.....Millimolar ( $10^{-3}$ )

ms.....Millisekunde(n) ( $10^{-3}$ )

## 1 Einleitung

### 1.1. Anästhesie

In wörtlicher Übersetzung aus dem Griechischen bedeutet Anästhesie Unempfindlichkeit gegenüber Schmerz-, Temperatur- und Berührungsreizen. Der Begriff Anästhesie wurde erstmals von griechischen Philosophen wie Discorides im 1. Jahr n. Christus benutzt und beschrieb den narkotischen Effekt der Pflanze Mandragora (Stanski, 2000). Am 30. März 1842 wurde die erste Äthernarkose durch Crawford Williamson Long angewendet. Wenige Jahre später, am 16. Dezember 1846, wurde die erste Äthernarkose zur Durchführung einer Operation mit Diethylether von William Thomas Green Morton in Boston ausgeführt (Ash, 1985; Bovill, 2008). Diese Substanz führte zu Bewusstlosigkeit und Analgesie. Wegen Gefahren durch das Gas (Explosionsgefahr) und der nicht unerheblichen Nebenwirkungen hat man bereits in der zweiten Hälfte des neunzehnten Jahrhunderts die Kombination aus Chloroform und Lachgas ( $N_2O$ ) zur Narkose verwendet, da Chloroform alleine zwar betäubt, aber keine Analgesie bewirkt. Lachgas ist ein sehr potentes Analgetikum, welches im Rahmen einer modernen Narkose supplementär in ein Gasgemisch aus Sauerstoff und Narkosegas eingespeist werden kann, um die analgetische Komponente hinzuzufügen. Moderne Narkose-Inhalationsgase sind chemisch so aufgebaut, dass sie aufgrund eines niedrigen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten schnelle Anflutungs- und Abflutungszeiten haben und eine Narkose besser steuer- und beherrschbar machen. Zu diesem Zweck lief die Entwicklung der Narkosegase zunehmend auf Hypnose und Muskelrelaxation zu. Die heute verwendeten Inhalationsgase (Desfluran, Enfluran, Isofluran und Sevofluran) sind im Gegensatz zu den "historischen" Gasen wesentlich nebenwirkungsärmer, einfacher handhabbar und, als Substanz selbst, ungefährlicher.

## 1.2. Volatile Anästhetika

Die heutzutage zur Verfügung stehenden Narkotika können unterteilt werden in: Inhalationsanästhetika, Intravenösanästhetika bzw. Sedativa, Lokalanästhetika und Analgetika wie z.B. Opiate. Volatile Anästhetika bilden eine der bedeutendsten Klassen von Medikamenten in der modernen Anästhesie.

Inhalationsanästhetika sind Substanzen, die über die Lunge aufgenommen und mit dem Blut in den verschiedenen Geweben des Körpers verteilt werden. Sie sind an der Förderung von inhibitorischen postsynaptischen Kanalaktivitäten und an der Dämpfung der exzitatorischen synaptischen Tätigkeit beteiligt. Hauptwirkungsort dieser Substanzen ist das Zentralnervensystem, wo sie mit den Funktionen neuronaler Membranen in Wechselwirkung treten. Im Allgemeinen ist die Inhalationsanästhesie im Vergleich zu der Intravenösen Anästhesie besser steuerbar, weil die Narkosetiefe leicht durch Veränderungen der inspiratorischen Anästhetikumkonzentration beeinflusst werden kann. Da die Inhalativa nicht alle Kriterien der Anästhetika erfüllen- wie beispielsweise Reflexdämpfung, Muskelrelaxierung, eine große Sicherheitsbreite und keine toxischen Wirkungen in klinischer Dosis- werden Sie häufig mit den anderen oben genannten Substanzen kombiniert, (Larsen,1995; 5. Auflage). Somit tragen die Intravenösen Anästhetika zur raschen Narkoseeinleitung, die Opioide und Lachgas zur verstärkten analgetischen Wirkung und die Muskelrelaxanzien zur vollständigen Erschlaffung der Muskeln bei. Der Mechanismus der Wirkung Inhalativer Anästhetika ist nicht vollständig definiert worden. Einige Faktoren können deren Pharmakokinetik beeinflussen, wie die Löslichkeit in Blut, Gewebe-Äquibrierung, Umfang der Gewebepfusion, Stoffwechsel, Partialdruck zwischen Blut und Gewebe und Alter des Probanden (Stachnik, 2006). Deshalb ist es von eminenter Bedeutung auf den molekularen Ebenen, die zugrunde liegenden biochemischen Vorgänge, die zur Inhibierung der Depolarisation führen, zu verstehen. Denn nur so kann man effektiv die Wirkungen dieser Substanzen an z.B. Rezeptoren beschreiben und nach Vergleich mit anderen Studien deren Wirkung charakterisieren. Wenn man nun der Frage nachgeht, wie die narkotische Wirkung zustande kommt, so machten Meyer und Overton einen wichtigen Schritt, indem sie die anästhetische Potenz von Narkotika mit einer ihrer physikochemischen Eigenschaften, ihrer Lipidlöslichkeit, in Verbindung brachten. Demnach sollte eine positive Korrelation („Meyer-Overton-Korrelation“) zwischen Wirkpotenz eines

Anästhetikums und seiner Lipophilie existieren. Die Lipophilie wird durch den Octanol/Wasser Partitionskoeffizienten „ $K_{o/w}$ “1 ausgedrückt. Sie wird definiert als das Verhältnis der Konzentration einer Chemikalie in der Octanol Phase zu seiner Konzentration in der wässrigen Phase in einem zweiphasigen Octanol/Wassersystem und wird als log P-Wert (Partition) ausgedrückt (Leo et al., 1971; Hansch et al., 1987). Der „ $K_{o/w}$ “ von Halothan liegt beispielsweise bei 2,70, der von Isoflurane bei 2,46 und von Desfluran bei 2,11.

Alle der genannten Inhalativa sind effektiv, sowohl für die Induktion als auch für die Aufrechterhaltung der Narkose. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf Halothan als Inhalationsanästhetikum

### 1.3. Halothan

Halothan wurde 1956 als erstes potentes, nichtexplosives Inhalationsanästhetikum in der klinischen Praxis eingeführt und hatte sich seit dem weltweit rasch verbreitet. Heutzutage hat es eher historischen Wert. Halothan liegt bei Raumtemperatur als klare, farblose, süßlich-ätherartig riechende Flüssigkeit vor (Conzen, 1996; Doi, 1993; Eger, 1994; Lerman, 1996; Liu, 1996; Rushman, 1999;), die einige Vorteile gegenüber klassischen Inhalativa aufweist: eine gute narkotische Wirkung, keine Reizung der Atemwege. Konstringierte Bronchien werden durch Halothan dilatiert, daher ist eine Anwendung bei Asthmatikern möglich (Baigel G. et al., 2003; Restrepo RD et al., 2005). Jedoch bestehen Nachteile von Halothan gegenüber anderen Narkotika, wie beispielsweise ein relativ hoher Blut-Gas-Verteilungskoeffizient, daher relativ langsame An- und Abflutungszeiten. Dies macht eine Narkose weniger gut steuer- und beherrschbar. Deshalb lief die Entwicklung der Narkosegase zunehmend auf die Säulen „Hypnose“ und Muskelrelaxation zu. Meistens wird Halothan in Kombination mit Lachgas ( $N_2O$ ), einem zentral wirksamen Analgetikum oder einem Opioid verabreicht, um eine ausreichende Anästhesie ohne unerwünschte Beeinträchtigung der Herz-Kreislauf-Funktion zu erreichen. Weiterhin besteht eine schwache analgetische Wirkung und geringe muskelrelaxierende Wirkung. Bei längerdauernder Narkose wird eine kontrollierte Beatmung benötigt, da Halothan atemdepressive Wirkungen zeigt (Baigel G. et al., 2003; Restrepo RD et al., 2005). Es heißt, dass der Patient bei unzureichenden oder suboptimalen thorakalen muskulären Aktivitäten maschinell unterstützt wird, damit die normalen Atemzüge und somit das

bedarfsgerechte Atemvolumen ermöglicht wird. Halothan ist außerdem eine Triggersubstanz der malignen Hyperthermie, einer pathologischen Veränderung des Zellstoffwechsels mit plötzlicher Steigerung der CO<sub>2</sub>-Produktion.

#### 1.4. Emesis

Emesis (gr. *emetikos*) bedeutet Erbrechen. Ungefähr ein Drittel der chirurgischen Patienten hat Übelkeit, Erbrechen und/oder beides nach der Gabe von Anaesthetika. Risikofaktoren sind weibliches Geschlecht, Nichtraucherstatus, vorherige Geschichte von postoperativer Übelkeit und Erbrechen oder unkontrollierter Gebrauch von postoperativen Opioiden. Das Vorkommen postoperativer Übelkeit und Erbrechen (PONV) ist und bleibt eine der häufigsten Komplikationen nach allgemeiner Anästhesie. Die Ursachen für PONV sind multimodal; involviert sind mehrere physiologische Pfade, die das Brechzentrum stimulieren, einschließlich der Chemorezeptor- triggerzone (CTZ), des gastrointestinalen Trakts, des vestibulären Systems, des cerebralen Kortex und des Zwischenhirns. Bedeutsame Forschungsergebnisse legen den Fokus auf den Einsatz verschiedener pharmakologischer Agenzien und unterschiedlicher anästhetischer Verfahren zur Vermeidung und „managing“ des PONV (Couture DJ et al., 2006). Die Forschung (wie der Gegenstand der vorliegenden Arbeit) ist auf die Vermeidung anstatt der Therapie der etablierten Symptome ausgerichtet. Dazu ist eine Verhinderung der Aktivierung des Brechreflexes notwendig. Der Brechreflex besteht aus Detektoren, die die Notwendigkeit zum Erbrechen feststellen, aus Effektoren, die das Erbrechen verursachen, und einem Koordinationszentrum, welches den gesamten Prozess steuert. Die Hauptdetektoren für das Erbrechen sind im Gastrointestinaltrakt, im Labyrinth des Innenohres, sowie in der sog. Chemorezeptorentriggerzone (CTZ), die sich in der Area postrema (AP) auf dem Boden des IV. Hirnventrikels befindet, lokalisiert. Die Chemo- und Mechanorezeptoren im Gastrointestinaltrakt übermitteln den Reiz an den Kern des Solitärbündels über den N.vagus, dessen einzelne Äste bis in die Area postrema reichen. Zum anderen ist die CTZ für die im Blut zirkulierenden Substanzen empfänglich, da sie durch ihre Lage Kontakt zu der zerebrospinalen Flüssigkeit hat. So handelt es sich um eine komplexe Schaltung- eine Substanz (Toxin oder Medikament) kann an mehreren Stellen aktiv werden und Übelkeit sowie Erbrechen auslösen (Leslie und Gwyn, 1984).

Serotonin (5-HT<sub>3</sub>)-Rezeptorantagonisten sind die Grundlage für die standardisierte antiemetische Behandlung bei Krebspatienten, die eine Chemotherapie erhalten oder unter postoperativer Emesis leiden. Um die Wirksamkeit dieser Agenzien zu fördern, wird regelmäßig Dexamethason in Kombination mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten durch intravenöse Infusion verabreicht, bevor mit der Chemotherapie oder der Operation begonnen wird. Der klinische Einsatz von Ondansetron oder anderen 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten hat sich bei Zytostatika- und Bestrahlungs-Induzierter Emesis bewährt. Der Hauptangriffspunkt emetogener Chemo- und Strahlentherapie liegt in der Schleimhaut des oberen Magen-Darm-Traktes, wo enterochromaffine Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Vagusafferenzen nachweisbar sind. Die emetische Wirkung von Zytostatika wird durch zwei Mechanismen ausgelöst: eine direkte zytotoxische Wirkung sowie die Freisetzung von Serotonin durch Exozytose aus den enterochromaffinen Zellen mit anschließender Erregung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf vagalen Afferenzen. Durch eine selektive Blockade der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren mit Ondansetron wird das Erbrechen wirksam gehemmt.

### 1.5. Der Serotonin (5-HT)<sub>3A</sub>-Rezeptor

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Kationen-Kanal, der im Zentralen- und im Peripheren Nervenensystem zu finden ist, sowie auf extraneuronalen Lokalisationen wie Lymphozyten und Monozyten. Fünf Subtypen, 5-HT<sub>(3A-E)</sub> sind identifiziert worden. Bradley (1986) ging davon aus, dass die unterschiedliche Affinität bestimmter Antagonisten für 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in verschiedenen neuronalen Strukturen das Vorhandensein mehrerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsubtypen vermuten lässt. Diese zeigen Unterschiede sowohl im Amino-terminalen, als auch im transmembranären Gebiet. Diese Ergebnisse lassen sich allerdings auch auf Spezies-Unterschiede zurückführen (Butler und Elswood, 1990).

5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren befinden sich überwiegend in ZNS Gebieten, die an der Integration von Brechreflexen, Schmerzverarbeitung und Angst beteiligt sind (Faerber et al., 2007). Die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit kommt funktionell als Homopentamer oder in Verbindung mit der 5-HT<sub>3B</sub>-Rezeptoruntereinheit, als Heteromer vor (Davies et al., 1999). 1991 wurde bei Mäusen die aus 487 Aminosäuren (56 kDa) bestehende erste Rezeptoruntereinheit 5-HT<sub>3A</sub> kloniert (Maricq und

Peterson, 1991). Hiervon sind alternative Splice-Varianten bekannt: eine Langform (5-HT<sub>3A1</sub>) sowie eine Kurzform (5-HT<sub>3A8</sub>). Die Splice-Varianten können keine funktionellen homomeren Rezeptoren bilden, beeinflussen aber die Kanalfunktion (Brüss et al., 2000)

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor konnte in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. Unabhängig von der Spezies ist er in sehr hoher Dichte im Tractus solitarius, in der Area postrema, am hinteren motorischen Nervus vagus Nucleus und im Nucleus des Tractus spinalis N. trigeminus zu finden (Pratt et al., 1990). Dies sind Nervenstrukturen, die an der Vermittlung von Emesis beteiligt sind, und somit mit der antiemetischen Wirkung von 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten in Zusammenhang gebracht werden. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor fungiert als Signalerkennung- und Übersetzung in einem Makromolekül: er spielt eine Rolle sowohl als Rezeptor als auch Effektor –nämlich als Ionenkanal.

## 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Substanzen wie volatile Anästhetika und n-Alkohole sind bereits auf der molekularen Ebene sowohl an humanen 5-HT<sub>3A</sub>-, als auch an Heteromären humanen (h)5-HT<sub>3AB</sub>-Rezeptoren untersucht worden (Stevens R et al, 2005). Vorherige Studien haben gezeigt, dass volatile Anästhetika und n-Alkohole Ströme modulieren, die bei Nagetieren (Machu und Harris, 1994; Jenkins et Al., 1996; Zhou und Lovinger, 1996) und Menschen (Suzuki et Al., 2002; Stevens et al., 2005) über 5-HT<sub>3A</sub> vermittelt werden. Eine Potenzierung der Ströme wurde bei Substanzen beobachtet, deren Größe kleiner als 0.120 nm<sup>3</sup> beträgt (Stevens et Al., 2005).

Vor kurzem wiesen Koshizaki et al. (2003) auf Halothan-induzierte Inhibierung der dorsalen Spinalneuronenaktivitäten hin. Diese partiell modulierende Wirkung geschah über GABA - und Strychnin-sensitive Glycinrezeptoren. Diese Rezeptoren gehören zu derselben Familie der ligandengesteuerten Ionen-Kanäle wie der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyp. Deshalb wurde eine mögliche Beteiligung des 5-HT-Rezeptorsystems bei der Halothan induzierten Inhibierung spinaler sensorischer Neuronen vermutet. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren teilweise an der Wirkung von Halothan auf der spinalen neuronalen Ebene beteiligt sind.

Trotz der klinischen Bedeutung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors ist noch wenig über die Mechanismen der Interaktion von 5-HT mit seiner Bindungsstelle an diesem Rezeptor bekannt. In dieser Arbeit wird zur Charakterisierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors zuerst die Reaktion des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors auf 5-HT, und zwar in variablen Konzentrationen, untersucht. Es soll überprüft werden, welche Wirkungen Halothan am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor im „Outside-out“-Patch Modus zeigt und ob sich diese mit den Effekten von anderen volatilen Analgetika, wie z.B. Sevofluran und Desfluran, vergleichen lassen und, ob die Ergebnisse der Untersuchung mit denen von anderen Autoren vergleichbar sind.

Es wurde bereits gezeigt (nicht publizierte Ergebnisse), dass Sevofluran (ein volatiles Anästhetikum) eine Inhibierung der 5-HT (30µM)-induzierten Ströme in einer konzentrations-abhängigen Art und Weise (IC<sub>50</sub> = 0,4 mM) aufweist. Demnach tritt bei Sevofluran eine nicht-kompetitive Inhibierung im Offenkanalzustand auf. Im Gegensatz dazu zeigte Halothan eine schnelle Potenzierung der durch 5-HT-induzierten initialen Signale und eine Inhibierung, die nicht unbedingt etwas mit dem Offenzustand der Kanäle zu tun hatte. Diese Erkenntnisse deuten auf Unterschiede in der Wirkung zwischen Sevofluran und Halothan an h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren auf der molekularen Ebene hin. Somit ist ein weiteres Studium der molekularen Wirkungen der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren unabdingbar, um die verschiedenen Indizien der postoperativen Emesis zu erklären, wenn verschiedene strukturell verwandte Anästhetika verwendet werden.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Stabile Transfektion**

Die Transfektion der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293 Zellen) fand im Institut für Pharmakologie (Abt. Bönisch / Brüss) der Universität Bonn statt. Für die Versuche erfolgte die stabile Transfektion der humanen embryonalen Nierenzellen mit der h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor cDNA nach der modifizierten Calciumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) mit Hilfe eines pCDNA3 (Invitrogen) Vektors unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus Promotors. Zwei Tage danach wurden die Zellen nach der stabilen Transfektion durch Zugabe von Geneticin (800 µg/ml) selektiert. Aus jeder Transfektion wurden 20-40 Kolonien hinsichtlich erfolgreicher

Expression der humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren mit [<sup>14</sup>C] Guanidinium Influx und Bindung des selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR 65630 [3-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-1(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanone] oder durch spezielle [<sup>3</sup>H]5-HT Aufnahmeexperimente getestet. Die Kolonien, die die beste Expression zeigten, wurden vermehrt und für weitere Experimente verwendet.

## 2.2. Zellkultur

Die HEK293 Zellen wurden in einem DMEM nutrient mix F12 (1:1; v/v) Medium bei 37°C mit 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Typ BB16, Fa Heraeus, Deutschland) kultiviert. Das Medium für das Wachstum enthielt 10% fetales Kälberserum, Penicillin (100 I.U./ml), Streptomycin (100 µg/ml), Geneticin (0,75 mg/ml) und Glutamin (292 µg/ml). Sechs Tage vor einem Patch-Clamp-Experiment wurden die Zellen in Petrischalen (Nunc, 35mm Durchmesser) aliquotiert.

Ein Teil der Zellen wurde für eine neue Zellkulturflasche verwendet. Nach drei Monaten wurde die laufende Zellcharge verworfen und eine neue herangezogen. Hierfür wurden neue, in 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C aufbewahrte HEK293 Zellen aufgetaut und nach Reinigung in eine neue Zellkulturflasche gebracht. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen.

## 2.3. Elektrophysiologie

### „Patch-Clamp“ („voltage clamp“)

Die Patch-Clamp-Technik, eine Methode der Elektrophysiologie, wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Hamill et al., 1981; Neher et al., 1976; Neher et al., 1992). Die Erforschung der Ionenströme und anderer elektrischer Phänomene an Zellmembranen wurde durch diese Technik erheblich vorangetrieben. Ein Patch wird erzeugt, indem man die Messpipette an eine am Boden der Petrischale adhärente Zelle heranführt und einen leichten Unterdruck appliziert, so dass zwischen der Zelle und der Pipette eine feste Verbindung entsteht. Der Widerstand zwischen Pipette und Zelle steigt im besten Fall auf über 1GΩ. In diesem

Moment hat man die „Cell-attached“-Konfiguration erreicht. Die Patch-Clamp-Technik wird in verschiedenen Konfigurationen angewendet. Dazu zählen „Excised“(inside out oder outside out)-, „Cell-attached“- und „Whole-Cell“(Ganzzellmessungen). Als die für diese Arbeit wichtige Technik wurde die “Excised“ - Konfiguration im „Outside-out“ Modus verwendet.

### Vorbereitung der Patch-Clamp-Experimente:

Für die Experimente wurden jeden Tag frische Petrischalen mit stabil transfizierten HEK 293 Zellen aus dem Brutschrank entnommen. Das Nährmedium wurde dekantiert und durch ECS-Lösungen mit folgenden Konzentrationen ersetzt: NaCl 150 mM; KOH 5,6 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; HEPES 10 mM; D-Glukose 20 mM (sonst nicht in ECS enthalten); pH 7,4.

Sowohl die Pipettenelektrode, als auch die Badelektrode bestanden aus Silberdrähten. Diese wurden in einer Natrium-Hypochloridlösung chloridiert, wobei der Farbwechsel von Silber nach Schwarz einer ausreichenden Chloridierung entsprach. Die aus Borosilikat-Glaskapillaren hergestellten Patchpipetten wurden mit Hilfe eines Pipettenpullers in zwei Schritten so gezogen, dass sie nach dem anschließenden Poliervorgang einen Widerstand von 2,5 - 3,5 MΩ-Ohm aufwiesen. Die Pipetten wurden vor dem Experiment mit Intrazellulärlösung (ICS) gefüllt, die den folgenden Ionenkonzentrationen entsprachen:

KCl 140 mM; EGTA 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; HEPES 10 mM; pH 7,4.

Die Glaskapillaren (Kwik-Fil<sup>TM</sup>, World Precision Instruments, USA) wurden im Pipettenziehgerät (Patch-Pipet-Puller PA10, ESF Elektronik, Göttingen) durch zweistufiges Ziehen zwei gleichlange Patchpipetten hergestellt. Die Pipettenspitzen wurden mit Hilfe eines Heizdrahtes poliert, die Enden mit einer Bunsenbrennerflamme geglättet. Die polierten Pipetten wurden in einem verschließbaren Behälter aufbewahrt und innerhalb weniger Stunden benutzt, da sie bei längerem Verweilen unbrauchbar werden.

### Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

Nach dem Einsetzen der Pipette konnte diese mit Hilfe des Mikromanipulators (siehe Abbildung. 1) manuell gesteuert auf die Zelle aufgesetzt werden. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks wurde die Zellemembran an die Pipette angesaugt und es entstand ein sog. „Gigaseal“, d.h. ein Widerstand im Giga Ω-Ohm-Bereich (1-4 GΩ). Dies nennt man „cell attached“. Mit der Pipette wurde die Zellmembran dann mit weiterem vorsichtigem Unterdruck durchstossen, sodass die Pipettenspitze sich in der Zelle befindet. Dies nennt man „whole cell“. Anschliessend wird die Pipette von der am Boden haftenden Zelle entfernt, so dass die an die Pipette anhaftende Zellmembran von der restlichen Zellmembran abreißt und sich spontan wieder verschließt. Dieser Vorgang wird als „Excisement“ bezeichnet. Die ehemalige Innenseite der Zellmembran wird zum Pipettenlumen gerichtet, die Membranaußenseite zur Badlösung. Dies nennt man „outside out“.

Dadurch konnte der Strom anhand einer kleinen Anzahl von geöffneten Ionenkanälen gemessen werden. Der Patch wurde mit Hilfe des Mikromanipulators vor das Lösungs-Applikationssystem (RSC 200, Biologic, Frankreich) positioniert, wo er je nach gewünschtem Experiment und dementsprechendem Parameterfile mit der notwendigen Lösung perfundiert wurde. Das Applikationssystem wurde elektronisch gesteuert.

Für die Experimente wurde ein computergesteuerter Patch-Clamp Verstärker (EPC-7, List Electronic, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die analogen Daten wurden durch einen externen Low-pass-Filter bei 1 kHz gefiltert (entweder Frequency Devices, MA, USA oder LPBF-48DG, NPI Electronic, Tamm, Deutschland) und anschließend digitalisiert (Digidata 1200, Axon, Kalifornien, USA). Die Aufnahmefrequenz betrug 2 kHz. Eine optimale Stabilität des Patches wurde erreicht, indem das Membranpotential erst 200 ms vor der Serotoninapplikation von 0 mV auf -100 mV geklemmt und nach der Agonistenapplikation wieder auf 0 mV gesenkt wurde. Dabei wurde das Membranpotential der Zelle bei der gewählten Spannung konstant gehalten und der Strom gemessen, der notwendig ist, um die Spannung aufrechtzuerhalten, wenn sich die Kanäle in der Zellmembran öffnen und der konsekutive Ionenfluss über die Membran einen Spannungsabfall induziert. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

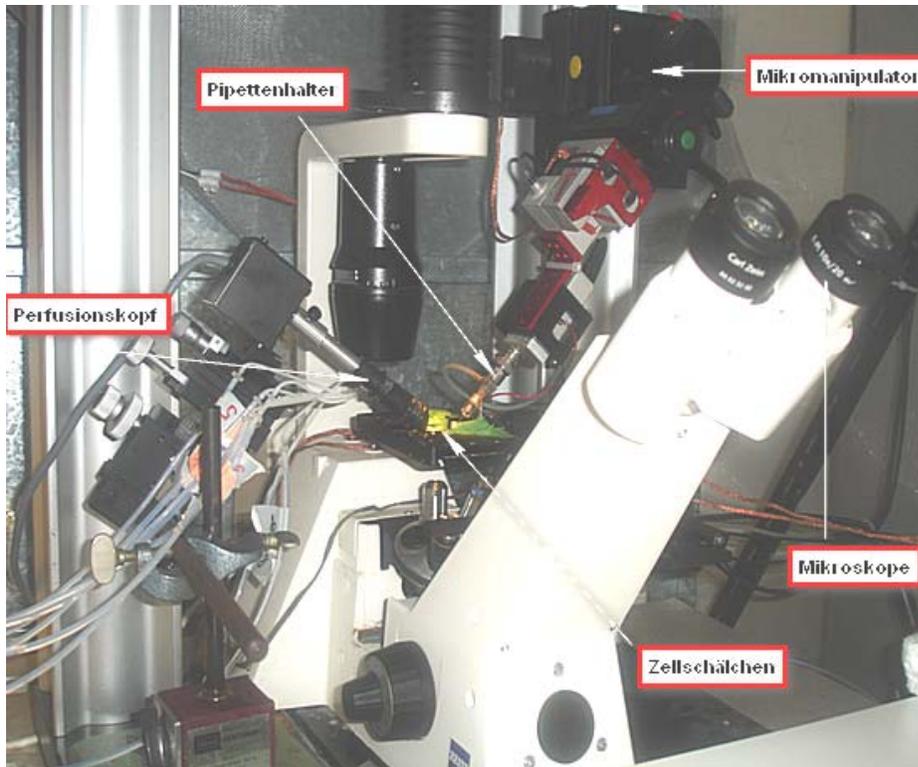


Abbildung 1. Zeigt den Aufbau der Messapparatur, mit dem Perfusionskopf und den anhängenden Quetsch-Schläuchen, dem Pipettenhalter und dem Zellschälchen.

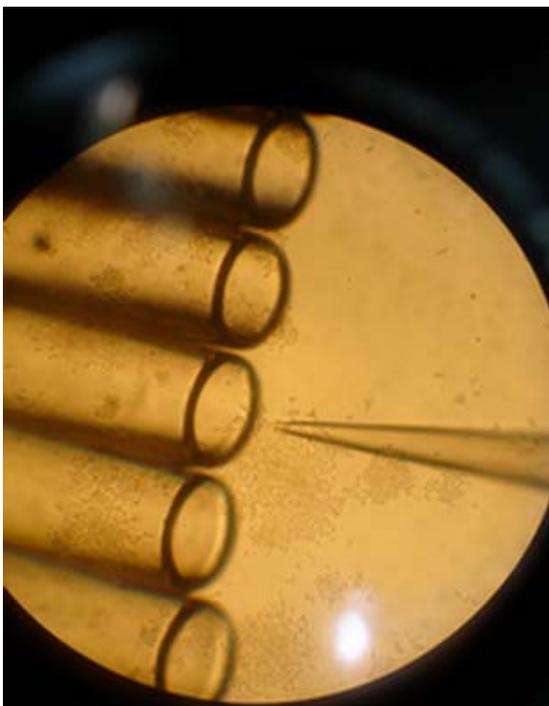


Abbildung 2: Links. Mikroskopische Aufnahme der Pipettenspitze mit Patch vor den „Tubes“ des Lösungs-Applikationssystems. Mit Hilfe des Steuerungsprogramms konnte man in einer experimentellen Sequenz durch Rotation des Drehkopfes die „Tubes“ schwenken, sodass die jeweiligen Lösungen isoliert in Kontakt

mit dem „Excised-Patch“ gebracht werden konnten. Im Hintergrund ist der am Boden des Zellschälchens haftende Zellrasen zu sehen. Rechts: Unter dem Mikroskop sichtbare Patch-Clamp Pipette, auf eine Zelle aufgesetzt.

## 2.5. Das Perfusionssystem

### Das RSC-200 (Lösungs-Applikationssystem)

Das Lösungsapplikationssystem erlaubt, den Lösungsaustausch innerhalb von weniger als 2 ms. Um einen Verlust von lipophilen Substanzen in Kunststoff zu vermeiden, bestand das Perfusionssystem hauptsächlich aus Polytetrafluorethylen-Schläuchen (Teflon), welche sich durch ihre inerten Eigenschaften gegenüber anderen chemischen Substanzen auszeichnen (Barann et al. 2000b). Über diese Schläuche gelangen die Perfusionslösungen aus den Glasreservoirs in die Applikationsröhrchen („tubes“). (Siehe Abbildung 4, Seite 20).

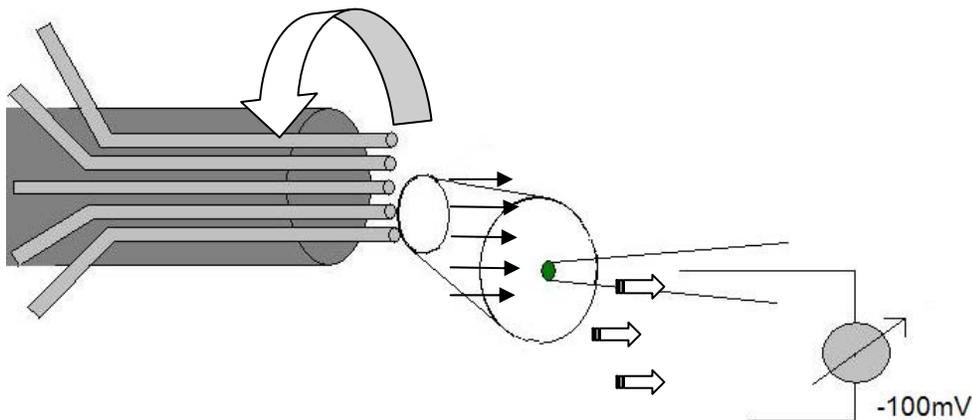
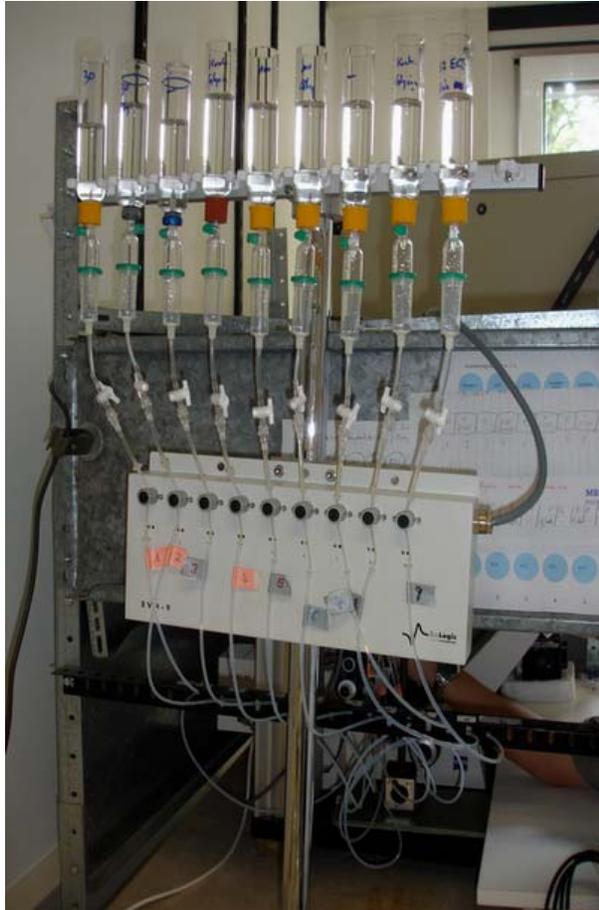


Abbildung 3: Versuchsaufbau des Perfusionssystems. Aus den Glasröhrchen (hellgrau) wird die Substanz auf den an der Pipettenspitze hängenden “patch” (grün) appliziert. Der Perfusionsskopf kann gedreht werden und ermöglicht so den schnellen Wechsel der zu applizierenden Substanzen. Es liegt eine Haltespannung von -100 mV an (hellgrauer Kreis).



**Abbildung 4: Von oben nach unten der Reihe nach: Glasreservoirs mit Perfusionslösungen, Tropfkammern und quetschbare Teflonschläuche.**

### Applikationenarten

Um einen möglichst optimalen Lösungsaustausch zu ermöglichen, wurden verschiedene Programme in Form von „Parameterfiles“ hergestellt, die in einem Computer gespeichert wurden und von dort aus zu bedienen waren. Durch dieses Steuerungsprogramm wurden die Bedingungen für den Rotationskopf (Träger der Glasröhrchen) festgelegt. (Siehe Abbildung 3, Seite 19).

Bei allen Experimenten diente ein Strom, der durch 30  $\mu$ M Serotonin (5-HT) induziert wurde, als Kontrolle. Folgende Lösungsapplikationsprotokolle wurden verwendet:

### 1. Konzentrations-Wirkungskurven

Eine Halothan-Konzentrations-Wirkungskurve ließ sich für drei verschiedene Applikationsarten erstellen:

- (1) Äquilibrium-Applikation (++) : In dieser Applikationsansatz wurde Halothan 60 s vor und 1-2 s lang während der 5-HT Gabe appliziert;
- (2) Offenkanal-Applikation (-+) : Applikation von Halothan 1-2 s lang ausschließlich während der 5-HT Gabe;
- (3) Geschlossenkanal- Applikation (+-) : Applikation von Halothan ausschließlich 60s Applikation vor der 5-HT Applikation.

### 2. Einwaschexperimente

Die Einwaschexperimente spielten eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der molekularen Kinetik von Halothan am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor und entsprachen einer kontinuierlichen Applikation. Hierbei hat man die Vorapplikationszeit variiert, um zu sehen, wie schnell ein induzierter Effekt durch Halothan vollständig zum Tragen kommt. Die Zeitintervalle waren wie folgt eingeteilt: 32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s und 60 s.

### 3. Auswaschexperimente

Die Auswaschexperimente dienten ebenfalls der Charakterisierung der Kinetik des Halothans. Hierbei wurde Halothan für 60 s auf den Patch appliziert. Bevor ein Strom durch Serotonin induziert wurde, wurde der Patch unterschiedlich lange mit ECS gespült, um zu sehen, wie schnell ein induzierter Effekt durch die verwendete Substanz wieder ausgewaschen werden kann. Die Zeitintervalle entsprachen: 32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s und 60 s.

#### 4. Elektrolyt- oder Konzentrationssprungexperimente

Bei den Konzentrationssprungexperimenten wurde erst ein Strom mit 30 $\mu$ M 5-HT erzeugt und z.B. 50 ms später eine Lösung mit einer 50%-igen Elektrolytkonzentration bzw. einer Mischung aus Halothan und dem Agonisten appliziert. Diese Experimente dienten - im Falle der 50%-igen Elektrolytlösung – dazu, die Geschwindigkeit des Applikationssystems zu testen und im Falle der Lösung mit Halothan, um zu prüfen, ob Effekte existieren, die noch schneller sind als die maximale Rotation des Perfusionkopfes (32 ms). Somit ist erkennbar, ob Halothan z.B. beschleunigenden- oder verlangsamen Einfluss auf die Desensibilisierung hat.

#### 2.6. Datenanalyse

##### Software

Alle Stromspuren wurden digitalisiert (Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) und gespeichert. Die Datenanalyse zur Darstellung der Kinetiken wurde mit dem Programm Clampfit durchgeführt und die Graphiken und die Auswertung der Rohdaten wurde in GraphPad Prism3<sup>®</sup> Software als Prozent der Kontrolle und unter Angabe der Durchschnittsfehler der Standardabweichung (SEM) angegeben. Die Mittelwerte zweier Gruppen wurden gegebenenfalls mittels gepaarten bzw. ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test auf Signifikanz untersucht. Befand sich die Irrtumswahrscheinlichkeit bei  $p \leq 0,05$  wurde der Unterschied als signifikant eingestuft.

##### Analyse der Stromspuren

###### a) Maximalamplitude (Peak)

Der „Peak“ wurde unter Verwendung eines „Cursors“ (siehe Abbildung 5. unten) in pA (Pico-Ampere) direkt abgelesen.

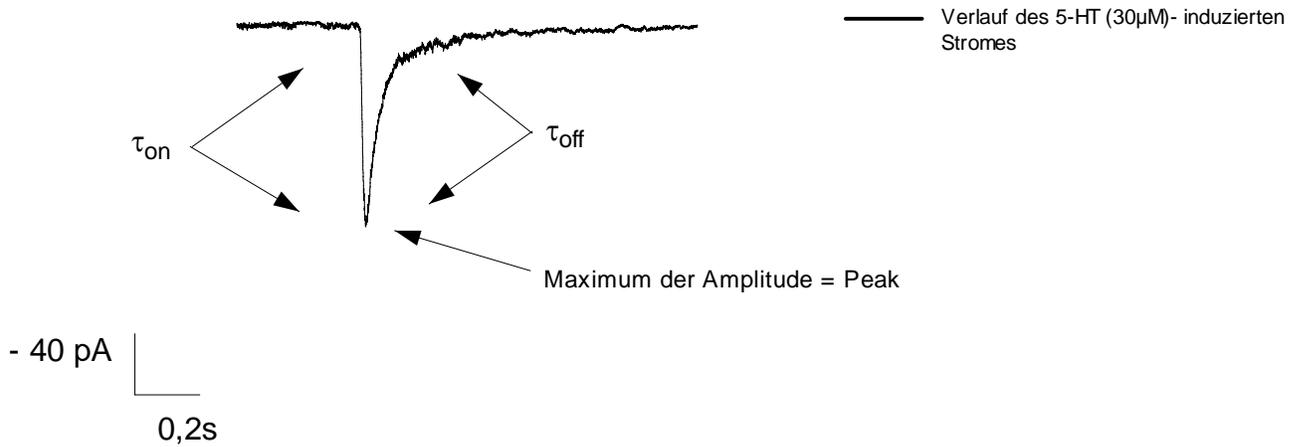


Abbildung 5: 5-HT (30µM)-induzierter Einwärtsstrom (-100mV Haltepotential). Es wurde die Aktivierungszeitkonstante ( $\tau_{on}$ ), die Inaktivierungszeitkonstante ( $\tau_{off}$ ) der Stromspur durch exponentielle Cursoranpassung ermittelt. Der Maximalstrom (Peak) wurde in pA abgelesen.

b) Mono- und Biexponentielle Bestimmung der Zeitkonstanten „Fitten“

Die erhaltenen Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung der durch 5-HT-induzierten Ströme wurden mit der im Programm Clampfit® enthaltenen Standard-Exponentialfunktion und der dazu wählbaren Chebyshev-Methode monoexponentiell getrennt ermittelt: Diese Gleichung entsprach folgender Formel:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

$n = 1$  für monoexponentielle und

$n = 2$  für biexponentielle Berechnungen

$A$  = Amplitude der Funktion, berechnet ab dem gewählten Startpunkt der Kurvenanpassung

$t$  = Zeit

$\tau$  = Zeitkonstante

$C$  = konstantes Offset.

Durch die biexponentielle Funktion konnten auch die beiden Zeitkonstanten für Aktivierung und Deaktivierung gemeinsam in einem Berechnungsvorgang ermittelt werden. Die auf diese Weise erhaltene Erstausswertung konnte auf das Programm Graph Pad Prism 3.0 Softwares übertragen und weiter analysiert werden.

Die Konzentrationswirkungskurven von 5-HT und Halothan wurden durch Anpassung an die Hill-Gleichung ermittelt:

$$i = \frac{c^n}{(c^n + EC_{50}^n)}$$

$i$  = der Maximalstrom in Gegenwart des Medikamentes als Fraktion des Maximalstroms der Kontrolle

$c$  = die 5-HT Konzentration,

$n$  = der Hill-Koeffizient, und

$EC_{50}$  = die Konzentration, bei der es zum halb maximalen Effekt gekommen ist. 3-6 erfolgreich durchgeführte Experimente ergaben einen Datenpunkt.

## 2.7. Herstellung von Halothan-Lösungen

Halothan wurde in der Originalflasche im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Für jeden Versuchstag wurden 8 -12 Stunden vor Beginn der Experimente frische Lösungen angesetzt. Um die Konzentrations-Wirkungskurve für Halothan herzustellen, ging man wie folgt vor: für 500ml einer 5mM Halothanlösung (Molgewicht = 197,4 g/M) wurden 264µl Halothanlösung (Dichte =1,87 g/ml) in einen Glaskolben auf 500ml ECS pipettiert. Nach Einlegen eines Rührfisches wurde dieser mit einem Glasstopfen luftdicht verschlossen und mit Styropor lichtgeschützt. Die Lösung wurde mindestens 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde zur Herstellung unterschiedlicher Konzentrationen aus der Stammlösung die für die Experimente gewünschte

Menge abpipettiert und mit ECS verdünnt. Halothan ist in folgenden Konzentrationen angesetzt worden: jeweils 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 3mM und 5mM.

## 2.8. Gaschromatographie

Um einen Verlust des Anästhetikums während des Experiments minimieren zu können, wurden für flüchtige Anästhetika gasdichte Lösungsmittelreservoirs verwendet. Zur Berechnung von exakten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen war es zusätzlich nötig, die unter den Versuchsbedingungen tatsächlich vorhandenen Halothan-Konzentrationen zu messen. Eine gaschromatographische Konzentrationsbestimmung kam für diesen Zweck zur Anwendung.

Aufgrund der volatilen Eigenschaften von Halothan war es trotz umsichtigen Einsatzes der Meßverfahren sowie die Verwendung inerter Materialien nicht zu verhindern, dass verminderte Anästhetikakonzentrationen in den Lösungen auftreten. Deshalb wurden zur Konzentrationbestimmung sowohl von der Stammlösung, als auch (vor und nach Erhalt eines stabilen Patches) von der applizierten Versuchslösung zügig Doppelproben entnommen. Dafür wurde der Perfusionsschlauch mit Hilfe einer Kanüle in ein mit einem Teflondeckel versehenes 2-ml-Probengefäß umgeleitet. Aus diesem wurden je 0,5 ml Lösung in ein 1-ml-Probengefäß umpipettiert, welches bereits 0,5 ml n-Hexan enthielt. Zur Minimierung des Halothanverlustes durch Verdunstung wurde der offene Abschnitt der Lösungskolben (Glasreservoirs) mit inertem Kunststoffmaterial, das mit einer Kanüle zum atmosphärischen Druckausgleich versehen war, verschlossen. Die so gewonnenen Proben wurden in einem Rotator für 2 bis 4 Stunden gemischt. Das Halothan ist dann in die überstehende (lipophile) n-Hexanphase übergetreten. Der Überstand wurde abpipettiert und die Halothankonzentration im Gaschromatographen bestimmt.

Als interner Standard (Vergleich) diente Isofluran. Die Proben wurden bis zur Messung in einem Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Ein typisches Chromatogramm ist in Abbildung 6 dargestellt.

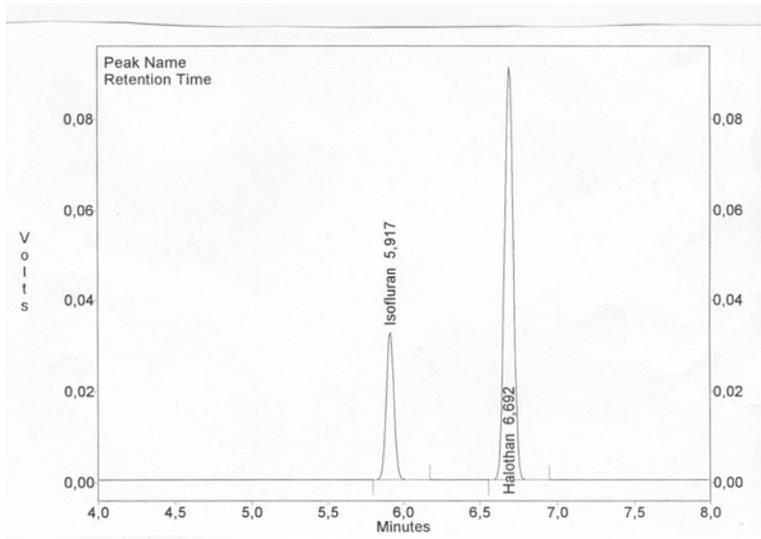


Abbildung 6: Typisches Chromatogramm einer Probe, die den internen Standard Isofluran enthält.

Ergebnisse der Gas Chromatographie:

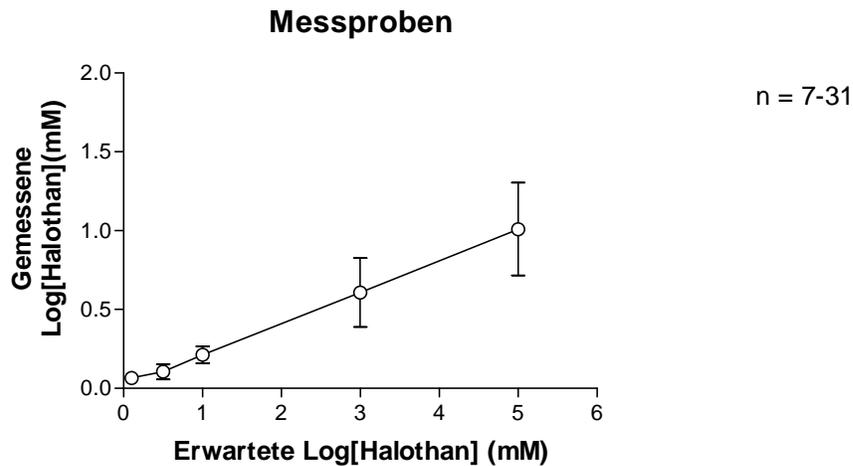


Abbildung 7: Verhältnis der theoretischen (erwarteten) Halothankonzentration zu der gemessenen.

In Abbildung 7 wurden die theoretischen Halothankonzentrationen mit den gemessenen verglichen. Die finale Halothankonzentration, d.h. die Konzentration die am Patch ankommt,

unterschied sich von der theoretischen um ca. 20 %. Im Folgenden wurden immer die finalen Konzentrationen angegeben.

## 2.9. Verwendete Substanzen

### Strukturformeln

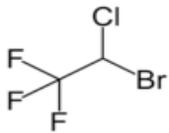
Vergleich der Strukturformeln der heute gebräuchlichen Volatilen Anästhetika.

### Inhalationsanästhetika

#### Halothan

(C<sub>2</sub>HBrClF<sub>3</sub>)

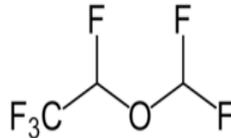
M Masse: 197,39 g/mol



#### Desfluran

(C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>OF<sub>6</sub>)

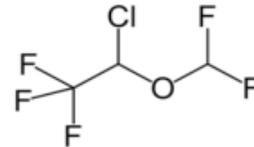
168,0 g/mol



#### Isofluran

(C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>ClF<sub>5</sub>O)

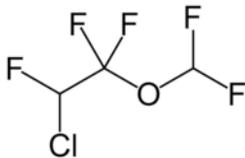
Dichte: 1,45 g·cm<sup>-3</sup>



#### Enfluran

(C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>ClF<sub>5</sub>O)

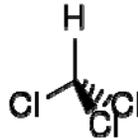
Dichte: 1,5167 g/cm<sup>3</sup>



#### Chloroform (Trichlormethan)

(CHCl<sub>3</sub>)

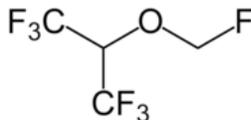
Dichte: 1,48 g·cm<sup>-3</sup>



#### Sevofluran

(C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>OF<sub>7</sub>)

Dichte: 1,52 g/ml



#### Stickoxydul (Distickstoffmonoxid)

(N<sub>2</sub>O)

Dichte: 1,85 kg·m<sup>-3</sup>



## Serotonin

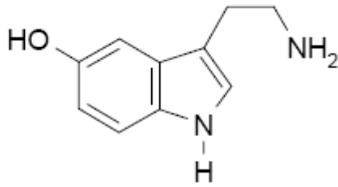


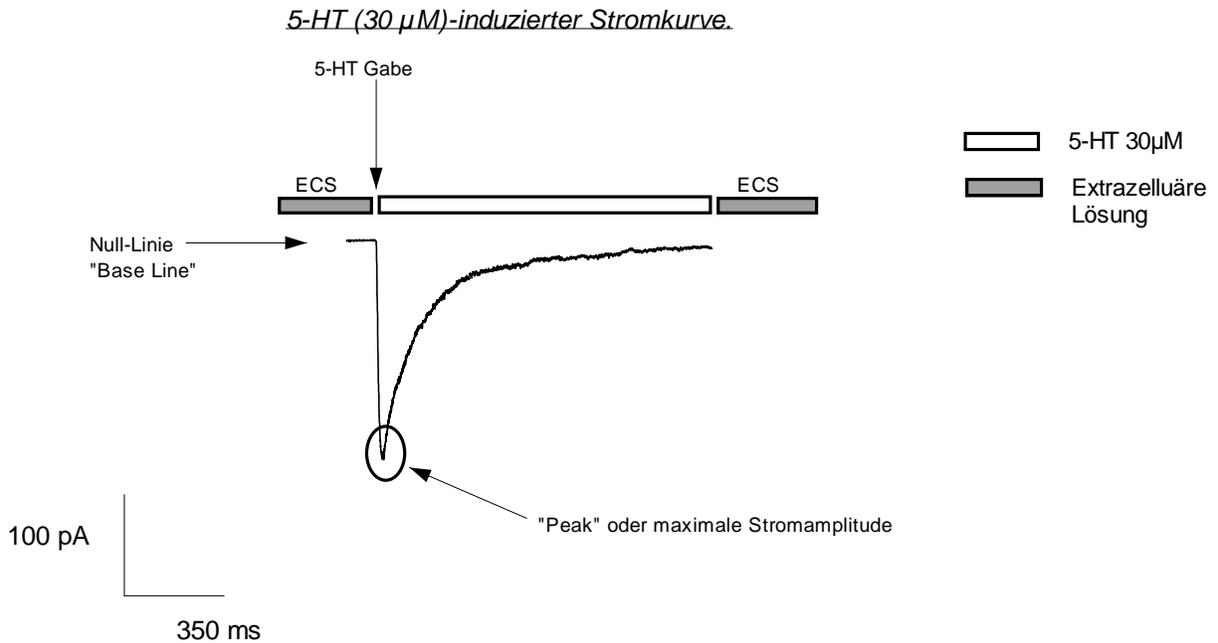
Abbildung 8: Vergleich der Strukturformeln von volatilen Anästhetika und Serotonin.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung der 5-HT-induzierten Ströme

Nach Applikation von 5-HT (30  $\mu\text{M}$ ) auf einen „Excised Patch“ kam es zur Auslösung eines Einwärtsstromes (Abbildung 9). Die Größe der Stromantwort war dabei sowohl von der gewählten 5-HT-Konzentration in der Agonistenlösung abhängig, als auch vom vorgegebenen Haltepotential abhängig.

Die angelegte Membranspannung spielte eine große Rolle als treibende Kraft für den Ionenfluss durch die geöffneten Kanäle; sie konnte sie hemmen und sogar umkehren (Siehe Abbildung 11 rechts). Eine Serotoninkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  wurde verwendet, weil sie den nahezu maximal auslösbaren Strom an diesem Rezeptor induzieren konnte. Dem Zeitpunkt der Serotoninabgabe entspricht der Beginn des fast senkrechten Teils der Kurve (von links nach rechts), die als Aktivierung bezeichnet wird. Diese Aktivierung wird nach Durchlaufen eines „Peaks“ (Stromspitze) abgelöst von einer weniger steil verlaufenden Deaktivierung, bis die Stromspur wieder auf die Null-Linie zurückkehrt, was auf einen Abschluss des depolarisierenden Vorganges hinweist. Um die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren charakterisieren zu können, wurden stufenweise ansteigende Serotoninkonzentrationen (1-100  $\mu\text{M}$ ) und ein Haltepotential von -100 mV gewählt. Die 5-HT Applikationszeit betrug 2 s. Zwischen den Applikationen lagen Zeitintervalle von 60 s (Spülen) zur vollständigen Erholung der Rezeptorkanäle.



**Abbildung 9:** Exemplarische Stromspur eines 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsstroms (Haltepotential: -100 mV). Das Strommaximum ist als „Peak“ gekennzeichnet. Vor und nach dem 5-HT-Impuls wurden die zu messenden Zellmembranflecken für 60 s mit ECS-Puffer perfundiert (angezeigt durch die grauen Balken). Die Phase der 5-HT-Applikation wird durch den weißen Balken angezeigt.

### 3.2. Strom-Spannungs-Kennlinie

Die Verhältnisse zwischen den Membranpotentialen und den durch 5-HT (30  $\mu$ M) induzierten Strömen auf „Outside-Out Patche“ wurden mit Hilfe einer Stromspannungskennlinie in Beziehung zu einander gesetzt. Abbildung 10 zeigt originale Stromspuren (5-HT 30  $\mu$ M), erhoben an einem „Patch“ in Abhängigkeit von der angelegten Spannung.

### ***Strom-Spannungskennlinien***

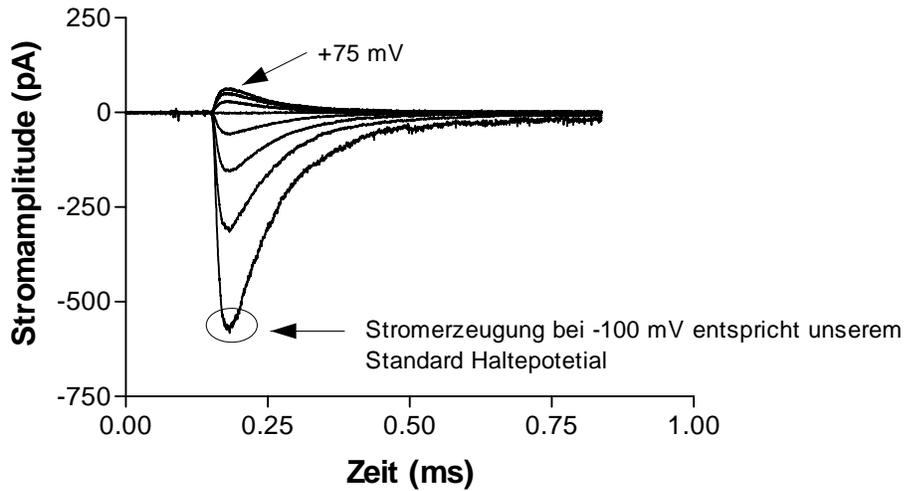


Abbildung 10: Die Original Stromkurven (30  $\mu$ M 5-HT) bei Haltepotentialen zwischen -100 mV und +75 mV (in 25 mV-Schritten).

Im Prinzip wurden Einwärtsströme bei negativer Haltespannung und Auswärtsströme bei positiver Haltespannung erzeugt.

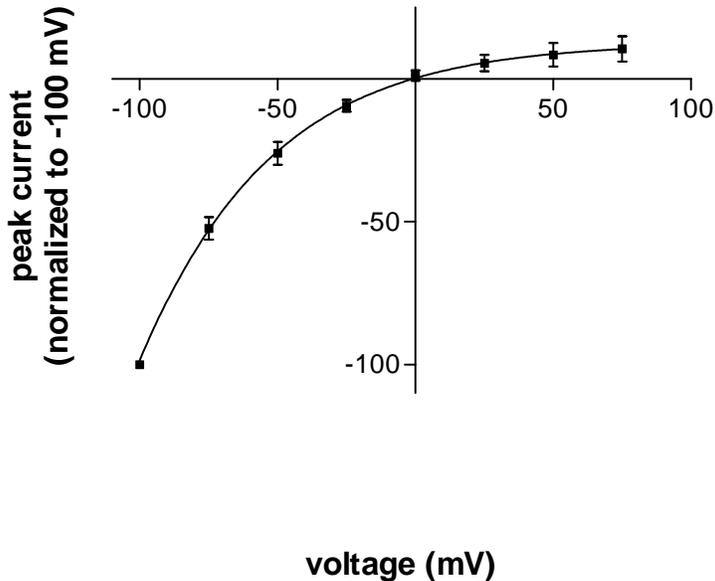


Abbildung 11: Strom-Spannungskennlinie. Gezeigt werden Spannungssprünge zwischen -100 und +75 mV in Schritten von 25 mV bei einer 5-HT-Konzentration von 30  $\mu$ M. Das Umkehrpotential lag bei 0 mV. Membranspannungen unterhalb davon in den negativen Bereich hinein bewirkten einen Einwärtsstrom in die Zelle, bei Spannungen oberhalb von +0 mV kam es zu einem Auswärtsstrom.

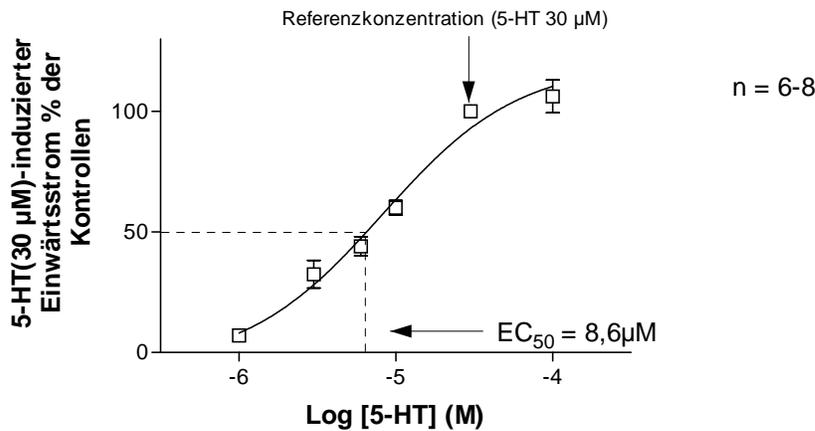
Die Peakströme wurden auf -100mV normiert, gemittelt und die Ergebnisse gegen die Spannung (-100 bis 75mV) aufgetragen. Man erkennt eine zwar nicht lineare aber positive Korrelation zwischen den maximal erreichbaren Strömen und den angelegten Spannungen. Das Umkehrpotential lag für diesen Versuch bei 0 mV. Membranspannungen unterhalb davon bis in den negativen Bereich hinein bewirkten einen Einwärtsstrom, bei Spannungen oberhalb von + 0 mV kam es zu einem Auswärtsstrom. Das Experiment wurde an sechs verschiedenen „Patches“ durchgeführt. In Abbildung 10 wird die Beziehung zwischen Membranpotential und den 5-HT 30  $\mu$ M-evozierten Strömen auf die „Outside-Out Patche“ verdeutlicht.

Aus diesem Experiment ist zu entnehmen, dass die angelegte Spannung einen bedeutenden Einfluss auf die Öffnungswahrscheinlichkeit bzw. das Ausmaß der Öffnung (und somit Strommenge) durch die ligandengesteuerten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren hat.

### 3.3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT

Um eine Konzentrations-Wirkungskurve herstellen zu können, wurden die Maximalströme bei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen („Peaks“) bestimmt und als Prozent der jeweiligen Kontrollstromspur (30  $\mu$ M) dargestellt. Man konnte die Effekte von Serotonin in verschiedenen Konzentrationen auf die Stromamplitude, Anstiegszeiten, Desensibilisierungszeiten und Ladungsmengen (Integral über der Stromspur) erfassen. Die Stromamplitude der durch 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme bei den von uns durchgeführten Messungen lag zwischen 20 und 3000 pA. Die so erhaltene Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT (Siehe Abbildung 12) wurde nach der Hill-Gleichung gefittet. Der EC<sub>50</sub> für diese Experimente, bei n = 6 - 8 (Anzahl der Patche) lag bei 8,6  $\mu$ M 5-HT. Dies bedeutet, dass bei dieser Konzentration eine halbmaximale Effektivität des 5-HT stattgefunden hat. Die Steigung der Kurve entsprach einem Wert von 1,11 (Hill-Koeffizient).

5-HT Konzentrations-Wirkungs-Beziehung



EC<sub>50</sub> = 8,6 µM 5-HT

Best-fit values	
BOTTOM (Constant)	0.0
TOP	116.7
LOGEC50	-5.065
HILLSLOPE	1.110
EC50	8.6020e-006

Abbildung 12: Serotonin- Konzentrations-Wirkungskurve (Haltepotential: -100 mV). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis der durch Serotonin auslösbaren Maximalströme zu den Kontrollströmen (30 µM 5-HT) aufgetragen. Die Kurve wurde nach der Hill-Gleichung gefittet . Eine 50 %-ige Stromantwort (EC<sub>50</sub>) lag bei 8,6 µM; Der- Hill Koeffizient (Steigung der Kurve) bei 1,11.

Nachdem der konzentrationsabhängige Effekt von Serotonin durch die 5-HT-Konzentrations-Wirkungs-Kurve bestimmt war, war es interessant zu wissen, welchen Einfluss das halogenierte Molekül Halothan an diesem Rezeptor zeigt.

### 3.4. Halothan-Effekte

Die Fähigkeit eines Pharmakons, an einem Rezeptor selbst einen Effekt auszulösen, wird als „intrinsische Aktivität“ bezeichnet. Es wurde experimentell geprüft, ob Halothan intrinsische Eigenschaften am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zeigt. Dies erfolgte, indem man Halothan alleine applizierte in Abwesenheit des Agonisten (5-HT) auf einen „Patch“, der Rezeptoren besitzt. Der Test auf intrinsische Aktivität fiel negativ aus (Siehe Abbildung 13). Dies bedeutet: Halothan löste keine Eigenaktivitäten nach Andockung am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor aus.

### Prüfung des Halothans auf intrinsische Aktivität



Abbildung 13. Original Stromspur, negativer Test auf intrinsische Aktivität für Halothan 0,6 mM.

### 3.5. Einfluss der Applikationsart auf die Unterdrückung

Die Konzentrations-Wirkungskurve für Halothan dient zur Einschätzung seiner Potenz (Wirkstärke) am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Diese Konzentrations-Wirkungskurve ließ sich bei drei verschiedenen Lösungs-Applikationsarten durchführen.

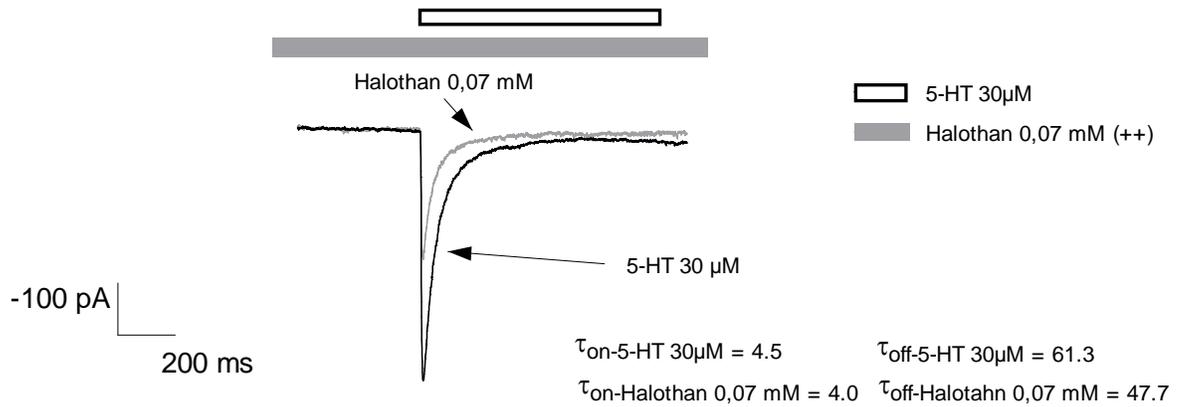
Halothan wurde in fünf aufsteigenden Konzentrationen: 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 3 mM und 5 mM. Zunächst einmal wird anhand von originalen Spuren illustriert, welche Effekte Halothan in den verschiedenen Applikationsmethoden, am Beispiel von jeweils zwei Konzentrationen, hatte.

#### Die Äquilibriumapplikation (++)

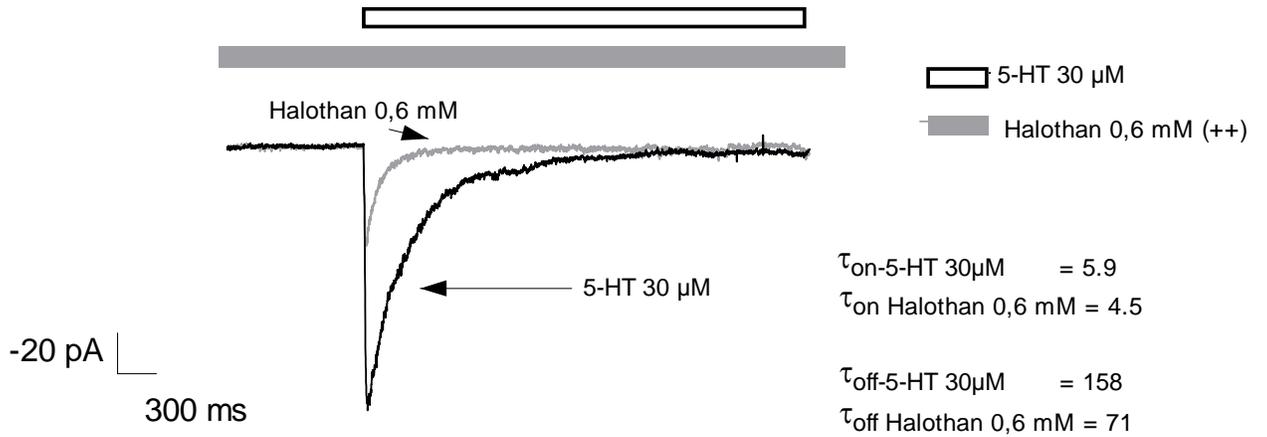
In dieser Applikationsart wurde Halothan für 60 s vor und während der 2 s 5-HT Gabe appliziert. Das entspricht einer kontinuierlichen Applikation. Im Folgenden sehen wir Beispielspuren, die uns den Effekt von Halothan in zwei ausgewählten Konzentrationen deutlicher machen.

**5-HT (30  $\mu$ M)-induzierter Ströme. Der Effekt zweier verschiedener Halothankonzentrationen [0,07 und 0,6 mM; Äquilibrium- (++)**

*Originalspuren: Halothan 0,07 mM + 5-HT 30  $\mu$ M*



*Originalspuren: Halothan 0,6 mM + 5HT-30  $\mu$ M*



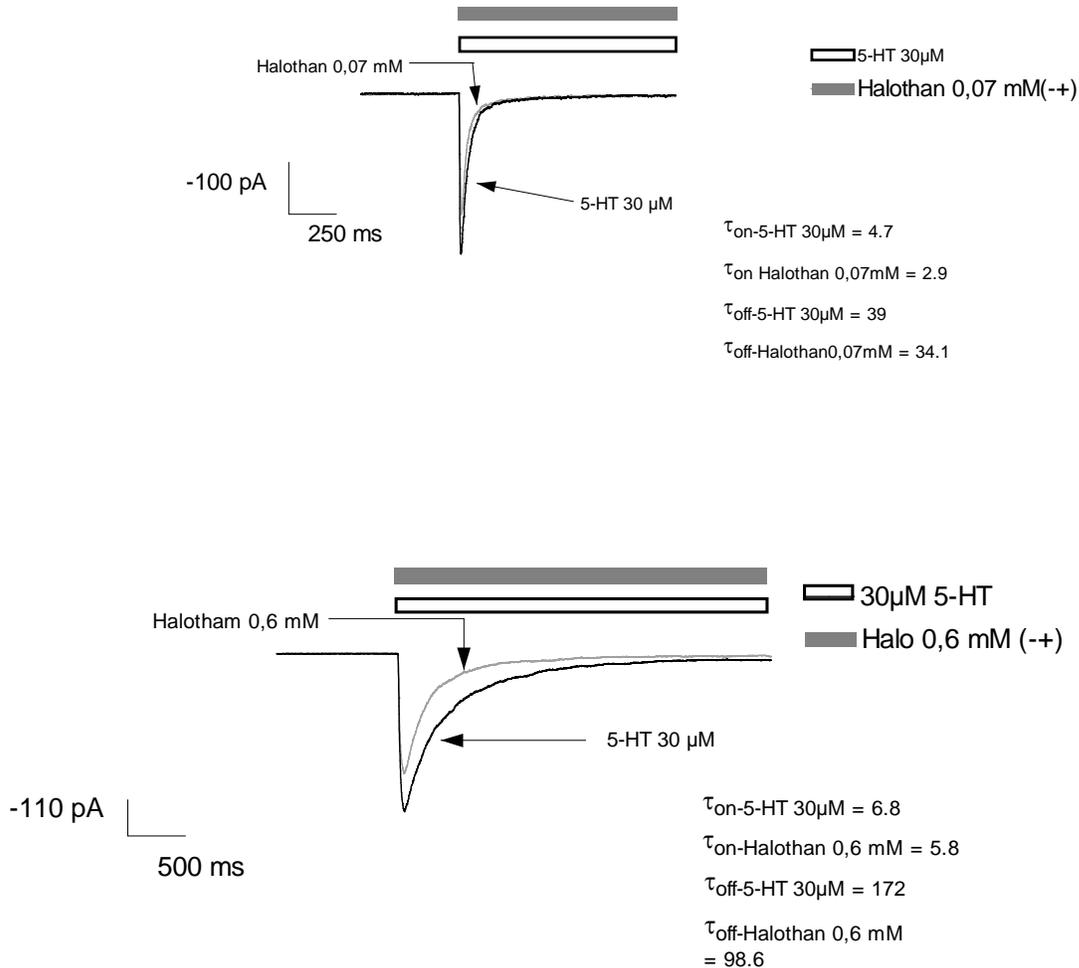
**Abbildung 14: Originalspuren 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierter Ströme (-100mV Haltepotential). Der Effekt zweier verschiedener Halothankonzentrationen [0,07 und 0,6 mM; Äquilibrium- (++)] wird dargestellt. Die Inaktivierung der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme ist unter Gabe von Halothan sichtbar beschleunigt. Es erfolgte ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt auf die Strommaxima.**

Aus den Kurven wird deutlich, dass Halothan die Stromamplitude konzentrationsabhängig hemmt und die Desensibilisierung ( $T_{\text{off}}$ ) geringfügig beschleunigt. Einerseits haben wir bei der (++)-Applikation eine Verkleinerung der „Peaks“ und eine Beschleunigung der Inaktivierungszeitkonstanten ( $T_{\text{off}}$ ) bzw. kleiner werden der Zeitkonstant, was für einen inhibitorischen Effekt von Halothan spricht. Da der Einfluss auf den Strompeak am aussagekräftigsten ist, kann man insgesamt von einem inhibitorischen Effekt sprechen.

### **Die Offenkanalapplikation (-+)**

Es wurde Halothan ausschließlich während der 2 s 5-HT (30 $\mu$ M)-Pulse gegeben, und der Effekt beobachtet. Vorher wurde der Patch 60 Sekunden lang mit ECS gespült. So ließen sich nochmals die Effekte von Halothan in zwei ausgewählten Konzentrationen auf die 5-HT-induzierte Kurve in der Offenkanal-Applikation (-+) bildlich darstellen.

**5-HT (30  $\mu$ M)-induzierte Ströme. Der Effekt zweier verschiedener Halothankonzentrationen [0,07 und 0,6 mM; Offenkanal (-+)]**



**Abbildung 15: Originalspuren 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierter Ströme (-100mV Haltepotential). Der Effekt zweier Halothankonzentrationen [0,07 und 0,6 mM; Offenkanal- (-+)] wird dargestellt. Die Inaktivierung der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme ist unter Gabe von Halothan beschleunigt (Siehe Zeitkonstanten). Ebenfalls ist eine Unterdrückung der erreichten Strommaxima zu sehen. Die Strommaxima waren leichter gehemmt als im Äquilibrium-Applikationsmodus.**

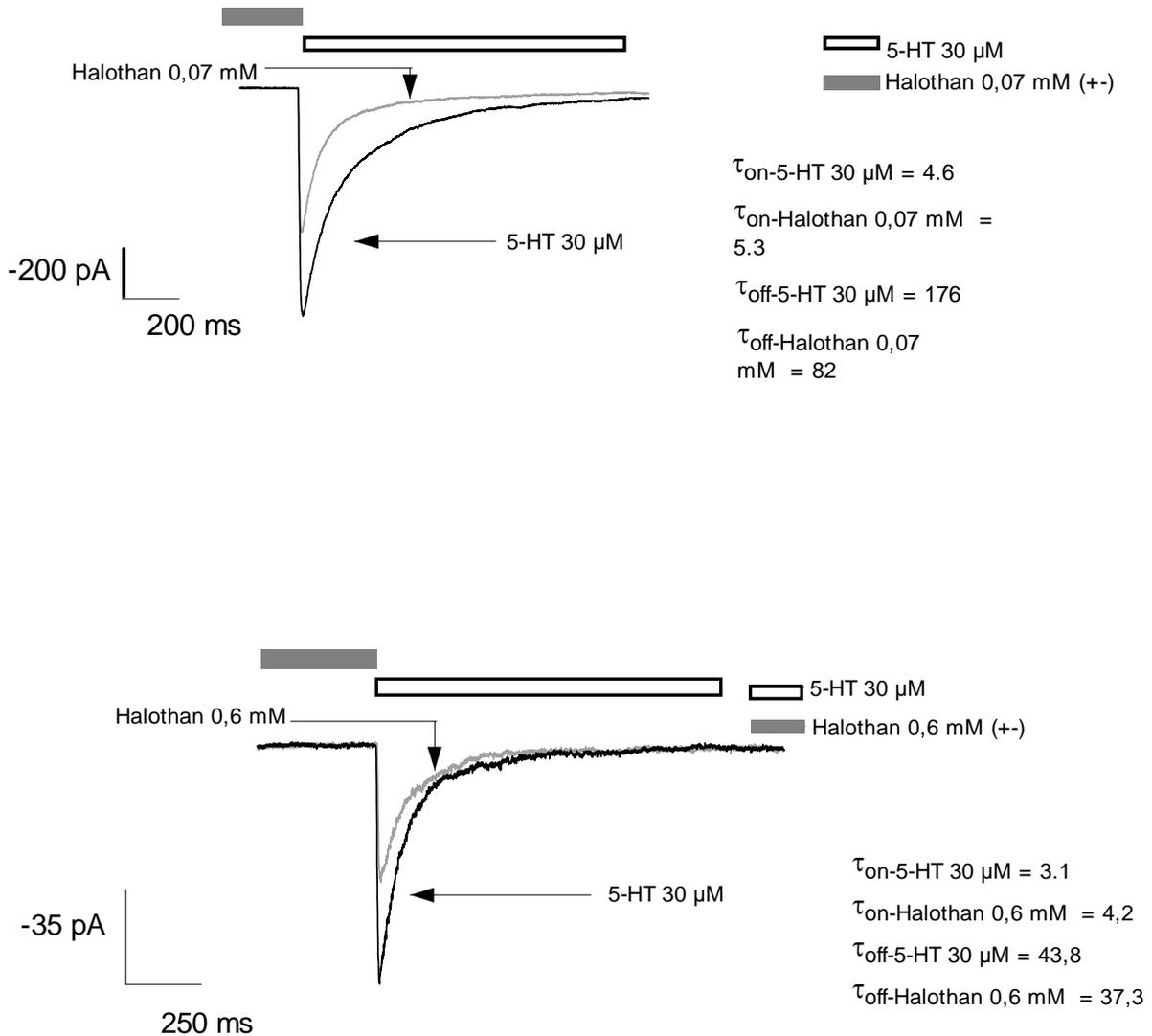
Ebenfalls zu erkennen war eine Beschleunigung der Aktivierungs- und Inaktivierungszeitkonstanten. In „Patchen“, die zuvor bei 5-HT (30  $\mu$ M)-Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste Halothan in Anwesenheit (-+) des Agonisten eine konzentrationsabhängige Hemmung aus. Bei noch höheren Konzentrationen (5mM) löste Halothan in Anwesenheit des Agonisten eine deutliche Beschleunigung der Inaktivierung

(Hemmung) und, ähnlich wie in den (++) Experimenten, eine geringgradige Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstanten (Potenzierung) aus. Das Ausmaß der Verkleinerung der 5-HT-induzierten Stromamplituden korrelierte mit der Halothan Konzentration. Dieses spricht für eine konzentrationsabhängige Inhibierung der 5-HT-induzierten Ströme durch Halothan in der Gegenwart des Agonisten.

### **Die Geschlossenkanalapplikation (+-)**

In dieser Versuchskonstellation wurde Halothan ebenfalls für 60 s appliziert, allerdings ausschließlich vor der 5-HT Applikation. Die Effekte sind genauso ausgewertet worden wie an den oben gezeigten Beispielen der Offenkanal- und Äquilibriumapplikationen.

**5-HT (30  $\mu$ M)-induzierte Ströme. Der Effekt zweier verschiedener Halothankonzentrationen [0,07 und 0,6 mM; Geschlossenkanal (+-)]**

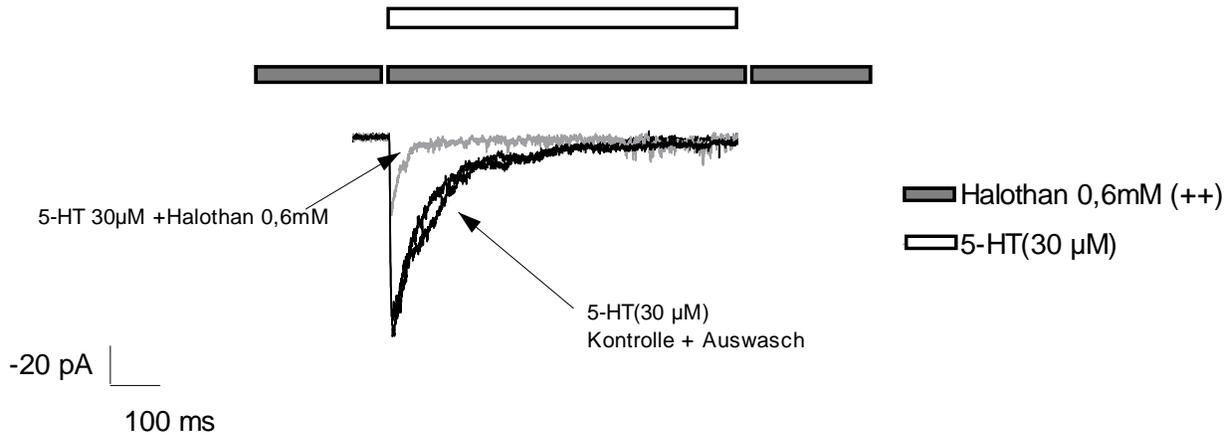


**Abbildung 16: Originalspuren 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierter Ströme (-100mV Haltepotential). Es wurde der Effekt zweier verschiedener Halothankonzentrationen [0,07 und 0,6 mM; Geschlossenkanal-Applikation (+-)] dargestellt. Die Inaktivierung der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme ist unter Gabe von Halothan deutlich beschleunigt.**

Aus den Beispielspuren der Konzentrations-Wirkungskurven wird klar, dass Halothan die Amplitude der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme konzentrationsabhängig reduziert hat. Dieser Effekt wird durch die in den Abbildungen 14-16 gezeigten Originalspuren verdeutlicht. Diese

Unterdrückung war reversibel, da mindestens 90 % der Kontrollamplitude nach einem Auswasch für 60 s (siehe Abbildung 17) wieder erreicht wurde.

**Reversible Unterdrückbarkeit des 5-HT-induzierten Stroms durch Halothan 3 mM**



**Abbildung 17: Reversible Unterdrückung der 5-HT-induzierten Stromspur. Etwa 95%-ige Wiedergabe nach 60 s Auswasch von Halothan mit ECS.**

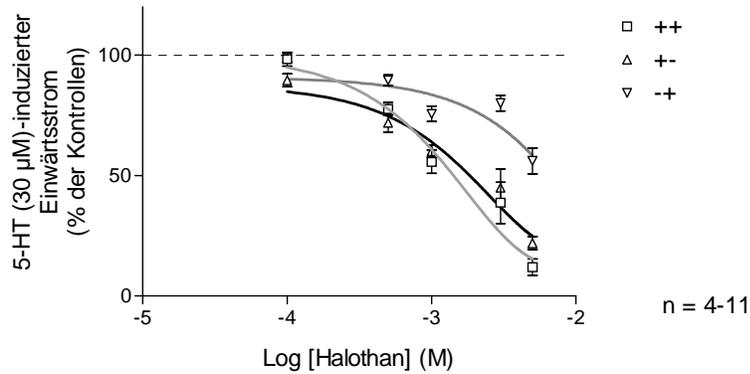
Aus den oben angegebenen Abbildungen ist zu entnehmen, dass Halothan die Amplitude der 5-HT (30µM)-induzierten Ströme konzentrationsabhängig bzw. progressiv unterdrückt, und zwar mit steigender Konzentration (EC<sub>50</sub> wert = 0,6 mM; die Substanz wurde im Äquilibrium appliziert, ++, s. Methoden).

Nachdem die einzelnen Wirkungen von Halothan in den verschiedenen Applikationsmodi charakterisiert wurden, ist es nun wichtig, die gesamten Effekte nebeneinander zu stellen und deren Verhältnis zueinander zu betrachten. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Halothan wurde für die drei Applikationsarten, kontinuierliche Applikation (++) , Offenkanaal-Applikation (-+) und Geschlossenkanaal-Applikation (+-) erstellt.

Die (++) und (+-) Kurven konnten am besten durch Sigmoidal, monoexponentielle Dosis-Wirkungsbeziehungen beschrieben werden, die (-+) Konzentrations-Wirkungskurve wurde durch Punkt-zu-Punkt-Linien-Verbindung erfasst (Abbildung 19). Zur Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungskurven hat man die oben angegebenen Halothankonzentrationen

logarithmiert und gegen die prozentuale Wiedergabe der Peakströme in Bezug auf die originale 5-HT 30 $\mu$ M induzierte Kurve aufgetragen. Die Ergebnisse wurden mit der Hill-Gleichung gefittet.

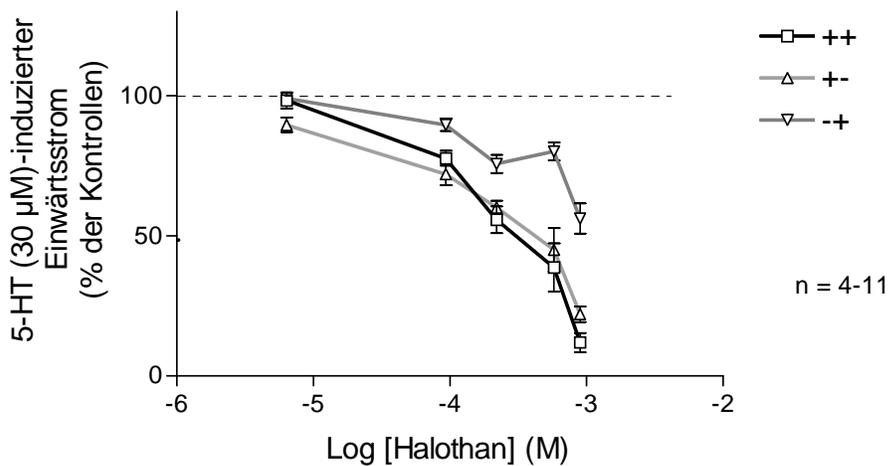
A.) Halothan-Konzentrationswirkungskurven in allen Applikationsmodi;  
Nicht korrigierte Version.



Fitparameter für die einzelnen Applikationsmodi

	++	+-	-+
Equation 1			
Best-fit values			
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0	0.0
TOP (Constant)	100.0	100.0	100.0
LOGEC50	-2.875	-2.801	-2.027
HILLSLOPE	-1.213	-0.8717	-0.6477
EC50	0.001333	0.001580	0.009406

B.) Halothan Peaks; korrigierte Version

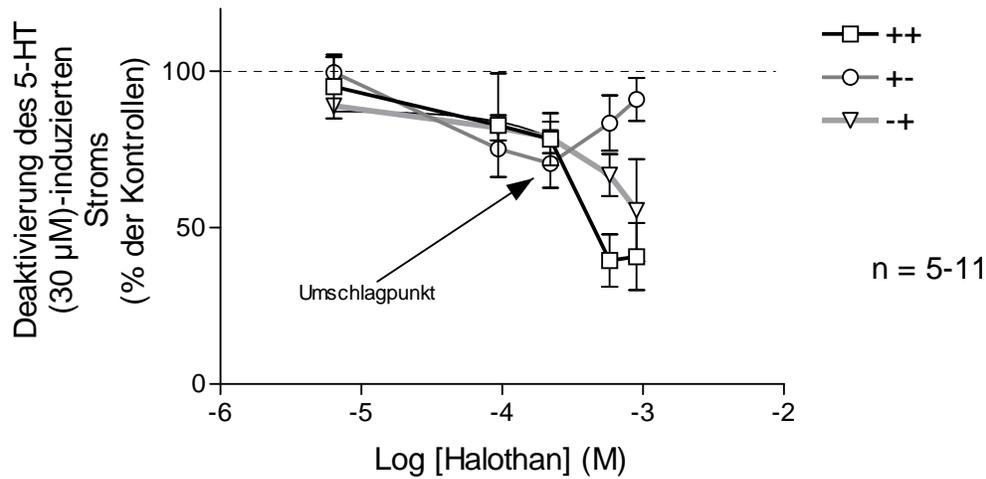


**Abbildung 18: Gegenüberstellung der nicht gaschromatographisch bestimmten A.) und der gaschromatographisch bestimmten B.) Halothankonzentrationen.**

Wie aus beiden oben dargestellten Abbildungen ersichtlich, verringerte sich die Halothankonzentration im Verlauf der Experimente aufgrund ihrer Volatilität, da sich eine Verschiebung der Kurven (Korrigierte Version) nach links ergibt. Gesichert wurde dies durch die gaschromatographischen Bestimmungen. Bei höheren Halothankonzentrationen verlief die Konzentrations-Wirkungs-Kurve sowohl bei (++) (Äquilibrium-Applikation), als auch bei (+-) (Geschlossenkanal-Applikation) steiler als beim Offenkanalapplikationsmodus (-+). Daraus geht hervor, dass nur durch längere Vorapplikation und die gemeinsame Applikation mit Serotonin eine maximal mögliche Inhibierung zu erreichen ist. Die  $IC_{50}$ -Werte dieser Inhibierung lagen bei 0,028 mM für die (++) Applikation und bei jeweils ca. 0,43 mM und 1,73 mM für die (+-) und die (-+) Applikationen.

### 3.6. Einfluss von Halothan auf die Stromkinetiken

### Halothan (Korrigierte Version)



	++	+-	-+
Equation 1	Floating point error.		
Best-fit values			
BOTTOM (Constant)		0.0	0.0
TOP		1.6600e+006	87.37
LOGEC50		-159.3	-2.820
HILLSLOPE		-0.02763	-1.145
EC50		0.0	0.001515
Std. Error			
TOP		1.4940e+012	11.52
LOGEC50		1.4160e+007	0.2509
HILLSLOPE		1.284	1.049

**Abbildung 19: Darstellung des Einflusses von Halothan auf die Inaktivierung**

Die Beobachtung der Halothaneinflüsse auf die Inaktivierung zeigt interessante Ergebnisse, und zwar abhängig von der Applikationsart auf den Patch: Der größte beschleunigende Effekt ergibt sich, wenn Halothan 60 s vor und während des 2 s dauernden 5-HT-Pulses appliziert wird (++ , Äquilibrium-Applikation). Eine submaximale Wirkung wird gemessen, wenn Halothan ausschließlich während der 5-HT-Gabe appliziert wird (-+ , Offenkanal-Applikation). Bei ausschließlicher, 60 s dauernder Applikation von Halothan vor der Öffnung der Kanäle durch 5-HT (+- , Geschlossenkanal-Applikation) ist die Halothan-Potenz deutlich erniedrigt.

In der Geschlossenkanal-Applikation (+-) beeinflusste Halothan die Desensibilisierung durch eine verhältnismäßig stärkeren Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstanten (bis zu ca. 30% Hemmung „+- Kurve“ bzw. „Umschlagpunkt“) bei tatsächlich gemessenen Substanzkonzentrationen von  $\leq 0,22$  mM. Die darüber hinaus liegenden Halothankonzentrationen führten zu verhältnismäßig geringerer Beschleunigung.

### 3.7. Kinetische Charakterisierung der Halothan-Effekte

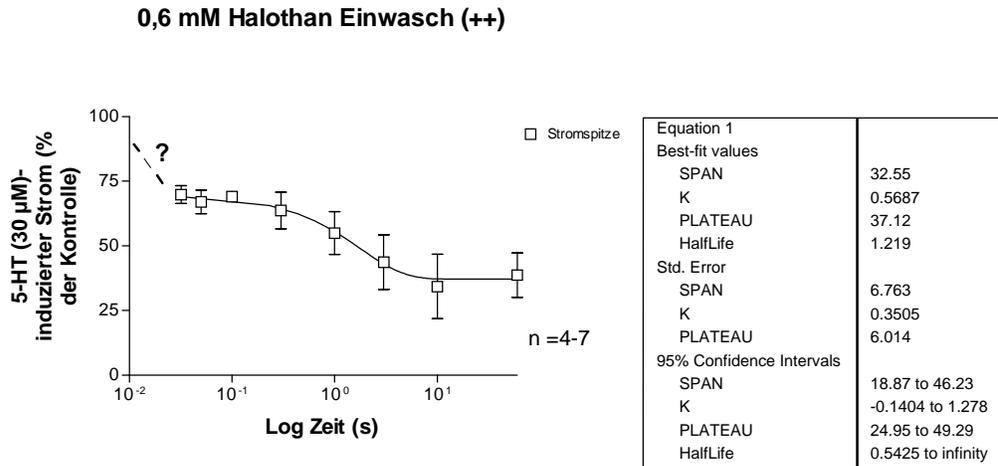
Um die Kinetik der Halothaneffekte besser verstehen zu können, wurden bei dem  $IC_{50}$ -Wert (3 mM, nicht korrigiert; 0,6 mM, korrigiert) die Ein- und Auswaschzeitkonstanten im (++)-Applikationsmodus gemessen (der Zeitverlauf bis zum Äquilibrium-effekt).

#### Halothan Einwaschexperimente

Man führte die Einwaschexperimente durch, um einen Eindruck über die Kinetik des Halothans am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zu haben. Dies entspricht einer „Äquilibrium-Applikation“, bei der man jedoch die Vorapplikationszeit so variiert, dass sich erkennen läßt, wie schnell ein induzierter Effekt vollständig zum Tragen kommt. Die Prä-Expositions-Zeitintervalle von Halothan auf den Patch waren: 32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s und 60 s. Die kürzeste Einwaschzeit von 32 ms musste gewählt werden, da die kleinste mögliche Drehkopfgeschwindigkeit (Wechsel von „tube“-Mittelpunkt zu „tube“-Mittelpunkt) auf 30 ms vom Steuerungsprogramm begrenzt ist.

An dieser Stelle sollte gesagt werden, dass die gaschromatographischen Konzentrationsmessungen noch nicht durchgeführt waren, so dass theoretische 3 mM Halothan weiterhin für verschiedene o.a. Vorlaufzeiten angesetzt wurde. Der tatsächliche Wert war aufgrund der Volatilität der Substanz kleiner und betrug ca. 0,6 mM (siehe korrigierte Konzentrations-Wirkungskurven). Das Ziel dieses Experimentes war es, zu sehen, wie lange man die Substanz applizieren musste, um eine 50%-ige Hemmung festzustellen bzw. schnelle und langsame Effekt zu trennen.

Um die Einwaschkurve für Halothan darzustellen, wurden die Vorapplikationszeiten logarithmiert und gegen die 5-HT induzierte Kurve als Prozentsatz der Referenzkonzentration (5-HT 30  $\mu$ M) aufgetragen. Die Ergebnisse wurden mit einer in Prism vorhandenen Gleichung gefittet. Beobachtet wurde der Effekt auf die Stromamplitude und die Desensibilisierungszeitkonstante.



**Abbildung 20: Einwaschkurve von 0,6 mM Halothan. 32ms, 50ms, 100ms, 300ms, 1s, 3s und 10s. Kontrolle (30 µM 5-HT); Einwasch von 0,6 mM Halothan im ++ Modus (Mittelwerte ± SEM). Kontrollen mit 30 µM 5-HT. Die ersten 32 ms waren nicht auflösbar, danach waren die Effekte von der Dauer der Vorapplikation abhängig. Tabelle rechts; Fitparameter für den Einwasch.**

In Abb. 20 werden zwei zeitlich getrennte inhibitorische Effekte beobachtet. Man sieht eine sofortige, nach 32 ms stattfindende Hemmung, der ein kurzes Plateau folgt. Das Experiment wurde mit nur einer monophasischen Zeitkonstante von 1,8 Sekunden beschrieben.

Der erste Prozess bzw. Hemmeffekt durch Halothan war nicht auflösbar, siehe auch (-+) Experiment, bzw. war zu plötzlich.

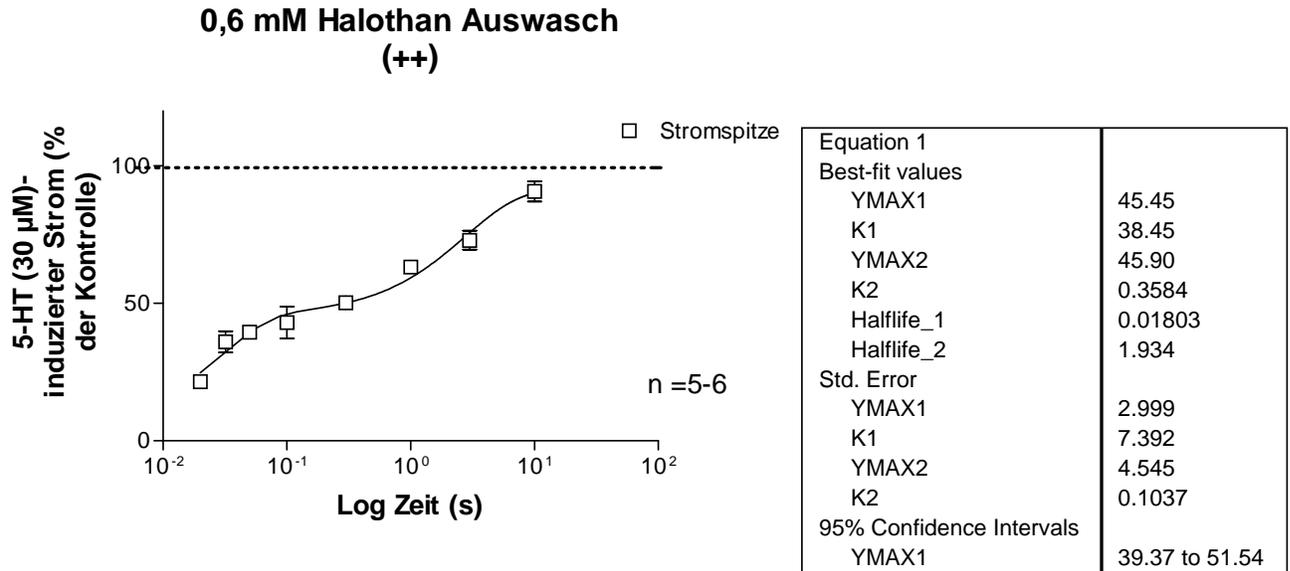
Der zweite Prozess beginnt nach 300 ms und erreicht eine Plateauphase nach 10 s Einwaschzeit. Nach 10 Sekunden Einwasch war der hemmende Effekt schon abgeschlossen, da bei längeren Einwaschzeiten keine weitere Inhibierung zu verzeichnen war. Die Inaktivierung spielte keine Rolle für die Kinetik, da die  $\tau_{off}$ -Werte unabhängig von den Einwaschzeiten, konstant geblieben sind.

### Auswaschexperimente

Die Auswaschexperimente wurden ebenfalls zur Charakterisierung der Kinetik des Halothans angewendet. In diesen Experimenten wurde Halothan für 60 s auf den Patch appliziert. Bevor dann 2 Sekunden Strompulse durch Serotonin induziert wurde, wurde der Patch unterschiedlich lange mit ECS gespült, um zu prüfen, wie schnell ein induzierter Effekt wieder ausgewaschen werden kann. Vereinfacht gesagt, wie schnell oder wie leicht lassen sich die Halothanmoleküle vom Rezeptor trennen. Die Auswasch-Zeitintervalle entsprachen wieder: 32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s und 60 s.

Genauso wie bei den Einwasch-Experimenten wurden zur Erstellung der Halothan-Auswaschkurve die Auswaschzeiten logarithmiert und gegen die 5-HT induzierte Kurve als Prozentsatz der Referenzkonzentration (5-HT 30  $\mu$ M) aufgetragen. Die Ergebnisse wurden mit einer in Prism angegebenen Gleichung gefittet. Beobachtet wurde wiederum der Effekt auf die Stromamplitude und die Desensibilisierungszeitkonstante. Bedingt durch die Form der Konzentrations-Wirkungskurve konnte an die Datenpunkte der Desensibilisierungszeitkonstante keine Funktion angepasst werden. Das Integral hat für die Beurteilung der Kinetiken eine geringere Aussagekraft und wurde deswegen nicht berücksichtigt.

**Auswasch (Halothan):**



**Abbildung 21: Auswasch von 0,6 mM Halothan (Mittelwerte ± SEM) für die Zeiten 20 ms, 32ms, 50ms, 100ms, 300ms, 1s, 3s und 10s. Kontrolle (30 µM 5-HT). Tabelle rechts; Fitparameter für den Auswasch.**

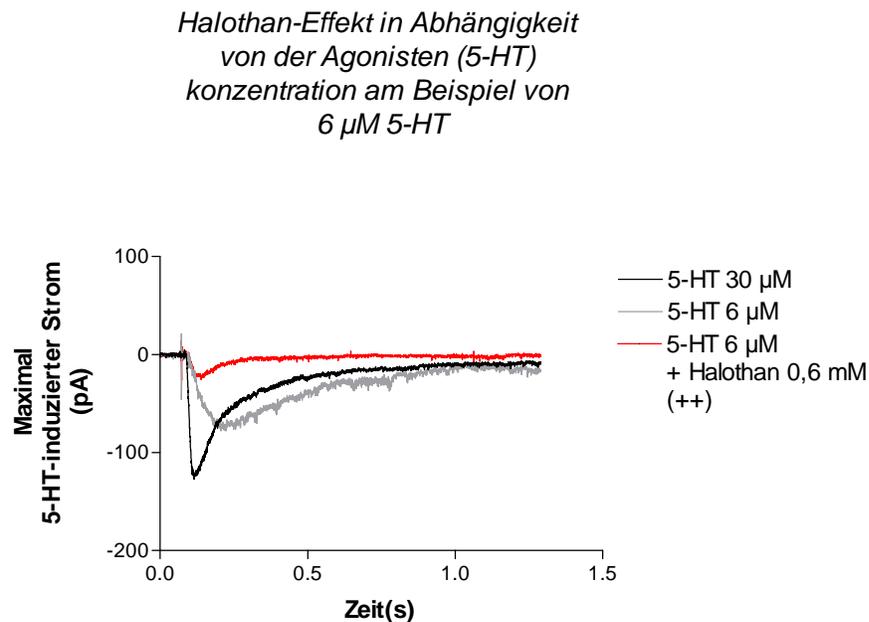
Die Auswaschkurve ließ sich biexponentiell fitten. Während die Auswaschkinetik beim Peak sigmoidal verläuft und nach 10 Sekunden noch nicht vollständig abgeschlossen ist, ist die Erholung der Desensibilisierung-Kinetik bereits nach 50 ms abgeschlossen.

**3.8. Pharmakologische Charakterisierung der Halothan-Effekte**

**Abhängigkeit von der Agonisten (5-HT) Konzentration**

In diesem Abschnitt wurden Experimente durchgeführt, in denen der Einfluss von 3mM (0.6 mM gemessen) Halothan auf die 5-HT-induzierte Stromkurve bei unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen untersucht wurde. Diese Experimente, die in Äquilibrium-, Offenkanal- und Geschlossenkanalmodi durchgeführt wurden, dienten dazu, zu zeigen, ob Halothan möglicherweise an dem gleichen Punkt angreift wie 5-HT, also kompetitiv ist oder nicht.

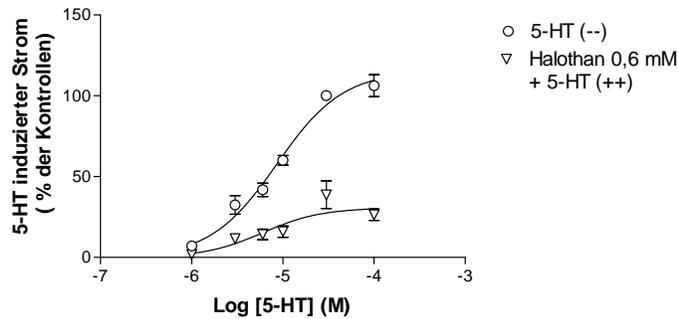
Der Ablauf der Experimente war so, dass zuerst eine 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierte Stromspur hergestellt wurde. Nach einem Intervall von 60 s kam z.B. eine 5-HT (6- $\mu\text{M}$ )-induzierte Stromspur, der dann nach weiteren 60 s eine gemeinsame Applikation von 5-HT und Halothan in den verschiedenen Applikationsmodi (++) , (-+) und (+-) folgte. Anhand von Abbildung 22 soll dieser Sachverhalt illustriert werden.



**Abb. 22:** Beispielkurve einer 30  $\mu\text{M}$  + 6 $\mu\text{M}$  5-HT Äquilibriumapplikation in Gegenwart von Halothan 3 mM.

Anhand der Abbildung wird ersichtlich, dass Halothan sowohl einen hemmenden Effekt auf die „Peaks“, als auch einen Verkleinerungseffekt auf die „Flächen über den Kurven“ bewirkt. Zur Charakterisierung des Einflusses von Halothan wurden komplette 5-HT Konzentrations-Wirkungs-Kurven in An- und Abwesenheit von 5-HT erstellt. Zunächst sehen wir die Effekte auf die Stromamplituden in allen Applikationsmodi (Abb. 23).

A.) Einfluss von Halothan ( $IC_{50}$ -Wert = 0,6mM) auf die 5-HT-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Äquilibrium-Applikationsmodus (Peak)



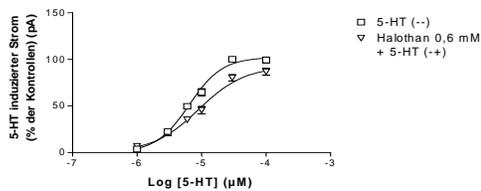
Fitparameter

Equation 1	5-HT [-] Peaks	Halo+5-HT [+] Peak
Best-fit values		
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP	115.4	30.59
LOGEC50	-5.066	-5.217
HILLSLOPE	1.196	1.358
EC50	8.5870e-006	6.0620e-006

Abbildung 23A: Effekte von Halothan ( $IC_{50}$  Wert = 0.6 mM) auf die Stromamplitude 5-HT(1-100  $\mu$ M)-induzierter Ströme (Äquilibrium-Applikation).

Man sieht bei allen 5-HT-Konzentrationen eine etwa 70%-ige gleichmäßige Hemmung.

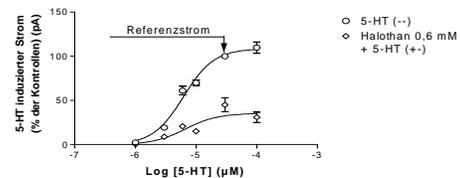
B.) Einfluss von Halothan ( $IC_{50}$  = 0,6 mM) auf 5-HT-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Offenkanal-Applikationsmodus (Peak)



Fitparameter

Equation 1	5-HT [-] Peaks	Halo+5-HT [+] Peak
Best-fit values		
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP	102.2	92.41
LOGEC50	-5.191	-5.046
HILLSLOPE	1.685	1.213
EC50	6.4360e-006	9.0040e-006

C.) Einfluss von Halothan ( $IC_{50}$  = 0,6 mM) auf 5-HT-Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Geschlossenkanal-Applikationsmodus (Peak)



Fitparameter

Equation 1	5-HT [-] Peaks	Halo+5-HT [+] Peak
Best-fit values		
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP	108.5	35.33
LOGEC50	-5.207	-5.174
HILLSLOPE	1.725	1.647
EC50	6.2130e-006	6.8960e-006

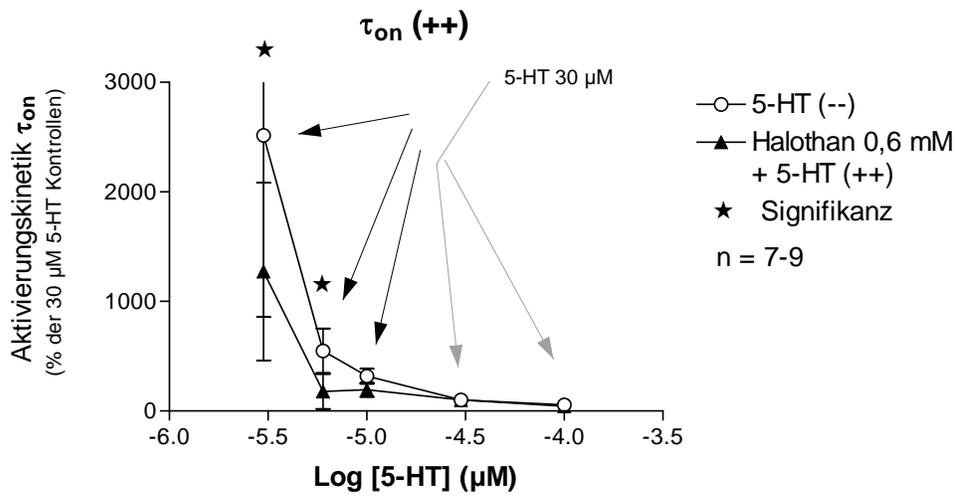
Abbildung 23 B+C: Effekte von Halothan ( $IC_{50}$  Wert = 0.6 mM) auf die Stromamplitude 5-HT(1-100  $\mu$ M)-induzierter Ströme im Offenkanal (B) - und Geschlossenkanalmodus (C).

Ebenfalls ist bei der Geschlossenkanalapplikation bei fast allen Agonistenkonzentrationen eine gleichmäßige Hemmung zu verzeichnen. Allerdings ist bei der Offenkanalapplikation eine deutlich geringere Antagonisierung des Serotonineffektes festzustellen.

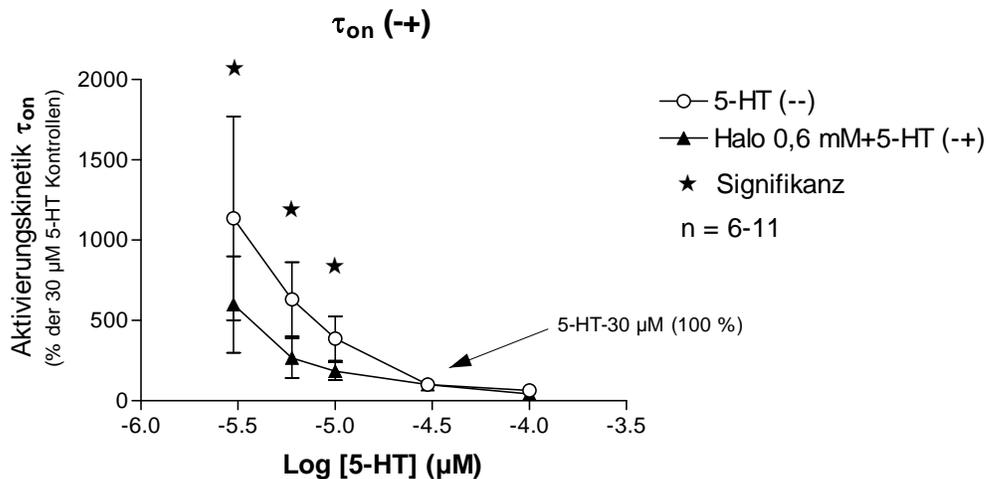
### Einfluss von Halothan auf die Aktivierungskinetik

Folgende Abbildungen sollen Aufschluss geben über Halothaneffekte auf weitere Parameter (Stromkinetiken).

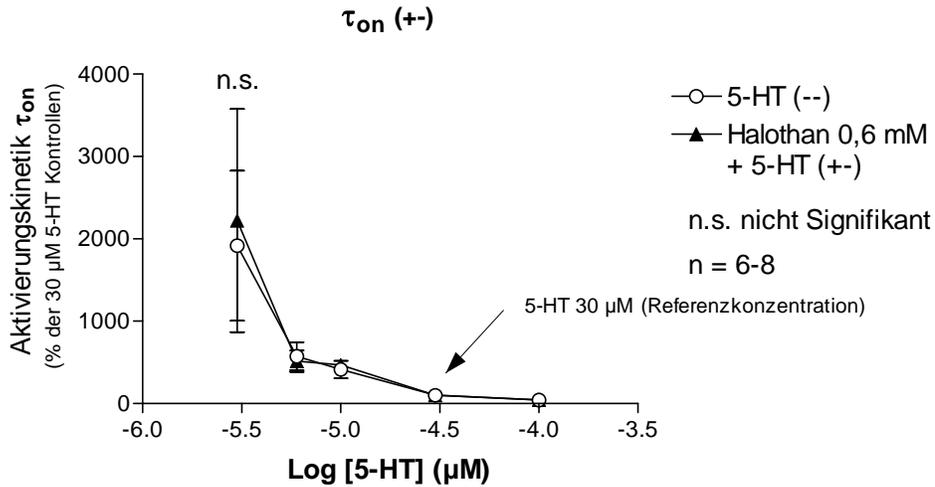
A. ( $\tau_{on}$  Äquilibriumapplikation, ++)



B:  $\tau_{on}$  (Offenkanalapplikation, -+)



C:  $\tau_{on}$  (Geschlossenkanalapplikation, +-)



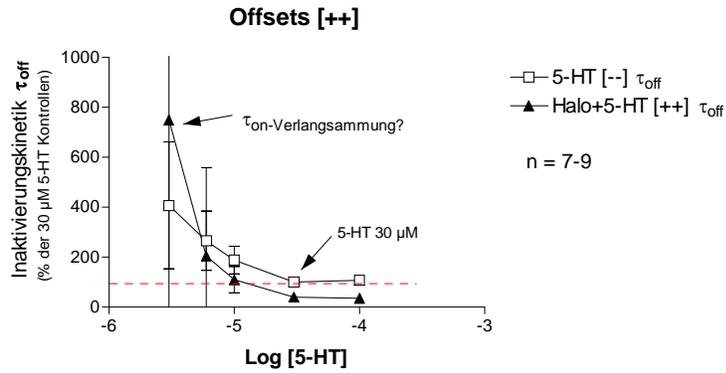
**Abbildung 24: Einfluss von Halothan auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) des 5-HT (1-100  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstroms. Das Volatile Anästhetikum wurde im (A) Äquilibrium - (++) , (B) Offenkanal- (-+) und (C) Geschlossenkanal-Applikationsmodus (+-) auf den „patch“ appliziert. Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{on}$ ) wurden in Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. (n = 6-11, Halothan 0,6 mM), (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms).**

Die Beschleunigung der Aktivierungskinetik war abhängig von der 5-HT-Konzentration und der Applikationsart des Halothan: Sie war ausgeprägt bei kleinen 5-HT-Konzentrationen ( $< 10 \mu\text{M}$  5-HT) und der Applikation während des 5-HT-Pulses. Dementsprechend wurde sie bei Geschlossenkanal-Applikation nicht beobachtet.

### **Einfluss von Halothan auf die Inaktivierungskinetik**

Halothan wirkte nicht nur auf die Stromamplitude und die Aktivierungskinetik, sondern beeinflusste auch die Desensibilisierungskinetik. In Abbildung 25 wird die Abhängigkeit der Halothanwirkungen auf die Inaktivierungskinetik von der 5-HT Konzentration dargestellt.

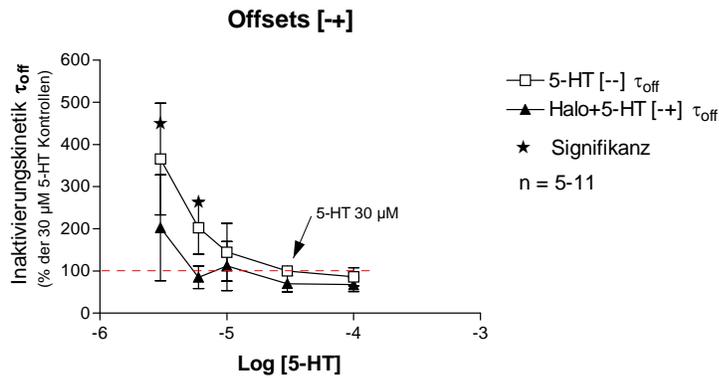
**A:  $\tau_{off}$  (Äquilibriumapplikation, ++)**



**Fitparameter:**

	5-HT [-] Offsets	Halo+5-HT [++] Offs
Best-fit values		
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP	5428	1.5160e+007
LOGEC50	-7.485	-7.968
HILLSLOPE	-0.5647	-1.762
EC50	3.2710e-008	1.0760e-008
Std. Error		
TOP	96002	2.5090e+012
LOGEC50	16.72	40844
HILLSLOPE	0.5047	7.605

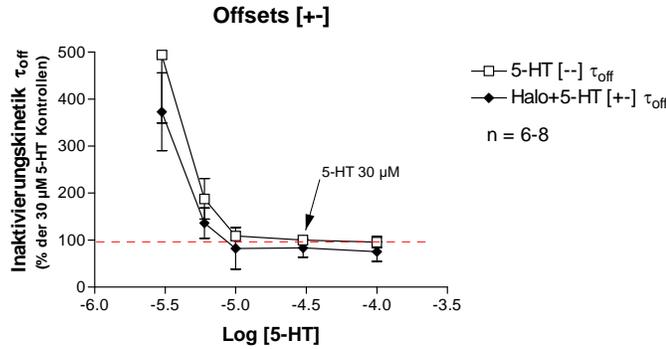
**B:  $\tau_{off}$  (Offenkanalapplikation, +-)**



**Fitparameter:**

	5-HT [-] Offsets	Halo+5-HT [-+] Offs
Best-fit values		
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP	12806	98.28
LOGEC50	-8.485	-23.55
HILLSLOPE	-0.5347	1.000
EC50	3.2700e-009	2.8220e-024
Std. Error		
TOP	457620	0.0
LOGEC50	31.25	0.0
HILLSLOPE	0.2912	0.0

C:  $\tau_{off}$  (Geschlossenkanalapplikation, +-)



Fitparameter:

	5-HT [-] Offsets	Halo+5-HT [+] Offs
Best-fit values		
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP	1.7320e+008	174218
LOGEC50	-10.79	-8.046
HILLSLOPE	-1.056	-1.068
EC50	1.6120e-011	9.0030e-009
Std. Error		
TOP	0.0	9.0350e+007
LOGEC50	0.0	215.2
HILLSLOPE	0.0	0.6664

**Abbildung 25: Einfluss von Halothan auf die Inaktivierungskinetik ( $\tau_{off}$ ) der 5-HT (3-100  $\mu$ M)-induzierten Ströme. Das Volatile Anästhetikum wurde in (A) Äquilibrium- (++) , (B) Offenkanal- (-+) und (C) Geschlossenkanal Applikationsmodus (+-) appliziert. Die Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{off}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms).**

Interessant ist es zu sehen, wie stark Halothan die Inaktivierungskinetik bei Agonistenkonzentrationen unter 10  $\mu$ M in der Offenkanalapplikation (-+) beschleunigt, was einer Inhibierung entspricht. Tendenziell war dieser Effekt ähnlich wie die oben beschriebene Aktivierungsbeschleunigung ähnlich abhängig von der 5-HT-Konzentration und der Applikationsart während des 5-HT-Pulses. Dementsprechend ist er in Abbildung (25 B) am deutlichsten zu erkennen.

### 3.2.5. Konzentrationsänderungen während der Ströme

Bei den Konzentrationssprungexperimenten wurde ein Strom mit 30  $\mu\text{M}$  5-HT erzeugt und 50 ms nach dem Beginn des Agonistenpulses (nach dem Peakstrom) eine Lösung mit 50%-iger Elektrolytkonzentration, bzw. eine Lösungskombination aus 5-HT und Halothan appliziert. Während des Wechsels zwischen den beiden Lösungen wurde ein Sprung im makroskopischen Stromverlauf sichtbar, dessen Zeitkonstanten (a) zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit des Perfusionssystems (Elektrolytsprung) und (b) zur Charakterisierung sehr schneller ( $< 32$  ms) Halothanefekte (Substanzsprung) herangezogen werden konnten (siehe Abbildung 26). Der Beginn des Sprungs, also die Applikation der 50%-igen Elektrolytlösung oder des Halothans, wurde im Folgenden immer durch einen Pfeil verdeutlicht (Siehe Abbildung 26).

#### Konzentrationsprungexperimente

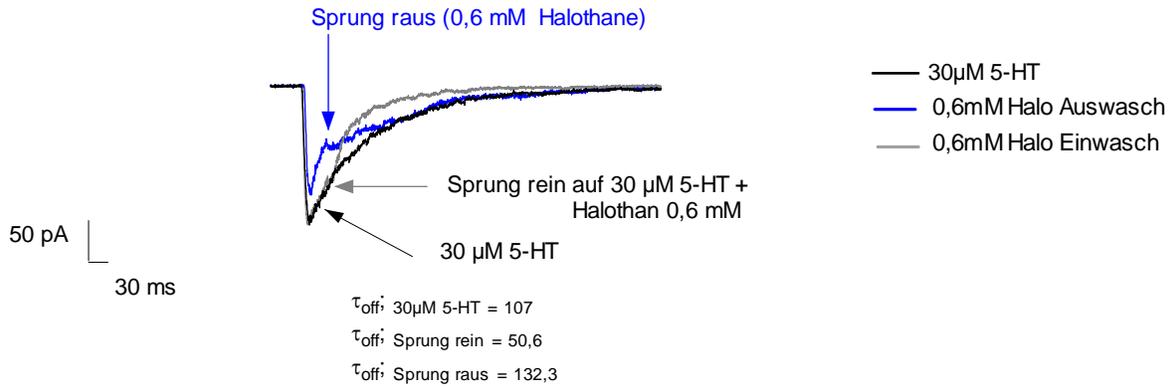
Da bei den Einwaschexperimenten aufgrund von technischen Bedingungen die kürzeste Einwaschzeit 32 ms betrug, wurden Konzentrationssprungexperimente durchgeführt, um den Prozess, der in den ersten 32 ms nach der Halothanapplikation einsetzt, genauer zu differenzieren. 50 ms nachdem die Stromapplikation durch 30  $\mu\text{M}$  5-HT induziert worden war, wurde eine bestimmte Halothankonzentration (in diesem Fall mit dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0,6 mM) simultan mit dem 2 s langen 30  $\mu\text{M}$  5-HT Puls appliziert. Auch der Auswasch wurde bei diesen Konzentrationen bestimmt und mit dem Einwasch verglichen. Die Konzentrationsprünge-Raus wurden so konfiguriert, dass nach einer simultanen Applikation von Halothan mit 5-HT, Halothan ausgewaschen wurde.

Beim Auswasch von Halothan (Konzentrationsprung raus; siehe blaue Kurve) bemerkte man eine Verlangsamung der Desensibilisierung (dies bedeutet eine Potenzierung). Hier werden zunächst nochmals Kanäle durch 5-HT geöffnet. Diese desensibilisieren sehr viel langsamer als die 5-HT induzierte aber durch 0,6 mM Halothan gehemmte Ströme.

Ist beim Sprung Halothan 0,6 mM enthalten (Konzentrationsprung rein; siehe graue Kurve), werden noch mehr Kanäle geschlossen. Die so induzierten Ströme desensibilisieren schneller als die 30  $\mu\text{M}$  5-HT Kontrollen, aber deutlich schneller als die, die ohne 0,6 mM Halothan (Sprung raus) induziert wurden (Abb. 26).

Beispielspuren:

**Konzentrations sprünge auf 0,6 mM Halothan + 30  $\mu$ M 5-HT.**



**Abbildung 26: Beispielspuren für Konzentrations sprünge auf 0.6 mM Halothan.**

**Kontrolle : 30 $\mu$ M 5-HT**

Es geht nun darum, zu verstehen, wie schnell die Wirkung von Halothan auftritt und wie schnell sie wieder austritt. Man beobachtet dadurch die Geschwindigkeit des desensibilisierenden Prozesses. Ebenfalls dienten die Sprungexperimente der makroskopischen Analyse des Antwortverhaltens des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, um die Charakterisierung der Halothanwirkung zu ermöglichen.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Halothan auf humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren auf der molekularen Ebene charakterisiert. Diese Rezeptoren vermitteln Emesis und Schmerz. Deswegen ist es wichtig, 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren weiter zu untersuchen, um molekulare Mechanismen der „Postoperativen Nausea and Vomiting“ (PONV) identifizieren zu können. Die Experimente wurden mit Hilfe einer elektrophysiologischen Methode (Patch-Clamp) durchgeführt. Bei der verwendeten „Patch-clamp“-Methode an „outside-out patches“ wurden Ionenkanäle isoliert in ihrer Membranumgebung (frei von Zytosol) untersucht. Auf diese Weise konnten Ionenkanäle (Hamil et al. 1981), die sich in einer kleinen Membranfläche befinden, untersucht werden. Die experimentellen Standardbedingungen (Membranhaltpotential  $-100$  mV = konstant) verhinderte eine mögliche Depolarisierung der Zelle und konnte somit die Beteiligung spannungsabhängiger Kanäle eliminieren.

Generell können Allgemeinanästhetika den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in seiner Funktion beeinflussen. In vorherigen Studien an 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren in N1E-115 Zellen konnte gezeigt werden, dass Pentobarbital, ein intravenöses Anästhetikum, ebenso wie Propofol einen inhibitorischen Effekt an diesem Rezeptor aufweisen (Barann et al. 1997; Barann et al. 2000a). Inhalative Anästhetika weisen diverse Effekte auf den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor auf, sowohl inhibitorische als auch potenzierende. Der Grund für diese Verschiedenheit ist noch nicht bekannt.

Beispielsweise hat Halothan, bei einem MAC von 1 % wesentlich den von einer kleinen 5-HT Konzentration induzierten Strom potenziert, während Sevofluran, Xenon, und Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) die Ströme deutlich verringerten und Isofluran verhältnismäßig kleine Wirkungen zeigte (Stevens et al. 2005). Diese Studie weist darauf hin, dass die Modulierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors durch Anästhetika in Abhängigkeit vom molekularen Volumen und sterischen Wechselwirkungen mit Bindungsstellen erfolgt. Diese Ergebnisse sollten nun mit Untersuchungen an humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren am Beispiel des Halothans verglichen werden. Weiterhin war es wichtig, Effekte von Halothan sowohl bei hohen (30  $\mu$ M 5-HT) als auch bei niedrigen (1  $\mu$ M 5-HT) Agonisten-Konzentrationen zu untersuchen. Die Effekte wurden auf Parallelen mit *in vivo* Beobachtungen überprüft.

#### 4.1. Validierung der Daten

Die Validität der Daten wurde überprüft, indem verschiedene experimentelle Ansätze durchgeführt und verglichen wurden:

- 1.) Die Bestimmung der besten Einstellungen des schnellen Lösungsaustauschsystems, sowie die Geschwindigkeit des Motors des Rotationskopfes.
- 2.) Parallele Durchführung der Experimente durch einen weiteren Mitarbeiter - die Ergebnisse zeigten keine Abweichungen voneinander.

#### 4.2. Allgemeine Auswirkungen von Anästhetika auf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren

Die in dieser Arbeit erhobenen 5-HT-induzierten (Kontroll -) Ströme sind konsistent mit denen von anderen Autoren (Barann et al. 2000, Schneider et al. 2001, Lyutenska 2006). Das Management postoperativer Übelkeit und Erbrechen (PONV), hat in der letzten Dekade, nicht zuletzt durch die Einführung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten, eine deutliche Qualitätsverbesserung erfahren: Ondansetron, Granisetron und Tropisetron reduzieren außerordentlich effektiv die Inzidenz der PONV (Wurglics et al. 2007). Ergebnisse von Ali et al. (1996) ließen erkennen, dass die Aktivierung von 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren die nozizeptive Antwort einiger dorsaler Hörnerneurone erleichterte. Es ist heute bekannt, dass 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren für die Modulation von Schmerzen, postoperativer Übelkeit und Erbrechen verantwortlich sind.

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, wird ein konzentrationsabhängiger Strom am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor durch den Agonisten 5-HT ausgelöst. Beim Betrachten verschiedener 5-HT Konzentrationen sieht man, dass die Aktivierungsrate mit Anstieg der 5-HT-Konzentration rasch beschleunigt wird. Bei hohen 5-HT Konzentrationen dagegen (30 - 100 µM), erreichte die Aktivierungsrate ein Plateau. Das Phänomen wurde durch andere Autoren bestätigt (Solt K. et al. 2007). Die Aktivierungskinetik war bei geringster Konzentration des Agonisten (1-3 µM 5-HT) sogar um einen Faktor 25 langsamer. Dieser Effekt (Abbildung 24) wurde schon früher beschrieben (Jenkins A. et al. 1996; Barann M. et al. 2000). Eine weitere Möglichkeit, die

Aktivierungskinetik zu beeinflussen, stellt die zusätzliche Applikation von Substanzen (Halothan) mit 5-HT dar.

In Anwesenheit von Halothan kam es zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der 5-HT-induzierten Ströme (Siehe Abb. 23). Bei näherer Betrachtung konnten zwei unterschiedliche Grundeffekte von Halothan auf die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren unterschieden werden: Eine langsame und dominierende Inhibierung und eine initiale, schnelle Potenzierung. Diese Effekte konnten durch Einflüsse auf den Peakstrom und Veränderungen der Kinetiken (Aktivierung oder Deaktivierung) des Rezeptors erklärt werden: Eine *Inhibierung* konnte durch eine Verlangsamung der Aktivierung oder eine Beschleunigung der Desensibilisierung des Stroms erklärt werden. Hingegen kann eine Beschleunigung der Aktivierung oder Verlangsamung der Desensibilisierung zu potenzierenden Effekten führen. Eine Potenzierung der 5-HT-Effekte allein würde für eine emetische Wirkung dieser Substanz sprechen, eine effektive Inhibierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors würde dagegen das Risiko von Übelkeit und Erbrechen reduzieren – immer vorausgesetzt, dass diese in-vitro-Effekte bei (freien) klinischen Plasmakonzentrationen stattfinden. Es ist auch durchaus möglich, dass Substanzen, die keinen direkten Effekt am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zeigen, ihn dennoch indirekt aktivieren könnten, z.B. durch eine Hemmung des Serotonintransporters, wie für Tramadol gezeigt (Barann et al., 2006). Im Folgenden wird detailliert auf die Ergebnisse, ihre möglichen Wirkmechanismen und die klinische Bedeutung eingegangen.

#### 4.3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Halothan

##### *Einfluss auf die Stromamplituden*

Wir beschäftigen uns zunächst mit dem Einfluss auf die Stromamplituden bei korrigierten, d.h. gemessenen Halothankonzentrationen.

Es wurde deutlich, dass schon bei niedrigen Halothankonzentrationen ein signifikanter inhibierender Effekt einsetzt. Der biphasische Verlauf der (++)- Konzentrations-Wirkungskurve deutet darauf hin, dass Halothan verschiedene Effekte am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor auslösen könnte. Beim Vergleich der Äquilibrium- und Offenkanal-Applikation von Halothan wurde klar, dass die Vorapplikation notwendig war, um eine größtmögliche Inhibierung zu erreichen. Dies weist

darauf hin, dass die Kinetik des inhibierenden Effektes durch Halothan einen langsamen Charakter besitzt. Im Vergleich dazu zeigte Sevofluran ( $IC_{50} = 0,5 \text{ mM}$ ) eine maximale Peakstrominhibierung im Offenkanal-Modus (-+) (Schneider MG et al. 2001). Dies bedeutet, dass Sevofluran trotz seines größeren molekularen Volumens (Siehe Strukturformeln) eine schnellere Wirkung am Offenkanal des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors besitzt als Halothan. Somit weisen die beiden volatilen Anästhetika Halothan und Sevofluran unterschiedliche Effekte am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor auf.

Die 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten maximalen Ströme wurden konzentrationsabhängig durch Halothan inhibiert. Die  $IC_{50}$ -Konzentration liegt unter klinischen Halothankonzentrationen, ist damit relevant. Die Beobachtung, dass kleinere halogenierte volatile Narkotika bei submaximalen 5-HT-Konzentrationen (z. B. 1  $\mu\text{M}$  5-HT) Ströme erhöht haben (Stevens R et al., 2005), konnte im Rahmen der Peakstrominhibierung für Halothan nicht bestätigt werden. Halothan zeigte selbst keine intrinsische Aktivität am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor.

#### *Einfluss auf die Aktivierung*

Halothan veränderte die Kinetiken 5-HT-induzierter Ströme: Aktivierungszeitkonstanten wurden durch Halothan in fast allen Applikationsmodi bei Agonistenkonzentrationen unter 30  $\mu\text{M}$  beschleunigt (Abbildungen 24). Dieser Effekt wurde nicht in der Geschlossenkanal-applikation beobachtet, war somit von der Anwesenheit Halothans während dem Agonisten (5-HT) Puls abhängig (Abbildung 24.B). Somit ist die Vorapplikation der Substanz für die Öffnungsgeschwindigkeit des Ionenkanals wahrscheinlich unerheblich. Wir wissen, dass die Aktivierung des Rezeptors ein schneller Prozess ist, bei welchem selbst eine prozentual bedeutende Beschleunigung kaum zu einer nennenswerten Vergrößerung des Gesamtstromflusses führt. Daher nehmen wir an, dass Substanzen, die ausschließlich die Aktivierungskinetik beschleunigen, aber nicht die Inaktivierung verlangsamen eher keine emetische Potenz zugeschrieben werden.

#### *Einfluss auf die Deaktivierung*

Im Vergleich zu dem sehr schnellen Prozess der Aktivierung, verläuft die Deaktivierung eher langsam. Sie beschreibt den Übergang eines Rezeptors vom offenen in den geschlossenen

Zustand in Anwesenheit eines Agonisten. Im Experiment wird die Deaktivierung als Stromabfall während der Applikation des Agonisten beobachtet. Änderungen in der Kinetik der Deaktivierung können zu einer deutlichen Veränderung im Stromfluss führen. Zum Beispiel wird der Gesamtstromfluss bei 1 mM Halothan im Äquilibrium durch eine Beschleunigung der Desensibilisierung um 40 % abgeschwächt (Abbildung 19).

Die Auswertung des Halothaneffektes auf die Deaktivierungskinetik zeigte, dass auch dieser Effekt von der Applikation während dem 5-HT-Puls abhängig ist, besonders deutlich war er in der Offenkanaal-Applikation konzentrationsabhängig zu sehen. Dieser Effekt ist neben der Amplitudenerniedrigung als inhibierender Komponente zu sehen. Die Beobachtungen an den „excised patches“ decken sich mit früheren Befunden an „Whole cell-Patches“, sind also unabhängig von der funktionierenden ganzen Zelle. Durch die nur gering und kurzzeitig stattfindende Potenzierung und die Netto-Reduktion des Gesamtstroms könnte das emetogene Profil von Halothan niedriger sein, als bei anderen volatilen Anästhetika. Dies ist in klinischen Studien zu prüfen. Erschwerend ist hierbei, dass die Substanzen mit anderen emetogenen Stoffen (z.B. Analgetika) kombiniert werden.

#### 4.4. Ein- und Auswaschkinetiken der Halothan-Effekte

Diese Versuche dienten der Trennung von verschieden schnell eintretenden Effekten von Halothan am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor. Es wurde eine Halothankonzentration gewählt, die etwa der IC<sub>50</sub> entsprach, um möglichst inhibitorische und (vorübergehend) potenzierende Effekte sehen zu können und auch eine möglichst hohe Auflösung des Signals zu erhalten (= keine zu geringe oder etwa fast komplette Inhibierung).

Beim Einwasch von ~ 0,6 mM Halothan war bereits nach der kürzesten Einwaschzeit von 32 ms ca. 60% der maximal möglichen Inhibierung erreicht. Insgesamt zeigte sich in den Einwaschexperimenten eine mehrphasige progressive Inhibierung des 5-HT-induzierten Stroms. Es konnte ein schneller und ein langsamer Prozesse getrennt werden (Abbildung 20). Der erste Effekt zeigte sich zwischen 32 und 300 ms, der zweite zwischen 10 und 60 s. Möglicherweise löst Halothan daher zwei Effekte bzw. Prozesse durch Bindung an eine Domäne am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor aus.

Der Auswasch erfolgte ebenfalls sehr schnell: Nach der kürzesten Auswaschzeit von ebenfalls 32 ms waren ca. 20 % der Inhibierung ausgewaschen. Die Auswaschexperimente verliefen ebenso wie die Einwasch Experimente progressiv stufenförmig (Abbildung 21, Seite 46) mit langsamen und schnellen Phasen. Der schnelle Prozess erfolgt zwischen 300 ms und 3 s. Halothan lässt sich anscheinend in dieser Phase leichter vom Rezeptor trennen.

Die Einwasch- und die jeweiligen Auswaschkinetiken konnten durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert werden.

#### 4.5. Kompetitivitätstest

Um die Mechanismen von Halothan besser verstehen und verschiedenartige Komponenten unterscheiden zu können, wurde Halothan bei den drei gängigen Applikationsarten bei sechs verschiedenen 5-HT-Konzentrationen gegeben. Es wurde somit auf eine mögliche Competition mit 5-HT getestet.

Ein kompetitiver Antagonist ist in der Lage, sich an der gleichen Bindungsstelle eines Rezeptors wie der Agonist anzulagern. Da Agonist und kompetitiver Antagonist um denselben Rezeptor konkurrieren, kann durch die Erhöhung der Konzentration des einen Stoffes der andere vom Rezeptor verdrängt werden. Eine kompetitive Inhibierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors würde eher für einen antiemetischen Effekt sprechen, da die Substanz bei entsprechender Potenz schon vor der Ausschüttung des Agonisten (5-HT) die Aktivierung des Rezeptors „präventiv“ verhindern würde.

Die dominierende Inhibierung durch Halothan (s.o.) war eindeutig nicht-kompetitiv, also unabhängig von der 5-HT-Konzentration (siehe Abbildung 19, Seite 42). Dies war beim Betrachten des Halothaneffektes auf die maximalen Stromamplituden, besonders in der Geschlossenkanal (+-)- und Äquilibriumapplikation (++), deutlich zu sehen: Die 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve war nicht parallel nach rechts verschoben, sondern in ihrem Maximum erniedrigt.

Allerdings gab es auch einen Halothaneffekt, der von der 5-HT-Konzentration abhängig war, nämlich die Aktivierungsbeschleunigung, die besonders stark bei niedrigen 5-HT-Konzentrationen war und bei  $> 10 \mu\text{M}$  5-HT gar nicht mehr beobachtet wurde. Somit kann man zu dem Schluss kommen, dass Halothan mindestens drei Mechanismen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor hat: Einen schnellen, potenzierenden und kompetitiven (die Aktivierungsbeschleunigung war besonders stark im Offenkanalmodus) und einen schnellen, inhibierenden (siehe Einwaschkinetik, erste 32 ms) sowie einen langsamen, inhibierenden und nicht kompetitiven (die nicht kompetitive Peakstrominhibierung war abhängig von der Applikation vor 5-HT).

#### 4.6. Konzentrationssprung (Halothan Einfluss)

Die Konzentrationssprungexperimente dienten dazu, schnelle Effekte, die innerhalb der ersten 32 ms Einwasch auftraten, zu bestimmen und zu analysieren. Die Analyse der Konzentrationssprünge zeigte, dass bereits in den ersten 32 ms ein einzelner schneller Prozess erfolgt. Dies wurde sowohl beim Einwasch, als auch beim Auswasch von Halothan beobachtet. Zusätzlich wurde durch Konzentrationssprünge mit unterschiedlicher Osmolarität („Salz-Sprung“), ohne Halothan während des 5-HT-Pulses bestätigt, dass das Lösungsaustauschsystem schneller ist als die von uns gemessenen Substanzeffekte, sei es die Aktivierung durch 5-HT oder die Inhibierung durch Halothan. Somit besteht kein Zweifel, dass die von uns gemessenen Kinetiken kein Apparatur-bedingtes Artefakt, sondern reale Substanzeffekte sind.

#### 4.7. Interpretation der Halothandaten

Halothan zählt zwar nicht mehr zu den aktuellen, im klinischen Alltag gebrauchten Anästhetika, aber aufgrund seiner Bedeutung als erstes verwendetes modernes volatiles Anästhetikum (Prototyp der halogenierten Kohlenwasserstoff-Anästhetika) wurde sie für diese Arbeit als Gegenstand des Betrachtens gewählt. Hinzu kommt, dass der Vergleich mit bereits erhobenen Ergebnissen aktueller Substanzen (Sevofluran, Isofluran) Rückschlüsse auf die Bedeutung der molekularen Struktur für die Wirkmechanismen zulässt. Die hier beschriebenen Halothan-Effekte liegen alle im Bereich der klinisch relevanten Plasmakonzentrationen, können also im Verlauf einer Narkose stattfinden.

#### 4.8. Bedeutung der Ergebnisse für PONV

Die Hemmung der 5-HT-Ströme durch Andockung an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren durch Halothan bei klinischen Plasmakonzentrationen könnte positiv zur Verträglichkeit dieser Substanz beitragen. Die Tatsache, dass die Halothan-Effekte sich prinzipiell von denen des Sevofluran unterscheiden und diese Substanzen sich hauptsächlich durch das Fehlen bzw. Vorhandensein einer Ethergruppe unterscheiden, könnte Hinweise auf neue, antiemetisch wirksame Anästhetikastrukturen geben.

## 5. Zusammenfassung

Bisherige elektrophysiologische Untersuchungen an humanen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren haben bestätigt, dass eine Korrelation zwischen antiemetischer Potenz und der Hemmung des 5-HT-Rezeptors bei klinischen Konzentrationen besteht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die kinetische und pharmakologische Charakterisierung der molekularen Effekte von Halothan auf humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, exprimiert in HEK-293 Zellen. Der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor steht klinisch mit Zytostatika-induziertem und postoperativem Erbrechen sowie mit Schmerz in Verbindung. Das Verständnis für die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von Emesis und Übelkeit ist ein wichtiger Baustein des Wissens über Anästhetika und deren Effekte. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der in diesem Modell (HEK-Zellen 293) erhaltenen 5-HT<sub>3A</sub>-Ionenkanäle und die Wirkungen von Halothan auf die Kanäle wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im „Outside-out“ Modus untersucht. Für das Studium der Anästhetika-Mechanismen an humanen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren ist die hier verwendete elektrophysiologische Methode in Kombination mit einem schnellen Lösungsaustauschsystem wichtig, denn direkte funktionelle Messungen an intakten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren *in-vivo* sind nicht durchführbar.

Durch unsere Experimente konnte Folgendes gezeigt werden:

- 1.) Halothan kann in klinisch relevanten Konzentrationen (0,3 bis 0,9 mM) in reversibler Art und Weise die 5-HT 30 µM induzierte Stromamplitude sowohl konzentrationsabhängig, als auch applikationsabhängig unterdrücken.
- 2.) Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken der 5-HT (30 µM)-induzierten Ionenströme ließen sich durch Halothan konzentrationsabhängig beschleunigen.
- 3.) Die Halothan-Effekte setzen sich aus mindestens drei unterschiedlichen Komponenten zusammen, davon waren zwei inhibitorisch und eine potenzierend. Die letztere war zudem kompetitiv. Insgesamt dominierten die inhibitorischen Effekte des Halothan.
- 4.) Die Halothan-Effekte am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor sprechen im Hinblick auf Emesis eher für eine antiemetische Wirkung.

## 6. Literaturverzeichnis

Ali Z, Wu G, Kozlov A, Barasi S. The role of 5HT<sub>3</sub> in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Neuroscience Letters* 1996; 208: 203-207.

Ash HL. Anesthesia's dental heritage (William Thomas Green Morton). *Anesthesia Progress* 1985; 32: 25-29.

Baigel G. Volatile agents to avoid ventilating asthmatics. *Anaesthesia and Intensive Care* 2003; 312: 208-210.

Barann M, Gothert M, Fink K, Bonisch H. Inhibition by anaesthetics of <sup>14</sup>C-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: 125-132.

Barann M, Friederich P, Retzmann K, Dybek A, Urban BW. Loss of propofol during in vitro experiments. *Anesthesiology* 2000; 93: 310-311.

Barann M, Meder W, Dorner Z, Brüss M, Bönisch H, Göthert M, Urban BW. Recombinant human 5-HT<sub>3A</sub> receptors in outside-out patches of HEK 29 cells: basic properties and barbiturates effects. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362: 255-265.

Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW. Molecular actions of propofol on human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives. *Anesthesia and Analgesia* 2008; 106: 846-857

Bovill, JG. Inhalation anaesthesia: from diethyl ether to xenon. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 182: 121-142

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional

receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 1986; 25: 563-576.

Bruss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Gothert M, Bonisch H. Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362:392-401.

Butler A, Elswood CJ. The pharmacological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in three isolated preparations derived from guinea-pig tissues. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 591-598.

Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745-2752.

Conzen P, Nuscheler M. New inhalation anesthetics. *Anaesthesist* 1996; 45: 674-693.

Costall B, Naylor RJ, Tyers MB. The psychopharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Pharmacol Ther* 1990; 47:181-202.

Couture DJ. Therapeutic modalities for the prophylactic management of postoperative nausea and vomiting. *J Perianesth Nurs* 2006; 21: 398-403.

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 1999; 397: 359-363

Doi M. Airway irritation produced by volatile anaesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane. *Can J Anaesth* 1993; 40: 122-126.

Eger EI 2nd, Strum DP. The degradation, absorption, and solubility of volatile anesthetics in soda lime depend on water content. *Anesth Analg* 1994; 78: 340-348.

Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-614.

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391: 85-100.
- Hansch C, Leo A, Björkroth JP. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J Pharm Sci* 1987; 76: 663-687.
- Jenkins A, Franks NP, Lieb WR. Actions of general anaesthetics on 5-HT<sub>3</sub> receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 1507-1515.
- Koshizaki M, Kawamata M, Shimada SG, Saito Y, Collins JG. 5-HT<sub>3</sub> receptors partially mediate halothane depression of spinal dorsal horn sensory neurons. *Anesth Analg* 2003; 96: 1027-1031.
- Larsen R. Intravenöse Anästhesie. In: Larsen R, HRSG. *Anästhesie*. München: Urban & Fischer, 1995: 178-179.
- Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews* 1971; 71: 525-615.
- Lerman J. Induction, recovery, and safety characteristics of sevoflurane in children undergoing ambulatory surgery. A comparison with halothane. *Anesthesiology* 1996; 84: 1332-1340.
- Leslie RA, Gwyn DG. Neuronal connections of the area postrema. *Fed Proc* 1984; 43: 2941-2943
- Liu Y, Dilger JP. Opening rate of acetylcholine receptor channels. *Biophys J* 1991; 60: 424-432
- Machu TK, Harris RA. Alcohols and anesthetics enhance the function of 5-hydroxytryptamine-3 receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 898-905.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991; 254: 432-437

Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260: 799-802

Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am* 1992; 266: 28-35

Pratt GD, Bowery NG, Kilpatrick GJ, Leslie RA, Barnes NM, Naylor RJ, Jones BJ, Nelson DR, Palacids JM, Slater P. Consensus meeting agrees distribution of 5-HT<sub>3</sub> receptors in mammalian hindbrain. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 135-137

Restrepo RD, Pettignano R, DeMeuse P. Halothane, an effective infrequently used drug, in the treatment of pediatric status asthmaticus: a case report. *J Asthma* 2005; 42: 649-651.

Solt K, Ruesch D, Forman SA, Davies PA, Raines DE. Differential effects of serotonin and dopamine on human 5-HT<sub>3A</sub> receptor kinetics: interpretation within an allosteric kinetic model. *J Neurosci* 2007; 27: 13151-13160.

Stanski DR, Shafer L. Monitoring Depth of Anesthesia. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 182: 409-423

Stachnik J. Inhaled anesthetic agents. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63: 623-634

Stevens R, Rüscher D, Solt K, Raines DE, Davies PA. Modulation of human 5-hydroxytryptamine type 3AB receptors by volatile anesthetics and n-alcohols. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 338-345

Suzuki T, Koyama H, Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. The diverse actions of volatile and gaseous anesthetics on human-cloned 5-hydroxytryptamine 3 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology* 2002; 96: 699-704.

Trepel M. Neuroanatomie, Struktur und Funktion. In: Trepel M, HRSG. München - Stuttgart - Jena - Lübeck - Ulm: Urban & Fischer, 1999: 9-10

Urban BW, Barann M., Eds. Molecular and Basic Mechanisms of Anesthesia. Lengerich - Berlin - Bremen - Miami - Riga - Virnheim - Wien – Zagreb: Pabst Science Publishers, 2002: 545-546

Urban BW, Bleckwenn M, Barann M. Interactions of anesthetics with their targets: Non-specific, specific or both? *Pharmacol Ther* 2006; 111: 729-770

Walkembach J, Bruss M, Urban BW, Barann M. Interactions of metoclopramide and ergotamine with human 5-HT<sub>3A</sub> receptors and human 5-HT reuptake carriers. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 543-552

Wurglics M, Spiegl F. Physiopathology, risk factors and therapy. Postoperative Nausea and vomiting. *Pharm Unserer Zeit* 2007; 36: 368-372

Zhou Q, Lovinger DM. Pharmacologic characteristics of potentiating of 5-HT<sub>3</sub> receptors by alcohols and diethyl ether in NCB-20 neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 732-740

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Barann für die Überlassung der interessanten Arbeit, für eine vorbildliche Betreuung, Unterstützung und für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen, die mir sehr weitergeholfen haben, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Urban danke ich für die Überlassung der Arbeit, eine exzellente wissenschaftliche Betreuung, die viele moralische Unterstützung während meiner Prüfungen, die freundliche Beratung und die vielen Ratschläge.

Frau Dorner und Frau von dem Bussche danke ich ganz herzlich für die immer „automatisch“ nachgelieferten Zellpräparationen sowie für das Hintergrund-„Know-how“ und ihre freundliche Art, die für eine tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt hat.

Herzlichen Dank an Herr Retzmann für die sorgfältige Durchführung der gaschromatographischen Bestimmungen.

Herrn Lenssen und Frau Brinkmann danke ich für die sorgfältige Unterstützung und die wertvollen Hinweise bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Grasmeyer und Herrn Witten danke ich für wertvolle und konstruktive Ratschläge nicht nur während der Experimente, sondern auch beim Schreiben der Dissertation.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Urban danke ich für das angenehme Zusammenarbeiten und für die Diskussionen im „Hille-Club“.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hasemann danke ich für die „Willensunterstützung“ und das anschließend gewissenhafte Korrekturlesen.

Ein großer Dank gilt meiner Familie für ihre stetige Unterstützung.