

**Untersuchung der Effekte von Ketamin, Etomidat und
Pethidin auf humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren und deren
Bedeutung für Nausea und Emesis**

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

Niklas Lenssen
aus Kiel

2010

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Martin Barann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Heinz Beck

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.10.2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
und Operative Intensivmedizin der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	7
2. Einleitung.....	9
2.1 Serotonin und Serotoninrezeptoren.....	9
2.2 Nausea und Emesis.....	14
2.2.1 Klinische Relevanz.....	14
2.2.2 Wie entstehen Übelkeit und Erbrechen?.....	15
2.3 Verwendete Substanzen.....	17
2.3.1 Ketamin.....	17
2.3.2 Etomidat.....	19
2.3.3 Pethidin.....	20
2.4 Strukturformeln.....	21
2.5 Problemstellung.....	22
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Stabile Transfektion.....	24
3.2 Zellkultur.....	25
3.3 Elektrophysiologie.....	25
3.3.1 „Patch-clamp“-Technik.....	25
3.3.1.1 Durchführung der „patch-clamp“-Experimente.....	27
3.3.2 Perfusionssystem.....	31
3.3.3 Applikationsarten.....	31
3.4 Datenanalyse.....	33
3.4.1 Software.....	33
3.4.2 Analyse der Stromspuren.....	33
3.4.2.1 Clampfit 8.....	33
3.4.2.2 Prism.....	34
3.4.3 Statistik (Microsoft Excel 2003).....	35
3.4.4 Meyer-Overton-Korrelation.....	35
3.5 Materialien.....	35
3.5.1 Lösungen.....	36
4. Ergebnisse.....	37
4.1 Ketamin.....	37
4.1.1 Konzentrationswirkungskurve.....	37
4.1.2 Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt von Ketamin.....	41
4.1.3 Einwaschexperimente.....	45

4.1.4	Auswaschexperimente.....	48
4.1.5	Konzentrationsprungexperimente.....	51
4.2	Etomidat.....	56
4.2.1	Konzentrationswirkungskurve.....	56
4.2.2	Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt von Etomidat.....	60
4.2.3	Einwaschexperimente.....	63
4.2.4	Auswaschexperimente.....	65
4.2.5	Konzentrationsprungexperimente.....	68
4.3	Pethidin (Meperidin).....	71
4.3.1	Konzentrationswirkungskurve.....	71
4.3.2	Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt von Pethidin.....	75
4.3.3	Einwaschexperimente.....	78
4.3.4	Auswaschexperimente.....	80
4.3.5	Konzentrationsprungexperimente.....	82
4.4	Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse.....	85
4.4.1	Konzentrationswirkungskurven.....	85
4.4.2	Einfluss der Substanzen auf Aktivierungs- (τ_{on}) und Inaktivierungskinetiken (τ_{off}).....	85
4.4.3	Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt der Substanzen.....	86
4.4.4	Einwasch- und Auswaschexperimente.....	86
4.4.5	Konzentrationsprungexperimente.....	86
5.	Diskussion.....	88
5.1	Einführung.....	88
5.2	Konzentrationswirkungskurven.....	89
5.3	Einfluss der Substanzen auf Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken.....	92
5.4	Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt der Substanzen.....	95
5.5	Einwasch- und Auswaschexperimente.....	95
5.6	Konzentrationsprungexperimente.....	96
6.	Zusammenfassung.....	99
7.	Literaturverzeichnis.....	101
8.	Danksagung.....	110
9.	Lebenslauf.....	111

1. Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm (10^{-6} g)
μM	Mikromolar (10^{-6} M)
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
„-“-Applikation	Offenkanal-Applikation
„+“-Applikation	Geschlossenkanal-Applikation
„++“-Applikation	Äquilibrium-Applikation
CINV	„chemotherapy-induced nausea and vomiting; Chemotherapie-induzierte(s) Übelkeit und Erbrechen
cDNA	„complementary“ DNA; komplementäre DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium“
ECS	„extracellular solution“; extrazelluläre Lösung
GABA	Gammaaminobuttersäure
GΩ	Gigaohm (10^9 Ω)
h5-HT _{3A} -Rezeptor	humaner 5-Hydroxytryptamin _{3A} -Rezeptor
HEK cells	„human embryonic kidney cells“; humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration, die eine Halbierung des Effektes bewirkt
ICS	„intracellular solution“; intrazelluläre Lösung
kHz	Kilohertz (10^3 Hz)
M	Molar
MHz	Megahertz (10^6 Hz)
Min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mM	Millimolar (10^{-3} M)
ms	Millisekunde (10^{-3} s)
mV	Millivolt (10^{-3})
n	Anzahl

nACh	nikotinergeres Acetylcholin
nM	Nanomolar (10^{-9} M)
n.s.	nicht signifikant
pA	Picoampere (10^{-12} A)
PONV	„postoperative nausea and vomiting“; postoperative Übelkeit und Erbrechen
s	Sekunde
SEM	„standard error of the mean“; Standardfehler des Mittelwerts
★	Signifikanzniveau $p < 0,05$
★★	Signifikanzniveau $p < 0,01$
★★★	Signifikanzniveau $p < 0,001$
τ_{on}	Aktivierungskinetik
τ_{off}	Inaktivierungskinetik

2. Einleitung

2.1 Serotonin und Serotoninrezeptoren

Das Monoamin Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT) wird beim Menschen im zentralen Nervensystem, in der Leber, der Milz und den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut durch Hydroxylierung und Decarboxylierung der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet (Abbildung 1). Es wird - wie Katecholamine - in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und bei Stimulation freigesetzt. Die Hauptmetabolisierung erfolgt durch die Monoaminoxidase (MAO) zu 5-Hydroxy-indolessigsäure (Karow und Lang-Roth, 2005).

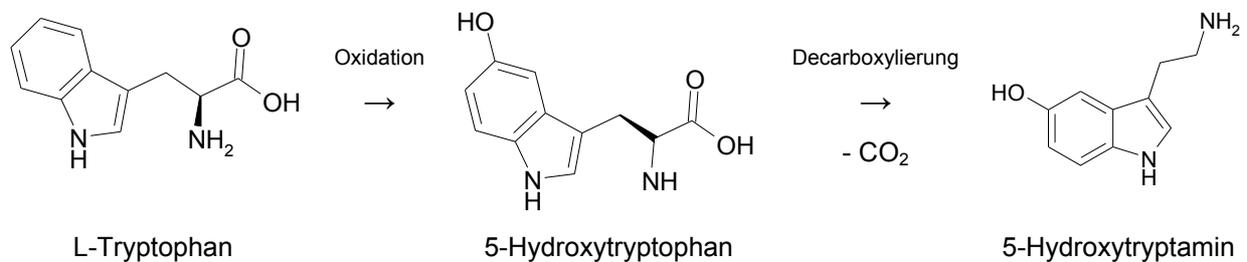


Abbildung 1: Biosynthese von Serotonin (5-Hydroxytryptamin) aus L-Tryptophan durch Oxidation und Decarboxylierung.

Serotonin weist ein vom Wirkort und Rezeptorsubtyp abhängiges breites Wirkspektrum auf und spielt als Neurotransmitter und Entzündungsmediator im gastrointestinalen und zentralen Nervensystem sowie im kardiovaskulären und respiratorischen System eine große Rolle. Wegen seines Einflusses auf das Wohlbefinden wird 5-HT häufig auch als „Glückshormon“ bezeichnet. Bei Depressionen, Aggressionen und Angstzuständen liegt in Analogie hierzu häufig ein Serotoninmangel vor. Von pathologischer Bedeutung ist eine Fehlsteuerung biochemischer Vorgänge an den Serotoninrezeptoren bei Migräne, pulmonaler Hypertonie, Schizophrenie, Essstörungen, Übelkeit und Erbrechen. Wie der Name Serotonin schon andeutet, wirkt 5-HT auf den Gefäßtonus, wobei sowohl vasokonstringierende als auch vasodilatierende Effekte beschrieben werden (Karow und Lang-Roth, 2005).

Der 5-HT₃-Rezeptor ist für die Thematik Übelkeit und Erbrechen von großer Relevanz. So wird beispielsweise das Chemotherapie-induzierte Erbrechen über die Freisetzung von Serotonin aus den enterochromaffinen Zellen des Darmes sowie einer nachfolgenden Erregung der afferenten Fasern des Nervus vagus ausgelöst (Andrews und Davis, 1993; Minami et al., 2003). Die 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, die sogenannten „Setrone“ (z.B. Ondansetron) stellen daher heute einen wichtigen und effektiven Baustein in der anti-emetischen Therapie dar (Tramèr et al., 1997a, 1997b). Gegenwärtig sind mindestens 14 Serotoninrezeptoren bekannt, die in sieben Rezeptorfamilien eingeteilt werden (Tabelle 1). Die ersten Hinweise auf eine pharmakologische Heterogenität der 5-HT-Rezeptoren haben Gaddum und Picarelli bereits vor über 50 Jahren beschrieben (Gaddum et al., 1957).

Rezeptor	Subtyp	Vorkommen	Physiologische Effekte	Anwendungs-Beispiele
5-HT ₁	5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}	ZNS	Angstreaktionen, Blutdrucksenkung, motorische Aktivität	Buspiron (Antagonist): Angststörungen Urapidil (Antagonist): Hypertonie Sumatriptan (Agonist): akuter Migräneanfall
5-HT ₂	5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}	ZNS, glatte Muskulatur, Thrombozyten	Neuronale Erregung	Methysergid (Antagonist): Migräne
5-HT ₃	5-HT _{3A} , 5-HT _{3B}	ZNS, afferente Vagusneurone, Darmnervensystem, Area postrema, Schmerzfasern	Übelkeit, Erbrechen, Schmerz	Ondansetron (Antagonist): Übelkeit und Erbrechen
5-HT ₄		Kolon, Herz, ZNS	Stimulation der ACh-Freisetzung im Magen-Darm-Trakt	Cisaprid (Agonist): gastrointestinale Störungen
5-HT ₅	5-HT _{5A} , 5-HT _{5B}		Inhibierung der Adenylcyclase	
5-HT ₆		ZNS	Glutamaterge und nikotinerge Effekte	
5-HT ₇		Ubiquitär	Regulation des Tag- Nacht-Rhythmus und der Körpertemperatur	

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Serotoninrezeptoren und ihrer Subtypen - Vorkommen, physiologische Effekte und Anwendungsbeispiele (modifiziert nach Karow und Lang-Roth, 2005).

Alle bisher bekannten Serotoninrezeptoren können den membranständigen Rezeptoren zugeordnet werden. Der 5-HT₃-Rezeptor zählt, wie auch die Glycin-, nACh- und GABA_A-Rezeptoren, zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen (Boess und Martin, 1994; Costall und Naylor, 1997; Derkach et al., 1989; Kilpatrick et al., 1990). Damit unterscheidet er sich von den anderen Serotoninrezeptoren, welche G-Protein-gekoppelt sind. In seiner Funktion als Ionenkanal ist der 5-HT₃-Rezeptor zugleich auch Effektor.

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, ergibt sich für den Serotoninstoffwechsel ein großes Gebiet der pharmakologischen Einflussnahme auf den Organismus.

5-HT₃-Rezeptoren zeigen molekulare, pharmakologische und physiologische Ähnlichkeiten mit dem nACh-Rezeptor: Beides sind ligandengesteuerte Ionenkanäle bestehend aus fünf Untereinheiten (zwei α sowie je eine β -, δ - und ϵ -Einheit). Jedoch unterscheiden sich die beiden Ionenkanäle durch eine unterschiedliche Aktivierungskinetik und Desensitivierung: 5-HT₃-Rezeptoren weisen eine langsamere Kinetik auf als nACh-Rezeptoren (Barann et al., 1997; Dilger et al., 1997; Urban et al., 2006).

Beim 5-HT₃-Rezeptor sind bisher fünf verschiedene Untereinheiten bekannt (5-HT_{3A-E}) (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Maricq et al., 1991; Niesler et al., 2003, 2007). Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf PONV scheinen die Untereinheiten 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} zu sein (Wallenborn et al., 2009).

Während die 5-HT_{3A}-Untereinheiten als Homopentamer funktionsfähig sind, können die anderen Untereinheiten nur zusammen mit der 5-HT_{3A}-Untereinheit einen funktionsfähigen Rezeptor bilden. Nach Niesler et al. (2007, 2008) ergeben sich für heteropentamere 5-HT₃-Rezeptoren (5-HT_{3A}-Untereinheit mit 5-HT_{3C, D} oder ϵ) keine wesentlichen pharmakologischen Unterschiede (Barnes et al., 2009; Niesler et al., 2007, 2008). In diesem Projekt wurde ausschließlich mit dem 5-HT_{3A}-Rezeptor gearbeitet.

1995 ist die 3A-Untereinheit des 5-HT-Rezeptors erstmals von Belelli et al. aus Humangewebe kloniert worden. Sie besteht aus 487 Aminosäuren und weist damit die längste Aminosäuresequenz der Untereinheiten auf (Steinhilber et al., 2005).

Die 5-HT_{3A}-cDNA bildet nach Expression in unterschiedlichen Zelllinien einen funktionellen Rezeptor, der ein dem physiologischen 5-HT₃-Rezeptor ähnliches pharmakologisches Profil aufweist (Jackson und Yakel, 1995; Steward et al., 2000).

Die klonierten 5-HT_{3A}-Untereinheiten können heterolog in HEK 293 Zellen exprimiert werden (Brüss et al., 1998). Die so entstehenden, membranständigen Kanäle bilden ein hervorragendes Modell, um die Kinetik des nativen 5-HT₃-Rezeptors sowie von Pharmakaeffekten an diesem Rezeptor zu erforschen, da sie diesem sowohl in ihren pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften wie auch strukturell in vielerlei Hinsicht entsprechen (Brady et al., 2001). Zudem weisen sie eine konstante Stöchiometrie der Untereinheiten auf.

Jede Untereinheit besteht aus vier transmembranären Helices (TM1 - 4), eine große extrazelluläre Bindungsdomäne und eine intrazelluläre Schleife zwischen TM3 und TM4. Die TM2-Segmente weisen eine α -Helix-Struktur auf und sind jeweils am Aufbau der Ionenpore beteiligt.

Die extrazelluläre Bindungsdomäne weist eine Cys-Cys-Schleife auf. Außerdem zeigt der Rezeptor extrazellulär verschiedene N-Glykosylierungsstellen, welche für die Bildung der Quartärstruktur des Rezeptors von Bedeutung sind und die Bindungsstelle für das Serotonin darstellen.

Intrazellulär sind Phosphorylierungsstellen bekannt, welche bei der Leitfähigkeit und Sensitivität des Rezeptors eine Rolle spielen (Eisele et al., 1993; Lummis, 2004; Steinhilber et al., 2005).

Mott et al. (2001) zeigten, dass vermutlich drei Moleküle des Agonisten für die Öffnung des 5-HT₃-Kanals notwendig sind. Da die Agonisten nach dem Prinzip der Kooperativität binden, ist nach der Bindung eines Agonistenmoleküls die Bindung weiterer Moleküle vereinfacht. Insgesamt können fünf Agonistenmoleküle gebunden werden. Mott et al. (2001) gehen davon aus, dass Rezeptoren, welche alle fünf Bindungsstellen besetzt haben, wiederum eine geringere Offenwahrscheinlichkeit besitzen als Rezeptoren mit weniger gebundenen Agonisten. In Abhängigkeit vom anliegenden Potential der Zelle kommt es zu einem Natrium/Calcium-Einwärtsstrom oder einem Kalium-Auswärtsstrom.

Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein exzitatorischer Ionenkanalrezeptor, da bei physiologischen Bedingungen (Ruhepotential ca. -60 mV) ein Natrium/Calcium-Einwärtsstrom erfolgt. Dies führt wiederum zu einer Depolarisation der Zelle. Der 5-HT₃-Ionenkanal ist kationenselektiv; überwiegend für monovalente Na⁺- und K⁺-Ionen, aber auch für divalente Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen (Barnes and Sharp, 1999; Hargreaves et al., 1994).

Es wird vermutet, dass die Öffnung des Ionenkanals nach Ligandenbindung durch eine Drehung der N-Termini aller fünf Untereinheiten zustande kommt (Steinhilber et al., 2005). Aufgrund der Analogien des 5-HT₃-Rezeptors zum nACh-Rezeptor wird vermutet, dass auch die Ligandenbindung in ähnlicher Art und Weise erfolgt.

Die extrazelluläre Domäne besteht aus sechs Schleifen (A - F), die mit einzelnen Aminosäuren an der Ligandenbindung beteiligt sind (Steinhilber et al., 2005).

Es ist bekannt, dass aus der Schleife A der Glutaminsäurerest (Glu 129) eine Wasserstoffbrückenbindung mit der phenolischen OH-Gruppe des Serotonins eingeht. Die Aminosäurereste Asparagin 128 (Asn 128) und Phenylalanin 130 (Phe 130) sind wichtig für die Signalfunktion des Rezeptors, aber nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt. In der Schleife B ist eine Kation- π -Wechselwirkung zwischen dem Tryptophan 183 (Trp 183) und der primären Aminofunktion des Serotonins bekannt. Der Tyrosin-Rest 234 (Tyr 234) aus der Schleife C und 153 (Tyr 153) aus der Schleife E gelten ebenfalls als essentiell für die Ligandenbindung. Die Aminosäuren Tryptophan 90 (Trp 90) und Arginin 92 (Arg 92), welche beide in der Schleife D lokalisiert sind, treten mit Agonisten und Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor in Wechselwirkung. Es handelt sich vermutlich um Wechselwirkungen der aromatischen Ringsysteme zwischen Serotonin und Tryptophan 90 (Trp 90) sowie Kation- π -Wechselwirkung zwischen Arginin und dem heteroaromatischen Ringsystem der Setrone. In der Schleife F sind potentiell wichtige Strukturen die Aminosäuren Tryptophan 195 (Trp 195) und Serin 206 (Ser 206) (Barnes et al., 2009).

Als Agonisten am 5-HT₃-Rezeptor gelten neben Serotonin beispielsweise 2-Methyl-5-HT oder 1-Phenylbiguanid (Fink und Göthert, 2007).

Die Aktivierung der 5-HT₃-Rezeptoren beeinflusst diverse Effekte. Dazu zählen emetische und inflammatorische Prozesse sowie Schmerzempfindung, Angst-, Sucht- und Affektverhalten (Dubin et al., 1999).

Bislang finden sich 5-HT-Agonisten nicht im klinischen Einsatz. Dagegen sind die Antagonisten, die sogenannten Setrone (Dolasetron, Granisetron, Ondansetron, Tropisetron), im klinischen Alltag von großer Bedeutung.

2.2 Nausea und Emesis

2.2.1 Klinische Relevanz

Die Inzidenz von postoperativer Übelkeit und postoperativem Erbrechen liegt bei allgemeinanästhetischen Verfahren ohne PONV-Prophylaxe bei 20 - 30 % (Apfel et al., 2004; Roewer, 2009). Bei Chemotherapien liegt die Inzidenz für Übelkeit und Erbrechen je nach Zytostatikum zwischen 30 % und 90 % (Kovac, 2003). Untersuchungen in der Anästhesie haben gezeigt, dass für Patienten die Qualität einer Narkose in erster Linie durch postoperative Schmerzfreiheit und das Freisein von postoperativer Übelkeit und Erbrechen (PÜ&E; englisch: post operative nausea and vomiting, PONV) gekennzeichnet ist. Dabei hat das Freisein von PONV eine noch größere Bedeutung für den Patienten als Schmerzfreiheit, Schläfrigkeit u.ä. postoperative Probleme (Eberhart et al., 2002; Jenkins et al., 2001; Macario et al., 1999).

Übelkeit und Erbrechen sind für die Patienten nicht nur unangenehme, sondern auch für die Gesundheit bzw. für die Genesung relevante Nebenwirkungen. Hier sind vor allem Komplikationen wie Nahtinsuffizienzen, Boerhaave-Syndrom und Trachealrupturen zu nennen (Apfel et al., 1999; Eberhart et al., 2009; Schumann, 1999). Nicht zuletzt spielt PONV in Zeiten der sogenannten „fast-track“-Behandlung eine wichtige Rolle bezüglich der Hospitalisierungsraten.

Zudem werden medizinische Behandlungen in den letzten Jahren immer mehr als Dienstleistung angesehen, an die man sehr hohe qualitative Ansprüche stellt. Hier sei an Stichworte wie Qualitätsmanagement und Zertifizierung der Krankenhäuser und Arztpraxen erinnert. Patienten fordern heutzutage aktiv ein gewisses Niveau der Therapien ein.

Es ist daher in mehrfacher Hinsicht wichtig, Nausea und Emesis verursachende Medikamente zu identifizieren, ihre Wirkungsweise zu charakterisieren, möglichst nebenwirkungsarme Medikamente herzustellen und ein in erster Linie auf Prophylaxe ausgerichtetes Handlungsregime (sogenannte „standard operating procedures“, kurz: SOP) zu erarbeiten.

2.2.2 Wie entstehen Übelkeit und Erbrechen?

Das emetische Zentrum stellt eine funktionelle Gruppe aus verschiedenen Kerngebieten in der *Formatio reticularis* bzw. *Medulla oblongata* dar. Es wird u.a. über Chemorezeptoren der *Area postrema* am Boden des IV. Ventrikels, der sogenannten chemorezeptorischen Triggerzone (CTZ), erregt. Die *Area postrema* steht aufgrund des gefensterten Kapillarendothels und der somit aufgehobenen Blut-Hirn-Schranke in direktem Kontakt mit dem Blut und den darin potentiell enthaltenen Emetika (Medikamente, Toxine etc.). Neben den Afferenzen aus der Chemorezeptortriggerzone erhält das Brechzentrum auch direkte, über den *Nervus vagus* vermittelte Erregungen aus dem Gastrointestinaltrakt sowie direkte Erregungen über das Vestibularorgan.

Die CTZ weist eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren auf. Unter den über 30 verschiedenen nachgewiesenen Rezeptoren sind, neben den Dopamin-, Muscarin-, Histamin- und Opioidrezeptoren, die Serotoninrezeptoren in hoher Dichte vertreten.

Dass die Serotoninrezeptoren von hoher Relevanz sind, zeigt sich darin, dass sie in allen Übelkeit modulierenden Zentren vorzufinden sind und ihre Antagonisten erfolgreich Übelkeit und Erbrechen vermindern können (Tramèr et al., 1997a; Kovac, 2000). Als ein klinisch relevantes Beispiel sei an dieser Stelle das Chemotherapie-induzierte Erbrechen genannt. Durch vermehrte Freisetzung von intestinalem Serotonin und einer damit einhergehenden Erregung von Serotoninrezeptoren wird das Brechzentrum über Afferenzen des *Nervus vagus* direkt stimuliert. Das Erbrechen kann effektiv durch selektive 5-HT₃-Rezeptorantagonisten (z.B. Ondansetron) therapiert werden.

Der Brechreflex ist ein multifaktoriell auslösbarer Effekt (vgl. Abbildung 2). So können neben den oben beschriebenen Modulationswegen auch viszerale Afferenzen aus dem Herz bei Koronarischämie, Strahlenexposition und erhöhter Hirndruck zu Übelkeit und

Erbrechen führen. Die Emesis gravidarum mit ihrer bis heute unbekanntem Pathogenese sowie der willkürlich ausgelöste Brechreflex durch Stimulation von Berührungssensoren im Pharynx (z.B. bei Bulimia nervosa) sind weitere klinisch relevante Ereignisse. Der willkürlich ausgelöste Brechreflex verdeutlicht auch, dass Erbrechen und Übelkeit nicht zwangsläufig zusammenhängende Ereignisse sein müssen. Weitere Beispiele hierfür sind die Luftinsufflation bei der Gastroduodenoskopie und die aus der Sicht des Anästhesisten besonders relevante, unzureichende Reflexdämpfung bei schwieriger Intubation mit Aspirationsgefahr. Übelkeit setzt im Gegensatz zu Erbrechen kortikales Bewusstsein voraus (Apfel und Roewer, 2004; Vaupel, 2000).

Kurz vor dem Auslösen des Brechreizes kommt es zu einer vom Ileum ausgehenden Anti-Peristaltik im Gastrointestinaltrakt. Diese bewirkt einen oralwärts gerichteten Transport des Dünndarminhaltes über das Duodenum in den Magen. Das Erbrechen wird durch eine tiefe Inspiration mit nachfolgendem Verschluss der Glottis und des Nasopharynx eingeleitet. Anschließend erschlaffen die Magenmuskulatur und die Ösophagusphinkter; das Zwerchfell und die Bauchdeckenmuskulatur kontrahieren sich ruckartig. Durch die daraus resultierende Erhöhung des intraabdominellen Drucks wird der Mageninhalt schließlich schwallartig retrograd entleert.

Die typische Symptomatik mit Kaltschweißigkeit und perioraler Blässe stellt vegetative Reaktionen dar, die über die Erregung sowohl sympathovagaler als auch motorischer Kerngebiete erfolgt.

Morphin-induziertes Erbrechen scheint vor allem über die CTZ vermittelt zu werden, da eine Durchtrennung der Verbindung zum Brechzentrum, z.B. mit Hilfe von Ablationsversuchen, das Erbrechen unterbindet (Apfel und Roewer, 2004).

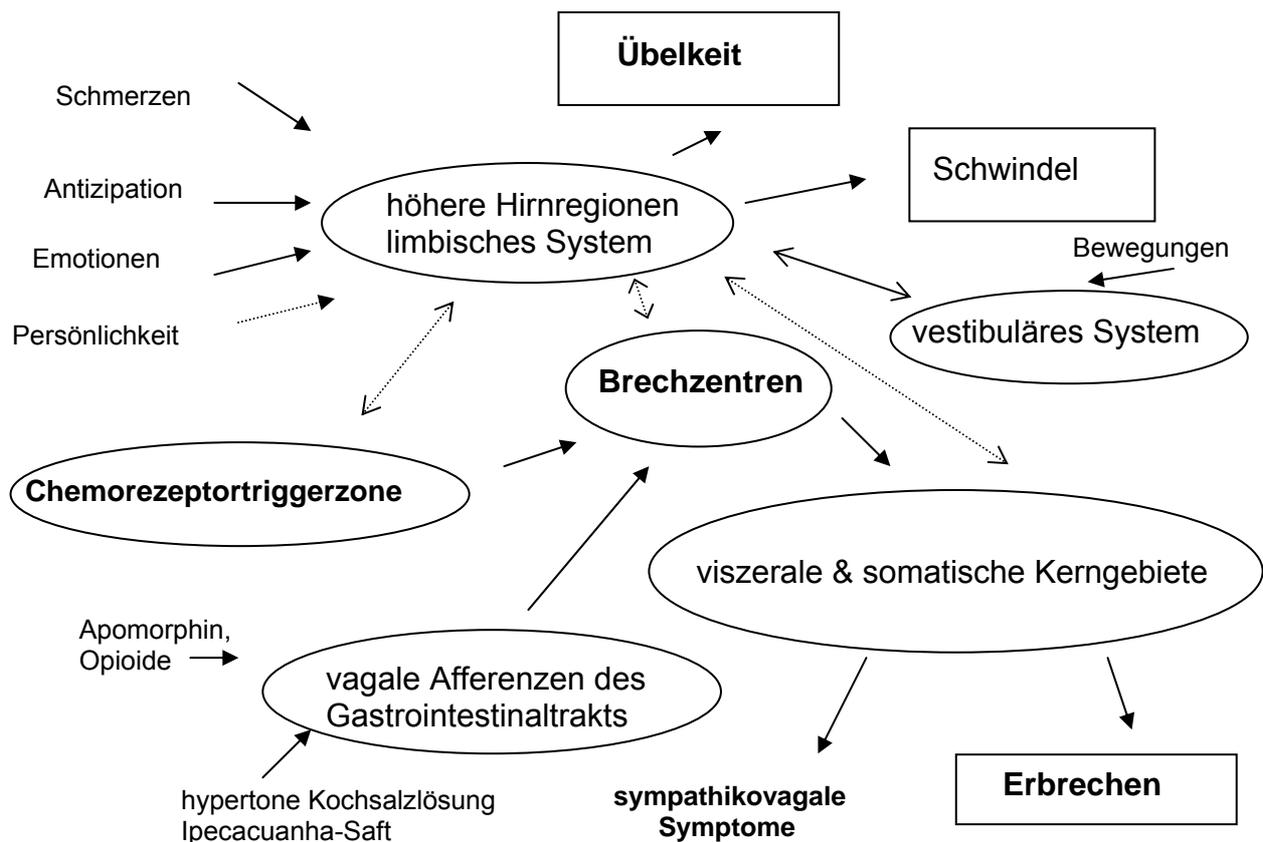


Abbildung 2: Darstellung des Erbrechens als multifaktorielles Geschehen. Zentrale und periphere Einflussfaktoren auf die Symptome Übelkeit und Erbrechen werden verdeutlicht. Die gestrichelt dargestellten Pfeile stellen nicht gesicherte Verbindungen dar (modifiziert nach Apfel und Roewer, 2004).

2.3 Verwendete Substanzen

2.3.1 Ketamin

Ketamin ist ein chirales, Halogen-substituiertes, aromatisches Aminoketon, welches strukturell mit Tilidin verwandt ist. Es besitzt im Gegensatz zu allen anderen klinisch eingesetzten Hypnotika eine starke analgetische Wirkkomponente, die auf dem Antagonismus am NMDA-Rezeptor beruht und führt zu einer sogenannten „dissoziativen Anästhesie“. Darunter versteht man einen katalepsieähnlichen Zustand mit Bewusstseinsverlust, Analgesie und Amnesie. Des Weiteren wirkt Ketamin über eine Sympathikusstimulation bronchodilatatorisch. Wie das Etomidat gehört Ketamin in die Gruppe der stickstoffhaltigen Injektionsnarkotika, zu denen auch Methohexital und Thiopental gehören (Karow und Lang-Roth, 2005; Steinhilber et al., 2005).

Als gelegentliche Nebenwirkung (d.h. $< 1/100$, aber $> 1/1000$) treten gastrointestinale Störungen wie Nausea und Emesis auf (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformation Ketamin-ratiopharm[®], 2010).

Für Ketamin ergeben sich folgende Indikationen:

- *Einleitung und Durchführung einer Allgemeinanästhesie* (günstig bei Patienten im Schock)
- *Analgesie und Anästhesie in der Notfallmedizin* (günstig bei der Befreiung eingeklemmter Personen (i.m.-Gabe), bei Schwer- und Polytraumatisierten)
- *Kurznarkotikum für diagnostische/therapeutische Eingriffe* (z.B. tägliche Verbandwechsel bei Verbrennungspatienten, Inzisionen, Repositionen)
- *Analgesedierung intubierter/beatmeter Patienten* (zumeist in Kombination mit Midazolam) v.a. bei hämodynamisch instabilen Patienten (Einsparung exogener Katecholamine)
- *Therapieresistenter Status asthmaticus*
- *Adjuvanz von nicht (mehr) ausreichender Regionalanästhesie*

Ketamin weist eine im Vergleich zu Etomidat längere anästhetische Wirkung auf. Diese wird durch die Umverteilungsgeschwindigkeit aus dem zentralen Körperkompartiment (Blutkreislauf) mit einer Halbwertszeit von 5,5 - 18 min beschrieben.

Die durch die Metabolisierung entstehenden Hauptmetabolite Norketamin (durch N-Demethylierung) und Cyclohexanon-Derivate sind schwächer anästhetisch wirksam als Ketamin.

Die Eliminationshalbwertszeit von Ketamin ist mit zwei bis drei Stunden mit Etomidat vergleichbar (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformaion Ketamin-hameln[®], 2010).

2.3.2 Etomidat

Etomidat ist der Ethylester einer Benzyl-substituierten Imidazolcarbonsäure mit einem Chiralitätszentrum. Narkotisch wirksam ist ausschließlich das (R)-Enantiomer (Steinhilber, Schubert-Zsilavec und Roth, 2005). Etomidat ist ein *hypnotisch* wirkendes Anästhetikum mit einer kurzen Halbwertszeit (3 - 5 min), welches im Gegensatz zu Ketamin und Pethidin *nicht analgetisch* wirkt. Es ist Mittel der Wahl für Narkoseeinleitungen bei Patienten mit kardiovaskulären und respiratorischen Risikofaktoren sowie als Kurzhypnotikum bei Kardioversion. Vereinzelt wird Etomidat auch als Kombinationspartner zur Therapie des Status epilepticus und zur Narkoseeinleitung bei Patienten mit Krampfleiden angewendet (Karow und Lang-Roth, 2005).

Etomidat wird als ein Ultrakurz-narkotikum bezeichnet. Es besitzt einen schnellen Wirkeintritt (Eintreten der Bewusstlosigkeit nach ca. 10 Sekunden) und ein durch Umverteilung der Substanz aus dem Blutkreislauf in periphere Körperkompartimente hervorgerufenen, rasches Abklingen der anästhetischen Wirkung (initiale Halbwertszeit: 1,3 - 4,5 Minuten). Die Verweildauer der Substanz im Körper wird durch die Eliminationshalbwertszeit von 2,4 - 5 h beschrieben. Die Biotransformation erfolgt über die Esterhydrolyse und N-Dealkylierung. Die entstehenden Metabolite sind pharmakologisch inaktiv (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformation Etomidat-Lipuro[®], 2010).

Beim Einsatz dieses Medikamentes klagen Patienten häufig (d.h. $< 1/10$, aber $\geq 1/100$) über Übelkeit und Erbrechen. Weitere Nebenwirkungen sind eine leichte Atemdepression, geringe kardiovaskuläre Beeinflussung (geringste der i.v.-Anästhetika), Gefäßwandreizung (evtl. Injektionsschmerz), motorische Störungen wie Myoklonien und Dyskinesien sowie eine Minderung der Cortisolsynthese in der Nebennierenrinde (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformation Etomidat-Lipuro[®], 2010). In der Literatur zeigen sich unterschiedliche Einschätzungen des emetogenen Potentials von Etomidat im Vergleich zu anderen Injektionsnarkotika. In einer Studie von Ulsamer et al. (1986) wird das Emesisrisiko für Etomidat höher als für Propofol eingeschätzt. In einer neueren Studie beschreiben Mayer et al. (1999) ein mit Propofol vergleichbares Emesisrisiko. Laut Fachinformation (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformation Propofol-Lipuro[®], 2010) tritt PONV nach Propofol-Applikation selten auf (d.h. $\geq 1/10000$, aber $< 1/1000$).

2.3.3 Pethidin

Pethidin, auch Meperidin genannt, ist eines der ersten synthetischen, vom Morphin abgeleiteten Narkoanalgetika, welches bei starken Schmerzen Anwendung findet. Es hat opiatagonistische Eigenschaften und weist eine ausgeprägte Affinität zu μ -Rezeptoren auf. Zu δ - und κ -Rezeptoren hingegen besteht nur eine geringe Affinität (reiner Agonist, wie Morphin, Tilidin, Fentanyl). Pethidin wirkt stark analgetisch, sedierend und atemdepressiv. Zudem wird der Blutdruck gesenkt und die Herzfrequenz erhöht. Es ist beschrieben, dass Patienten, die mit Pethidin behandelt wurden, über Übelkeit und Erbrechen klagten (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformation Dolantin[®], 2010). Dies konnte vor allem bei schneller Injektion des Medikamentes festgestellt werden (O'Sullivan, 1962).

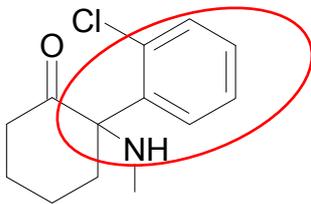
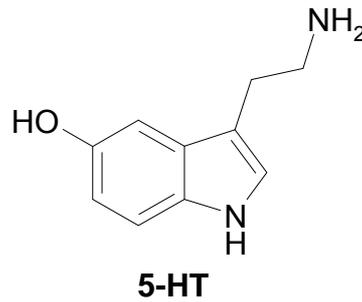
Für Opiate ist generell ein emetogenes Potential beschrieben, unabhängig von Applikationsform und Indikation (Biedler et al., 1998). Nach Apfel et al. (2000) erhöhen insbesondere postoperativ eingesetzte Opiode das PONV-Risiko.

Das Emesisrisiko von Pethidin wird in der Literatur kontrovers diskutiert, teilweise wird ein geringeres Risiko beschrieben als für Morphin. Nach Ansicht von Apfel et al. (2000) ergeben sich für das PONV-Risiko keine wesentlichen Unterschiede bei den Opioiden.

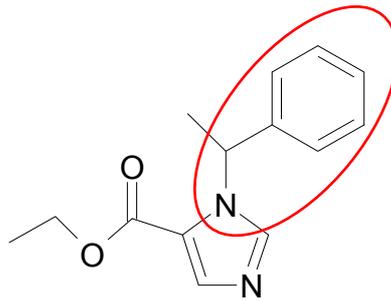
Eine Weiterentwicklung des Pethidins sind die auch als Antiemetikum eingesetzten Butyrophenone (= Neuroleptika) (Steinhilber et al., 2005).

Pharmakokinetisch zeigt sich für Pethidin ein ausgeprägter Metabolismus zu Norpethidin, welches pharmakologisch aktiv ist. Die durch Hydrolyse entstehenden Carbonsäuren werden in konjugierter Form eliminiert. Mit einer Plasmahalbwertszeit von 3,2 - 8 Stunden für Pethidin und 8 - 12 Stunden für Norpethidin weisen diese Substanzen eine wesentlich längere Aktivität im Körper auf als die zuvor genannten Narkotika (Rote Liste[®] GmbH, Fachinformation Dolantin[®], 2010).

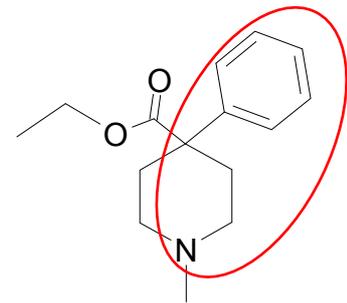
2.4 Strukturformeln



Ketamin



Etomidat



Pethidin

Abbildung 3: Strukturformeln des Serotonins und der verwendeten Substanzen Ketamin, Etomidat und Pethidin. Die rot umrandeten Teilstrukturen der Arzneistoffe zeigen die jeweiligen strukturellen Ähnlichkeiten im Vergleich zu Serotonin.

Die Strukturen der verwendeten Substanzen sind in Abbildung 3 zu sehen. Optisch hervorgehoben sind die strukturellen Ähnlichkeiten im Vergleich zu Serotonin: Hier lassen sich vor allem das aromatische Ringsystem und die daran anhängenden Alkylaminstrukturen erkennen.

Im Serotonin findet sich ein Ethylaminrest als Alkylaminstruktur, die aromatische Teilstruktur wird im Serotonin durch das Indol repräsentiert.

Das Vorhandensein von ähnlichen funktionellen Gruppen in den Molekülen kann zur Interpretation von ähnlichen Wechselwirkungen an Rezeptoren herangezogen werden.

2.5 Problemstellung

Barann et al. (1993) konnten in Tracerfluxexperimenten mit [¹⁴C]-Guanidinium (N1E-115 Zellen) zeigen, dass Ketamin und Etomidat einen antagonistischen Effekt am 5-HT₃-Rezeptor haben. In einer Studie von Appadu und Lambert (1996) wurde ein gleichartiger Effekt gefunden.

Es galt herauszufinden, ob ein Effekt der jeweiligen Substanzen auch an in HEK 293 Zellen exprimierten 5-HT_{3A}-Rezeptoren und eine Beeinflussung des 5-HT₃-induzierten Ionenstroms gemessen werden kann. Mittels „patch-clamp“-Messungen wäre zudem eine detaillierte Aufschlüsselung einzelner Prozesse, wie der Einfluss auf Stromamplituden und Kinetiken möglich. Hierüber ließe sich der Beitrag des 5-HT_{3A}-Rezeptors zum emetogenen Potential der jeweiligen Substanzen exakter ableiten.

Sowohl „whole-cell“ als auch „excised-cell patch-clamp“-Messungen haben gezeigt, dass Morphin-Derivate bei klinischen Konzentrationen in HEK 293 Zellen den 5-HT₃-Rezeptor beeinflussen (Lyutenska, 2006; Wittmann et al., 2006 und 2008). Morphin und Hydromorphon unterdrückten in den o.a. Studien den 5-HT (30 µM)-induzierten Maximalstrom und verlangsamten gleichzeitig die Rezeptorkinetiken, insbesondere die Rezeptorinaktivierung. Dies wurde als Hinweis auf eine Rezeptorinhibierung und -potenzierung gedeutet. Aufgrund der hohen Potenz, verglichen mit ihrer Lipophilie, ist von einem direkten Effekt der Substanzen am 5-HT_{3A}-Rezeptor auszugehen.

Die an den Opioidrezeptoren deutlich potenteren Fentanyl-Derivate schienen hingegen nur unspezifische Effekte aufzuweisen. Man kann daher davon ausgehen, dass die Bindungen der Substanzen an den Opioidrezeptoren anders als an den 5-HT_{3A}-Rezeptoren erfolgt (Lyutenska, 2006).

Dies steht im Einklang mit einer Studie von Barann et al. (2008), in der gezeigt werden konnte, dass eine phenolische OH-Gruppe, die sowohl Morphin als auch Hydromorphon besitzen, eine Rolle in der spezifischen Bindung an den 5-HT_{3A}-Rezeptor spielt.

Wie bereits erläutert wird das emetogene Potential des Etomidats gerne mit jenem von Propofol verglichen. In der Arbeit von Barann et al. aus dem Jahr 2008 wird in „patch-clamp“-Untersuchungen eine antagonistische Wirkung von Propofol an 5-HT_{3A}-Rezeptoren gezeigt, welches für einen anti-emetischen Effekt spricht.

Daher war es von Interesse die Einwirkung von Etomidat auf den Ionenstrom am 5-HT_{3A}-Rezeptor zu untersuchen und damit Aussagen über PONV-modulierende Effekte tätigen zu können.

Für Ketamin, einem Hypnoanalgetikum mit ebenfalls emetogenem Potential, waren ebenfalls keine derartigen Untersuchungen bekannt.

Pethidin als eines der synthetischen Opioide sollte in seinem Einfluss auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor untersucht werden, um die bisher gewonnenen Erkenntnisse über andere Opioide (Morphin, Hydromorphon, Fentanyl) am 5-HT_{3A}-Rezeptor zu erweitern.

Auf dem Hintergrund dieser Ergebnisse, war es von Interesse folgende Fragestellungen zu erforschen:

- 1.) Welche Effekte hat Ketamin als Hypnotikum und Analgetikum auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor?
- 2.) Welche Effekte hat Etomidat als reines Hypnotikum auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor?
- 3.) Welche Effekte hat Pethidin, eines der ersten synthetischen und vom Morphin abgeleiteten Analgetika auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor?
- 4.) Finden etwaige Effekte bei klinischen Konzentrationen der Substanzen statt?
- 5.) Welche Aussagekraft hat die Lipophilie der Substanzen bezüglich der Potenz am 5-HT_{3A}-Rezeptor?

3. Material und Methoden

3.1 Stabile Transfektion

Mittels stabiler Transfektion können Gene in das Genom einer Zielzelle eingebaut werden. Sie werden anschließend dauerhaft exprimiert. Die stabile Transfektion der für diese Arbeit relevanten cDNA des humanen (h) 5-HT_{3A}-Rezeptors in die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK 293) wurde im Institut für Pharmakologie (Abteilung Bönisch/Brüss) der Universität Bonn durchgeführt. Sie erfolgte nach der modifizierten Calciumphosphat-Methode (Brüss et al., 2000; Chen und Okayama, 1987) mit Hilfe des pCDNA3 (Invitrogen) Vektors unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus-Promotors.

Eine Selektion der Zellen erfolgte durch die Zugabe von Geneticin (750 µg/ml) zwei Tage nach der Transfektion. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach Auftreten einzelner Zellkolonien wurden diese durch spezielle Klonzylinder (Sigma) getrennt und anschließend in 24-fachen Kulturplatten (Falcon) bis zur Konfluenz kultiviert. Aus jeder Transfektion wurden 20 - 40 Kolonien hinsichtlich erfolgreicher Expression der humanen 5-HT_{3A}-Rezeptoren mit [¹⁴C]Guanidinium Influx und Bindung des selektiven 5-HT₃-Rezeptorantagonisten [³H]GR 65630 [3-[5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-1(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanone] oder durch spezielle [³H]5-HT Aufnahmeexperimente getestet. Die Kolonien mit der besten Expression wurden schließlich kryokonserviert und für weitere Experimente verwendet.

Unter sterilen Bedingungen wurden die für die Kryokonservierung vorgesehenen Zellen abgeerntet und bei 1000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 % DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für 1 - 2 h bei -20°C, anschließend bei -80°C eingefroren.

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der mit dem humanen 5-HT_{3A}-Rezeptor stabil transfizierten HEK 293 Zellen erfolgte in DMEM nutrient mix F12 (1:1; v/v) Medium bei 37°C mit 95 % Luft und 5 % CO₂ in einem Brutschrank (Typ BB16, Fa. Heraeus, Deutschland). Das Medium war mit 10 % fetalem Kälberserum, Penicillin (100 I.U./ml), Streptomycin (100 µg/ml), Geneticin (0,75 mg/ml) und Glutamin (292 µg/ml) supplementiert. 7 - 14 Tage vor einem „patch-clamp“-Experiment wurden die Zellen in Petrischalen (Nunc, 35 mm Durchmesser) aliquotiert, die dann auch als Zellschälchen für die „patch-clamp“-Versuche dienten. Nach drei Monaten wurde die laufende Zellcharge verworfen und eine neue herangezogen.

3.3 Elektrophysiologie

3.3.1 „Patch-clamp“-Technik

Die von Neher und Sakmann 1976 entwickelte „patch-clamp“-Technik (Hamill et al., 1981; Sakmann und Neher, 1984) ermöglicht es, transmembranäre Ionenflüsse bzw. Ströme an wenigen µm² großen Membranfragmenten („patch“) zu messen. Bei diesen Messungen wird eine vorgegebene Spannung angelegt und über die Dauer des Experiments konstant gehalten („clamp“). Der gemessene Strom liegt dabei in der Größenordnung 25 - 3000 pA.

Bei der „patch-clamp“-Methode unterscheidet man im Wesentlichen drei verschiedene Konfigurationen:

a) „Cell attached“:

Nach Aufsetzen einer Pipette auf eine Zelle wird ein leichter Unterdruck erzeugt, wobei die Zelle intakt bleibt.

b) „Whole cell patch“:

Hierbei erzeugt man entweder einen stärkeren Unterdruck oder legt einen kurzen Spannungspuls an, wodurch die Membran durchbrochen wird. Die gesamte Zelle steht mit der Pipette in Verbindung und der Strom, der durch die gesamte Membranoberfläche der Zelle fließt, kann gemessen werden.

c) „Excised cell patch“:

Bewegt man die Pipette nach dem Durchbrechen der Membran gleichmäßig nach oben, bleibt nur ein Fragment der Membran („patch“) an der Pipettenspitze hängen. Ist die zytoplasmatische Seite des „patches“ zur Badlösung exponiert, bezeichnet man dies als „inside-out“-Konfiguration.

Liegt jedoch die Außenseite des „patches“ zur Badlösung hin, bezeichnet man dies als „outside-out“-Konfiguration.

In dieser Arbeit wurde die „excised“-Konfiguration im „outside-out“-Modus verwendet. Sie eignet sich gut für die Untersuchung von ligandengesteuerten Ionenkanälen, da die Substanzen von außen, und damit hier von der extrazellulären Seite, auf den „patch“ appliziert werden können. Die Entstehung eines „patches“ wird in Abbildung 4 gezeigt.

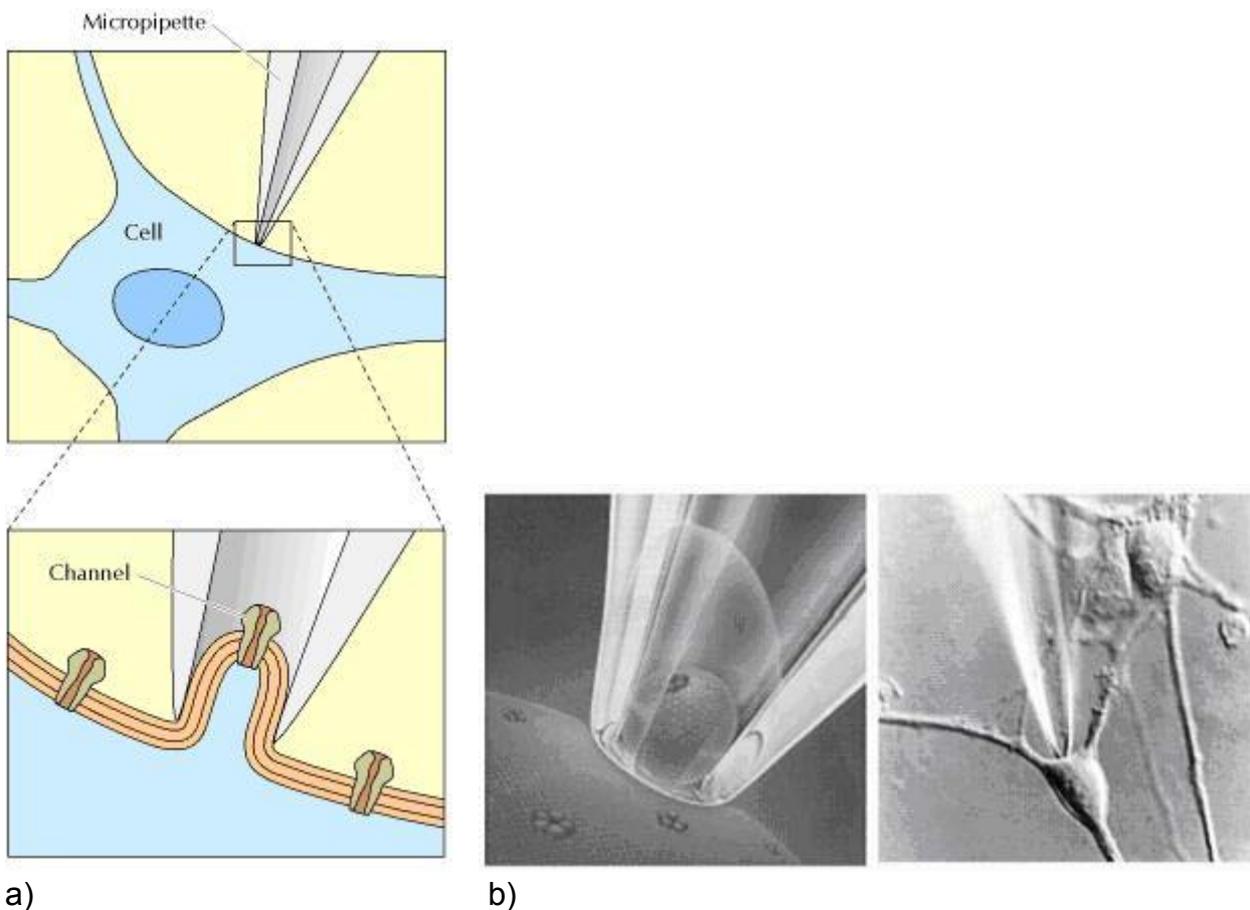


Abbildung 4: Entstehung eines „patches“. **a)** Schematische Darstellung; **b)** Aufnahme bei der Durchführung eines Experimentes. Die Pipettenspitze wird an die Zelle herangeführt. Durch einen Unterdruck bildet sich eine hochohmige Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran. Anschließend wird die Zellmembran durch stärkeren Unterdruck aufgerissen (= „whole-cell patch“, nicht abgebildet). Beim langsamen Entfernen von der Zelle entsteht der „outside-out patch“, bei dem die intrazelluläre Seite der Membran zur Pipette und die extrazelluläre Seite zur Badlösung gerichtet ist (Neher und Sakmann, 1992).

3.3.1.1 Durchführung der „patch-clamp“-Experimente

Für die Experimente wurde eine Petrischale mit stabil transfizierten HEK 293 Zellen aus dem Brutschrank entnommen. Das Nährmedium wurde dekantiert und durch ECS-Lösung ersetzt, die sich wie folgt zusammensetzt: NaCl 150 mM; KOH 5,6 mM; CaCl₂ 1,8 mM; MgCl₂ 1 mM; HEPES 10 mM; D-Glukose 20 mM; pH 7,4.

Vor dem Experiment wurden aus einer Borosilikat-Glaskapillare (Kwik-Fil™, World Precision Instruments, USA) zwei gleich lange Pipetten gezogen. Diese wurden daraufhin mit der „Mikroforge“ (L/M-CPZ 101, List-Medical-Electronic, Darmstadt) poliert und bis zum Experiment für maximal wenige Stunden in einer verschlossenen Schachtel aufbewahrt. Die so hergestellten Pipetten hatten einen Widerstand von 3 - 5 M Ω . Kurz vor dem Experiment wurden die Pipetten mit einer Elektrolytlösung gefüllt, die dem intrazellulären Milieu angepasst war (KCl 140 mM; EGTA 10 mM; MgCl₂ 5 mM; HEPES 10 mM; pH 7,4).

Sowohl die Pipettenelektrode als auch die Badelektrode bestanden aus Silberdrähten (Ag 15 W). Diese wurden in einer Natrium-Hypochloridlösung chloridiert.

Mit Hilfe eines Mikromanipulators konnte die Pipette manuell gesteuert auf die Zelle aufgesetzt werden. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks wurde die Zellemembran an die Pipette gesaugt und es entstand ein sogenannter „Gigaseal“, d.h. ein Widerstand im Giga-Ohm-Bereich (1 - 4 G Ω). Dies trug dazu bei, Leckströme auf ein Minimum zu reduzieren.

Ein „patch“ wurde mit Hilfe des Mikromanipulators vor das Applikationssystem positioniert, wo er je nach gewünschtem Experiment und dementsprechendem Parameter mit der notwendigen Lösung perfundiert wurde (Abbildung 5).

Das Applikationssystem (RSC 200, Biologic) wurde elektronisch gesteuert. Mittels Tief-Pass-Filter wurden die Daten gefiltert (1 kHz) und anschließend mit einem Digidata 1200 Analog/Digitalumwandler digitalisiert (2 kHz).

Eine optimale Stabilität des „patches“ wurde erreicht, indem das Membranpotential erst 200 ms vor der Serotonin-Applikation von 0 mV auf -100 mV geklemmt und nach der Messung wieder auf 0 mV gesenkt wurde. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (19 - 26 °C) durchgeführt. Einen typischen „patch-clamp“-Arbeitsplatz zeigt Abbildung 6.

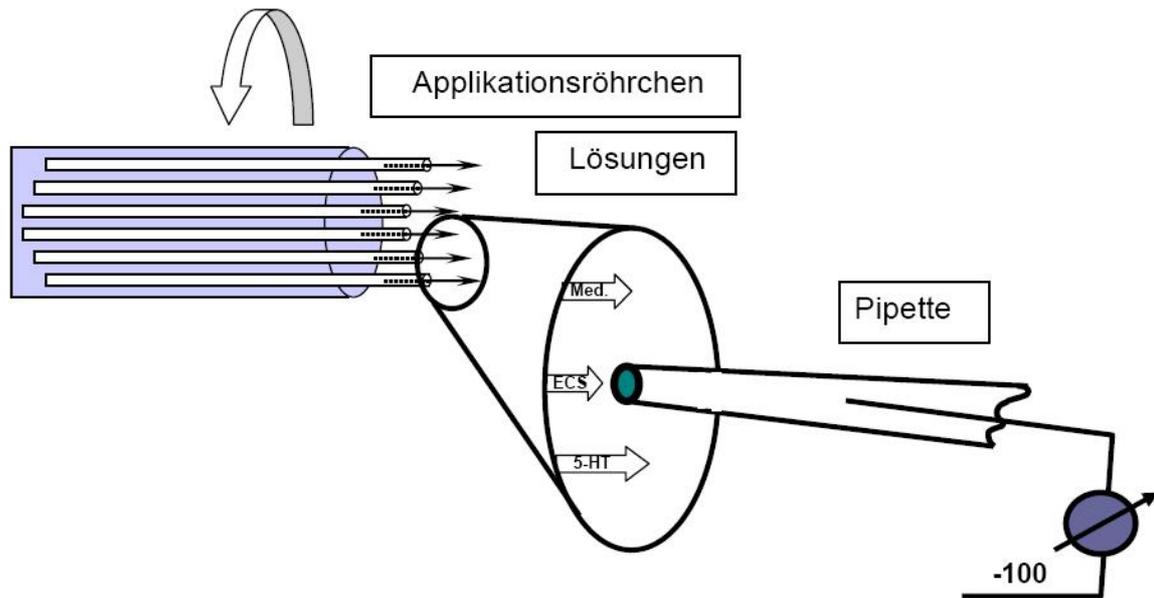


Abbildung 5: Versuchsaufbau des schnellen Applikationssystems. Aus den Glas-Applikationsröhrchen wird die Substanz auf den an der Pipettenspitze hängenden „patch“ appliziert. Der Drehkopf ermöglicht die schnelle und exakte Positionierung der Applikationsröhrchen vor den „patch“ und somit den schnellen Wechsel der zu applizierenden Substanz(en). Über die in der Pipette eingeführte Elektrode wurde die Membran hyperpolarisiert (-100 mV; modifiziert nach Walkembach et al., 2005).



Abbildung 6: „Patch-clamp“-Arbeitsplatz. Die Pipette mit dem an der Spitze hängendem „patch“ wurde im Zellschälchen vor den Perfusionskopf positioniert. Durch die Glaskapillaren am Perfusionskopf erfolgt die Applikation der Substanzen auf den „patch“. Mit Hilfe der Elektrode in der Pipette und der Badelektrode wird an den „patch“ eine Haltespannung von -100 mV angelegt. Die Korrekturen dieser Haltespannung („Voltage Clamp“), welche aufgrund des Ionenflusses durch die Kanäle nötig werden, werden im Vorverstärker in Strom umgerechnet und verstärkt an den Hauptverstärker weitergeleitet (modifiziert nach Meiboom, 2010).

3.3.2 Perfusionssystem

Bei den hier durchgeführten Experimenten sollten zum Teil sehr schnelle Prozesse untersucht werden, weswegen ein schnelles Lösungs-Applikationssystem (RSC 200, Biologic, Frankreich) verwendet werden musste (Abbildung 5). Wichtig war dabei, dass der Lösungswechsel in einer kürzeren Zeit ablief als die Zeitkonstante des schnellsten zu beobachtenden Effekts. In dem verwendeten Applikationssystem war ein Lösungswechsel innerhalb von 2 ms möglich. Das Reservoir der Substanzen bestand in der Regel aus fünf Glasröhren. Um einen gleichmäßigeren Zulauf zu erhalten, wurde an diese Reservoirs ein Infusionsbesteck mit Tropfkammer angehängt. Von diesen Tropfkammern führte jeweils ein Teflonschlauch (Teflon, DuPont, USA) zu einer der bis zu sechs Glaskapillaren, vor die der „patch“ bei der Messung platziert wurde. Teflon wurde aufgrund seiner inerten Eigenschaften gegenüber den meisten chemischen Substanzen gewählt, wodurch der Verlust von lipophilen Substanzen vermindert werden konnte (Barann et al., 2000). Um die Substanzen gezielt applizieren zu können, wurde ein Teil der Teflonschläuche durch zudrückbare Silikonschläuche ersetzt. Diese Schläuche wurden durch die Computer-steuerbaren Quetschventile des Applikationssystems (RSC 200, Biologic, Frankreich) geführt.

3.3.3 Applikationsarten

Je nach Anordnung der Lösungen in den 3 - 6 Glasreservoirs konnten verschiedene Lösungs-Applikationsprotokolle durchgeführt werden. Die Protokolle wurden mit Hilfe des bereits erwähnten Programms RSC 200 (Biologic, Frankreich) auf einem mit dem Perfusionssystem verbundenen Computer geschrieben und gesteuert. Abbildung 7 zeigt beispielhaft eine Anordnung der Lösungen.

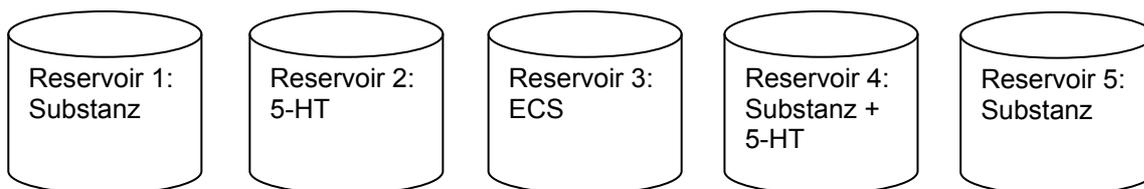


Abbildung 7: Standardanordnung der Lösungen in fünf Glasreservoirs. Diese Anordnung eignet sich beispielsweise für Äquilibrium-, Geschlossenkanal- und Offenkanalexperimente.

Mit der in Abbildung 7 gezeigten Anordnung wurde in drei verschiedenen Applikationsarten gemessen. Wie in Tabelle 2 dargestellt wurde ein Applikationsmodus mit Substanzgabe vor und während des Serotoninpulses (Äquilibrium-Modus), ein weiterer mit Substanzgabe vor dem Serotoninpuls (Geschlossenkanal-Modus) sowie ein Modus mit einer Substanzgabe parallel zum Serotoninpuls (Offenkanal-Modus) gewählt.

Äquilibrium-Applikation („++“)	Die Substanz wurde 60 s lang vor und während des 5-HT-Pulses appliziert.
Geschlossenkanal-Applikation („+-“)	Die Substanz wurde ausschließlich 60 s lang vor dem 5-HT-Puls appliziert.
Offenkanal-Applikation („-+“)	Die Substanz wurde nur während des 5-HT-Pulses appliziert.

Tabelle 2: Darstellung der Applikationsarten Äquilibrium-, Geschlossenkanal- und Offenkanal-Applikation mit den entsprechenden Applikationszeitpunkten der Testsubstanz.

In einem Experiment wurden dreimal alternierend eine Kontrolle und - nach dem jeweiligen Protokoll - eine Messung mit der entsprechenden Testsubstanz durchgeführt. Voraussetzung war, dass sich bei den Kontrollspuren eine etwa neunzigprozentige Erholung von der Testsubstanz-induzierten Maximalstrominhibierung zeigte. Zwischen den Aufzeichnungen wurde der „patch“ jeweils 60 s lang gespült. Das Zeitintervall wurde so gewählt, dass die Rezeptoren wieder aktivierbar waren. Während der Versuche wurden die Stromamplituden, das Integral und die Kinetiken der Stromspuren beobachtet.

3.4 Datenanalyse

3.4.1 Software

Alle Stromspuren wurden digitalisiert (Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) mit Hilfe des Programms Pclamp 7 (Axon) aufgezeichnet und auf der angeschlossenen Computerfestplatte gespeichert. Pclamp 7 ermöglichte zudem Modifizierungen der Pulseinstellungen.

Der Computer steuerte den zur Messung der Stromspuren notwendigen „patch-clamp“-Verstärker.

Die Ergebnisse der mit dem Programm Clampfit 8 (Axon) ausgewerteten Stromspuren konnten mit der Prism 3.2 Software (Graph Pad, CA, USA) in Graphiken eingefügt und analysiert werden.

3.4.2 Analyse der Stromspuren

3.4.2.1 Clampfit 8

Für die Auswertung der 5-HT (30 μM)-induzierten Stromspuren im Clampfit-Programm wurde im ersten Schritt der vorhandene Leck-Strom herausgerechnet. Dies erfolgte, indem die Basislinie aller Stromspuren auf 0 mV gesetzt wurde. Anschließend wurden die zusammengehörenden Stromspuren gemittelt, sofern sie zur Auswertung geeignet waren. Bei den gemittelten Stromspuren wurden anschließend die Maximalströme mit Hilfe des Positionsanzeigers in pA abgelesen. Die den Gesamtstrom repräsentierende Fläche unter den Stromspuren (= Integral) wurde vom Beginn der 5-HT-Applikation bis zu dem Zeitpunkt 2 s ermittelt.

Um die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken ermitteln zu können, wurde - wenn möglich - eine biexponentielle Funktion ($f(t) = a_0 + a_1e^{-t/\tau_1} + a_2e^{-t/\tau_2}$) an die Stromspuren angepasst. Ansonsten wurde eine mono- oder tri-exponentielle Funktion gewählt. Vergleiche hierzu Abbildung 8.

Beispiel eines durch 30 μM 5-HT-induzierten Stroms:

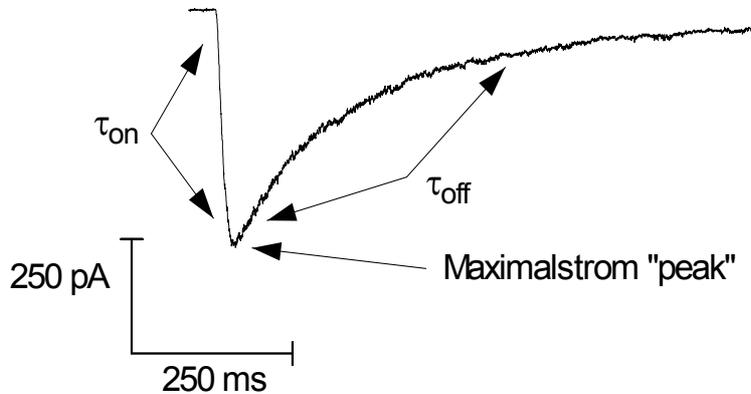


Abbildung 8: Eine exemplarische durch 30 μM 5-HT-induzierte Stromspur. Die Maximalstromamplitude („peak“) wird in pA abgelesen. Durch Anpassen einer biexponentiellen Funktion können mathematisch die Aktivierungszeitkonstante (τ_{on}) und die Inaktivierungszeitkonstante (τ_{off}) berechnet werden.

3.4.2.2 Prism

Die Resultate wurden in die Graph Pad Prism 3.2 Software (Graph Pad, CA, USA) importiert und dort in Graphen dargestellt. Die IC_{50} -Werte wurden in Prism aus den importierten Daten errechnet. Die Konzentrationswirkungskurven der untersuchten Substanzen wurden durch Anpassen der Hill-Gleichung vorgenommen:

$$i = [IC_{50}^n / (c^n + IC_{50}^n)]$$

(i ist der Maximalstrom in Gegenwart des Medikamentes als Fraktion des Maximalstroms der Kontrolle; c ist die Konzentration der Substanz; n ist der Hill-Koeffizient; IC_{50} ist die Konzentration der Substanz, die eine halbmaximale Inhibierung des Kontrollstroms bewirkt)

3.4.3 Statistik (Microsoft Excel 2003)

In Microsoft Excel wurden Mittelwerte und „Standard Error of the Mean“ (SEM) berechnet. Die Signifikanz wurde durch den gepaarten Student T-Test geprüft. Das gewählte Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

3.4.4 Meyer-Overton-Korrelation

Zur Abschätzung, ob die entsprechenden Potenzen der Substanzen ausschließlich auf nicht-spezifische, hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen sind, wurde die Meyer-Overton-Korrelation (Urban et al., 2006) verwendet. Für ligandengesteuerte Ionenkanäle und gepoolte Anästhetika-Daten lautet die Formel:

$$\log(\text{IC}_{50}) = -1.568 \text{ bis } 0.9898 * \log(\text{P}_{\text{Oktanol/Wasser}})$$

Es wurde das ALOGPS 2.1 Programm (Virtual Computational Chemistry Laboratory; Tetko et al., 2001; Tetko und Tanchuk, 2002) verwendet.

3.5 Materialien

Die Experimente wurden mit folgenden Substanzen durchgeführt:

- Ketamin (Sigma-Aldrich-Chemie, München, Deutschland)
- Etomidat (Tocris, Bristol, Großbritannien)
- Pethidin (Dolantin[®], Sanofi Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland)

Alle Substanzen wurden direkt in Extrazellulärlösung gelöst.

3.5.1 Lösungen

Die *Extrazellulärlösung*, die sowohl zum Lösen der Substanzen, als auch als Badlösung im Zellschälchen genutzt wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl 150 mM; KCl 5,6 mM; CaCl₂ 1,8 mM; MgCl₂ 1 mM; HEPES 10 mM; pH 7,45

Die *Badlösung* enthielt zusätzlich Glucose (0,056 mM).

Die *Intrazellulärlösung* für die Pipetten enthielt:

KCl 140 mM; EGTA 10 mM; MgCl₂ 5 mM; HEPES 10 mM; pH 7,45

Der pH-Wert wurde in beiden Lösungen mit NaOH bzw. KOH/HCl eingestellt.

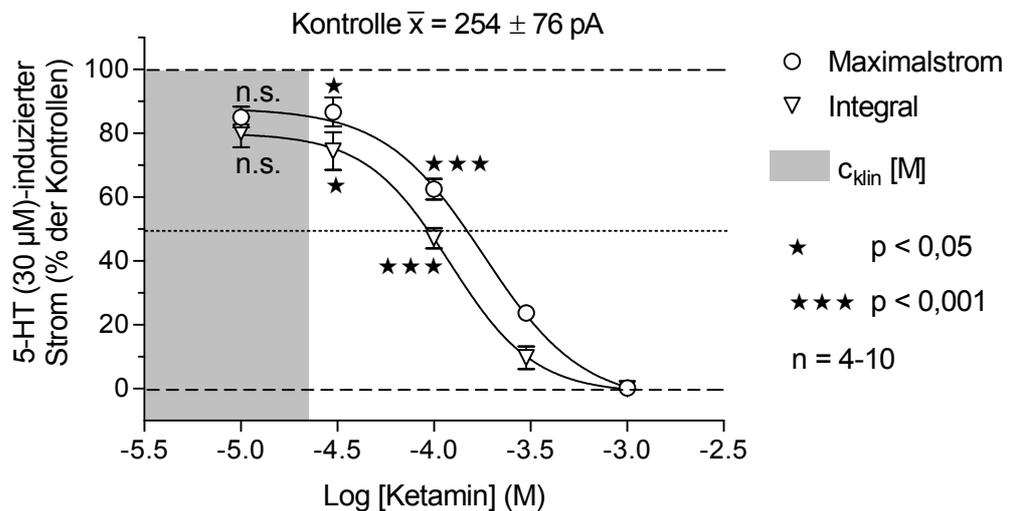
4. Ergebnisse

4.1 Ketamin

4.1.1 Konzentrationswirkungskurve

Die Konzentrationswirkungskurve von Ketamin wurde in der Äquilibrium-Applikationsart erstellt. In „patchen“, die zuvor bei alleiniger 5-HT (30 μ M)-Applikation einen Einwärtsstrom zeigten, löste Ketamin in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

a)



b)

		Ketamin
IC ₅₀ (μ M, Äquilibrium)	Stromamplitude	181 \pm 1,13
	Integral	121 \pm 1,12
	Integral (Maus) ¹	182
	Berechnet ²	58
Hill-coefficient	Stromamplitude	-1,7 \pm 0,31
	Integral	-2,0 \pm 0,53
aLogP		2,70
LogP		2,18

¹Barann, 1993 ²ALOGPS 2.1 Programm

c)

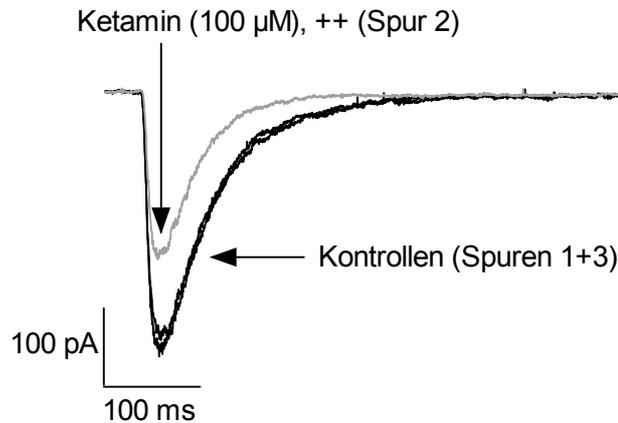


Abbildung 9: **a)** Konzentrationswirkungskurve (Mittelwerte \pm SEM): Effekte von Ketamin auf den 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Einwärtsstrom (-100 mV) im Äquilibrium-Applikationsmodus „++“ bezogen auf die Maximalstromamplitude („peak“) und das Integral, c_{klin} = klinische Plasmakonzentration von Ketamin, signifikante Inhibierung ($p < 0,05$) ab einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ Ketamin („peak“ + Integral), gepaarter t -Test basierend auf den Absolutwerten in pA; **b)** Fit- und Vergleichsparameter; **c)** Exemplarische Originalspuren 5-HT-induzierter Ströme an $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptoren (-100 mV): 5-HT ($30 \mu\text{M}$) wurde alternierend in Abwesenheit (Kontrolle) und in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Ketamin (60 s vor und während des Agonistenpulses = Äquilibrium „++“) auf den „patch“ appliziert.

Die Konzentrationswirkungskurve in Abbildung 9 a) sowie die Originalspuren in Abbildung 9 c) zeigen, dass Ketamin konzentrationsabhängig und reversibel den 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Einwärtsstrom inhibiert. Dieser Effekt konnte sowohl bei den Amplituden als auch beim Integral festgestellt werden. Dabei wurde deutlich, dass das Integral - im Vergleich zu den Amplituden - bei gleicher Ketaminkonzentration eine stärkere Inhibierung des 5-HT-induzierten Stromes aufweist. Dies spiegelt sich auch in dem in Abbildung 9 b) demonstrierten höheren IC_{50} -Wert der Stromamplituden ($181 \mu\text{M}$; Integral: $121 \mu\text{M}$) wider.

Der graue Balken in Abbildung 9 a) bezeichnet die therapeutische oder klinische Plasmakonzentration von Ketamin: $c_{\text{klin}} = 1 - 6 \mu\text{g/ml}$, entsprechend $3,7 - 22 \mu\text{M}$ (Schulz und Schmoltdt, 2003).

Bei den ermittelten Stromkurven wurden zusätzlich die Aktivierungs- (τ_{on} ; Abb. 10) und die Inaktivierungskinetik (τ_{off} ; Abb. 11) untersucht. Während bei der Aktivierungskinetik weder eine signifikante Beschleunigung noch eine Verlangsamung registriert werden konnte, kam es bei der Desensibilisierung zu einer signifikanten Beschleunigung ($p < 0,05$) ab einer Konzentration von 100 μM Ketamin ($41,7 \pm 9,6 \%$).

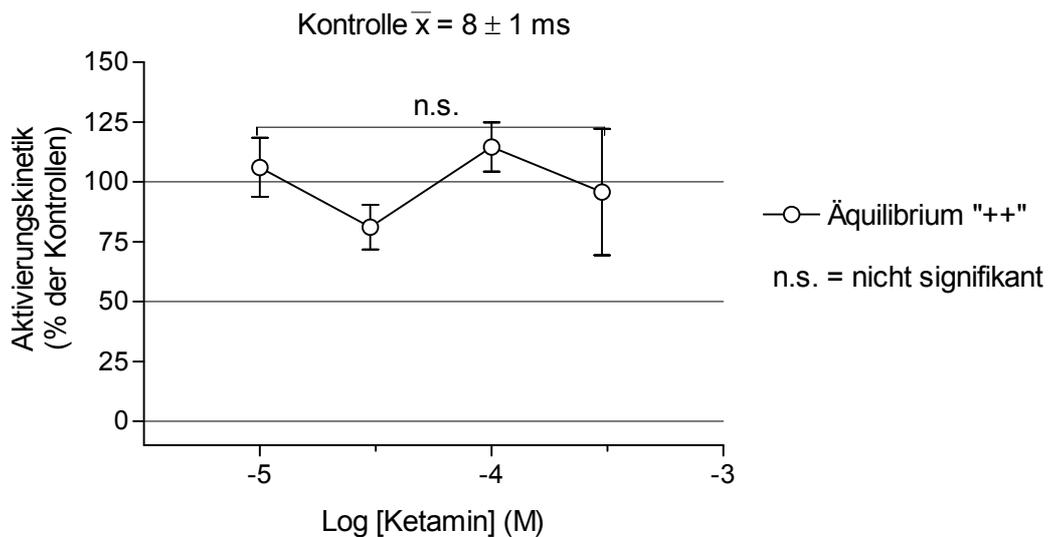


Abbildung 10: Effekte von Ketamin auf die Aktivierungszeitkonstante „ τ_{on} “ 5-HT (30 μM)-induzierter Ströme in der Äquilibrium-Applikation. Darstellung der Aktivierungszeitkonstante in % der 30 μM 5-HT-Kontrollen in Bezug auf die Ketamin-Konzentration (10 μM bis 1 mM). Es zeigte sich, dass die Aktivierungszeit bei keiner der gemessenen Ketamin-Konzentrationen signifikant beeinflusst wurde. Der Wert bei 1 mM wird hier nicht gezeigt, da eine Kinetik aufgrund 100%iger Inhibierung der Maximalamplitude nicht bestimmbar war.

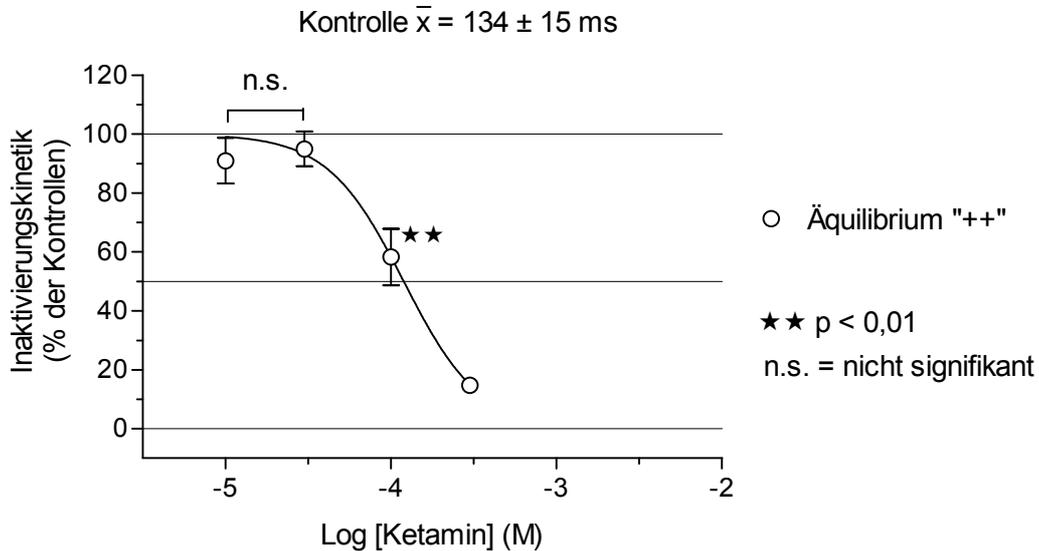
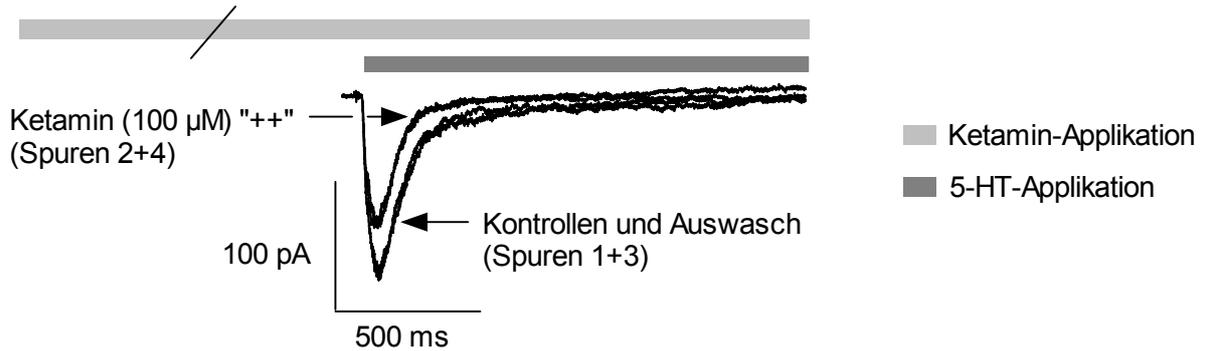


Abbildung 11: Effekte von Ketamin auf die Inaktivierungszeitkonstante „ τ_{off} “ 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme in der Äquilibrium-Applikation. Darstellung der Inaktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrollen in Bezug auf die Ketamin-Konzentration ($10 \mu\text{M}$ bis 1mM). Es zeigte sich, dass die Inaktivierungszeit ab einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ Ketamin signifikant ($p < 0,01$) beschleunigt wurde. Der Wert bei 1mM wird hier nicht gezeigt, da eine Kinetik aufgrund 100 %iger Inhibierung der Maximalamplitude nicht bestimmbar war.

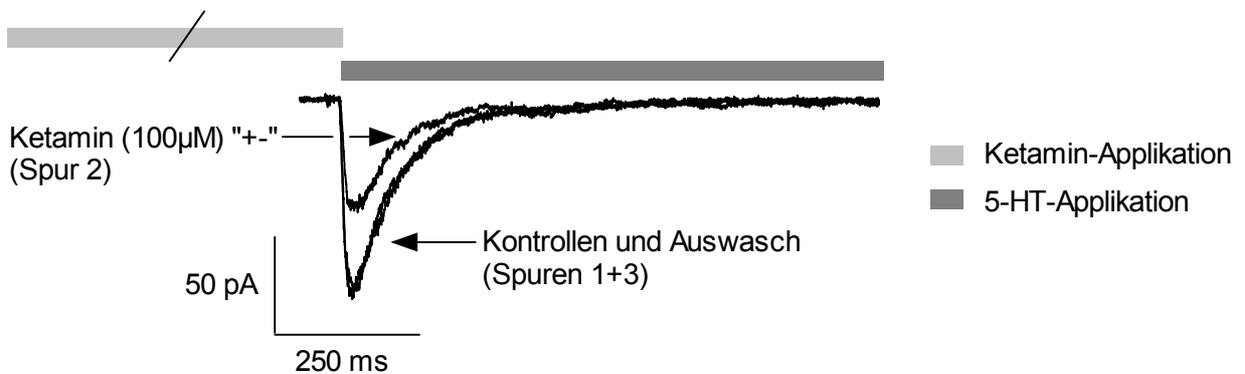
Da der IC_{50} -Wert beim Maximal-, Integral- und „tracer flux“-Strom zwischen 100 und $200 \mu\text{M}$ lag, wurde für die weiteren Experimente eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ Ketamin gewählt. Im Äquilibriumexperiment wurde bei dieser Konzentration eine durchschnittliche Hemmung von $37,5 \pm 3,25 \%$ ($p < 0,001$; Maximalstrom) und $52,9 \pm 3,2 \%$ ($p < 0,001$; Integral) ermittelt.

4.1.2 Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt von Ketamin

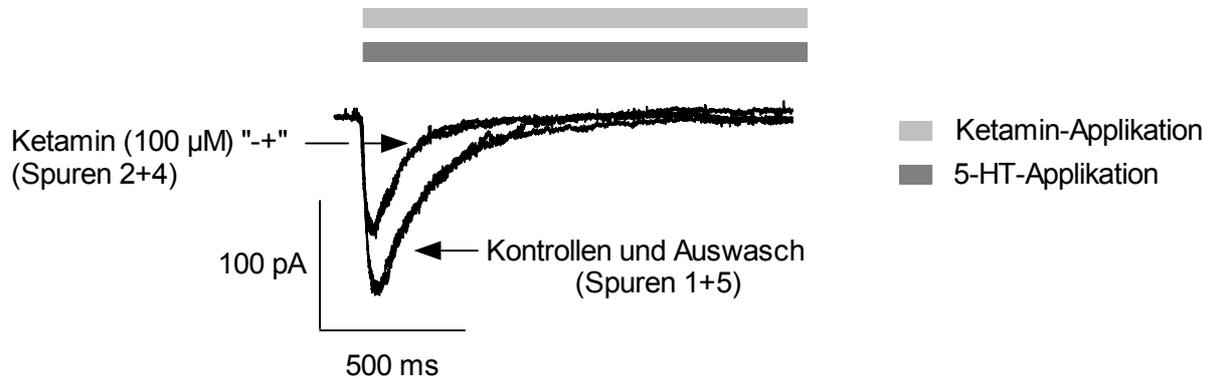
Die Abbildung 12 zeigt exemplarische Originalspuren für die drei Applikationsmodi Äquilibrium-, Geschlossen- und Offenkanal-Applikation und verdeutlicht die Applikationsunterschiede.



A: Äquilibrium-Applikation „++“ (100 µM Ketamin)



B: Geschlossenkanal-Applikation „+“-“ (100 µM Ketamin)



C: Offenkanal-Applikation „-+“ (100 µM Ketamin)

Abbildung 12: Exemplarische Originalspuren in der Äquilibrium- (A), Geschlossenkanal- (B) und Offenkanal-Applikation (C) (100 µM Ketamin). In der Äquilibrium-Applikation wird 60 s vor und während des 5-HT-Pulses die Substanz (hier Ketamin) appliziert. In der Offenkanal-Applikation wird ausschließlich während des 5-HT-Pulses die Substanz appliziert; in der Geschlossenkanal-Applikation hingegen nur während der 60 s vor dem 5-HT-Puls.

In der Offenkanal-Applikationsart, die einem Einwasch von ungefähr 10 - 20 ms vor dem Maximalstrom entspricht, wurden bereits 77 % der in der Äquilibrium-Applikationsart erzielten Amplitudeninhibierung erreicht (Abbildung 13). In der Geschlossenkanal-Applikationsart, die einem Auswasch von ungefähr 10 - 20 ms vor dem Maximalstrom entspricht, wurden noch 54 % des in der Äquilibrium-Applikationsart gemessenen Hemmeffektes erreicht.

Wie an der Offenkanal-Applikation (Abbildung 14) deutlich zu sehen ist, treten die Effekte von Ketamin sehr schnell ein (nach ~ 10 ms). Die in der Offenkanal- und Äquilibrium-Applikation ermittelten Inhibierungen der Kontrollen („-+“ $55,6 \pm 1,9 \%$, „++“ $51,2 \pm 2,5 \%$) unterscheiden sich nur geringgradig. Ein schneller Effektverlust zeigt sich im Geschlossenkanal-Modus (Inhibierung „+-“ $22,63 \pm 3,9 \%$).

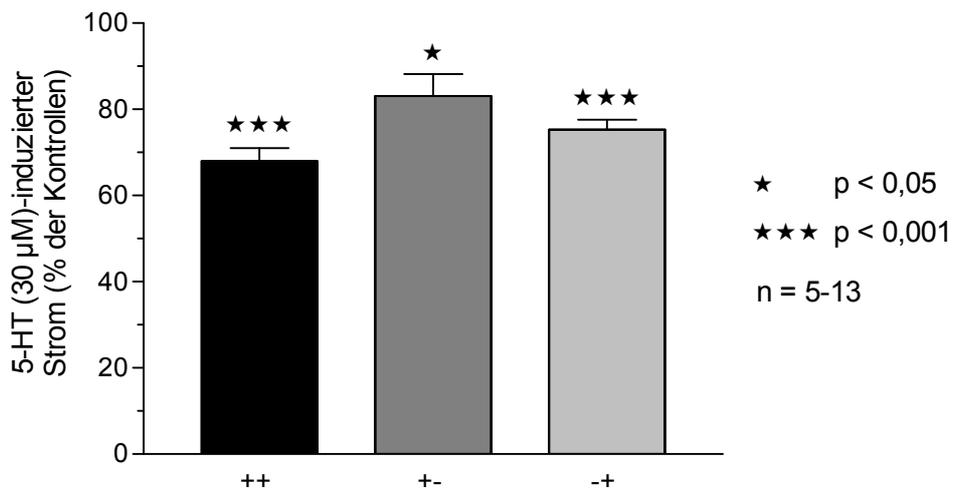


Abbildung 13: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme („peak“) bei Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+“-) und Offenkanal („-+“-) Applikationsmodus. Es wurden folgende prozentuale Inhibierungen der Kontroll-Amplituden gemessen: „++“ 32 ± 3,1 % (p < 0,001), „+“- 16,9 ± 5,1 % (p < 0,05) und „-+“- 24,7 ± 2,3 % (p < 0,001).

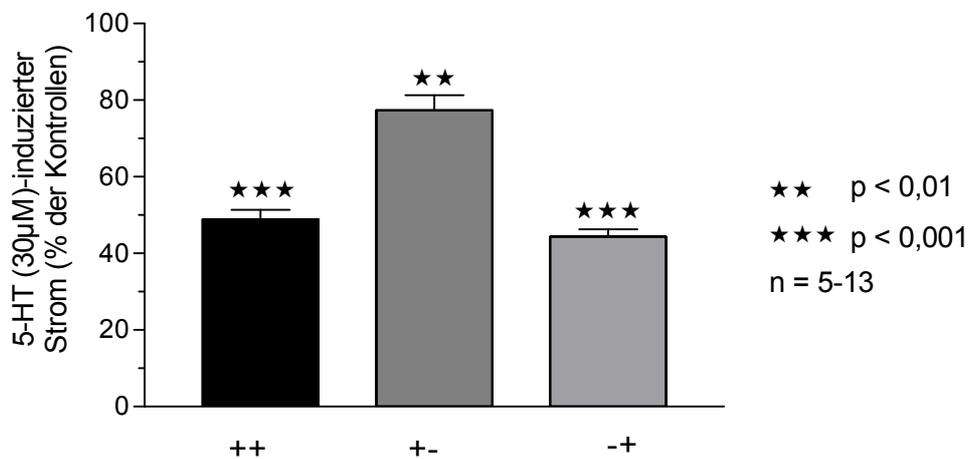


Abbildung 14: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+“-) und Offenkanal („-+“-) Applikationsmodus. Es wurden folgende prozentuale Inhibierungen der Kontroll-Integrale gemessen: „++“ 51,2 ± 2,5 %, „+“- 22,63 ± 3,9 % und „-+“- 55,6 ± 1,9 %.

In der Äquilibrium-Applikation zeigte sich eine nicht signifikante Verlangsamung der Aktivierungskinetik im Vergleich zu den Kontrollen. Bei der Geschlossenkanal- und der Offenkanal-Applikation wurden hingegen jeweils eine nicht signifikante Beschleunigung der Aktivierungskinetik gemessen (Abbildung 15).

Wie Abbildung 16 zeigt, waren bei den Äquilibrium- und Offenkanalexperimenten signifikante Beschleunigungen der Desensibilisierungs-/Inaktivierungskinetiken zu sehen („++“ $38,5 \pm 7,2\%$, $p < 0,001$; „-+“ $48,4 \pm 4,8 \%$, $p < 0,05$). Bei den Geschlossenkanal-experimenten kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Inaktivierungskinetik.

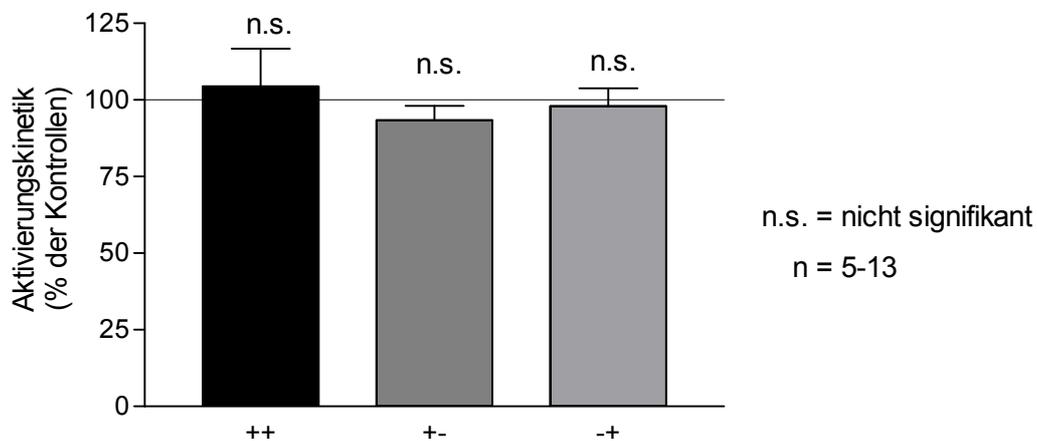


Abbildung 15: Vergleich der Aktivierungskinetiken „ τ_{on} “ in der Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+ -“)- und Offenkanal („- +“)-Applikation ($100 \mu\text{M}$ Ketamin). Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „++“ = $105 \pm 12 \%$, „+ -“ = $93 \pm 5 \%$, „- +“ = $98 \pm 6 \%$.

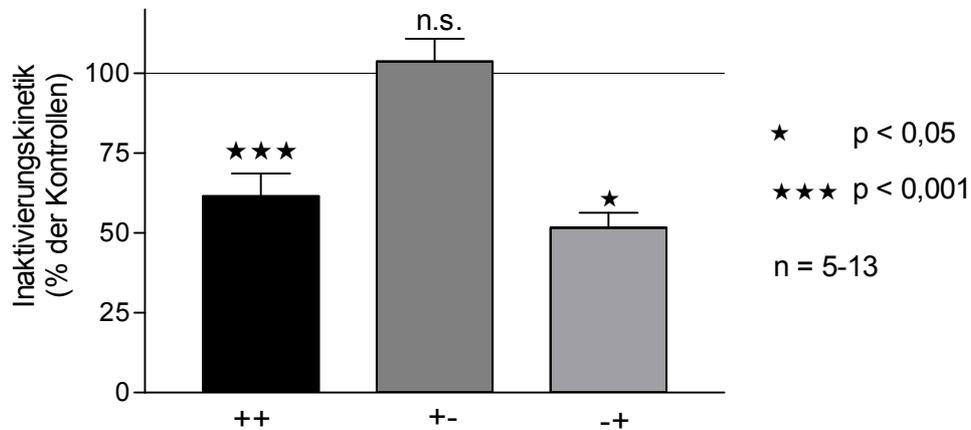


Abbildung 16: Vergleich der Inaktivierungskinetiken „ τ_{off} “ in der Äquilibrium (++)-, Geschlossenkanal (+-) und Offenkanaal (-+)-Applikation mit 100 μM Ketamin. Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „++“ = $61,5 \pm 7,2 \%$, „+-“ = $103,8 \pm 7,1 \%$, „-+“ = $51,6 \pm 4,8 \%$.

4.1.3 Einwaschexperimente

Bei den Einwaschexperimenten (Abbildung 17) wurden Zeiten zwischen 32 ms und 10 s gewählt. Bereits bei der kürzesten Einwaschzeit dieser Messreihe (32 ms) war eine $24,8 \pm 3,17 \%$ ige Inhibierung ($p < 0,01$) des 5-HT-induzierten Einwärtsstromes zu sehen, was auf einen sehr schnellen Effekt des Ketamins am 5-HT-Rezeptor hindeutet. Dieser Wert wurde durch das Ergebnis aus der Offenkanaal-Applikation („-+“ $24,7 \pm 2,3 \%$, $p < 0,001$) verifiziert. Die Offenkanaal-Applikation stellt das Experiment mit der kürzesten zu messenden Einwaschzeit (~ 20 ms) dar. Auch hier stellt man eine Inhibierung von ca. 25 % fest. Nach einem Einwasch von 20 ms wurden über 75 % der beim Äquilibriumexperiment erzielten Inhibierung erreicht (Memo: 32 %ige Hemmung bei „++“). Nach einem Einwasch von 32 ms wurden schon 80 % der im Äquilibrium-Modus erzielten Inhibierung erreicht. Der schnellen, nicht bestimmbareren Zeitkonstante innerhalb der ersten 20 ms folgte eine langsamere Zeitkonstante ($\tau_{\text{langsam}} = 1$ s) bis zur Erreichung des Äquilibriumwertes.

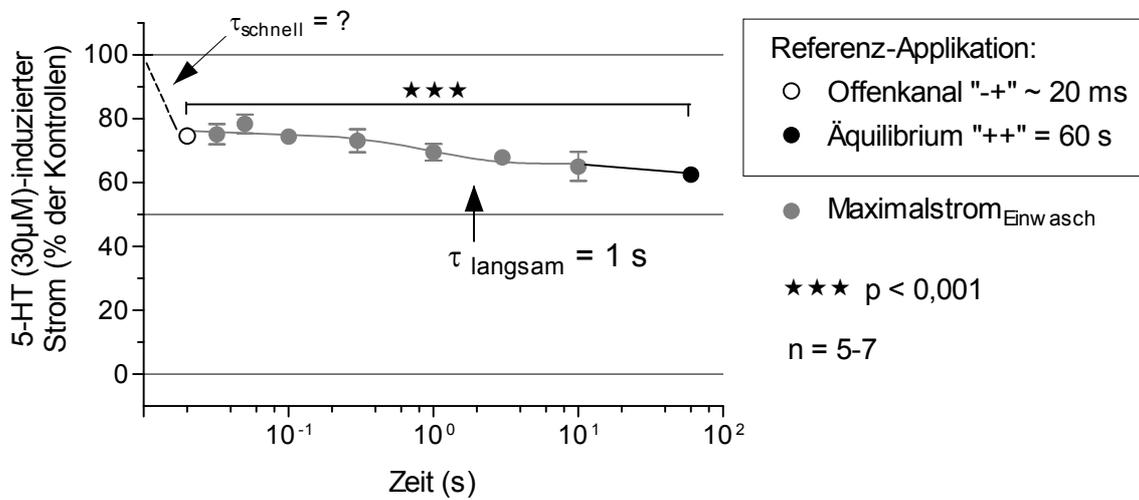


Abbildung 17: Vergleich der Effekte von 100 μM Ketamin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei jeder gemessenen Einwaschzeit kam es zu einer signifikanten Inhibierung ($p < 0,001$) der Amplituden.

Abbildung 18 zeigt, dass das Integral ebenfalls mit einem sehr schnellen Effekt binnen der ersten 20 ms Einwasch auf den Äquilibriumwert inhibiert wurde.

Im Einklang mit den Äquilibriumexperimenten bestand keine signifikante Beeinflussung der Aktivierungskinetik (Abbildung 19).

Wie in Abbildung 20 zu sehen, war die Inaktivierungskinetik bereits binnen ~ 20 ms mit $51,62 \pm 4,78$ % und 32 ms mit $53,16 \pm 4,56$ % der Kontrollen auf dem Niveau der Äquilibriummessung ($47,1 \pm 3,2$ %).

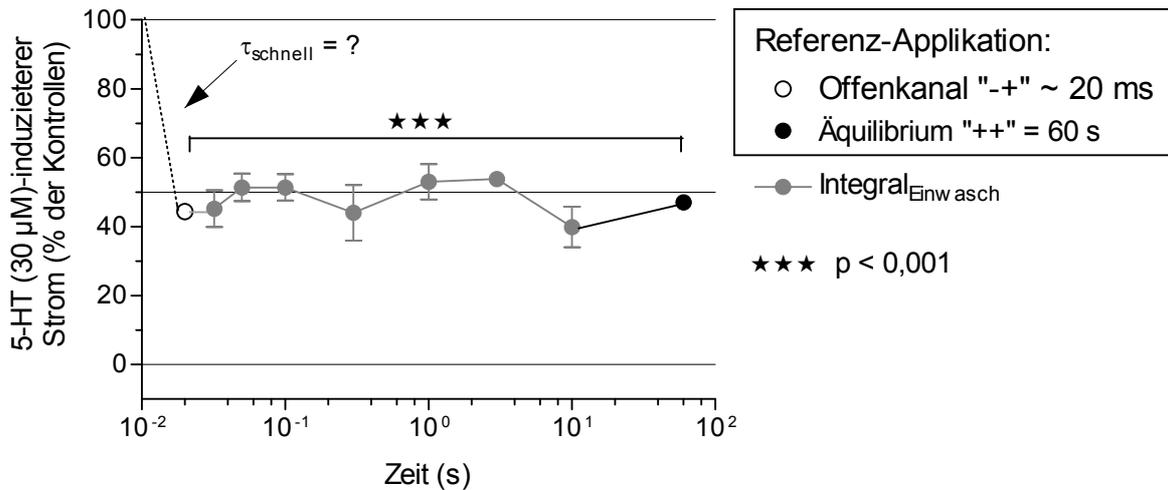


Abbildung 18: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei jeder gemessenen Einwaschzeit kam es zu einer signifikanten Inhibierung ($p < 0,001$) der Amplituden.

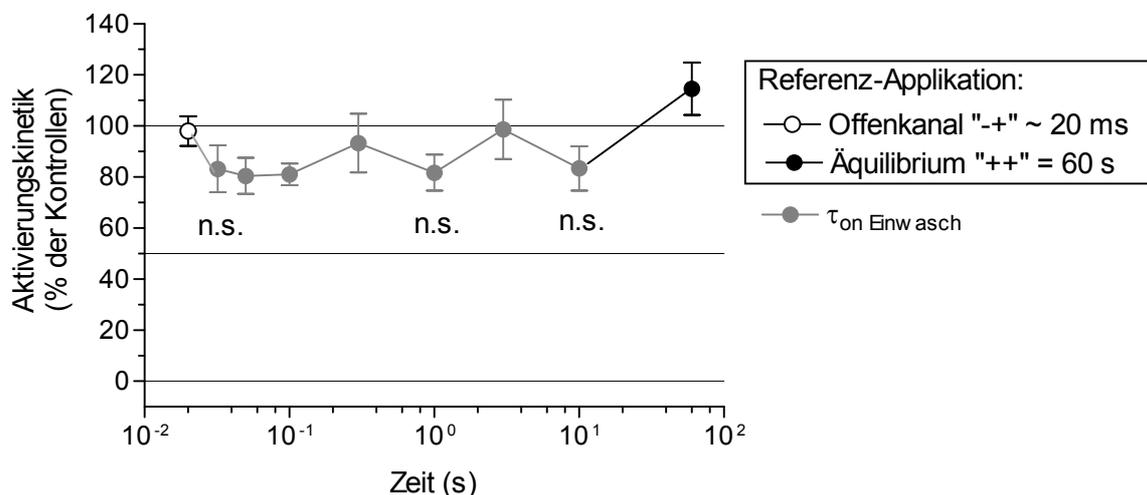


Abbildung 19: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf die Aktivierungskinetik bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei keiner der gemessenen Einwaschzeiten kam es zu einer signifikanten Beeinflussung der Kinetik.

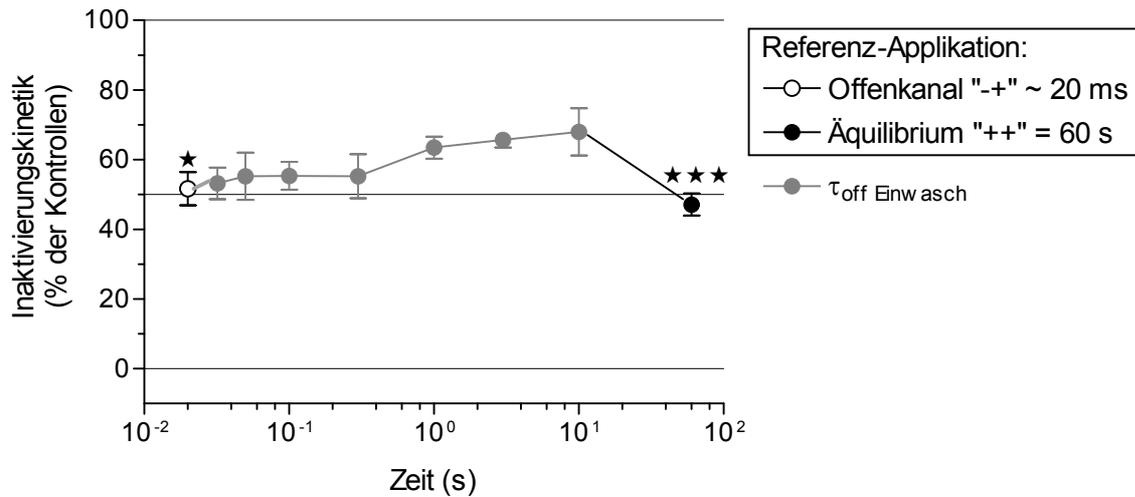


Abbildung 20: Vergleich der Effekte von 100 μM Ketamin-Konzentrationen auf die Inaktivierungskinetik bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei allen gemessenen Einwaschzeiten kam es zu einer signifikanten Beschleunigung der Inaktivierungskinetik.

4.1.4 Auswaschexperimente

Die Ergebnisse der Auswaschexperimente für Ketamin (100 μM) (Abbildung 21) zeigen, dass bereits 32 ms Auswasch einen 50 %igen Rückgang der im Äquilibrium-Modus bewirkten Strominhibierung hervorrief. Die Inhibierung betrug beim Auswasch von 32 ms $18,73 \pm 3,23 \%$, beim Äquilibriumexperiment $37,46 \pm 3,25 \%$. Dieser schnellen Komponente folgte ein Plateau. Erst im Bereich zwischen 300 ms und 10 s folgte eine zweite schnelle Komponente mit einem Rückgang der Hemmung auf wenige Prozent. Der zum Vergleich eingetragene Mittelwert aus der Geschlossenkanal-Applikation (Inhibierung $16,9 \pm 5,1 \%$) stellt die kürzeste, messbare Auswaschzeit dar und verifiziert die schnelle Effektkomponente.

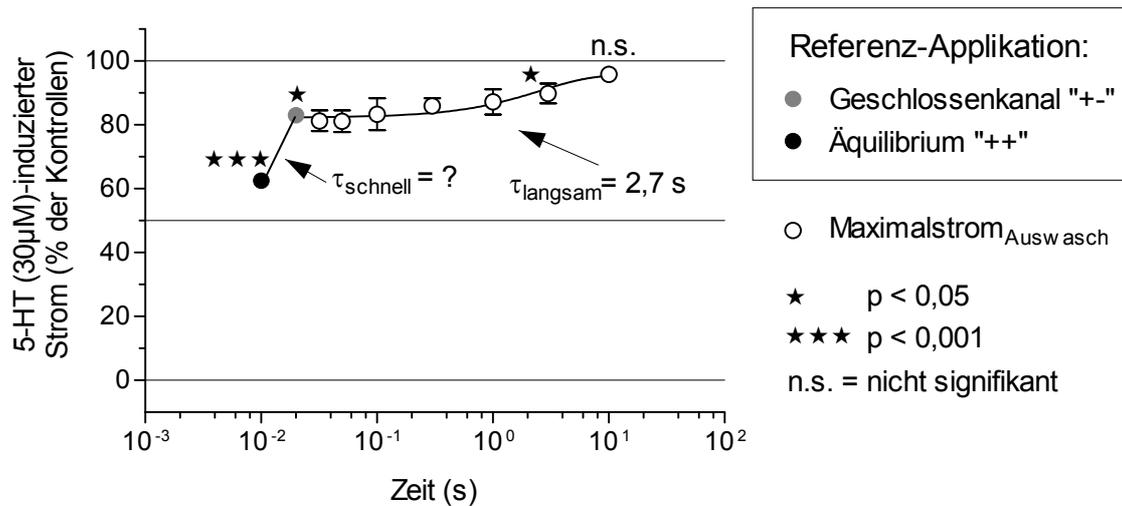


Abbildung 21: Vergleich der Effekte von 100 μM Ketamin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei den Auswaschzeiten wurde bis einschließlich dem 3 s-Wert eine signifikante Inhibierung ($p < 0,05$) der Amplituden ermittelt.

Die Ergebnisse der Auswaschexperimente für die integrierten Ströme (Abbildung 22) zeigen analog zu den Ergebnissen für die Maximalströme bereits beim Auswasch von 32 ms einen Rückgang um 31 % der in der Äquilibriummessung hervorgerufenen Inhibierung (Inhibierung: Auswasch (32 ms) $35,4 \pm 4,36$ %, Äquilibrium $51,16 \pm 2,52$ %). Der Vergleichswert aus der Geschlossenkanal-Applikation zeigt eine Inhibierung von $16,19 \pm 7,18$ %.

In den Auswaschexperimenten kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Aktivierungskinetik (Abbildung 23).

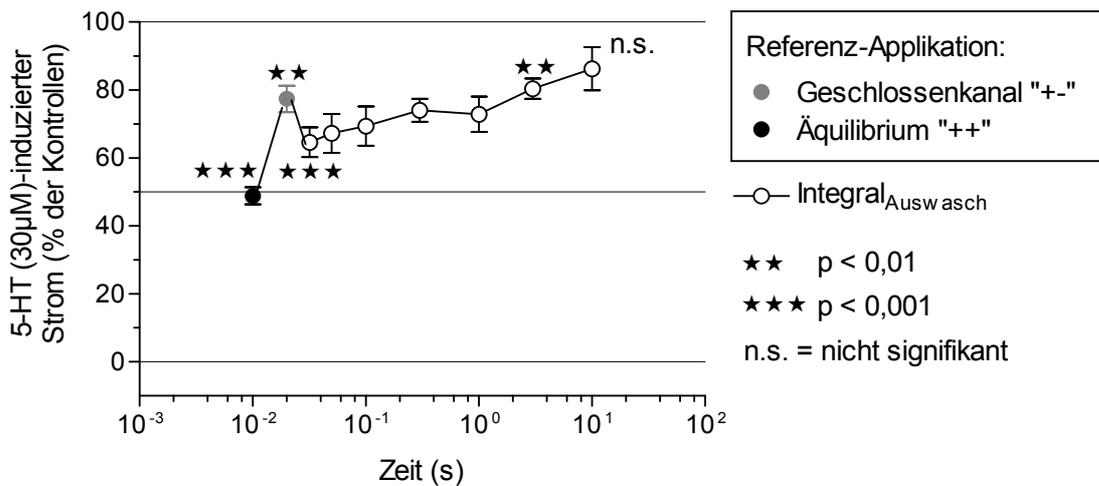


Abbildung 22: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei den Auswaschzeiten wurde bis einschließlich dem 3 s-Wert eine signifikante Inhibition ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$) der Amplituden ermittelt.

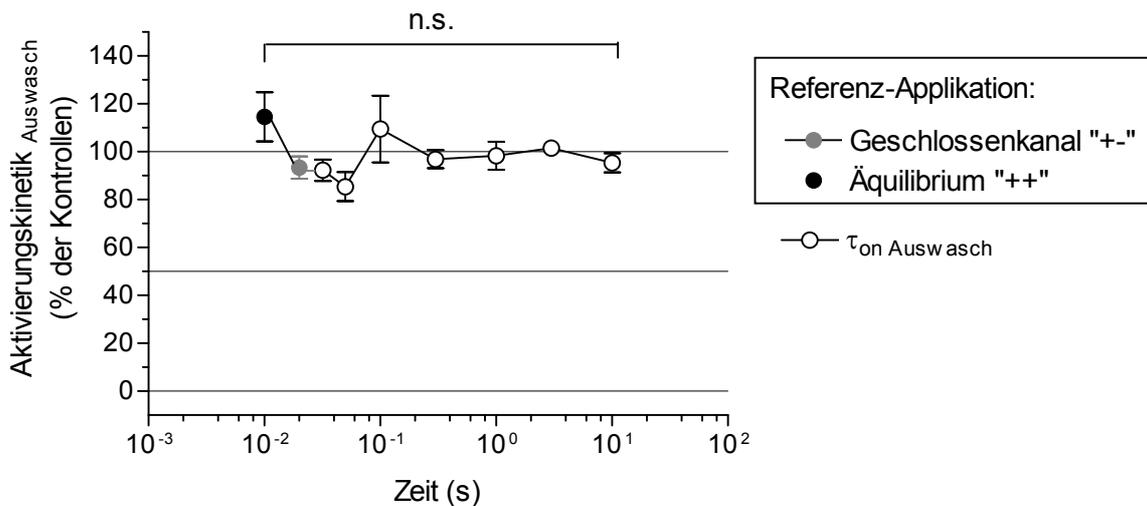


Abbildung 23: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf die Aktivierungskinetik bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei keiner der gemessenen Einwaschzeiten kam es zu einer signifikanten Beeinflussung der Kinetik.

Die Inaktivierungskinetik wurde in einem schnellen Prozess binnen der ersten 32 ms des Auswasches noch auf $82,47 \pm 4,29$ % der Kontrolle beschleunigt. In der Äquilibriummessung ergab sich eine Beschleunigung auf $61,5 \pm 7,2$ % der Kontrollen (Abbildung 24).

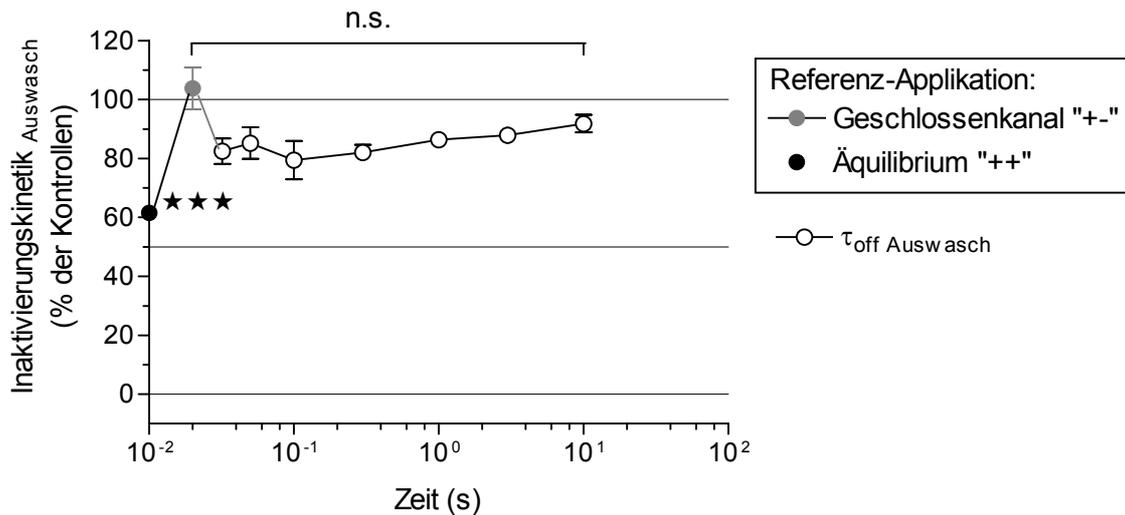


Abbildung 24: Vergleich der Effekte von $100 \mu\text{M}$ Ketamin auf die Inaktivierungskinetik bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Eine signifikante Beschleunigung der Inaktivierungskinetik war ausschließlich bei Äquilibrium-Applikation messbar.

4.1.5 Konzentrationssprungexperimente

Bei den Einwasch- und Auswaschexperimenten waren jeweils die ersten 20 bis 32 ms die Zeiträume mit dem Haupteffekt. Da die bis dato verwendeten Applikationsmodi ihre geringste Zeitauflösung bei ca. 20 ms haben, sollten sogenannte Konzentrationssprungexperimente einen Einblick in diesen schwer erfassbaren Zeitraum geben. In diesen Experimenten werden die zu untersuchenden Substanzen während des Agonistenpulses appliziert. Abbildung 25 zeigt ein typisches Konzentrationssprungexperiment.

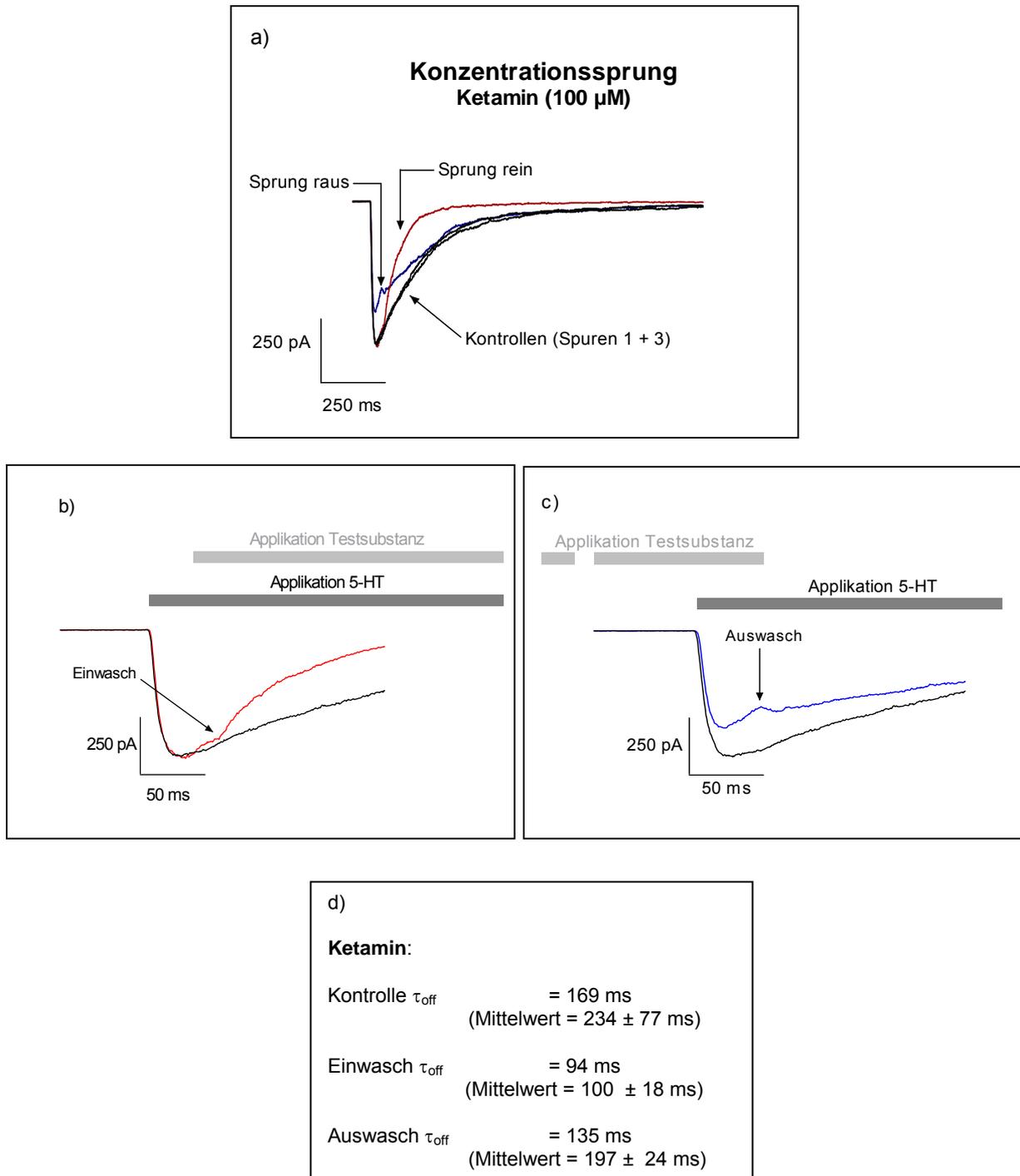


Abbildung 25: **a)** Darstellung der Effekte von 100 μM Ketamin auf den 5-HT (30 μM)-induzierten Einwärtsstrom (-100 mV) bei Konzentrationssprungexperimenten; **b)** Beim „Sprung rein“-Experiment wurde zuerst für 0,05 s 5-HT appliziert, dann für 1,55 s 5-HT gemeinsam mit 100 μM Ketamin; **c)** Beim „Sprung raus“ wurden für 0,05 s 5-HT und Ketamin appliziert, anschließend für 1,55 s ausschließlich 5-HT; **d)** Vergleich der Inaktivierungskinetiken der Konzentrationssprungexperimente mit der Kontrolle.

Bei den „Sprung rein“-Experimenten war eine nicht signifikante Hemmung auf die Stromamplitude zu sehen. Diese Inhibierung ist am ehesten als Variabilität der Stromkurven zu deuten, da die Ketamin-Applikation erst nach Erreichen des Maximalstroms erfolgte.

Beim „Sprung raus“ sah man bereits eine signifikante Hemmung von $22,1 \pm 1,14 \%$ ($p < 0,001$; Abbildung 26).

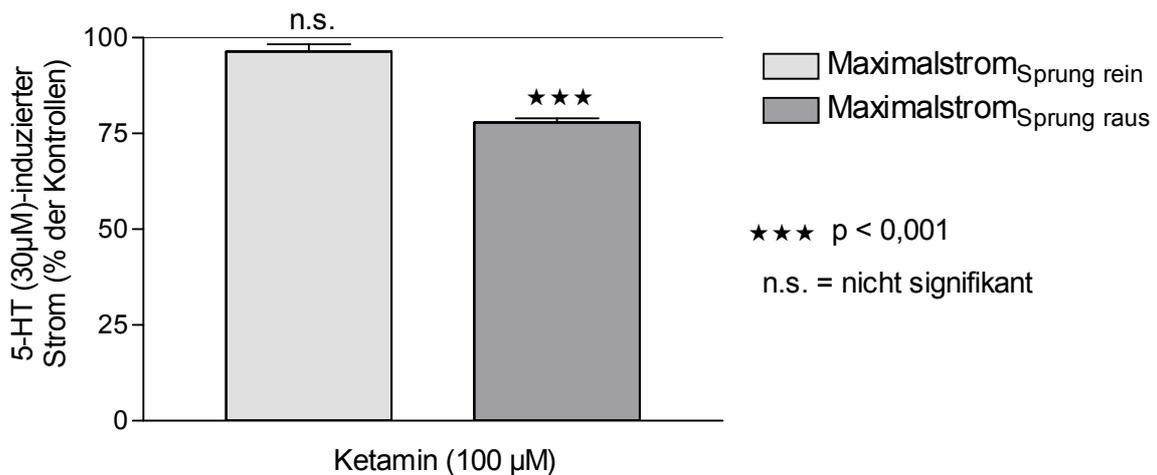


Abbildung 26: Vergleich der Effekte von $100 \mu\text{M}$ Ketamin auf die 5-HT_{3A} -Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Beim „Sprung rein“ wurde eine nicht signifikante Inhibierung von $3,6 \pm 1,9 \%$, beim „Sprung raus“ hingegen eine signifikante Inhibierung von $22,14 \pm 1,1 \%$ ($p < 0,001$) festgestellt.

Im Gegensatz zu den Stromamplituden zeigte sich beim Integral sowohl beim „Sprung rein“ als auch beim „Sprung raus“ eine signifikante Inhibierung. Beim „Sprung raus“ wurde noch 50 % der beim „Sprung rein“ ermittelten Inhibierung erreicht (Abbildung 27).

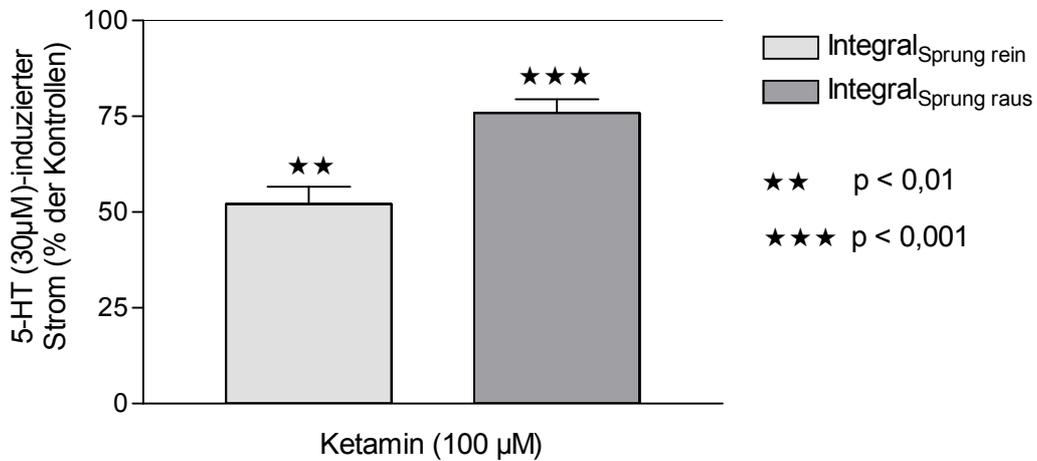


Abbildung 27: Vergleich der Effekte von 100 µM Ketamin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Sowohl beim „Sprung rein“ als auch beim „Sprung raus“ wurde eine signifikante Inhibierung festgestellt: „Sprung rein“ 47,9 ± 4,5 % ($p < 0,01$), „Sprung raus“ 24,1 ± 3,6 % ($p < 0,001$).

Die Aktivierungskinetik wurde - wie in Abbildung 28 zu sehen - weder bei den „Sprung rein“- (4,96 ± 11,45 %) noch bei den „Sprung raus“-Experimenten (11,42 ± 10,84 %) signifikant beeinflusst.

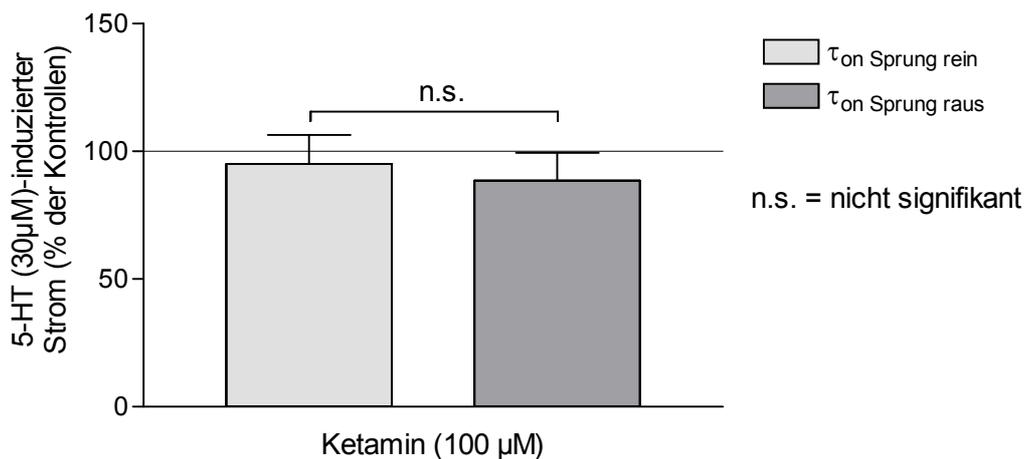


Abbildung 28: Vergleich der Aktivierungskinetiken „τ_{on}“ in der „Sprung rein“ und der „Sprung raus“-Applikation bei 100 µM Ketamin. Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „Sprung rein“: 95 ± 11,5 %, „Sprung raus“ = 88,6 ± 10,8 %.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen, war die Inaktivierungskinetik bereits beim „Sprung rein“-Experiment auf dem Niveau der Äquilibriummessung. Beim „Sprung raus“-Experiment dagegen zeigte sich ein schneller Effektverlust.

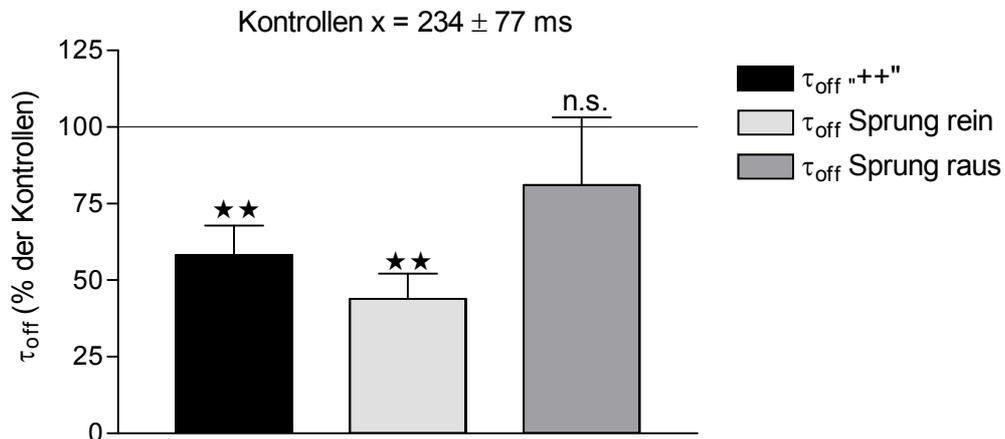


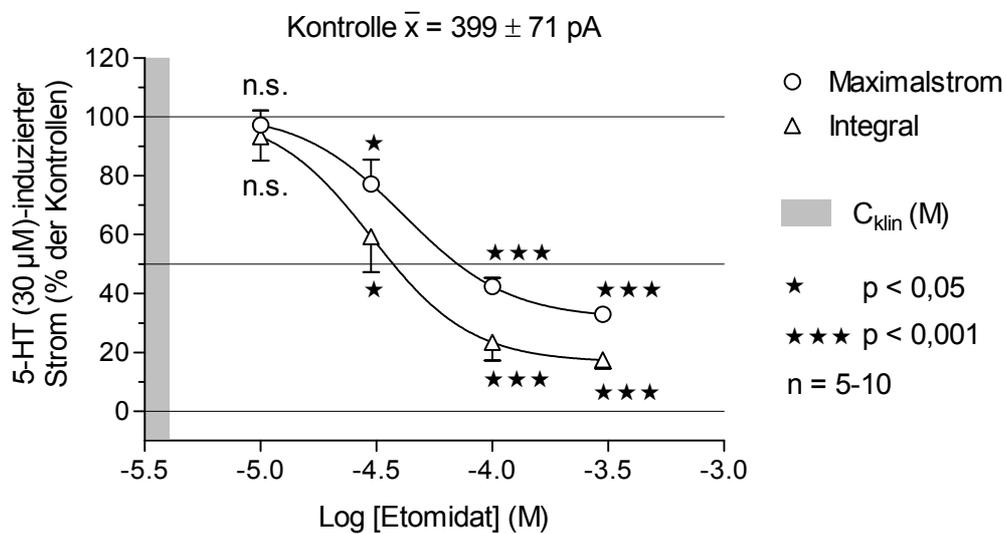
Abbildung 29: Vergleich der Inaktivierungskinetiken „ τ_{off} “ in der „Sprung rein“ und der „Sprung raus“-Applikation bei $100 \mu\text{M}$ Ketamin. Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „Sprung rein“: $43,9 \pm 8,24$ %, „Sprung raus“ = $81,1 \pm 22,1$ %. Im Äquilibrium wurde $58,3 \pm 9,6$ % der Kontrollen ermittelt.

4.2 Etomidat

4.2.1 Konzentrationswirkungskurve

Die Konzentrationswirkungskurve von Etomidat wurde in der Äquilibrium-Applikationsart erstellt. In „patches“, die zuvor bei alleiniger 5-HT (30 μ M)-Applikation einen Einwärtsstrom zeigten, löste Etomidat in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

a)



b)

		Etomidat
IC ₅₀ (μ M, Äquilibrium)	Stromamplitude	42 \pm 1,25
	Integral	30 \pm 1,38
	Integral (Maus) ¹	12
	Berechnet ²	63
Hill-coefficient	Stromamplitude	-1,9 \pm 0,76
	Integral	-2,0 \pm 1,5
aLogP		2,66
LogP		2,99

¹Barann, 1993 ²ALOGPS 2.1 Programm

c)

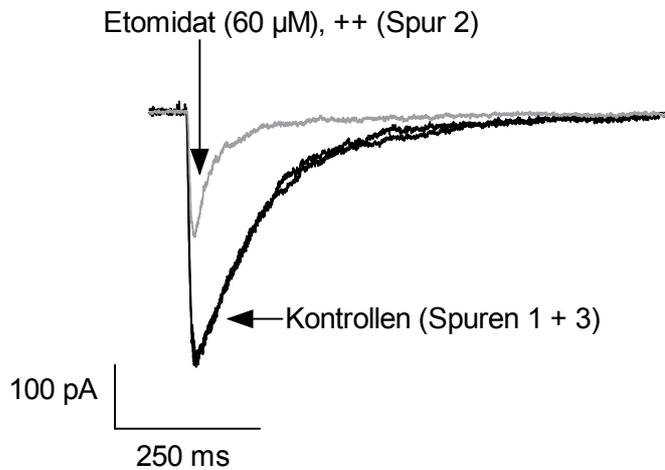


Abbildung 30: a) Konzentrationswirkungskurve (Mittelwerte \pm SEM): Effekte von Etomidat auf den 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Einwärtsstrom (-100mV) im Äquilibrium-Applikationsmodus „++“ bezogen auf die Maximalstromamplitude („peak“) und das Integral; c_{klin} = klinische Plasmakonzentration von Etomidat; signifikante Inhibierung $p < 0,05$ ab einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ Etomidat („peak“ + Integral), gepaarter t-Test basierend auf den Absolutwerten in pA; **b)** Fit- und Vergleichsparameter; **c)** Exemplarische Originalspuren 5-HT-induzierter Ströme an $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptoren (-100 mV): 5-HT ($30 \mu\text{M}$) wurde alternierend in Abwesenheit (Kontrolle) und in Anwesenheit von $60 \mu\text{M}$ Etomidat (60 s vor und während des Agonistenpulses = Äquilibrium „++“) auf den „patch“ appliziert.

Die Konzentrationswirkungskurve in Abbildung 30 a) sowie die Originalspuren in Abbildung 30 c) zeigen, dass Etomidat konzentrationsabhängig und reversibel den 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Einwärtsstrom inhibiert. Dieser Effekt konnte sowohl bei den Amplituden als auch beim Integral festgestellt werden. Dabei wurde deutlich, dass bei gleicher Konzentration im Integral eine stärkere Inhibierung des 5-HT-induzierten Stromes als bei den Stromamplituden erfolgte. Dies spiegelt sich auch in dem in Abbildung 30 b) demonstrierten höheren IC_{50} -Wert der Stromamplituden ($42 \mu\text{M}$; Integral $30 \mu\text{M}$) wider.

Der graue Balken in Abbildung 30 a) bezeichnet die therapeutische oder klinische Plasmakonzentration von Etomidat: $c_{\text{klin}} = 0,1 - 0,5 (-1) \mu\text{g/ml}$, entsprechend $0,4 - 2,1 (-4,1) \mu\text{M}$ (Schulz und Schmoltdt, 2003).

Wie in Abbildung 31 zu sehen, wurde die Aktivierungskinetik der 5-HT (30 μ M)-induzierten Ströme bei keiner der gemessenen Etomidat-Konzentrationen signifikant beeinflusst.

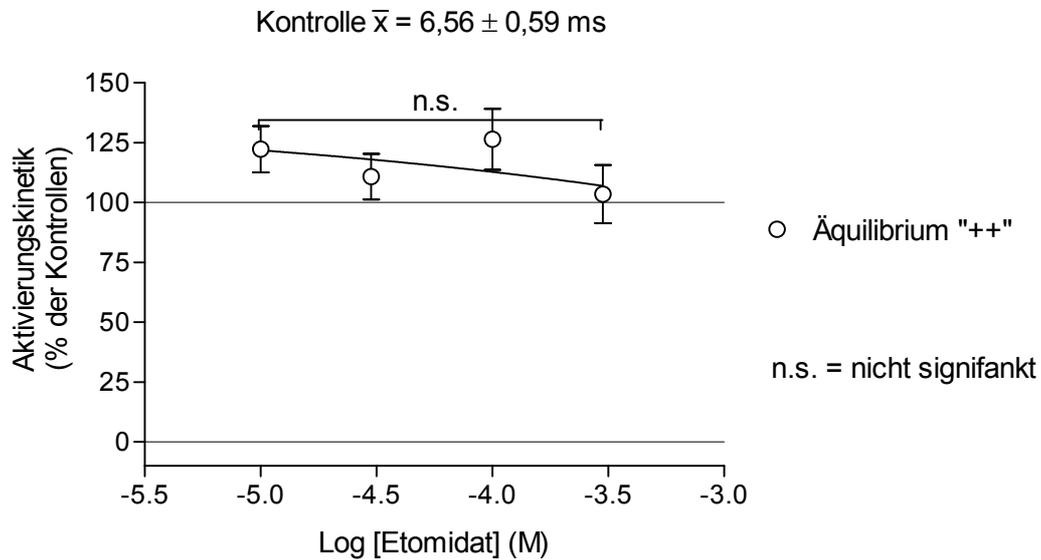


Abbildung 31: Effekte von Etomidat auf die Aktivierungszeitkonstante „ τ_{on} “ 5-HT (30 μ M)-induzierter Ströme in der Äquilibrium-Applikation. Darstellung der Aktivierungszeitkonstante in % der 30 μ M 5-HT-Kontrollen in Bezug auf die Etomidat-Konzentration (10 μ M bis 1 mM). Es zeigte sich, dass die Aktivierungszeit bei keiner der gemessenen Etomidat-Konzentrationen signifikant beeinflusst wurde. Der Wert bei 1 mM wird hier nicht gezeigt, da eine Kinetik aufgrund 100%iger Inhibierung der Maximalamplitude nicht bestimmbar war.

Im Gegensatz dazu wurde, wie Abbildung 32 zeigt, die Inaktivierungskinetik ab einer Konzentration von 30 μM signifikant beschleunigt ($30,4 \pm 7,2 \%$, $p < 0,05$).

Es wurde eine deutliche Inaktivierungsbeschleunigung gesehen, weshalb die „++“-Spur nur noch tri- und nicht biphasig gefittet werden konnte.

Bei den Konzentrationen 100 μM und 300 μM Etomidat wurden signifikante Inaktivierungsbeschleunigungen von $56,7 \pm 19,2 \%$ ($p < 0,001$), respektive $50,8 \pm 12,3 \%$ ($p < 0,001$) ermittelt.

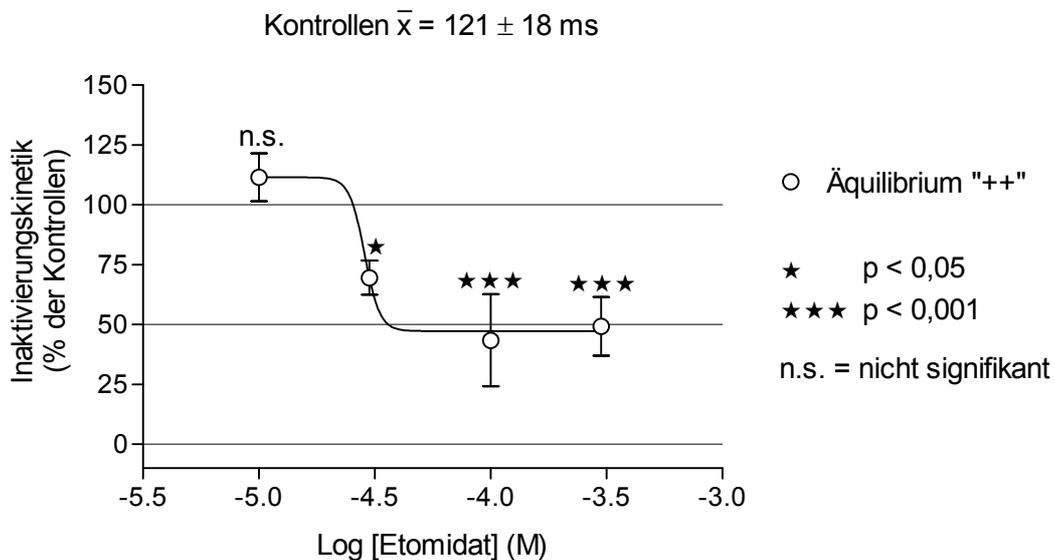


Abbildung 32: Effekte von Etomidat auf die Inaktivierungszeitkonstante „ τ_{off} “ 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme in der Äquilibrium-Applikation. Darstellung der Inaktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT-Kontrollen in Bezug auf die Etomidat-Konzentration ($10 \mu\text{M}$ bis 1 mM). Es zeigte sich, dass die Inaktivierungszeit ab einer Konzentration von $32 \mu\text{M}$ Etomidat signifikant ($p < 0,05$) beschleunigt wurde. Der Wert bei 1 mM wird hier nicht gezeigt, da eine Kinetik aufgrund 100%iger Inhibierung der Maximalamplitude nicht bestimmbar war.

4.2.2 Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt von Etomidat

Etomidat (60 μM) führte in der Äquilibrium-Applikation zu einer Inhibierung des Maximalstroms von $44,37 \pm 2,6 \%$ ($p < 0,001$). In der Geschlossenkanal- ($29,1 \pm 5 \%$ $p < 0,001$) und der Offenkanal-Applikation ($29,14 \pm 2,7 \%$, $p < 0,001$) traten nahezu identische Inhibierungen auf (Abbildung 33; jeweils 66 % der in der Äquilibrium-Applikation gemessenen Inhibierung).

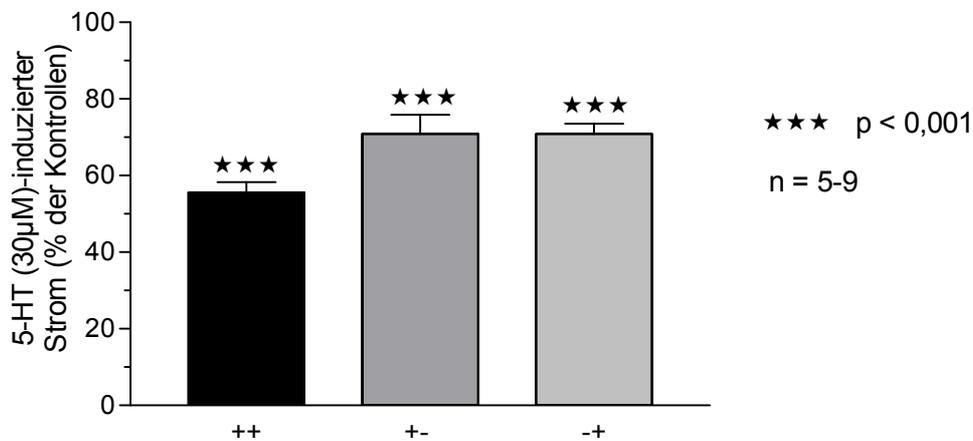


Abbildung 33: Vergleich der Effekte von 60 μM Etomidat auf 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme („peak“) bei Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+“-) und Offenkanal („-+“-)Applikationsmodus. Es wurden folgende prozentuale Inhibierungen der Kontroll-Amplituden gemessen: „++“ $44,37 \pm 2,6 \%$ ($p < 0,001$), „+“- $29,113 \pm 5,0 \%$ ($p < 0,001$) und „-+“ $29,14 \pm 2,7 \%$ ($p < 0,001$).

In der Abbildung 34 zeigt sich, dass - bezogen auf das Integral - in der Äquilibrium- ($55,4 \pm 8,5 \%$) und der Offenkanal-Applikation ($55,4 \pm 2,9 \%$) nahezu identische Werte erzielt wurden. In der Geschlossenkanal-Applikation wurde eine Inhibierung von $39,1 \pm 4,9 \%$ gemessen.

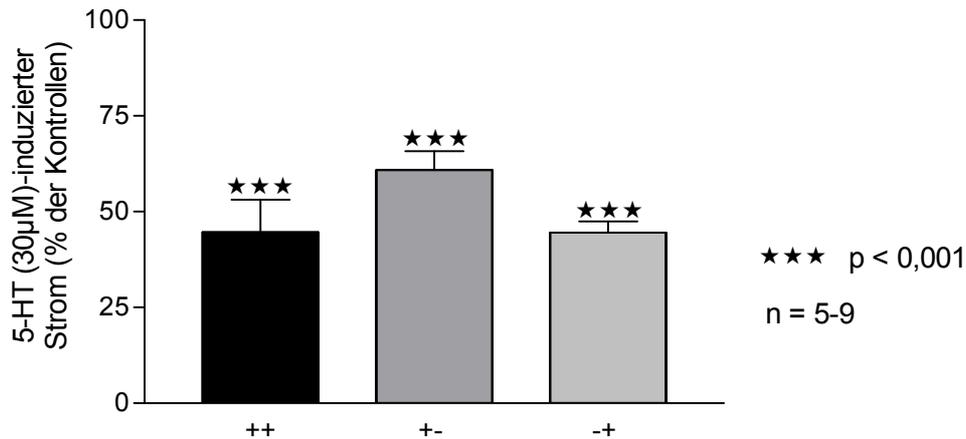


Abbildung 34: Vergleich der Effekte von 60 µM Etomidat auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+-“)- und Offenkanal („-+“)-Applikationsmodus. Es wurden folgende prozentuale Inhibierungen der Kontroll-Integrale gemessen: „++“ 55,4 ± 8,5 % (p < 0,001), „+-“ 39,1 ± 4,9 % (p < 0,001) und „-+“ 55,4 ± 2,9 % (p < 0,001).

Die Aktivierungskinetiken wurden in keiner der drei Applikationsarten signifikant beeinflusst (Abbildung 35). Die Inaktivierungskinetiken (Abbildung 36) hingegen wurden sowohl in der Äquilibrium- (57,6 ± 5,9 %) als auch in der Offenkanal-Applikation (53,83 ± 6,1 %) signifikant beschleunigt. In der Geschlossenkanal-Applikation wurde eine nicht signifikante Beschleunigung von 17,0 ± 8,0 % ermittelt.

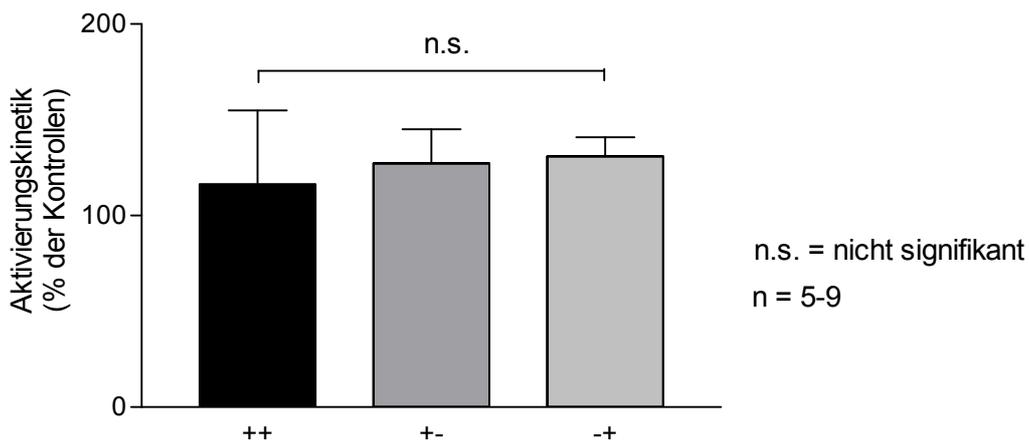


Abbildung 35: Vergleich der Aktivierungskinetiken „τ_{on}“ in der Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+-“)- und Offenkanal („-+“)-Applikation (100 µM Ketamin). Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „++“ = 116,2 ± 38,7 %, „+-“ = 127,2 ± 17,8 %, „-+“ = 131 ± 9,9 %.

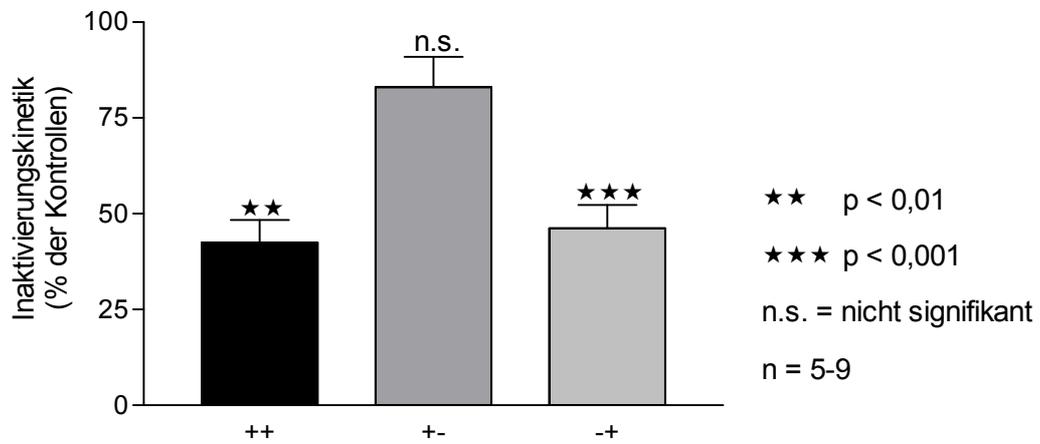


Abbildung 36: Vergleich der Inaktivierungskinetiken „ τ_{off} “ in der Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+ -“) und Offenkanal („- +“)-Applikation mit 60 μ M Etomidat. Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „++“ = 42,44 \pm 5,9 %, „+ -“ = 83 \pm 8,0 %, „- +“ = 46,2 \pm 6,1 %.

4.2.3 Einwaschexperimente

Im Äquilibriumexperiment wurde die Maximalstromamplitude um $44,4 \pm 2,6 \%$ inhibiert. In der Offenkanal-Applikation zeigte sich bereits eine Inhibierung von $29,1 \pm 2,7 \%$, beim Einwasch von 32 ms waren es $37,2 \pm 7,8 \%$. D.h. ungefähr 66 % bzw. 84 % der im Äquilibrium-Modus gemessenen Inhibierung wurden binnen der ersten 20 bis 32 ms erzielt (Abbildung 37).

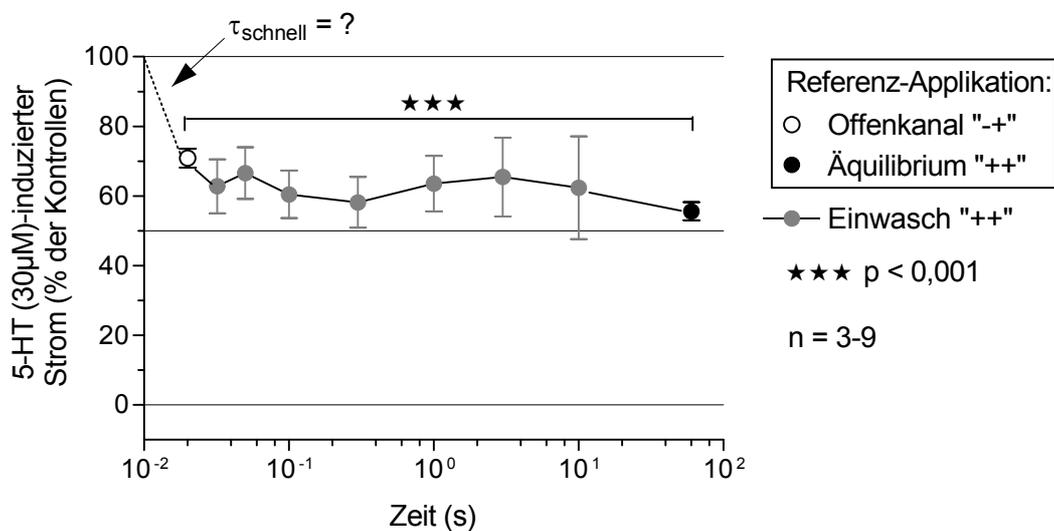


Abbildung 37: Vergleich der Effekte von $60 \mu\text{M}$ Etomidat auf die $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei jeder gemessenen Einwaschzeit kam es zu einer signifikanten Inhibierung ($p < 0,001$) der Amplituden.

Beim Integral zeigte sich bereits in der Offenkanal-Applikation eine Hemmung von $55,4 \pm 2,9 \%$. Nach einem Einwasch von 32 ms konnte eine Inhibierung von $54,1 \pm 6,6 \%$ registriert werden. Als Referenzwert ist der Äquilibriumwert mit $55,4 \pm 8,5 \%$ eingetragen. Wie bei den Maximalströmen kam es binnen der ersten 32 ms zu einer starken Inhibierung (Abbildung 38).

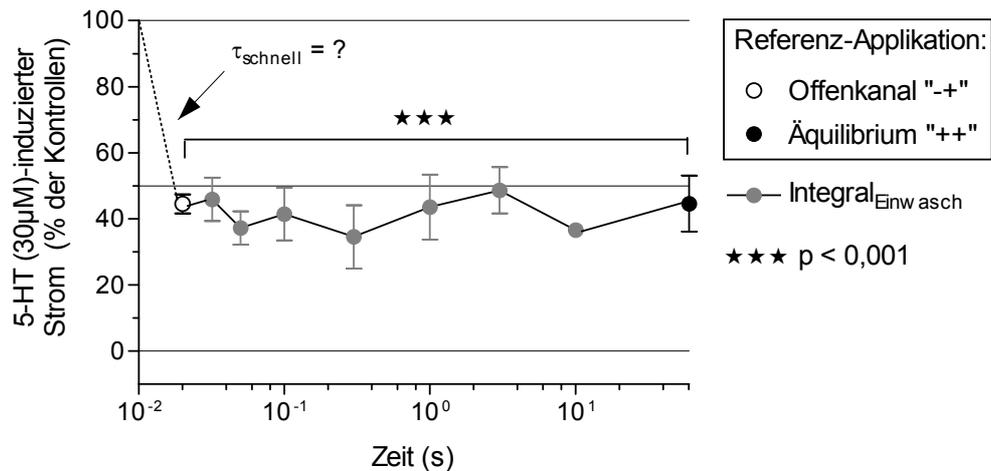


Abbildung 38: Vergleich der Effekte von 60 μM Etomidat auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei jeder gemessenen Einwaschzeit kam es zu einer signifikanten Inhibition ($p < 0,001$) der Amplituden.

In Einklang mit den Ergebnissen der Äquilibriumexperimente bestand keine signifikante Beeinflussung der Aktivierungskinetiken (Abbildung 39).

Wie in Abbildung 40 zu sehen, war die Inaktivierungskinetik binnen ca. 20 ms mit $53,83 \pm 6,1 \%$ und binnen 32 ms mit $49 \pm 3 \%$ der Kontrollen auf dem Niveau der Äquilibriummessung ($57,6 \pm 5,9 \%$).

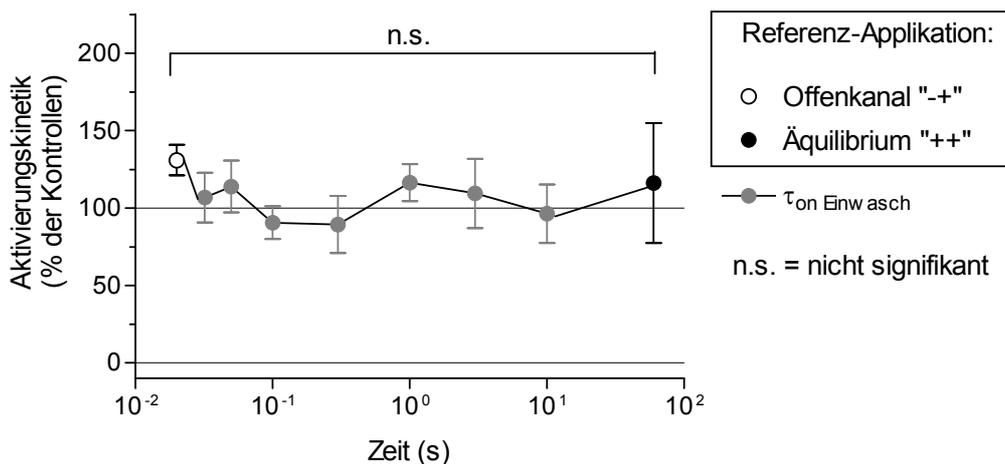


Abbildung 39: Vergleich der Effekte von 60 μM Etomidat auf die Aktivierungskinetik bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei keiner der gemessenen Einwaschzeiten kam es zu einer signifikanten Beschleunigung.

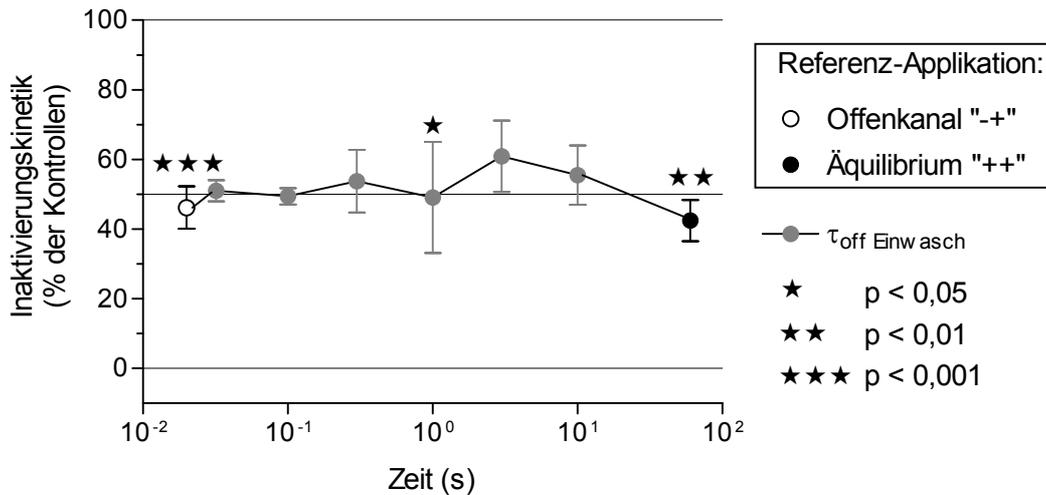


Abbildung 40: Vergleich der Effekte von 60 μM Etomidat auf die Inaktivierungskinetik bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei allen gemessenen Einwaschzeiten kam es zu einer signifikanten Beschleunigung.

4.2.4 Auswaschexperimente

Die Abbildung 41 zeigt, dass die Inhibierung des Maximalstroms in der Geschlossenkanal-Applikation ($29,1 \pm 5 \%$) und nach einer Auswaschzeit von 32 ms ($22,7 \pm 3,3 \%$) noch etwa 55 % und 43 % der im Äquilibrium erzielten Inhibierung ($53 \pm 2,6 \%$) entsprach. Dem initialen schnellen Prozess schloss sich eine langsamere Plateau-Phase an. Eine signifikante Inhibierung bestand bei einer Auswaschzeit bis zu 1 s. Nach Auswaschzeit von 10 s betrug die nicht signifikante Inhibierung noch $10,4 \pm 4,1 \%$.

Die Abbildung 42 zeigt, dass die Inhibierung des Integrals in der Geschlossenkanal-Applikation ($39,1 \pm 4,9 \%$) und nach einer Auswaschzeit von 32 ms ($27,5 \pm 7,1 \%$) noch 71 % und 50 % der im Äquilibrium erzielten Inhibierung ($55,38 \pm 8,5 \%$) entsprach. Dem initialen schnellen Prozess schloss sich eine langsamere Plateau-Phase an. Bis zu einer Auswaschzeit von 1 s wurde eine signifikante Inhibierung des Integrals gemessen. Nach 1 s folgte eine zweite schnelle Komponente. Nach einer Auswaschzeit von 10 s betrug die nicht signifikante Inhibierung noch $13,1 \pm 11,4 \%$.

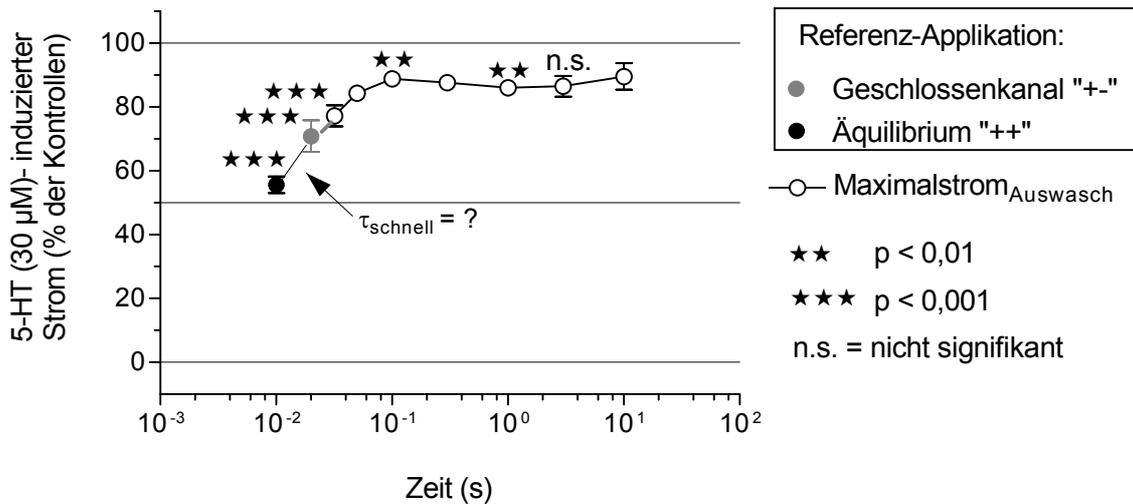


Abbildung 41: Vergleich der Effekte von 60 μM Etomidat auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei den Auswaschzeiten wurde bis einschließlich dem 1 s-Wert eine signifikante Inhibierung ($p < 0,01$) der Amplituden ermittelt.

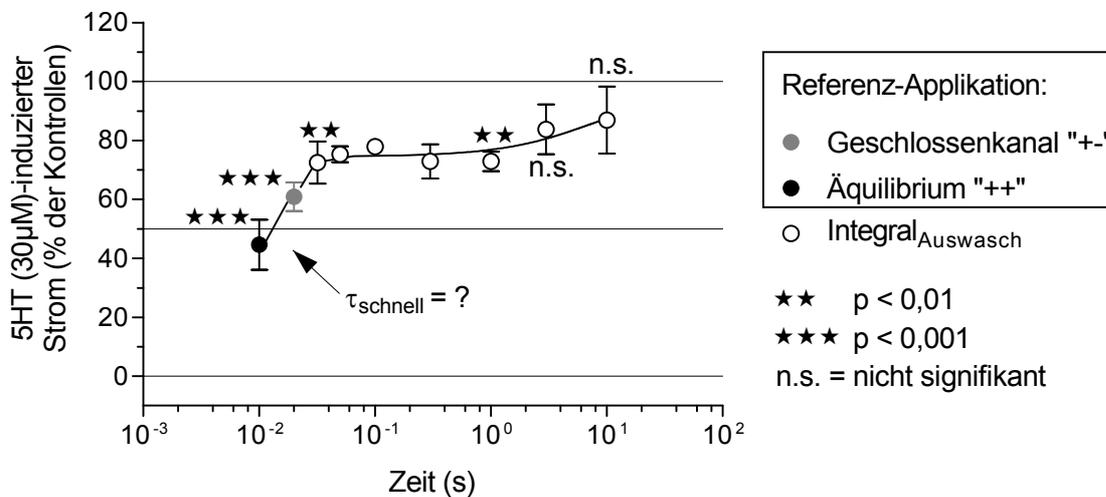


Abbildung 42: Vergleich der Effekte von 60 μM Etomidat auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei den Auswaschzeiten wurde bis einschließlich dem 3 s-Wert eine signifikante Inhibierung (p mindestens < 0,01) der Amplituden ermittelt.

In den Auswaschexperimenten kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Aktivierungskinetik (Abbildung 43). Die Inaktivierungskinetik (Abbildung 44) wurde in einem schnellen Prozess binnen der ersten 32 ms Auswasch auf $21,3 \pm 5\%$ beschleunigt. In der Äquilibriummessung ergab sich eine Beschleunigung auf $57,6 \pm 5,9\%$ der Kontrollen.

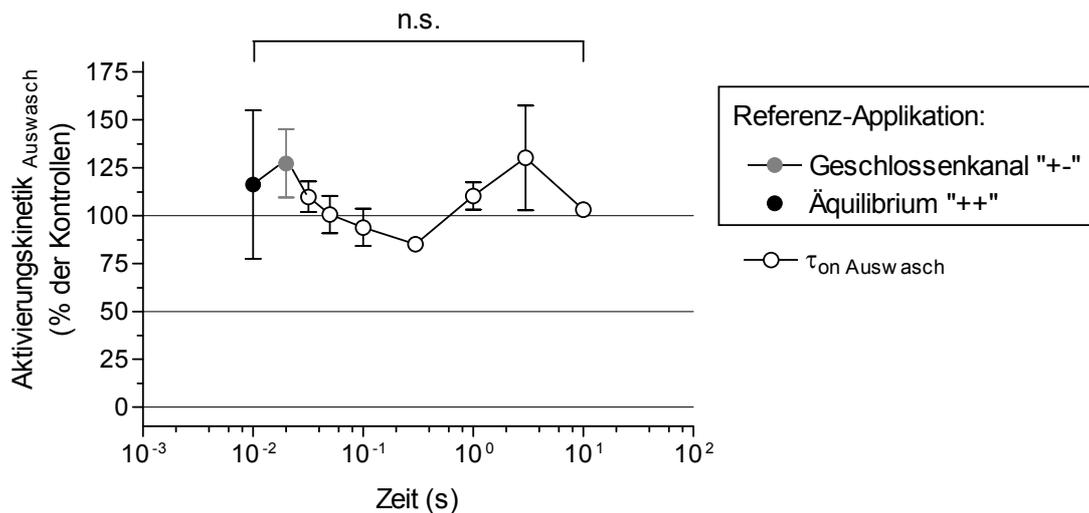


Abbildung 43: Vergleich der Effekte von $60 \mu\text{M}$ Etomidat auf die Aktivierungskinetik bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei keiner der gemessenen Einwaschzeiten kam es zu einer signifikanten Beeinflussung der Kinetik.

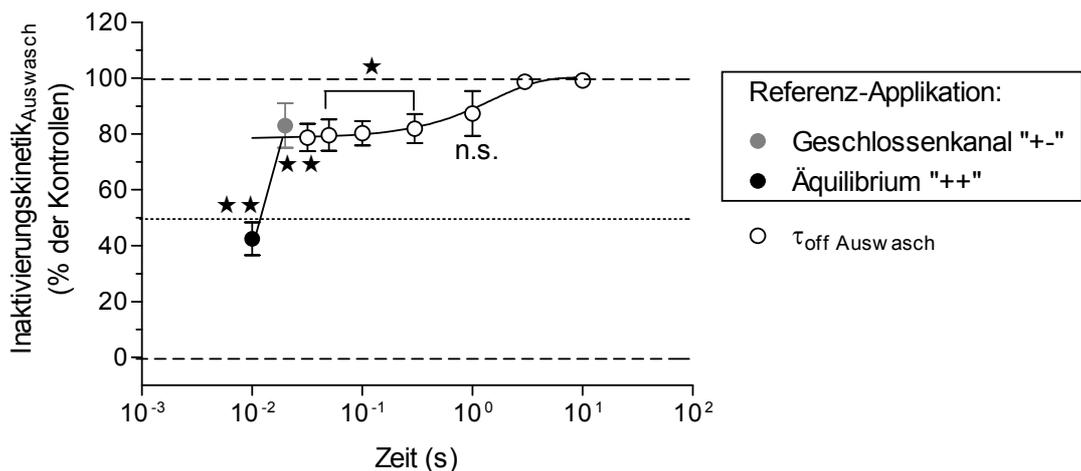


Abbildung 44: Vergleich der Effekte von $60 \mu\text{M}$ Etomidat auf die Inaktivierungskinetik bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Eine signifikante Inaktivierungsbeschleunigung war bis zum Zeitpunkt 300 ms messbar.

4.2.5 Konzentrationssprungexperimente

Abbildung 45 zeigt ein typisches Konzentrationssprungexperiment mit 60 μM Etomidat.

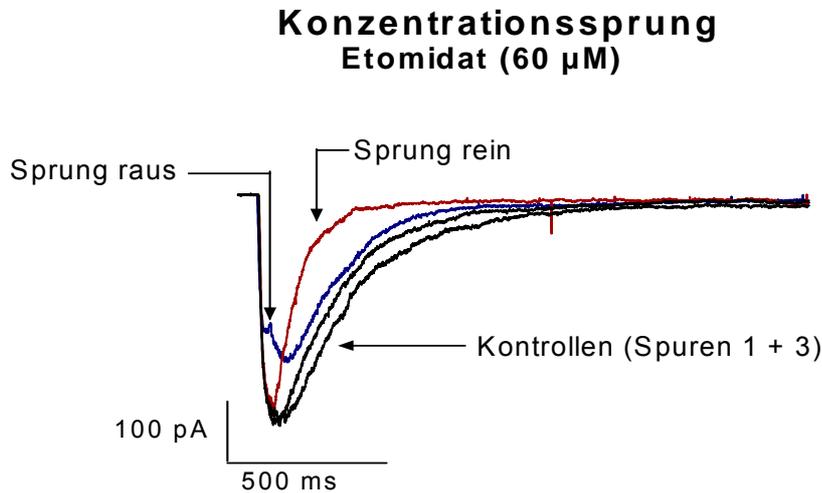


Abbildung 45: Darstellung der Effekte von Etomidat (60 μM) auf den 5-HT (30 μM)-induzierten Einwärtsstrom (-100 mV) bei Konzentrationssprungexperimenten. Beim „Sprung rein“-Experiment wurde zuerst für 0,05 s 5-HT appliziert, dann für 1,55 s 5-HT gemeinsam mit 60 μM Etomidat. Beim „Sprung raus“ wurden für 0,05 s 5-HT und Etomidat appliziert, anschließend für 1,55 s ausschließlich 5-HT.

Bei den „Sprung rein“-Experimenten war eine nicht signifikante Hemmung auf die Stromamplitude ($3,9 \pm 1,2 \%$) zu sehen (Abbildung 46). Diese Inhibierung ist am ehesten als Variabilität der Stromkurven zu deuten, da die Etomidat-Applikation erst nach Erreichen des Maximalstroms erfolgte. Beim „Sprung rein“-Experiment wurde für 0,05 s 5-HT appliziert, dann für 1,55 s 5-HT und Etomidat.

Beim „Sprung raus“-Experiment wurden für 0,05 s 5-HT und Etomidat appliziert, anschließend für 1,55 s ausschließlich 5-HT. Dabei sah man eine signifikante Hemmung von $25,1 \pm 3,3 \%$ ($p < 0,001$; Abbildung 46).

Im Gegensatz zu den Stromamplituden zeigte sich beim Integral (Abbildung 47) sowohl beim „Sprung rein“- als auch beim „Sprung raus“-Experiment eine signifikante Inhibierung. Die Inhibierung im „Sprung raus“-Experiment ($23 \pm 4,7 \%$) war nahezu identisch mit der im „Sprung rein“-Experiment ermittelten ($25,3 \pm 4,4 \%$).

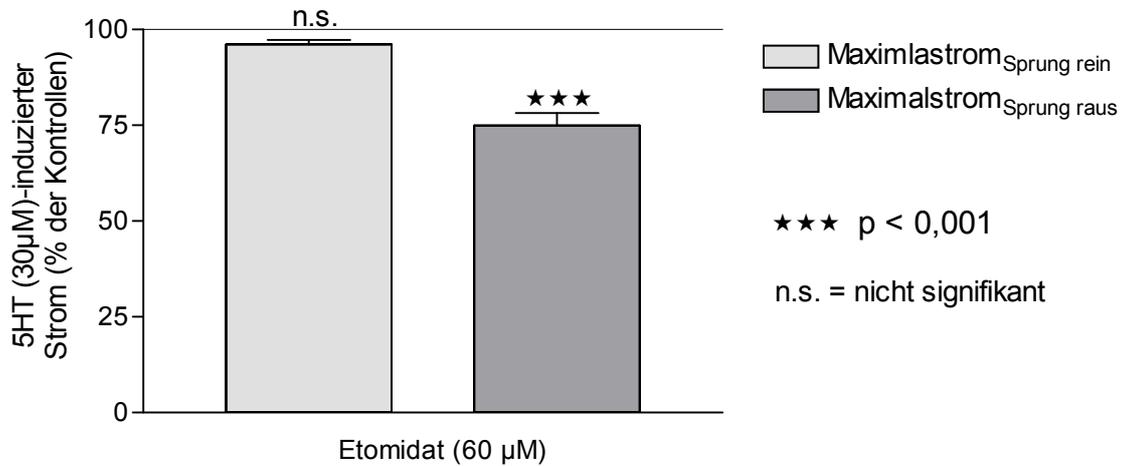


Abbildung 46: Vergleich der Effekte von 60 µM Etomidat auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Beim „Sprung rein“ wurde eine nicht signifikante Inhibierung von $3,87 \pm 1,2$ %, beim „Sprung raus“ hingegen eine signifikante Inhibierung von $25,1 \pm 3,3$ % ($p < 0,001$) festgestellt.

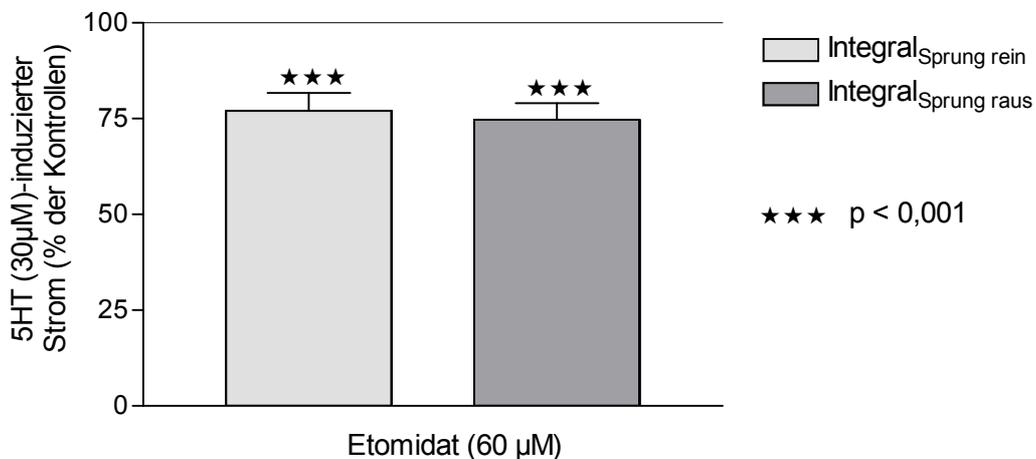


Abbildung 47: Vergleich der Effekte von 60 µM Etomidat auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“- Experimenten. Sowohl beim „Sprung rein“ als auch beim „Sprung raus“ wurde eine signifikante Inhibierung festgestellt: „Sprung rein“ $23 \pm 4,7$ % ($p < 0,01$), „Sprung raus“ $25,33 \pm 4,4$ % ($p < 0,001$).

Beim „Sprung rein“-Experiment konnte eine nicht signifikante Beschleunigung der Aktivierungskinetik von $8,3 \% \pm 6,3 \%$, beim „Sprung raus“ eine ebenfalls nicht signifikante Beschleunigung von $16,32 \pm 12,2 \%$ gegenüber der Kontrolle gemessen werden (Abbildung 48).

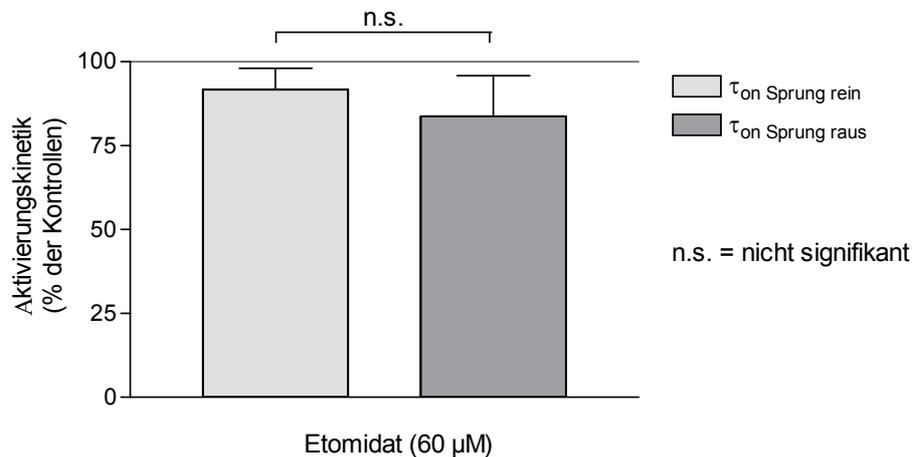


Abbildung 48: Vergleich der Effekte von $60 \mu\text{M}$ Etomidat auf die Aktivierungskinetik bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Weder beim „Sprung rein“ noch beim „Sprung raus“ wurde eine signifikante Inhibierung festgestellt.

Bei der Inaktivierungskinetik der „Sprung rein“-Experimente wurde eine signifikante Beschleunigung ($40,7 \pm 7,0 \%$), beim „Sprung raus“ dagegen nur eine nicht signifikante Beschleunigung von $0,8 \pm 2 \%$ gemessen (Abbildung 49).

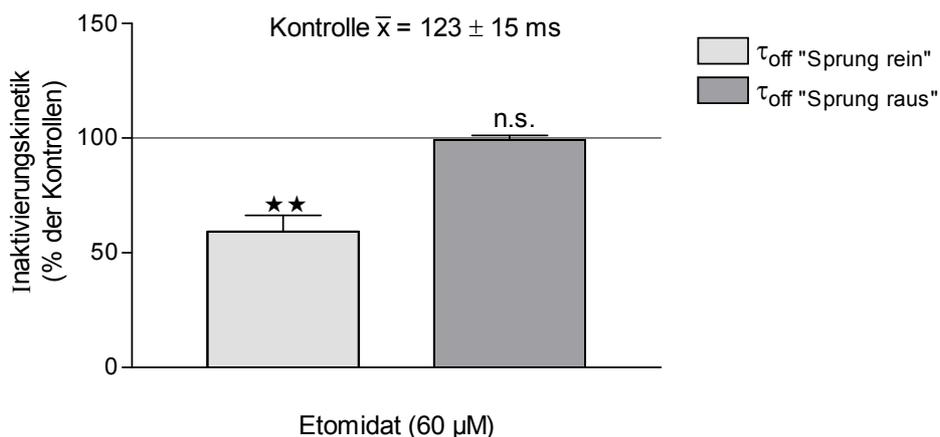


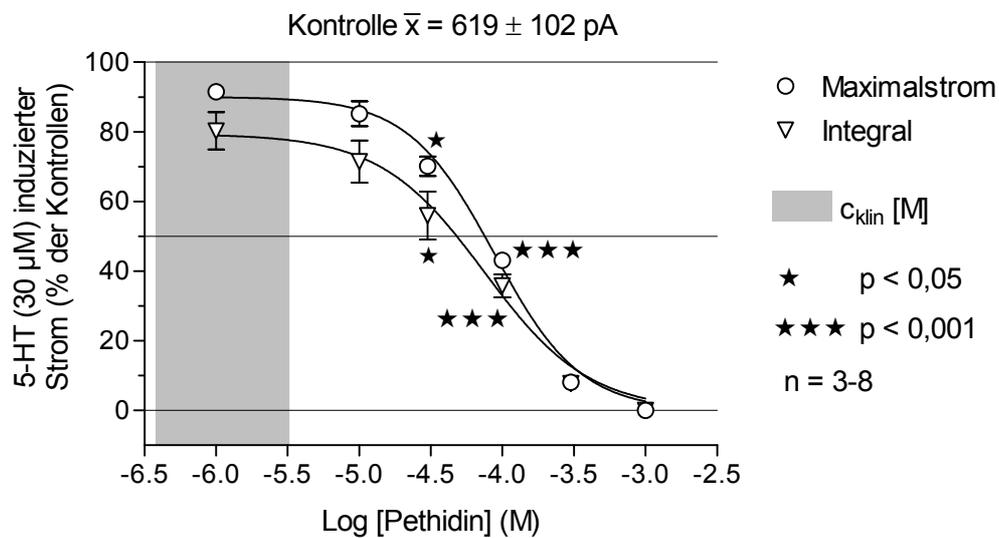
Abbildung 49: Vergleich der Effekte von $60 \mu\text{M}$ Etomidat auf die Inaktivierungskinetik bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Bei den „Sprung rein“-Experimenten wurde eine signifikante Beschleunigung ermittelt.

4.3 Pethidin (Meperidin)

4.3.1 Konzentrationswirkungskurve

Die Konzentrationswirkungskurve von Pethidin wurde in der Äquilibrium-Applikationsart erstellt. In „patches“, die zuvor bei alleiniger 5-HT (30 μ M)-Applikation einen Einwärtsstrom zeigten, löste Pethidin in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

a)



b)

		Pethidin
IC ₅₀ (μ M, Äquilibrium)	Stromamplitude	89 \pm 1,07
	Integral	81 \pm 1,20
	Berechnet ¹	36
Hill-coefficient	Stromamplitude	-1,4 \pm 0,16
	Integral	-1,2 \pm 0,25
aLogP		2,90
LogP		2,35

¹ALOGPS 2.1 Programm

c)

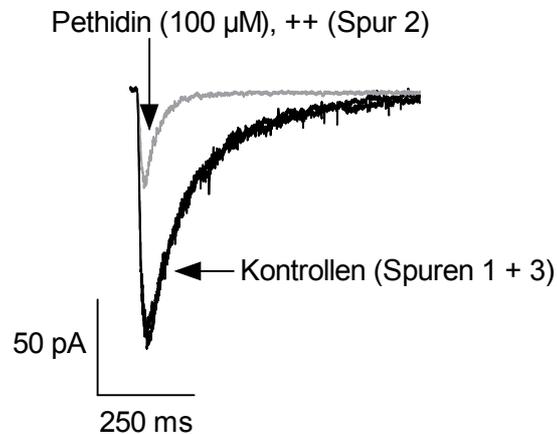


Abbildung 50: **a)** Konzentrationswirkungskurve (Mittelwerte \pm SEM): Effekte von Pethidin auf den 5-HT (30 μ M)-induzierten Einwärtsstrom (-100 mV) im Äquilibrium-Applikationsmodus „++“ bezogen auf die Maximalstromamplitude („peak“) und das Integral, c_{klin} = klinische Plasmakonzentration von Pethidin, Signifikanz ($p < 0,05$) ab einer Konzentration von 30 μ M Pethidin; **b)** Fit- und Vergleichsparameter; **c)** Exemplarische Originalspuren 5-HT-induzierter Ströme an 5-HT_{3A}-Rezeptoren (-100 mV): 5-HT (30 μ M) wurde alternierend in Abwesenheit (Kontrolle) und in Anwesenheit von 100 μ M Pethidin (60 s vor und während des Agonistenpulses = Äquilibrium „++“) auf den „patch“ appliziert.

Die Konzentrationswirkungskurve in Abbildung 50 a) sowie die Originalspuren in Abbildung 50 c) zeigen, dass Pethidin konzentrationsabhängig und reversibel den 5-HT (30 μ M)-induzierten Einwärtsstrom inhibiert. Dieser Effekt konnte sowohl bei den Amplituden als auch beim Integral festgestellt werden. Bei den niedrigeren Pethidin-Konzentrationen zeigte sich, dass - im Vergleich zu den Stromamplituden - bei gleicher Konzentration im Integral eine stärkere Inhibition des 5-HT-induzierten Stromes erfolgte. Dieser Effekt schwächte sich zu höheren Konzentrationen hin ab. Der IC₅₀-Wert der Stromamplituden (88,89 μ M) im Vergleich zu dem des Integrals (81,26 μ M) zeichnet daher nur einen geringen Unterschied ab.

Der graue Balken in Abbildung 50 a) bezeichnet die therapeutische oder klinische Plasmakonzentration von Pethidin: $c_{klin} = 0,1 - 0,8 \mu\text{g/ml}$, entsprechend 0,4 - 3,2 μ M (Schulz und Schmoldt, 2003).

Wie Abbildung 51 zeigt, beeinflusste Pethidin die Aktivierungskinetik bei den getesteten Konzentrationen nicht signifikant. Dahingegen wurde die Inaktivierungskinetik (Abbildung 52) ab einer Konzentration von 1 μM Pethidin signifikant beschleunigt.

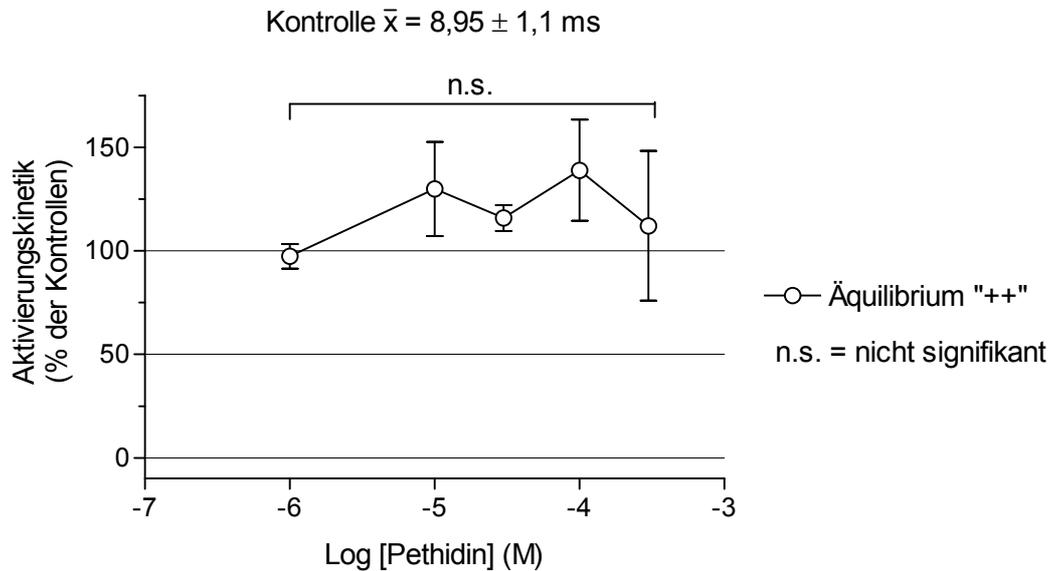


Abbildung 51: Effekte von Pethidin auf die Aktivierungszeitkonstante „ τ_{on} “ 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme in der Äquilibrium-Applikation. Darstellung der Aktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT-Kontrollen in Bezug auf die Pethidin-Konzentration ($1 \mu\text{M}$ bis 1 mM). Es zeigte sich, dass die Aktivierungszeit bei keiner der gemessenen Pethidin-Konzentrationen signifikant beeinflusst wurde. Der Wert bei 1 mM wird hier nicht gezeigt, da eine Kinetik aufgrund 100%iger Inhibierung der Maximalamplitude nicht bestimmbar war.

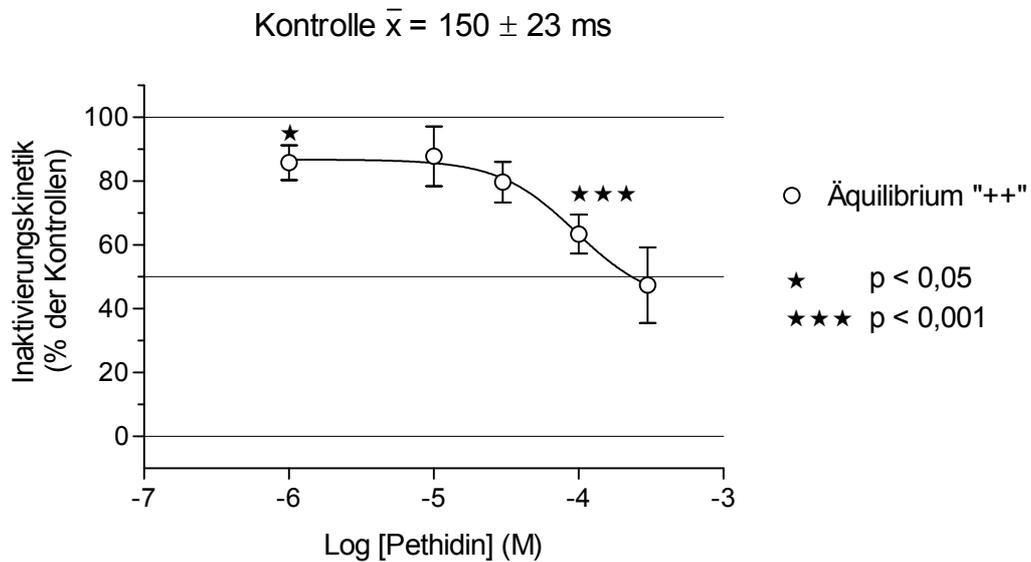


Abbildung 52: Effekte von Pethidin auf die Inaktivierungszeitkonstante „ τ_{off} “ 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme in der Äquilibrium-Applikation. Darstellung der Inaktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT-Kontrollen in Bezug auf die Pethidin-Konzentration ($1 \mu\text{M}$ bis 1mM). Es zeigte sich, dass die Inaktivierungszeit bereits ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Pethidin signifikant ($p < 0,05$) beschleunigt wurde. Der Wert bei 1mM wird hier nicht gezeigt, da eine Kinetik aufgrund 100 %iger Inhibierung der Maximalamplitude nicht bestimmbar war.

4.3.2 Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt von Pethidin

In der Abbildung 53 ist ersichtlich, dass die Effekte des Pethidins auf die Stromamplitude in der Geschlossen- und der Offenkanal-Applikation nahezu identisch waren. Ungefähr 55 % der im Äquilibrium gemessenen Hemmung, wurde in den beiden Applikationsmodi erzielt.

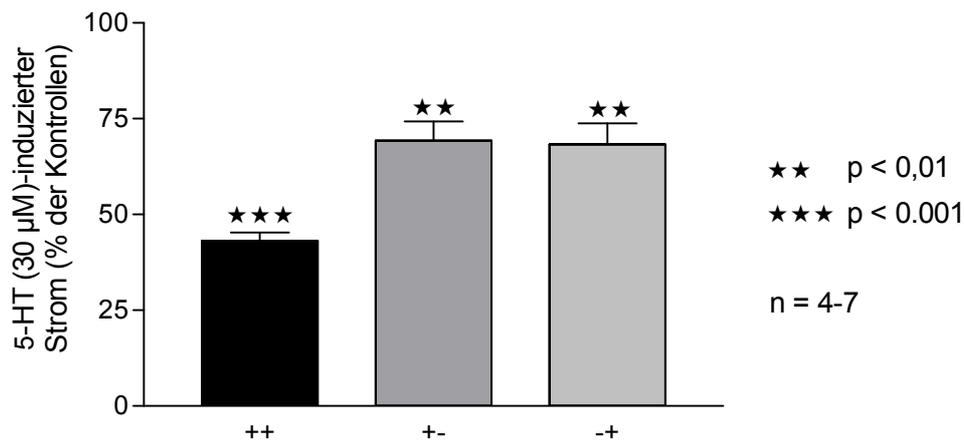


Abbildung 53: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme („peak“) bei Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+“-) und Offenkanal („-+“-) Applikationsmodus. Es wurden folgende prozentuale Inhibierungen der Kontroll-Amplituden gemessen: „++“ 56,8 ± 2,1 % (p < 0,001), „+“- 30,7 ± 5 % (p < 0,01) und „-+“- 31,7 ± 5,5 % (p < 0,01).

In der Äquilibrium-Applikation wurde beim Integral eine Inhibierung von 64,8 ± 2,9 % festgestellt (Abbildung 54). Im Offenkanalexperiment wurden 89 % dieser Inhibierung erreicht, im Geschlossenkanalexperiment 59 %.

Während es bei der Aktivierungskinetik (Abbildung 55) zu keiner signifikanten Beeinflussung kam, zeigte sich bei der Inaktivierungskinetik (Abbildung 56) in allen drei Applikationsarten eine signifikante Beschleunigung. Im Äquilibrium-Modus wurde eine Beschleunigung um 56,7 % ± 3,4 %, im Offenkanal-Modus um 48,2 ± 4,6 % und in der Geschlossenkanal-Applikation um 22,4 ± 2,5 % gemessen.

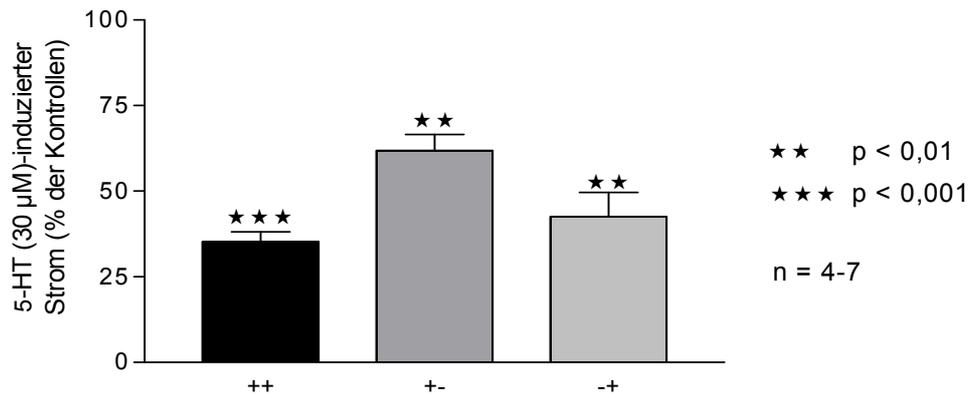


Abbildung 54: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+-“)- und Offenkanal („-+“)-Applikationsmodus. Es wurden folgende prozentuale Inhibierungen der Kontroll-Integrale gemessen: „++“ 64,8 ± 2,9 %, „+-“ 38,2 ± 4,7 % und „-+“ 57,4 ± 7,1 %.

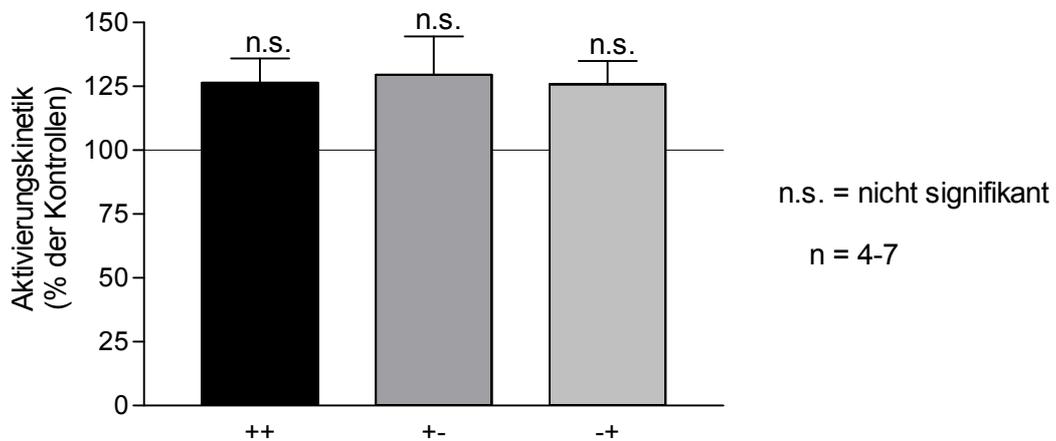


Abbildung 55: Vergleich der Aktivierungskinetiken „ τ_{on} “ in der Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+-“)- und Offenkanal („-+“)-Applikation (100 µM Pethidin). Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „++“ = 126,5 ± 9,5 %, „+-“ = 129,6 ± 15 %, „-+“ = 125,8 ± 9,1 %.

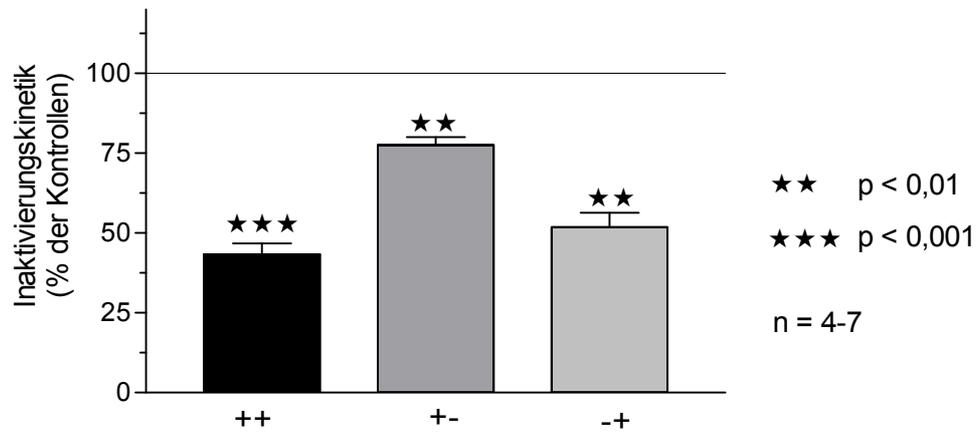
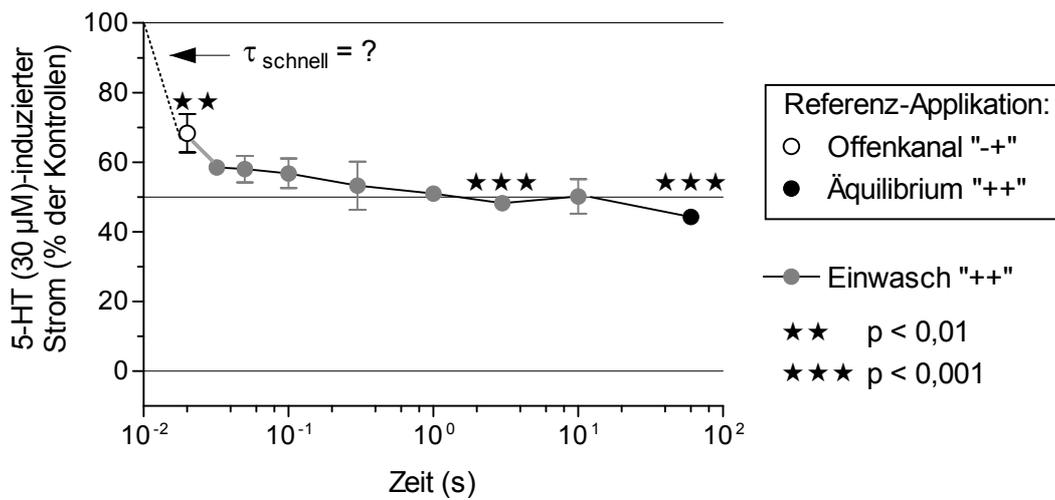


Abbildung 56: Vergleich der Inaktivierungskinetiken „ τ_{off} “ in der Äquilibrium („++“)-, Geschlossenkanal („+“-) und Offenkanal (-+)-Applikation mit 100 μ M Pethidin. Es wurden folgende %-Werte der Kontrollen gemessen: „++“ = $43,3 \pm 3,4$ % ($p < 0,001$), „+“-“ = $77,6 \pm 2,5$ % ($p < 0,01$), „-+“ = $51,8 \pm 4,6$ % ($p < 0,01$).

4.3.3 Einwaschexperimente

Im Offenkanalexperiment wurde eine $31,7 \pm 5,5$ %ige Hemmung gemessen. Bei einer Einwaschzeit von 32 ms war bereits eine $41,5 \pm 1,3$ %ige Hemmung ersichtlich. Analog zu Ketamin und Etomidat fand auch hier der maßgebliche Effekt binnen der ersten 20 bis 32 ms statt (Abbildung 57).



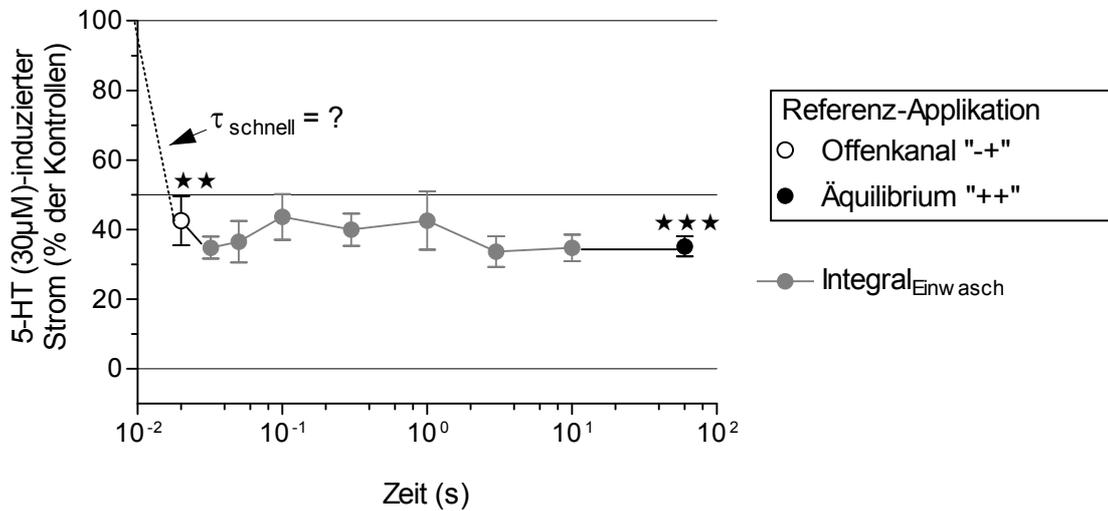


Abbildung 58: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf das Integral bei verschiedenen Einwaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei jeder gemessenen Einwaschzeit kam es zu einer signifikanten Inhibierung des Integrals.

4.3.4 Auswaschexperimente

Die in Abbildung 59 dargestellten Experimente zeigen, dass nach einem Auswasch von 20 und 32 ms ein Rückgang der im Äquilibrium erzielten Hemmung um etwa 15 % erfolgte. Dieser schnellen, nicht exakt zu bestimmenden Zeitkonstante folgte eine langsamere. Nach 10 s Auswasch blieb noch eine signifikante Restinhibierung von $9,87 \pm 1,7 \%$.

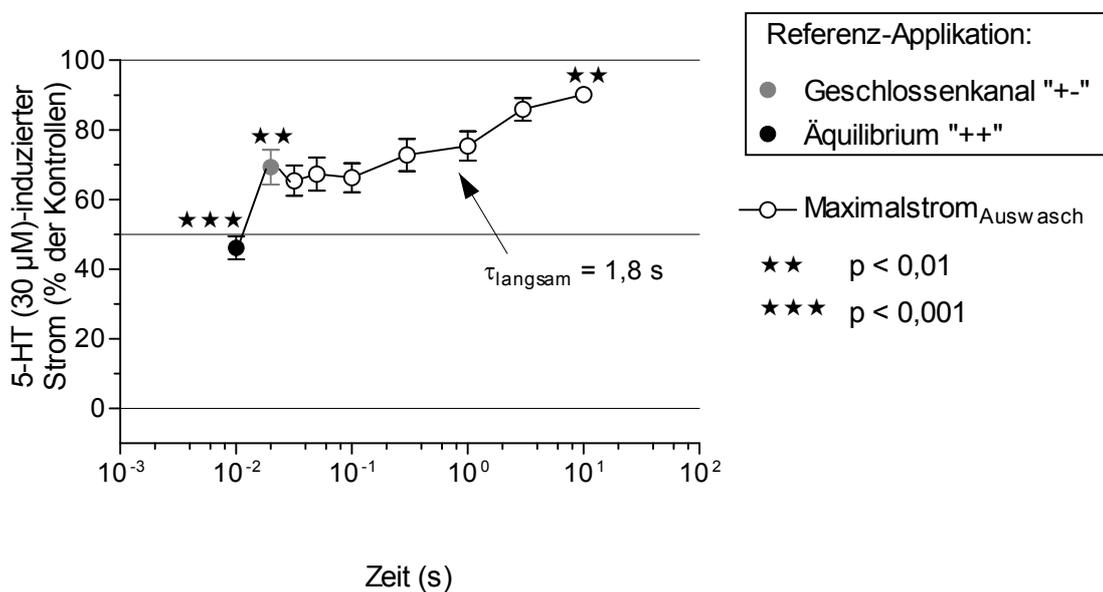


Abbildung 59: Vergleich der Effekte von $100 \mu\text{M}$ Pethidin auf die 5-HT_{3A} -Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Offenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei den Auswaschzeiten wurde bis einschließlich dem 10 s-Wert eine signifikante Inhibierung ($p < 0,01$) der Amplituden ermittelt.

Im Äquilibrium-Modus wurde eine Inhibierung von $64,8 \pm 2,9 \%$ ermittelt. In der Geschlossenkanal-Applikation wurde noch eine Inhibierung von $38,56 \pm 4,7 \%$, im „32 ms“-Auswaschexperiment ein Inhibierung von $47,6 \pm 5,9 \%$. Die letzte Auswaschzeit mit signifikanter Inhibierung war der „1 s“-Auswasch mit einer Inhibierung von $37,13 \pm 8,0$ (Abbildung 60).

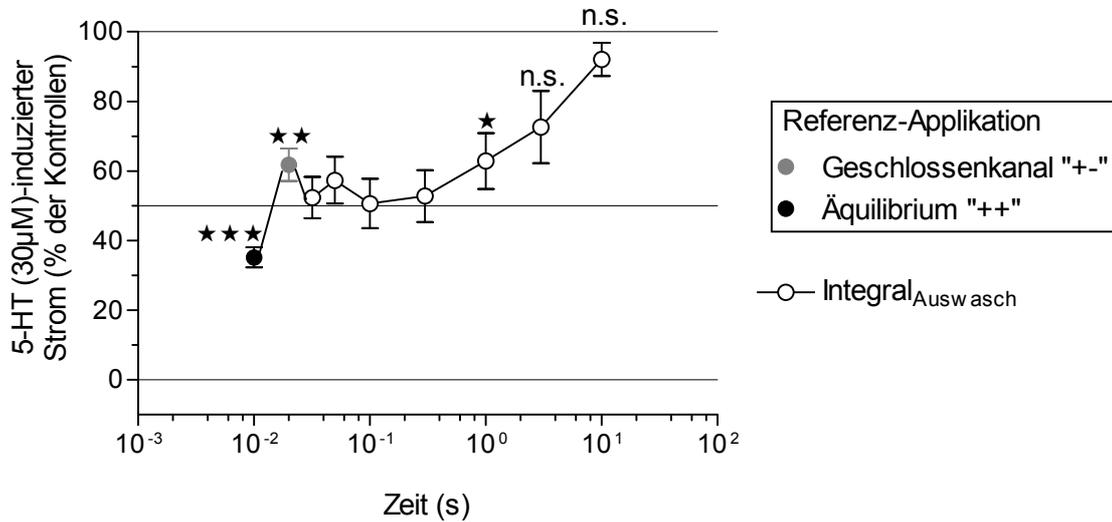


Abbildung 60: Vergleich der Effekte von 100 μM Pethidin auf das Integral bei verschiedenen Auswaschzeiten (32 ms - 10 s). Als Referenzpunkte wurden die Werte aus der Geschlossenkanal- und der Äquilibrium-Applikation hinzugefügt. Bei den Auswaschzeiten wurde bis einschließlich dem 1 s-Wert eine signifikante Inhibition der Amplituden ermittelt.

4.3.5 Konzentrationssprungexperimente

Abbildung 61 zeigt ein typisches Konzentrationssprungexperiment mit 100 μM Pethidin.

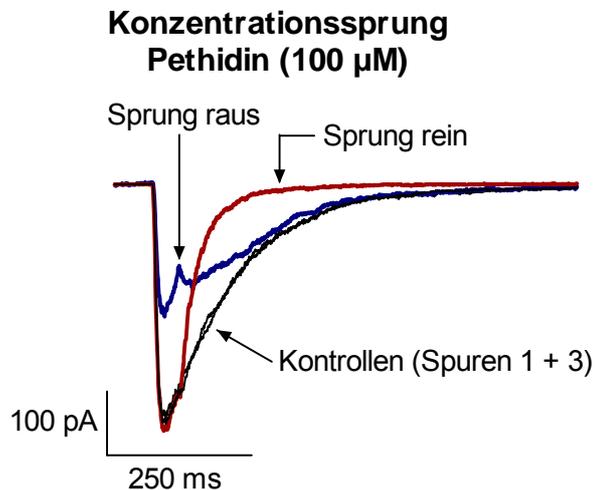


Abbildung 61: Darstellung der Effekte von Pethidin (100 μM) auf den 5-HT (30 μM)-induzierten Einwärtsstrom (-100 mV) bei Konzentrationssprungexperimenten. Beim „Sprung rein“-Experiment wurde zuerst für 0,05 s 5-HT appliziert, dann für 1,55 s 5-HT gemeinsam mit 100 μM Pethidin. Beim „Sprung raus“ wurden für 0,05 s 5-HT und Pethidin appliziert, anschließend für 1,55 s ausschließlich 5-HT.

Beim „Sprung raus“-Experiment wurde eine signifikante Inhibierung des Maximalstroms ($45,8 \pm 1 \%$) gemessen. Beim „Sprung rein“-Experiment wurde hingegen keine signifikante Inhibierung ($4,6 \pm 1,6 \%$) registriert (Abbildung 61 und 62).

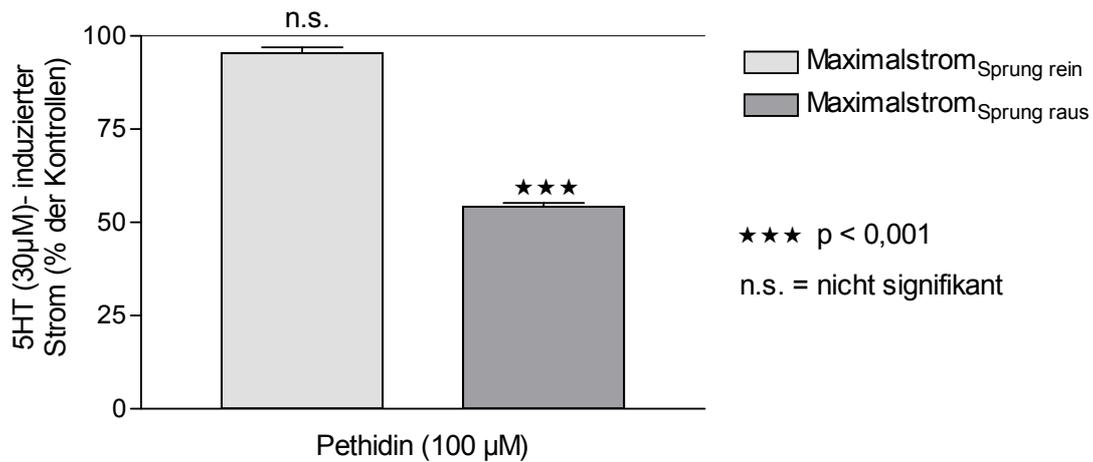


Abbildung 62: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Stromamplituden bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Beim „Sprung rein“ wurde eine nicht signifikante Inhibierung von $4,6 \pm 1,6$ %, beim Sprung raus hingegen eine signifikante Inhibierung von $45,8 \pm 1$ % ($p < 0,001$) festgestellt.

Bei der Auswertung des Integrals (Abbildung 63) zeichnete sich sowohl der schnelle Einwasch- als auch der schnelle Auswascheffekt von Pethidin am 5-HT₃-Rezeptor deutlich ab (51,1 % Inhibierung beim „Sprung rein“-, 43,1 % Inhibierung beim „Sprung raus“-, 63,2 % Inhibierung beim „++“-Experiment).

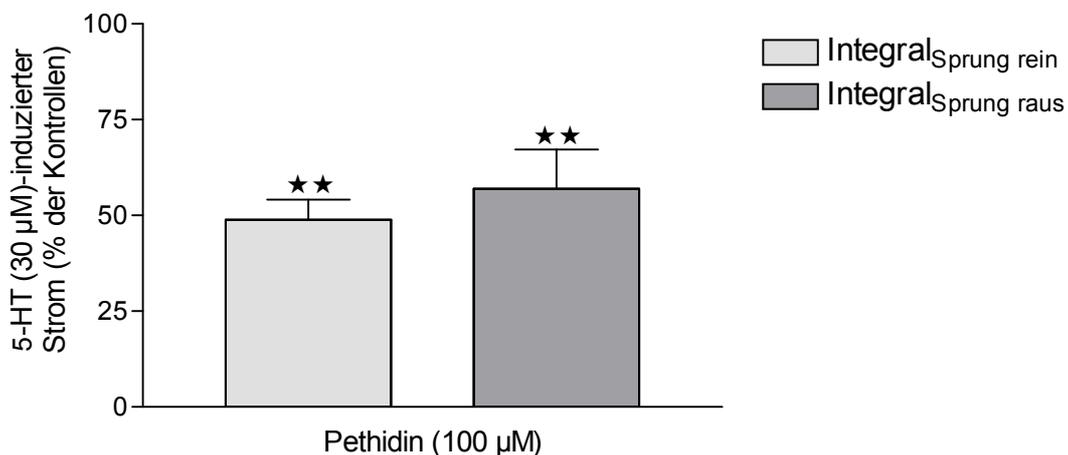


Abbildung 63: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten integrierten Ströme bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Es zeigte sich sowohl beim „Sprung rein“ als auch beim „Sprung raus“ eine deutliche, jedoch nicht signifikante Inhibierung.

Die Aktivierungskinetik wurde in den Konzentrationssprungexperimenten nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 64). Die Inaktivierungskinetik hingegen wurde beim „Sprung rein“-Experiment signifikant beschleunigt ($72,47 \pm 1,2 \%$; Abbildung 65).

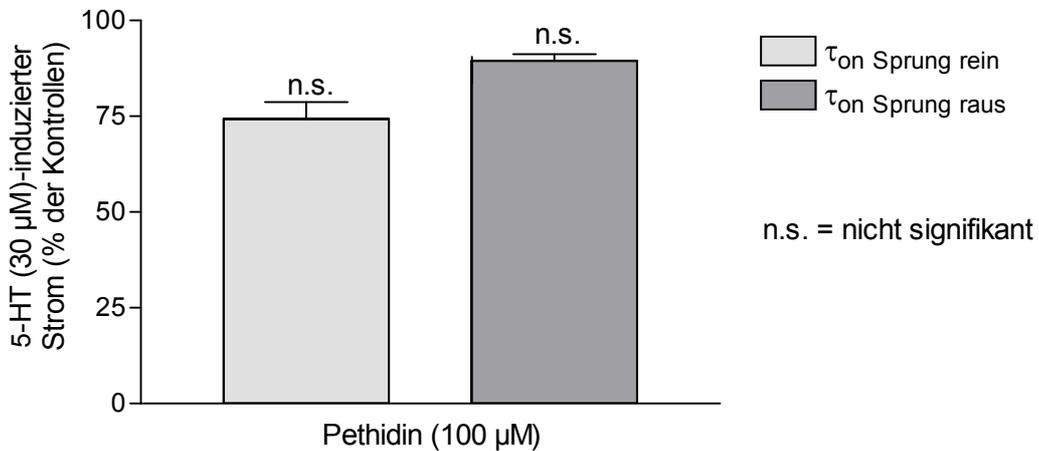


Abbildung 64: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf die Aktivierungskinetik bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten: Weder beim „Sprung rein“ noch beim „Sprung raus“ wurde eine signifikante Beeinflussung der Aktivierungskinetik festgestellt.

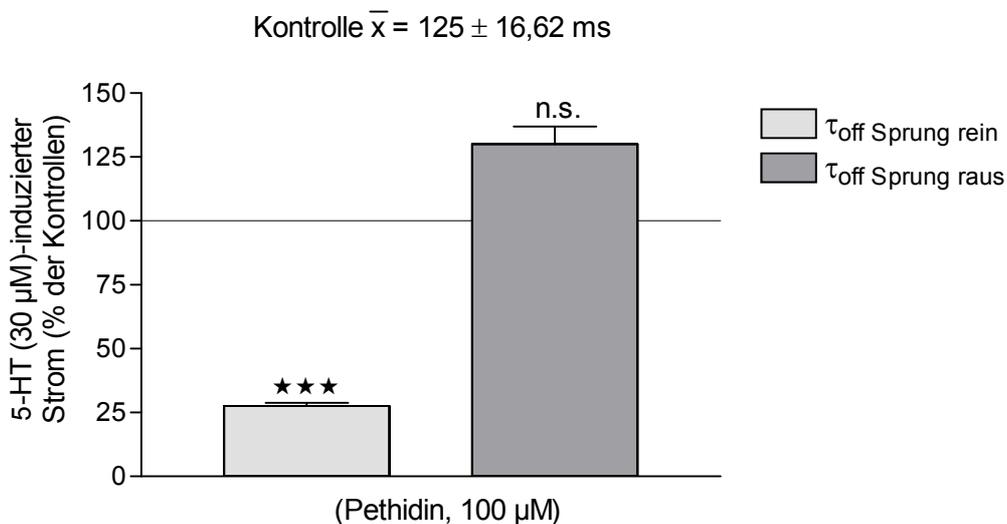


Abbildung 65: Vergleich der Effekte von 100 µM Pethidin auf die Inaktivierungskinetik bei „Sprung rein“- und „Sprung raus“-Experimenten. Beim „Sprung rein“ wurde eine signifikante ($p < 0,001$) Beschleunigung festgestellt. Beim „Sprung raus“ hingegen trat keine signifikante Beeinflussung auf.

4.4 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse

4.4.1 Konzentrationswirkungskurven

		Etomidat	Ketamin	Pethidin
IC₅₀ (μ M, Äquilibrium)	Maximalstrom	42 \pm 1,25	181 \pm 1,13	89 \pm 1,07
	Integral	30 \pm 1,38	121 \pm 1,12	81 \pm 1,20
	Integral (Maus)	12	182	n.a.
	Berechnet	63	58	36
Hill-Koeffizient	Maximalstrom	-1,9 \pm 0,76	-1,7 \pm 0,31	-1,4 \pm 0,16
	Integral	-2,0 \pm 1,5	-2,0 \pm 0,53	-1,2 \pm 0,25
aLogP		2,66	2,70	2,90
LogP		2,99	2,18	2,35

Tabelle 3: Vergleich der IC₅₀-Werte der getesteten Substanzen für die Stromamplituden- und Integral-Auswertung. Hierzu stehen im Vergleich die „tracer-flux“-Ergebnisse (= Integral (Maus)) nach Barann, 1993 sowie die mittels dem ALOGPS 2.1 Programm (Virtual Computational Chemistry Laboratory, Tetko et al., 2001; Tetko und Tanchuk, 2002) berechneten IC₅₀-Werte sowie die Hill-Koeffizienten.

4.4.2 Einfluss der Substanzen auf Aktivierungs- (τ_{on}) und Inaktivierungskinetiken (τ_{off})

		Aktivierung	Inaktivierung
		(% der Kontrollen)	
Ketamin	100 μ M	Keine signifikante Beeinflussung	58
	300 μ M		15
Etomidat	100 μ M		43
	300 μ M		49
Pethidin	100 μ M		63
	300 μ M		47

Tabelle 4: Vergleich der Inaktivierungskinetik für Ketamin, Pethidin und Etomidat (jeweils 100 μ M und 300 μ M). Für die Aktivierungskinetiken ergaben sich keine signifikanten Einflüsse der Arzneistoffe. Die Inaktivierungskinetiken hingegen wurden von den getesteten Substanzen signifikant beschleunigt.

4.4.3 Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt der Substanzen

	Inhibierung der Kontrollen in %		
	++	+-	-+
Ketamin	32	17	25
Etomidat	44	29	29
Pethidin	57	31	32

Tabelle 5: Vergleich der Applikationsmodi für Ketamin (100 μM), Etomidat (60 μM), Pethidin (100 μM).

Die größten Einflüsse ließen sich bei der Äquilibrium („++“-Applikation beobachten, jedoch zeigten auch die Geschlossenkanal („+-“- und die Offenkanal („-+“-Applikation signifikante Einflüsse.

4.4.4 Einwasch- und Auswaschexperimente

	% des Äquilibriumwertes nach 32 ms	
	Einwasch	Auswasch
Ketamin	66	50
Etomidat	84	51
Pethidin	84	51

Tabelle 6: Vergleich der Einwasch- und Auswaschexperimente für Ketamin (100 μM), Etomidat (60 μM) und Pethidin (100 μM). Ein schneller Eintritt sowie ein schnelles Abklingen der Effekte wurden deutlich.

4.4.5 Konzentrationssprungexperimente

	Sprung rein Inhibierung in %			
	Maximalstrom	Integral	τ_{on}	τ_{off}
Ketamin	Keine	48	Keine	56
Etomidat	signifikante	23	signifikante	41
Pethidin	Beeinflussung	51	Beeinflussung	73

Tabelle 7: Vergleich der „Sprung rein“-Experimente für Ketamin (100 μM), Etomidat (60 μM), Pethidin (100 μM). Während weder die Maximalströme noch die Aktivierungskinetiken (τ_{on}) durch die Testsubstanzen signifikant beeinflusst wurden, zeigten sich bei allen Substanzen eine signifikante Beeinflussung der Integralströme und der Inaktivierungskinetiken (τ_{off}).

Sprung raus				
Inhibierung in %				
	Maximalstrom	Integral	τ_{on}	τ_{off}
Ketamin	22	24	Keine signifikante Beeinflussung	Keine signifikante Beeinflussung
Etomidat	25	25		
Pethidin	46	43		

Tabelle 8: Vergleich der „Sprung raus“-Experimente für Ketamin (100 μ M), Etomidat (60 μ M), Pethidin (100 μ M). τ_{on} und τ_{off} wurden nicht signifikant beeinflusst; Maximal- und Integralströme wurden nahezu gleich stark inhibiert.

5. Diskussion

5.1 Einführung

PONV und Substanz-induzierte Emesis stellen ein multifaktorielles Geschehen dar, welches, neben dem individuellen Leidensdruck, ein erhöhtes Komplikationsrisiko und damit ein ernst zu nehmendes Gesundheitsrisiko für Patienten darstellt (Roewer, 2009). Auch wenn die komplexen Mechanismen dieses Geschehens bis heute nicht vollständig entschlüsselt sind, so weiß man doch, dass 5-HT₃-Rezeptoren wesentlich an der Modulation der Substanz-induzierten und postoperativen Emesis beteiligt sind (Andrews und Davis, 1993; Board und Board, 2006; Minami et al., 2003). Untersuchungen des 5-HT_{3A}-Rezeptors und der Wirkung von (klinisch eingesetzten) Substanzen auf diesen Rezeptor können daher zu einem besseren Verständnis der Modulationswege von Übelkeit und Erbrechen führen. Dies könnten die Grundlagen für weitere Forschungen im Hinblick auf Prophylaxemaßnahmen der PONV oder zur Herstellung nebenwirkungsärmerer Medikamente sein. Gerade in Zeiten des Qualitätsmanagements und der „fast-track“-Behandlungen sollten Übelkeit und Erbrechen, das sogenannte „big little problem“, bestmöglich verhindert oder im Bedarfsfall bestmöglich therapiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, welche Effekte die beiden emetogenen Einleitungsnarkotika Ketamin (= Hypnoanalgetikum) und Etomidat (= Hypnotikum) sowie das ebenfalls emetogene Opioid Pethidin (= Analgetikum) auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor haben. Die Messung der Stromamplituden, der entsprechenden Integrale sowie der verschiedenen Kinetiken (Zeitverläufe) sollte dazu beitragen, unterschiedliche Effekte am Rezeptor zu differenzieren. Zusätzlich sollte der Einfluss der Lipophilie auf die Potenz der Substanzen am 5-HT₃-Rezeptor überprüft werden.

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Substanzen, die den 5-HT_{3A}-Rezeptor bei klinischen Konzentrationen inhibieren, anti-emetisch wirksam sind bzw. im Vergleich zu ähnlichen Substanzen eine geringere Emetogenität aufweisen. Substanzen, die den Rezeptor dagegen potenzieren oder keine Inhibierung zeigen, gehören zu Stoffgruppen, die eher emetogen wirksam sind (Barann et al., 2006a, 2006b).

In Studien von Lyutenska (2006) und Wittmann et al. (2006, 2008) konnte gezeigt werden, dass Morphin bei klinisch relevanten Plasmakonzentrationen den 5-HT-induzierten Einwärtsstrom konzentrationsabhängig und reversibel hemmt. Zudem werden die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken durch Morphin signifikant verlangsamt. Die Fentanyl-Derivate hingegen führen in Dosierungen über den klinischen Plasmakonzentrationen zu Inhibierungen des 5-HT induzierten Einwärtsstroms und zu Beschleunigungen der Inaktivierungskinetiken.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Pethidin als synthetisches Opioid ähnliche Effekte wie Morphin oder wie Fentanyl-Derivate hervorruft. Die Effekte des Hypnoanalgetikums Ketamin und des reinen Hypnotikums Etomidat sollten hiermit verglichen werden.

5.2 Konzentrationswirkungskurven

Bei allen drei untersuchten Substanzen wurde zuerst eine Konzentrationswirkungskurve im Äquilibrium-Applikationsmodus („++“) erstellt. Der Äquilibrium-Modus entspricht von den genutzten Applikationsmodi am ehesten den physiologischen Bedingungen. In den „patch-clamp“-Messungen an „outside-out patchen“ zeigte sich, dass alle drei Substanzen konzentrationsabhängig und reversibel inhibierend auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor wirken. Dabei konnten die in Tabelle 3 zusammengefassten Potenzen ermittelt werden. Sowohl bezogen auf die Stromamplitude als auch auf das Integral ist Etomidat am 5-HT_{3A}-Rezeptor der potenteste Inhibitor, gefolgt von Pethidin und dem im Vergleich am wenigsten potenten Ketamin. Bei Etomidat und Ketamin liegen zudem Daten aus „tracer flux“-Experimenten an Mauszellen vor, die die hier gefundenen Potenzen verifizieren (Barann et al., 1993). In einer Studie von Rüscher et al. aus dem Jahr 2007 konnten für Etomidat in Experimenten an in Oozyten des *Xenopus laevis* exprimierten 5-HT₃-Rezeptoren ähnliche Effekte gezeigt werden (IC₅₀-Wert: 180 µM).

Beim Vergleich der Maximal- mit den Integralströmen zeigte sich, dass die Integralströme, bei gleicher Konzentration der Testsubstanzen, stärker inhibiert werden. Dies lässt sich damit erklären, dass die Integralströme deutlicher von verschiedenen Effekten, wie z.B. Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken, beeinflusst werden.

Insgesamt kann man festhalten, dass durch die Inhibierung ein geringerer Stromfluss erfolgt. Da bei allen drei getesteten Substanzen zumindest bei sehr hohen klinischen Plasmakonzentrationen eine Strominhibierung erfolgt, kann dies auf eine antiemetogene Wirkkomponente der Substanzen via 5-HT_{3A}-Rezeptoren hindeuten.

Für Propofol wurde von Barann et al. (2008) ebenso eine antagonistische Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor beschrieben. In dieser Hinsicht sprechen diese Ergebnisse sowohl von Propofol als auch von Etomidat, Pethidin und Ketamin eher für einen anti-emetischen Effekt am 5-HT₃-Rezeptor.

Versucht man die in den Experimenten gefundene antagonistische Wirkung von Ketamin, Etomidat und Pethidin anhand der Molekülstrukturen zu erklären, so lässt sich die in der Arbeit von Meiboom (2010, eingereicht) geäußerte Hypothese, dass ein aromatisches Ringsystem für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor von Bedeutung sein muss, hier ebenfalls nachvollziehen. Auch Gozlan und Langlois äußerten in einer Arbeit aus dem Jahr 1992 den Verdacht dieser Wirkungsweise. Nach den Ergebnissen von Meiboom ist die Ethylamin-Struktur des Serotonins an der Aktivierung des Rezeptors wesentlich beteiligt. Diese Teilstruktur ist bei den hier verwendeten Substanzen nur indirekt gegeben: Bei Pethidin ist eine Propylamin-Teilstruktur erkennbar, im Ketamin und Etomidat ist zwischen dem Aromat und dem N-Atom ein C-Atom Abstand. Es liegt aber keine lineare Alkylamin-Struktur in den Molekülen vor. Auch hier decken sich die beobachtete Inhibierung des Stromflusses durch Pethidin, Etomidat und Ketamin mit dem Fehlen der für die Aktivierung möglicherweise notwendigen Teilstruktur.

Bezieht man die Lipophilie - repräsentiert durch die Meyer-Overton-Korrelation - in die Diskussion mit ein, so ergeben sich folgende Überlegungen:

Die mittels der Meyer-Overton-Korrelation prognostizierten, über den klinischen Plasmakonzentrationen liegenden IC₅₀-Werte entsprechen den experimentell ermittelten (Tabelle 3). Diese Ergebnisse unterstützen die auf der Lipophilie basierende Vorhersagekraft der Meyer-Overton-Korrelation (Urban et al., 2006) bezüglich der Substanzpotenzen. Dabei wird zudem deutlich, dass die ermittelten Effekte eher

unspezifischer Natur sind und somit wahrscheinlich keine spezifischen, funktionellen Gruppen für die Wirkung verantwortlich sind. Hierin unterscheiden sich Ketamin, Etomidat und Pethidin insbesondere von Morphin, das sowohl spezifische als auch unspezifische Effekte am 5-HT_{3A}-Rezeptor aufweist.

Für Propofol hingegen wurde beschrieben, dass die mittels Meyer-Overton-Korrelation berechneten Werte für unspezifische Effekte am 5-HT₃-Rezeptor sprechen (Barann et al., 2008). In dieser Hinsicht zeigen Ketamin, Etomidat und Pethidin ähnliche Effekte auf den Serotoninrezeptor wie das Hypnotikum Propofol.

5.3 Einfluss der Substanzen auf Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken

Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken sind von Interesse, da die meisten getesteten Substanzen bei klinischen Konzentrationen die Kinetiken verändern (Barann et al., 2006a, 2006b).

Die Aktivierung stellt den Übergang eines Rezeptors vom geschlossenen in den geöffneten Zustand in Anwesenheit eines Agonisten dar. Im Experiment wird die Aktivierung als Stromfluss während der Applikation des Agonisten registriert. Da dies ein sehr schneller Prozess ist, kann selbst eine signifikante Beschleunigung der Aktivierung kaum zu einer signifikanten Vergrößerung des Stromflusses führen. Man kann daher davon ausgehen, dass Substanzen, welche die Aktivierungskinetik beschleunigen, tendenziell eher keine emetische Potenz besitzen. Substanzen, die zu einer signifikanten Verlangsamung der Aktivierung führen, können jedoch möglicherweise einen anti-emetischen Effekt aufweisen (Wittmann et al., 2006).

Die Inaktivierung/Desensibilisierung beschreibt den Übergang eines Rezeptors vom offenen in den geschlossenen Zustand in Anwesenheit eines Agonisten. Im Experiment wird die Desensibilisierung durch einen Stromabfall während der Applikation des Agonisten dargestellt. Im Vergleich zu dem sehr schnellen Prozess der Aktivierung, ist die Desensibilisierung eher langsam. Daher können Änderungen in der Kinetik der Inaktivierung/Desensibilisierung zu einer deutlichen Veränderung im Stromfluss führen.

Die Aktivierungszeitkonstante (τ_{on} = Aktivierungskinetik) wurde von keinem der drei untersuchten Substanzen signifikant beeinflusst (Tabelle 4). Damit unterscheiden sich Ketamin, Etomidat und Pethidin zum einen von Morphin und Hydromorphon, bei denen es zu einer Verlangsamung der Aktivierungskinetik kam, zum anderen von Alfentanil, wo eine Beschleunigung gefunden wurde (Lyutenska, 2006). Propofol zeigte in entsprechenden Versuchen ebenfalls keine Effekte auf die Aktivierungskinetik (Barann et al., 2008).

Bei der Desensibilisierungszeitkonstante (τ_{off} = Inaktivierungskinetik) kam es bei Ketamin, Etomidat und Pethidin jeweils zu einer signifikanten Beschleunigung (Tabelle 4). Lyutenska (2006) fand eine Beschleunigung für Dihydroergotamin, die

Fentanyl-Derivate Alfentanil, Sufentanil und Remifentanil sowie für Endomorphin 2. Auch für Propofol ist ein beschleunigender Effekt für die Desensibilisierung gezeigt worden (Barann et al., 2008). Für Morphin, Hydromorphon und Sumatriptan wurde dagegen eine Verlangsamung festgestellt.

Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass Aktivierung und Inaktivierung/Desensibilisierung grundsätzlich zwei voneinander unabhängige Prozesse sind. Die Beschleunigung der Inaktivierungskinetik erklärt zudem die stärkere Inhibierung beim Integral im Vergleich zur Maximalstromamplitude bei gleicher Konzentration der Substanzen. Da durch die Inaktivierungsbeschleunigung der Stromfluss deutlich vermindert wird, sprechen die hier gefundenen Ergebnisse, besonders auch im Zusammenhang mit der Inhibierung der Stromamplituden für einen möglichen anti-emetischen Effekt. Dadurch, dass diese Effekte jedoch erst bei sehr hohen klinischen Plasmakonzentrationen hervorgerufen werden, kann man vermuten, dass die Emetogenität dieser Medikamente nicht auf direkte Effekte (z.B. Potenzierungen) am 5-HT_{3A}-Rezeptor zurückzuführen ist. Dies bedeutet, dass der Rezeptor bei den klinischen Plasmakonzentrationen der getesteten Substanzen eher unbeeinflusst bleibt und damit ein potentiell Ziel für indirekte Effekte der Substanzen darstellt (z.B. über Serotoninausschüttung, Interaktionen mit dem 5-HT-Transporter; Barann et al., 2006b).

Im Hinblick auf eine mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehung weisen die Ergebnisse aus der Arbeit von Meiboom (2010, eingereicht) darauf hin, dass ein Aromat mit Ethylamin-Struktur eine Beschleunigung der Desensibilisierung hervorruft. Es kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die im Pethidin enthaltene Propylamin-Struktur und die in Ketamin und Etomidat enthaltenen Methylamin-Strukturen auch über ähnliche Wechselwirkungen mit dem 5-HT_{3A}-Rezeptor interagieren können.

Jedoch ergibt sich auch durch den Imidazol-Ring im Etomidat- oder die Carbonyl-Strukturen im Pethidin- und Ketamin-Molekül die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureresten in den Rezeptor-Strukturen.

Die genaue Einlagerung und Bindung der Ligandmoleküle ist bisher nicht im Detail bekannt, so dass sich noch keine detaillierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen formulieren lassen.

Da in den Versuchen mit Ketamin, Etomidat und Pethidin die Aktivierungskinetik jeweils unbeeinflusst blieb, deutet dies auf eine unspezifische, nicht-kompetitive Hemmung des Rezeptors hin. Diesbezüglich decken sich die Ergebnisse mit denen von Lyutenska (2006) und Wittmann et al. (2008) für die Fentanyl-Gruppe. Für Morphin und Hydromorphon fanden diese hingegen einen spezifischen Effekt. Hierfür scheint die OH-Gruppe verantwortlich zu sein. Diese ist im 5-HT-, Morphin- und Hydromorphon-Molekül enthalten, fehlt jedoch in den Molekülen der Fentanyl-Gruppe sowie in Ketamin, Etomidat und Pethidin. Dies würde die Theorie eines allosterischen Bindungsmechanismus unterstützen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wäre es interessant Kompetitivitätsexperimente durchzuführen.

5.4 Einfluss der Applikationsmodi auf den Effekt der Substanzen

In der Tabelle 5 sind die durch die jeweilige Substanz hervorgerufenen Inhibierungen bei den drei Applikationsmodi Äquilibrium- („++“), Geschlossenkanal- („+-“) und Offenkanal-Applikation („-“) aufgeführt.

Alle drei Substanzen erreichen ihren Maximaleffekt in der Äquilibrium-Applikation, wobei die Potenz der einzelnen Substanzen variiert. Bei allen drei Substanzen wird jeweils eine etwa gleich große Inhibierung in der Offenkanal- und der Geschlossenkanal-Applikation erreicht (20 - 30 %ige Inhibierung). Die getesteten Substanzen benötigen folglich nur ca. 20 ms, also die ungefähre Zeit des „onsets“, um zwischen 65,9 % (Pethidin), 71,1 % (Ketamin) und 71,2 % (Etomidat) der Inhibierung bei den Äquilibriumexperimenten zu erzielen. Bei der Geschlossenkanal-Applikation reicht den Substanzen eine Auswaschzeit von 20 ms, um einen Rückgang der Inhibierung zwischen 28,9 % (Etomidat), 36,2 % (Pethidin) und 45,8 % (Ketamin) zu erzielen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Substanzen ihre Effekte sehr schnell am 5-HT_{3A}-Rezeptor ausüben können. Auch der Rückgang der Inhibierung ist durch einen schnellen, wenn auch vergleichsweise etwas langsameren Prozess gekennzeichnet.

5.5 Einwasch- und Auswaschexperimente

In den Einwasch- und Auswaschexperimenten bestätigen sich die in den Offen- und Geschlossenkanalexperimenten gefundenen schnellen Prozesse. Zwischen 66 % (Ketamin) und 84 % (Etomidat und Pethidin) der im Äquilibrium-Modus gemessenen Inhibierung wurde nach einer Einwaschzeit von 32 ms registriert. Bei allen drei Substanzen reichte eine Auswaschzeit von 32 ms aus, um die im Äquilibrium-Modus gemessene Inhibierung um 50 % zu reduzieren (Tabelle 6).

Unmittelbar nach Zugabe der Testsubstanzen - den kurzen Einwaschzeiten entsprechend - ließ sich jeweils ein schneller Anstieg der Inhibierung beobachten. Im Anschluss - den längeren Einwaschzeiten entsprechend - folgte eine vergleichsweise langsamere Annäherung an den Maximaleffekt der Inhibierung.

Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass in der schnellen Anfangsphase einige Rezeptoren durch die Substanzbindung inhibiert werden. Die noch wenigen unbesetzten Rezeptoren werden in der zweiten Phase langsamer besetzt, da die Liganden mehr Zeit benötigen, um einen unbesetzten Rezeptor anzutreffen. Für das Auswaschexperiment gilt selbiges in umgekehrter Weise.

Alle drei Substanzen scheinen folglich schnell am 5-HT_{3A}-Rezeptor binden und so auch zu einer schnellen Inhibierung führen zu können. Da die Moleküle reversibel und vermutlich schwach an den Rezeptor binden, ist ein schnelles Auswaschen des Effektes möglich.

5.6 Konzentrationssprungexperimente

Konzentrationssprungexperimente dienen dazu, schnelle Effekte, die bei Einwasch- und Auswaschexperimenten innerhalb der ersten 20 bis 32 ms auftreten, bestimmen und von langsamen differenzieren zu können. Bei allen drei untersuchten Substanzen zeigte sich, dass im „Sprung rein“-Experiment die Inaktivierungskinetik bereits signifikant beschleunigt und das Integral signifikant inhibiert wurde. Dies bestätigt den schnellen Effekt der Substanzen. Der Maximalstrom und die Aktivierungskinetik wurden und konnten nicht signifikant beeinflusst werden, da die jeweilige Testsubstanz erst nach Erreichen des Maximalstromes appliziert wurde. Bei den „Sprung raus“-Experimenten hingegen wurden der Maximalstrom und das Integral signifikant inhibiert. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik wurden dagegen nicht signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigen den schnellen Effektverlust der Substanzen (Tabelle 7 und 8).

Vorsicht ist bei einem Vergleich mit den Einwasch- und Offenkanal-Applikationsexperimenten geboten, da bei diesen Experimenten die jeweilige Substanz auf schon vollständig geöffnete Kanäle appliziert wurde. Bei den „Sprung rein“-Experimenten wurde die Substanz jedoch auf die geschlossenen Kanäle oder mit dem Öffnen der Kanäle appliziert.

Es stellt sich die Frage, in wie weit die Offenkanal-Applikation eine physiologische Situation darstellt. Die einzige mögliche Konstellation ist, dass es an einer Synapse zu einer Ko-Applikation der jeweiligen Substanz mit aus den Vesikeln ausgeschüttetem Serotonin kommt, ohne dass die verabreichte Substanz vorher präsent war.

Die Äquilibrium- oder auch die Geschlossenkanal-Applikation sind die wahrscheinlich realistischeren Situationen an der Synapse. Bei der Geschlossenkanal-Applikation bleibt jedoch die Problematik bestehen, dass der Effekt der „reinen“ Vor-Applikation schwer zu bestimmen ist, da es mit der Serotonin-Applikation gleichzeitig zu einem Auswasch des Effektes kommt und somit ein sehr schneller Effekt leicht übersehen werden kann.

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte, kann man davon ausgehen, dass die untersuchten Substanzen Emesis nicht direkt über den 5-HT_{3A}-Rezeptor vermitteln (z.B. durch Potenzierung oder direkte Aktivierung). Die Tatsache, dass der 5-HT_{3A}-Rezeptor bei klinischen Konzentrationen unbeeinflusst bleibt, bedeutet im Umkehrschluß, dass er weiterhin ein funktionelles Ziel für indirekte Substanzeffekte sein kann. Solch ein Effekt wurde von Barann et al. (2006b) auch für das emetogene Analgetikum Tramadol diskutiert, welches die 5-HT-Plasmakonzentration durch Inhibierung des 5-HT-Transporters erhöht, den 5-HT_{3A}-Rezeptor bei gleichen Konzentrationen jedoch nicht inhibiert.

Des Weiteren bleibt zu bedenken, dass die physiologischen Verhältnisse sich von der In-vitro-Situation unterscheiden. Denkt man an die im Körper vorhandenen unspezifischen Esterasen, so wird bei der Esterstruktur in Pethidin und Etomidat eine Sollbruchstelle deutlich. Durch den enzymatischen Metabolismus wird der aliphatische Alkohol aus der Esterbindung freigesetzt und die entstehenden Moleküle weisen strukturell eine Säurefunktion auf. Hieraus ergeben sich eventuell andere Bindungsmodalitäten an die Rezeptoren, so dass eine mögliche Bindung der Metabolite in den In-vitro-Versuchen nicht abgebildet wird. Interessant wäre daher, auch diese Strukturen im Hinblick auf ihre Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor zu untersuchen.

So ist für Pethidin bekannt, dass der Hauptmetabolit Nor-Pethidin, welcher durch Demethylierung am Stickstoffatom entsteht, zu großen Teilen für die narkotische Wirkung verantwortlich ist.

Weiterhin kann die Ladung der untersuchten Substanzen diskutiert werden. Etomidat und Ketamin liegen bei dem verwendeten pH-Wert von 7,45 ungeladen vor. Daher haben sie vermutlich eine gute Möglichkeit, Membranen zu überwinden und so über die Blut-Hirn-Schranke an entsprechenden 5-HT₃-Rezeptoren zu wirken, die im ZNS liegen. Eine Wirkung an den Serotoninrezeptoren der Area postrema ist hiervon aufgrund der fehlenden Blut-Hirn-Schranke unabhängig.

Pethidin, welches mit dem tertiären Amin eine leicht protonierbare Struktur besitzt, weist einen pKa-Wert von 8,7 auf. Im wässrigen System mit einem pH von 7,45 ergibt sich aus Berechnung nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, dass Pethidin zu etwa 95% protoniert vorliegt. Da nur eine Diffusion des ungeladenen Moleküls über die Blut-Hirn-Schranke hinweg als wahrscheinlich anzusehen ist, werden die Konzentrationen an Pethidin an den Serotoninrezeptoren im ZNS geringer sein, als jene von Etomidat und Ketamin.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, modulatorische Effekte der emetogenen Substanzen Ketamin, Etomidat und Pethidin am 5-HT_{3A}-Rezeptor zu charakterisieren. Dieser spielt bekanntermaßen eine wesentliche Rolle in der Modulation von Übelkeit und Erbrechen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit sollten Rückschlüsse auf die Emesismodulation gezogen werden. Im Einzelnen fanden sich folgende Ergebnisse:

1.) Ketamin, Etomidat und Pethidin führen zu konzentrationsabhängiger und reversibler Unterdrückung 5-HT (30 µM)-induzierter Ionenströme. Ähnliche Ergebnisse wurden von Lyutenska (2006) und Wittman et al. (2006, 2008) für Morphin, Hydromorphon und Apomorphin, von Barann et al. (2008) für Propofol sowie von Rüscher et al. (2007) für Etomidat gefunden. Aufgrund der hohen IC₅₀-Werte ist eher von einer indirekten Beteiligung des 5-HT_{3A}-Rezeptors an der Modulation der durch die Testsubstanzen hervorgerufenen Emesis auszugehen.

2.) Die Aktivierungskinetiken der 5-HT (30 µM)-induzierten Ionenströme werden durch keine der getesteten Substanzen signifikant beeinflusst. Somit zeigt sich ein Unterschied zu den Untersuchungsergebnissen von Lyutenska (2006) und Wittmann et al. (2006, 2008) für Morphin und Hydromorphon (Verlangsamung der Aktivierungskinetik) sowie zu dem Ergebnis für Alfentanil (Beschleunigung der Aktivierungskinetik). Die Aktivierungskinetik beschleunigende Substanzen scheinen keine oder eine vergleichsweise geringe emetische Potenz aufzuweisen. Eine signifikante Verlangsamung der Aktivierungskinetik hingegen kann für einen möglichen antiemetischen Effekt sprechen. Propofol zeigt hinsichtlich dieser Kinetiken ein vergleichbares Bild – ein ähnlicher Effekt im Hinblick auf das anti-emetogene Potential am 5-HT₃-Rezeptor lässt sich somit vermuten.

Auf molekularer Ebene sprechen die unveränderte Aktivierungskinetik und das Fehlen einer OH-Gruppe für eine unspezifische, nicht kompetitive Hemmung. Um jedoch eindeutige Aussagen zum Bindungsverhalten auf molekularer Ebene tätigen zu können, sind weitergehende Ligand-Bindungsstudien notwendig.

3.) Die Inaktivierungskinetiken der 5-HT (30 μ M)-induzierten Ionenströme werden von allen drei Substanzen beschleunigt. Dies bestätigt die von Lyutenska (2006) berichteten Ergebnisse für Alfentanil, Sufentanil, Remifentanil und Endomorphin 2 sowie die von Barann et al. (2008) berichteten Ergebnisse für Propofol. Demgegenüber steht die Verlangsamung der Deaktivierungskinetiken der 5-HT (30 μ M)-induzierten Ionenströme bei Morphin, Hydromorphon und Sumatriptan bei Lyutenska (2006) und Wittmann et al. (2006, 2008). Auch dieser Effekt spricht eher für eine anti-emetische Wirkung.

4.) Es findet keine Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors durch eine der Substanzen in Abwesenheit des Agonisten (5-HT) statt.

5.) Die kurzen Ein- und Auswaschzeiten von Ketamin, Etomidat und Pethidin verdeutlichen, dass die Substanzen ihre Effekte zum einen schnell am 5-HT_{3A}-Rezeptor ausüben können, zum anderen ihre Wirkung bereits nach kurzen Auswaschzeiten verlieren. Den initialen, schnellen Prozessen sowohl bei den Ein- als auch bei den Auswaschversuchen folgen vergleichsweise langsamere Prozesse.

6.) In den Konzentrationssprungexperimenten werden analog zu den Ein- und Auswaschexperimenten initial schnelle Effekte gesehen, denen vergleichsweise langsamere folgen.

7.) Die mittels der Meyer-Overton-Korrelation vorhergesagten, über den klinischen Plasmakonzentrationen liegenden IC₅₀-Werte stimmten eng mit den experimentell gefundenen Werten überein. Dies untermauert die Vorhersagekraft der Meyer-Overton-Korrelation bezüglich der Substanzpotenzen und spricht für unspezifische Effekte der Testsubstanzen am 5-HT₃-Rezeptor.

Bei klinischen Konzentrationen von Ketamin, Etomidat und Pethidin bleibt der 5-HT_{3A}-Rezeptor eher unbeeinflusst. Das emetische Potenzial der Testsubstanzen kann daher über indirekte Mechanismen, die womöglich 5-HT_{3A}-Rezeptoren einbeziehen (z.B. Beeinflussung des 5-HT-Transporters) oder aber über nicht-serotonerge Bahnen erklärt werden. Weitere Forschung in diesen Bereichen könnte somit von Interesse sein. Ebenso muss die Übertragbarkeit der experimentell gefundenen Effekte auf die In-vivo-Situation in weiteren experimentellen und klinischen Studien ermittelt werden.

7. Literaturverzeichnis

Andrews PLR, Davis CJ. The mechanism of emesis induced by anti-cancer therapies. In Emesis in Anti-cancer Therapy. Mechanisms and Treatment. London: Chapman & Hall, 1993

Apfel CC, Läärä E, Koivuranta M, Greim CA, Roewer N. A simplified risk score for predicting postoperative nausea and vomiting: conclusions from cross-validations between two centers. *Anesthesiology* 1999; 91: 693-700

Apfel CC, Roewer N. Einflussfaktoren von Übelkeit und Erbrechen nach Narkosen: Fiktionen und Fakten. *Anaesthesist* 2000; 49: 629-641

Apfel CC, Kranke P, Eberhart LHJ, Roos A, Roewer N. Comparison of predictive models for postoperative nausea and vomiting. *Br J Anaesth* 2002; 88: 234-240

Apfel C, Roewer N. Postoperative Übelkeit und Erbrechen. *Anaesthesist* 2004; 53: 377-391

Apfel CC, Korttila K, Abdalla M, Kerger H, Turan A, Vedder I, Zernak C, Danner K, Jokela R, Pocock SJ, Trenkler S, Kredel M, Biedler A, Sessler DI, Roewer N. A factorial trial of six interventions for the prevention of postoperative nausea and vomiting. *N Engl J Med* 2004; 350: 2441-2451

Appadu BL, Lambert DG. Interaction of i.v. anaesthetic agents with 5-HT₃ receptors. *Br J Anaesth* 1996; 76: 271-273

Barann M, Göthert M, Fink K, Bönisch H. Inhibition by anaesthetics of ¹⁴C-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT₃ receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 347: 125-132

Barann M, Göthert M, Bönisch H, Dybek A, Urban BW. 5-HT₃ receptors in outside-out patches of N1E-115 neuroblastoma cells: basic properties and effects of pentobarbital. *Neuropharmacology* 1997; 36: 655-664

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

Barann M, Brüss M, Brinkmann M, Linden I, Lyutenska M, Schneider M, Walkembach J, Wittmann M. 5-HT₃ receptors and emesis. *Pharmacological Reports* 2006a; 58: 253-255

Barann M, Urban BW, Stamer U, Dorner Z, Bönisch H, Brüss M. Effects of tramadol and O-demethyl-tramadol on human 5-HT reuptake carriers and human 5-HT_{3A} receptors: a possible mechanism for tramadol-induced early emesis. *Eur J Pharmacol* 2006b; 531: 54-58

Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW. Molecular actions of propofol on human 5-HT_{3A} receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives. *Anesth Analg* 2008; 106: 846-857

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1083-1152

Barnes NM, Hales TG, Lummis SCR, Peters JA. The 5-HT₃ receptor - the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 2009; 56: 273-284

Belelli D, Balcarek JM, Hope AG, Peters JA, Lambert JJ, Blackburn TP. Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 1054-1062

Biedler A, Wilhelm W. Postoperative Übelkeit und Erbrechen. *Anaesthesist* 1998; 47: 145-158

Board T, Board R. The role of 5-HT₃ receptor antagonists in preventing postoperative nausea and vomiting. *AORN J* 2006; 83: 209-216

Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 1994; 33: 275-317

Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, Barnes NM. Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A/3B} receptors. *Neuropharmacology* 2001; 41: 282-284

Brüss M, Göthert M, Hayer M, Bönisch H. Molecular cloning of alternatively spliced human 5-HT₃ receptor cDNAs. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 861: 234-235

Brüss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Göthert M, Bönisch H. Modified 5-HT_{3A} receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT_{3A} receptor isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362: 392-401

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

Costall B, Naylor RJ. Neuropharmacology of 5-HT₃ receptor ligands. In: Baumgarten HG, Göthert M. HRSG. Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer, 1997; 409-438

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

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 1989; 339: 706-709

Dilger JP, Boguslavsky R, Barann M, Katz T, Vidal AM. Mechanisms of barbiturate inhibition of acetylcholine receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 1997; 109: 401-414

Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem* 1999; 274: 30799-30810

Eberhart LHJ, Morin AM, Wulf H, Geldner G. Patient preferences for immediate postoperative recovery. *Br J Anaesth* 2002; 89: 760-761

Eberhart LHJ, Kranke P. Postoperative Übelkeit und Erbrechen - Für wen ist PÜ&E relevant - und wer ist ein Risikopatient? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2009; 44: 280-284

Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 1993; 366: 479-483

Fink K, Göthert M. 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 360-417

Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 1957; 12: 323-328

Gozlan H, Langlois M. Structural analysis of receptor-ligand interactions. In: Hamon M, Hrsg. *Central and Peripheral 5-HT₃ Receptors*. London: Academic Press, 1992: 59-88

Hargreaves AC, Lummis SC, Taylor CW. Ca²⁺ permeability of cloned and native 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 1120-1128

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

Minami M, Endo T, Hirafuji M, Hamaue N, Liu Y, Hiroshige T, Nemoto M, Saito H, Yoshioka M. Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 149-165

Jackson MB, Yakel JL. The 5-HT₃ receptor channel. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 447-468

Jenkins K, Grady D, Wong J, Correa R, Armanious S, Chung F. Post-operative recovery: day surgery patients' preferences. *Br J Anaesth* 2001; 86: 272-274

Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: Thomas Karow, 2005

Kilpatrick GJ, Bunce KT, Tyers MB. 5-HT₃ receptors. *Med Res Rev* 1990; 10: 441-475

Kovac AL. Prevention and treatment of postoperative nausea and vomiting. *Drugs* 2000; 59: 213-243

Kovac AL. Benefits and risks of newer treatments for chemotherapy-induced and postoperative nausea and vomiting. *Drug Saf* 2003; 26: 227-229

Lummis SC. The transmembrane domain of the 5-HT₃ receptor: its role in selectivity and gating. *Biochem. Soc Trans* 2004; 32: 535-539

Ljutenska M. 5-HT₃-Rezeptoren und Analgetika: Effekte von Antimigränemitteln und Opioiden auf humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren. Dissertation, Medizinische Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006

Macario A, Weinger M, Carney S, Kim A. Which clinical anesthesia outcomes are important to avoid? The perspective of patients. *Anesth Analg* 1999; 89: 652-658

Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, and Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991; 254: 432-437

Mayer M, Doenicke A, Nebauer AE, Hepting L. Propofol und Etomidat-Lipuro zur Einleitung einer Allgemeinanästhesie. *Anaesthesist* 1999; 45:1082-1084

Minami M, Endo T, Hirafuji M, Hamaue N, Liu Y, Hiroshige T, Nemoto M, Saito H, Yoshioka M. Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 149-165

Mott DD, Erreger K, Banke TG, Traynelis SF. Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol* 2001; 535: 427-443

Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am* 1992; 266: 44–51

Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 2003; 310: 101-111

Niesler B, Walstab J, Combrink S, Moeller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G., Brüß M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E}. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 8-17

Niesler B, Kapeller J, Hammer C, Rappold G. Serotonin type 3 receptor genes: HTR3A, B, C, D, E. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 501-504

O'Sullivan JF. Analgesia for forceps delivery. A technique for the „single-handed“ obstetrician. Br Med J 1962; 1: 151-152

Roewer N. Postoperative Übelkeit und Erbrechen - Ein Problem mit hoher Relevanz. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2009; 44: 278-279

Rote Liste® Service GmbH, 2010: Fachinformation Dolantin®.
<http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/06/000632.pdf> (Zugriffsdatum: 05.07.2010)

Rote Liste® Service GmbH, 2010: Fachinformation Etomidat-®Lipuro
<http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/45/004548.pdf> (Zugriffsdatum: 05.07.2010)

Rote Liste® Service GmbH, 2010: Fachinformation Ketamin-hameln®.
<http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/99/009930.pdf> (Zugriffsdatum: 05.07.2010)

Rote Liste® Service GmbH, 2010: Fachinformation Ketamin-ratiopharm®.
<http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/66/006608.pdf> (Zugriffsdatum: 05.07.2010)

Rote Liste® Service GmbH, 2010: Fachinformation Propofol-Lipuro®.
<http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/67/006783.pdf> (Zugriffsdatum: 05.07.2010)

Rüsch D, Braun HA, Wulf H, Schuster A, Raines DE. Inhibition of human 5-HT_{3A} and 5-HT_{3AB} receptors by etomidate, propofol and pentobarbital. Eur J Pharmacol 2007; 573: 60-64

Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. Annu Rev Physiol 1984; 46: 455-472

Schulz M, Schmoltdt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. Pharmazie 2003; 58: 447-474

Schumann R, Polaner DM. Massive Subcutaneous Emphysema and Sudden Airway Compromise After Postoperative Vomiting. *Anesth Analg* 1999; 89: 796-797

Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth H. *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2005

Steward LJ, Boess FG, Steele JA, Liu D, Wong N, Martin IL. Importance of phenylalanine 107 in agonist recognition by the 5-hydroxytryptamine(3A) receptor. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 1249-1255

Tetko IV, Tanchuk VY, Villa AE. Prediction of N-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. *J Chem Inf Comput Sci* 2001; 41: 1407-1421

Tetko IV, Tanchuk VY. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J Chem Inf Comput Sci* 2002; 42: 1136-1145

Tramèr MR, Moore RA, Reynolds DJ, McQuay HJ. A quantitative systematic review of ondansetron in treatment of established postoperative nausea and vomiting. *BMJ* 1997a; 314: 1088-1092

Tramèr MR, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Efficacy, dose-response, and safety of ondansetron in prevention of postoperative nausea and vomiting: a quantitative systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Anesthesiology* 1997b; 87: 1277-1289

Ulsamer B, Doenicke A, Laschat M. Propofol im Vergleich zu Etomidat zur Narkoseeinleitung. *Anaesthesist* 1986; 35: 535-542

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

Vaupel P. Funktionen des Magen-Darm-Trakts. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F. Physiologie des Menschen. Berlin: Springer-Verlag; 2000; 806-848

Walkembach J, Brüss M, Urban BW, Barann M. Interactions of metoclopramide and ergotamine with human 5-HT_{3A} receptors and human 5-HT reuptake carriers. Br J Pharmacol 2005; 146: 543-552

Wallenborn J, Eberhart LHJ, Kranke P. Postoperative Übelkeit und Erbrechen -. Alles beim Alten in der Pharmakotherapie von PONV? Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2009; 44: 296-304

Wittmann M, Peters I, Schaaf T, Wartenberg HC, Wirz S, Nadstawek J, Urban BW, Barann M. The effects of morphine on human 5-HT_{3A} receptors. Anesth Analg 2006; 103: 747-752

Wittmann M, Schaaf T, Peters I, Wirz S, Urban BW, Barann M. The effects of fentanyl-like opioids and hydromorphone on human 5-HT_{3A} receptors. Anesth Analg 2008; 107: 107-112

8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Urban und Herrn Privatdozent Dr. Barann für die Überlassung dieser überaus interessanten Arbeit sowie für die stets vorbildliche Betreuung.

Frau Dorner möchte ich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung in allen Phasen der Arbeit, insbesondere in der Einarbeitungszeit, danken. Zudem möchte ich ihr sowie auch Frau von dem Bussche für die Bereitstellung der Zellkulturen danken.

Frau Dr. Wittmann, Frau Dr. Linden und Frau Brinkmann danke ich für die gute Einarbeitung und die konstruktiven Diskussionen im Labor.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Urban möchte ich für die Hilfsbereitschaft, die interessanten und hilfreichen Diskussionen und das überaus angenehme Arbeitsklima danken.

Ganz herzlicher Dank gilt natürlich auch meiner Familie - insbesondere meinen Eltern und meiner Freundin - für die unermüdliche Unterstützung nicht nur während der Dissertation.