

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Hamburg  
(Direktor: Professor Dr. med. J. Schulte am Esch)

Einfluß der Inhibition des Stickoxidmetabolismus  
auf die anästhetische Potenz des Barbiturates Thiopental und des  $\alpha_2$ -  
Adrenozeptor-Agonisten Dexmedetomidin

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Nicolas Oliver Schlamp  
aus Hamburg  
Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 5. September 2000

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Priv. Doz. Dr. P. Tonner

Korreferent: Prof. Dr. J. Schulte am Esch

In Andenken an meinen Vater  
Dr. med. Hans-Joachim Schlamp

## Inhalt

1.	Einleitung	1 - 7
2.	Material und Methoden	8 - 14
2.1.	Versuchstiere	8
2.2.	Reflexprüfung bei den Versuchstieren	8
2.3.	Substanzen	10
2.3.1.	Thiopental	10
2.3.2.	Dexmedetomidin	10
2.3.3.	L-NAME	11
2.3.4.	L-Arginin	12
2.3.5.	D-Arginin	12
2.4.	Verdünnungsreihen	13
2.5.	Statistische Auswertung	14
3.	Ergebnisse	15 - 19
3.1.	L-NAME	15
3.2.1.	Thiopental	15
3.2.2.	Thiopental plus L-NAME	16
3.3.1.	Dexmedetomidin	17
3.3.2.	Dexmedetomidin plus L-NAME	18
3.4.1.	Thiopental plus L-NAME plus L-Arginin	18
3.4.2.	Thiopental plus L-NAME plus D-Arginin	18

4.	Diskussion	20 - 34
4.1.	Bestimmung der anästhetischen Potenz an Kaulquappen	20
4.2.	Die Rolle von NO zur Signalübermittlung im ZNS	25
4.2.1.	Lokalisation der NO-Synthase im ZNS	27
4.2.2.	Wirkung von Anästhetika auf die rezeptorvermittelte Signalübermittlung im ZNS und die Bedeutung von NO	27
4.3.	Spezifität der L-NAME-Wirkung auf die NO-Synthase	31
4.4.	Bewertung anderer Arbeiten zur Rolle von NO in der Anästhesie	32
5.	Zusammenfassung	35 - 36
6.	Literaturverzeichnis	37 - 47

## Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
D	Diffusionskonstante
D-Arginin	rechtsdrehendes Stereoisomer von Arginin
dc / dx	Konzentrationsänderung pro Streckenintervall
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EDRF	endothelium derived relaxing factor
F	Diffusionsfläche
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
iv	intravenös
g	Gramm
L-Arginin	linksdrehendes Stereoisomer von Arginin
L-NAME	Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NMMA	Nitro-Methyl-L-Arginin
m	Meter
MAK	minimale alveolare Konzentration
min	Minute
MG	Molekulargewicht
l	Liter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
M	Mol
NADPH	Wasserstoff-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat
N-Arg	Nitro-L-Arginin

NaOH	Natronlauge
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
s	Sekunde
T	Diffusionsgeschwindigkeit
VRR	Verlust des Richtungsreflexes
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Anästhesie wird allgemein in Regionalanästhesie und Allgemeinanästhesie unterteilt. Bei der Regionalanästhesie ist die Schmerzausschaltung mittels Lokalanästhetikum auf einen bestimmten Körperteil begrenzt und beruht auf der Blockierung der Reizweiterleitung. Als Allgemeinanästhesie bezeichnet man die temporäre und reversible Funktionshemmung des zentralen Nervensystems zur Herbeiführung von Bewußt- und Schmerzlosigkeit. Die Verarbeitung von Sinnesreizen und deren Bewußtwerdung sind sehr komplexe, weitgehend ungeklärte Prozesse und es gibt demgemäß bisher keine eindeutigen Erklärungsmodelle für den Zustand der Anästhesie. Bis heute sind weder ihr genauer molekularer Wirkmechanismus noch ihr Wirkort bekannt. Um genauere Vorstellungen über den Zustand der Anästhesie zu erlangen, zieht man Rückschlüsse auf Wirkmechanismen aus den Reaktionen der Lebewesen auf Anästhetika, unter Berücksichtigung bekannter Stoffwechselwege.

Anästhetika unterteilt man nach der Art ihrer Applikation in volatile und intravenöse Anästhetika. Zu den volatilen Anästhetika, die in der Klinik Verwendung finden, gehören Stickoxydul, Halothan, Enfluran, Isofluran, Desfluran und Sevofluran. Es sind, abgesehen vom Stickoxydul, halogenierte kurzkettige Kohlenwasserstoffe, die im wesentlichen lipophile aber auch in geringem Maße hydrophile Eigenschaften besitzen. Zu den klinisch eingesetzten intravenösen Anästhetika gehören die Gruppe der Barbiturate, Ketamin, Etomidat, Propofol und im weiteren Sinne auch die  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten. Im Gegensatz zu den volatilen Anästhetika sind intravenöse Anästhetika chemisch gesehen sehr unterschiedliche Substanzen. Allen gemein ist ihre Lipophilie. Hinsichtlich ihrer Pharmakodynamik lassen sich die einzelnen Substanzen als eher spezifisch über Rezeptoren wirksame oder als unspezifisch wirksame Substanzen klassifizieren. Die

meisten Anästhetika werden zu den unspezifisch wirkenden Substanzen gezählt. Ein Hinweis dafür ist der Umstand, daß diese Substanzen in ihrer Potenz der um die Jahrhundertwende formulierten Meyer-Overton-Korrelation entsprechen, welche besagt, daß die anästhetische Potenz mit der Lipidlöslichkeit einer Substanz zunimmt. Ein weiteres Charakteristikum unspezifischer Wirkung ist der Umstand, daß sie sich nicht gezielt antagonisieren läßt.

Als Agonisten des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor zeigen  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten rezeptorspezifisches Verhalten, da sie sich antagonisieren lassen und in ihrer erwarteten anästhetischen Potenz nicht der Meyer-Overton-Regel folgen (Tonner et al. 1997).

Es konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, daß Anästhetika im Stoffwechsel der Reizüberleitung und -verarbeitung insbesondere an Zellmembranen direkt und an Strukturen angreifen, die Zellmembranen-assoziiert sind. Als Beispiel hierfür sind zum einen die Rezeptoren und die Synapsen als auch die intrazelluläre Kalziumhomöostase zu nennen (Urban et al. 1995, Johns 1996, Pajewski et al. 1996). Darüber hinaus können Anästhetika Einfluß auf second-messenger, wie zum Beispiel das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) nehmen.

cGMP ist im Organismus ein wichtiger second-messenger. Die cGMP-Konzentration hängt in Endothelzellen und im ZNS vom Stickstoffmonoxidmetabolismus (NO-Metabolismus) ab (Snyder 1992), da die für die Produktion von cGMP notwendige Guanylylcyclase direkt durch NO stimuliert wird. Hieraus resultiert die Erkenntnis, daß NO und Anästhetika auf einen gemeinsamen Stoffwechselweg, nämlich das cGMP-System, Einfluß nehmen.

NO ist ein sehr kleines Molekül, welches sowohl in hydrophober als auch in hydrophiler Umgebung löslich ist und daher leicht durch die verschieden-

sten Medien diffundieren kann. Es ist eine Substanz mit hoher Reaktionsbereitschaft, was seine theoretische Reichweite stark beschränkt. In löslicher Form wird NO innerhalb von wenigen Minuten zu inaktiven Stickstoff-Sauerstoffverbindungen oxidiert. In biologischen Systemen liegt die Halbwertszeit zwischen 3 und 30 Sekunden, da es als freies Radikal rasch durch Radikalfängersysteme, insbesondere durch Superoxidasen und Oxyhämoglobin inaktiviert wird (Moncada et al. 1991, Moncada et al. 1993, Abu-Soud et al. 1995). NO besitzt eine hohe Affinität zu verschiedenen Liganden von Proteinen. Wichtige Liganden sind zum Beispiel die Häm-Gruppe, wie sie im Hämoglobin und in zahlreichen Hämoproteinen vorkommt, die Cysteingruppe, welche sich im Serumalbumin findet und die Thiolgruppe, welche im NMDA-Rezeptor enthalten ist (Braugher et al. 1979, Ignarro 1991).

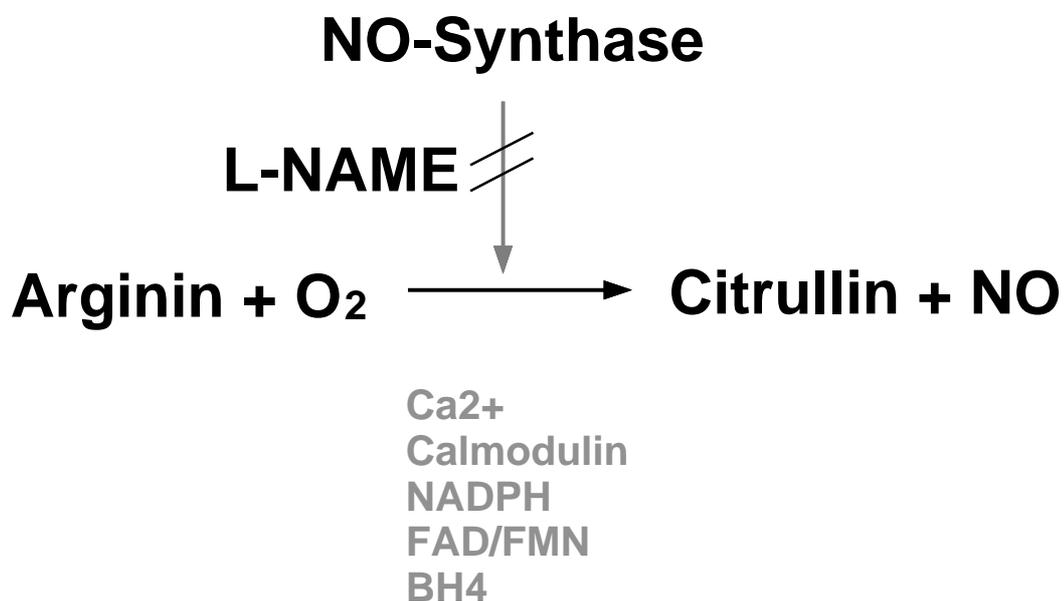


Abb. 1.1 Schema der NO Synthese aus L-Arginin und Sauerstoff zu Citrullin + NO. Hierfür sind die Cofaktoren NADPH, FAD und BH<sub>4</sub> sowie je nach Art der NO-Synthase Ca und Calmodulin notwendig. Die verschiedenen Isoformen der NO-Synthase lassen sich durch L-NAME kompetitiv hemmen.

Die intrazelluläre Synthese von NO erfolgt über mehrere Redox-Schritte aus dem Guanidinstickstoff von L-Arginin unter Verwendung von Sauerstoff (Abb. 1.1). Dieses geschieht mit Hilfe der sogenannten NO-Synthase unter zusätzlicher Verwendung mehrerer Kofaktoren. Wichtige Kofaktoren sind das NADPH, Flavinadenindinukleotid, Flavinmononukleotid, Häm, Tetrahydrobiopterin und Kalzium-Calmodulin (Ca-Calmodulin) (Nathan und Xie 1994, Wang und Marsden 1995).

Die NO-Synthase läßt sich in drei verschiedene Formen unterteilen. Es existiert eine induzierbare, auch als immunologisch bezeichnete Form, deren Aktivität durch die Expression einer bestimmten Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) gesteuert wird. Diese befindet sich in den Makrophagen und vermittelt die Zytotoxizität. Die beiden anderen Isoformen der NO-Synthase sind an den Calmodulin-Komplex assoziiert, sie werden gewebsspezifisch als endotheliale oder als neuronale NO-Synthase bezeichnet. Eine lokale Konzentrationserhöhung von Ca führt bei diesen Isoenzymen zur Bildung eines Ca-Calmodulin-Komplexes und überführt die NO-Synthase kurzfristig in ihre aktive Form (Bredt und Snyder et al. 1992).

Die endotheliale Isoform der NO-Synthase kommt in den Endothelzellen der Blutgefäße vor. Das von der endothelialen Form gebildete NO wirkt, bekannt als EDRF (Furchgott und Zawadzki 1980), erschlaffend auf die Gefäßmuskulatur und führt so zu einer Vasodilatation. Anästhetika, sowohl volatile als auch intravenöse, wirken ebenfalls auf den Gefäßtonus. Ob dieses über Interaktion mit dem NO-Stoffwechsel in der Endothelzelle oder auf anderem Wege geschieht, ist derzeit noch umstritten. Bekannt ist allerdings die Tatsache, daß volatile Anästhetika wie Halothan die Produktion von NO in Endothelzellen hemmen können (Muldoon et al. 1988) Somit konnte eine Interaktion von Anästhetika mit dem NO-Metabolismus im Endothel bereits nachgewiesen werden.

Im ZNS führt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch seinen Agonisten Glutamat zur Konzentrationserhöhung von NO um 300% (Bredt und Snyder 1989). Die cGMP-Konzentration stieg dabei ebenfalls um 300% an. Daraus folgerten Bredt und Snyder, daß die cGMP-Produktion im ZNS NO-vermittelt ist, weshalb man NO im ZNS mittlerweile die Eigenschaften eines second-messenger zuschreibt (Lowenstein et al. 1994). Im ZNS sind Interaktionen von Anästhetika mit dem cGMP-Stoffwechsel bekannt. So hemmt Thiopental den NMDA-Rezeptor-vermittelten Anstieg der cGMP-Konzentration im ZNS (Terasako et al. 1994). Ob dieses wie im Endothel über eine Interaktion mit dem NO-Metabolismus geschieht, ist noch nicht abschließend geklärt.

Die neuronale Form der NO-Synthase konnte in hoher Aktivität unter anderem im Kleinhirn, im Hypothalamus und im Mittelhirn sowie in geringerer Aktivität im Striatum im Hippokampus und im zerebralen Kortex nachgewiesen werden (Bredt und Snyder 1992, Forstermann et al. 1990). Sie fand sich also in Hirnregionen, die an der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt sind. Da Anästhetika auf das Bewußtsein Einfluß nehmen und eben dieses in diesen Regionen gesteuert wird, scheinen Anästhetika und NO in den gleichen Regionen zu wirken. Da bereits für das Endothel und im ZNS zahlreiche Interaktionen von Anästhetika mit dem NO-Metabolismus nachgewiesen wurden, könnte dieses auch hier der Fall sein.

Die neuronale Form der NO-Synthase läßt sich kompetitiv durch Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) hemmen (Abb. 1.1). Vor diesem Hintergrund untersuchten Johns und seine Mitarbeiter (1992) die Auswirkung von L-NAME auf die minimale alveolare Konzentration (MAK) von Halothan bei Ratten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die zusätzliche Applikation von L-NAME zu einer MAK-Reduktion von bis zu 51% führte. Dieser Effekt war durch Zugabe des Substrates der NO-

Synthese L-Arginin voll reversibel. Also scheint die NO-Aktivität Einfluß auf die Ansprechbarkeit des Organismus für Anästhetika zu haben. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei Vertreter aus der Gruppe der intravenösen Anästhetika gewählt.

Die Barbiturate stellen eine wichtige Gruppe der intravenösen Anästhetika dar. Thiopental ist der wichtigste klinische Vertreter aus dieser Gruppe. Es ist eine seit den dreißiger Jahren bekannte Substanz und durch zahlreiche pharmakologische und anästhesiologischen Untersuchungen in seinen Wirkungen und Nebenwirkungen gut erforscht (Ho und Harris 1981, Richter und Holtman 1982).

Die  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten stellen eine erst kürzlich als anästhetisch wirksam bekannt gewordene Gruppe der intravenösen Anästhetika dar. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Dexmedetomidin. Erste Hinweise auf ihre sedierende Wirksamkeit erhielt man durch pharmakologische Studien mit Clonidin (Maze und Tranquilli 1991), einer in der Behandlung des Hypertonus (Wing et al. 1977) lange bekannten Substanz. So führt Clonidin in Verbindung mit Thiopental zu einer Konzentrationseinsparung von Thiopental bis zu 60% (Tonner et al. 1995), wobei Clonidin allein keine erkennbare anästhetische Potenz besitzt. An Ratten konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Dexmedetomidin die MAC von Halothan deutlich senkt (Segal et al. 1989). Da Dexmedetomidin eine größere Selektivität für den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor als Clonidin besitzt (Virtanen 1989), ist es möglich, mit Dexmedetomidin allein den Zustand der Anästhesie zu erzeugen (Tonner et al. 1997).

Es wurden Kaulquappen der Gattung *Xenopus laevis* als Versuchsobjekte gewählt. Kaulquappen finden schon seit der Jahrhundertwende als Versuchstiere in der Pharmakologie Verwendung (Overton 1901). Die

Ergebnisse solcher Versuche zur Bestimmung der anästhetischen Potenz einer Substanz lassen sich mit hoher Korrelation auf Säugetiere übertragen (Lipnick 1989)

Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären, ob die Inhibition des NO-Metabolismus zur Veränderung der anästhetischen Potenz der intravenösen Anästhetika Thiopental und Dexmedetomidin führt, wie bereits für Halothan (Johns et al. 1992) und Isofluran (Pajewski et al. 1996) gezeigt werden konnte. Aus der Klärung dieser Frage ließen sich weitere wichtige Hinweise auf den molekularen Wirkmechanismus von Anästhetika gewinnen, wie zum Beispiel auf die Frage, ob volatile und intravenöse Anästhetika einen gemeinsamen Wirkmechanismus besitzen. Aus der Möglichkeit, mit NO-Synthase-Inhibitoren die anästhetische Potenz von Anästhetika zu steigern, ließen sich unter Umständen neue Medikamente entwickeln, die den Anästhetikaverbrauch reduzieren könnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Mit Genehmigung (Nr. 33/94) der örtlichen Tierschutzkommission wurden als Versuchstiere Kaulquappen der Gattung *Xenopus laevis* aus dem Bestand der Versuchstierhaltung des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Hamburg, verwendet. Alle Tiere eines Versuches stammten aus einem Laich. Die Tiere wurden bei 18,0° C Raumtemperatur gehalten und artgerecht gefüttert.

Das Einschlußkriterium für die Teilnahme an den Versuchen war eine Körperlänge von mindestens 8 mm und maximal 15 mm. Diese Größe wurde zwischen dem 7. und 10. Tag der Kaulquappenentwicklung erreicht. Jedes Tier nahm nur an einem Versuch teil, und es wurden nur solche Tiere verwendet, die bei Versuchsbeginn sehr lebhaft Reaktionen auf Vibrationen und Erschütterungen des Beckens zeigten. Die Versuchslösungen wurden vor dem Einsetzen der Tiere auf Raumtemperatur gebracht und ausreichend oxygeniert.

Die Versuche wurden über mindestens 120 Minuten durchgeführt, während dieser Zeit wurde alle 10 Minuten der Richtungsreflex überprüft. Nach den Versuchen wurden die Kaulquappen wieder in reines Wasser zurückgesetzt, wo sehr schnell eine Erholung der Tiere zu beobachten war. Anschließend gingen die Tiere wieder in den Bestand der Versuchstierhaltung des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf über. Alle Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt.

### 2.2. Reflexprüfung bei den Versuchstieren

Die Durchführung der Versuche fand in entsprechend gekennzeichneten 1000 ml Bechergläsern statt. Alle 10 Gläser wurden im Abstand von einer

Minute mit mindestens 10 und maximal 13 Kaulquappen bestückt. Die erste Reflexprüfung fand nach 10 Minuten statt. Es wurde hierfür eine Glaspipette verwendet, die vorher durch Erhitzen zu einem Haken am Ende umgebogen worden war. Zur Prüfung des Richtungsreflexes wurden alle Tiere nacheinander mit der Glaspipette auf den Rücken gedreht. Dieses geschah möglichst vorsichtig, um die Tiere nicht durch Schmerzreize zu aktivieren. Der Zustand der Anästhesie war definiert als Verlust des Richtungsreflexes für mehr als 5 s (Alifimoff et al. 1987, Tonner et al. 1992, Tonner et al. 1995). Wenn das Tier sich nach 5 s nicht wieder in seine Ausgangslage gedreht hatte, wurde es als anästhesiert gezählt (Abb. 2.1). Die Reflexprüfung wurde über eine Dauer von zwei Stunden nach Einsetzen der Tiere in die Bechergläser durchgeführt. Um sicherzustellen, daß unter konstanten Bedingungen gearbeitet wurde, wurden alle Versuche mindestens 30 Minuten lang nach Auftreten einer stabilen Reaktionslage fortgeführt. Anschließend wurden die Tiere wieder in reines Wasser zurückgesetzt.

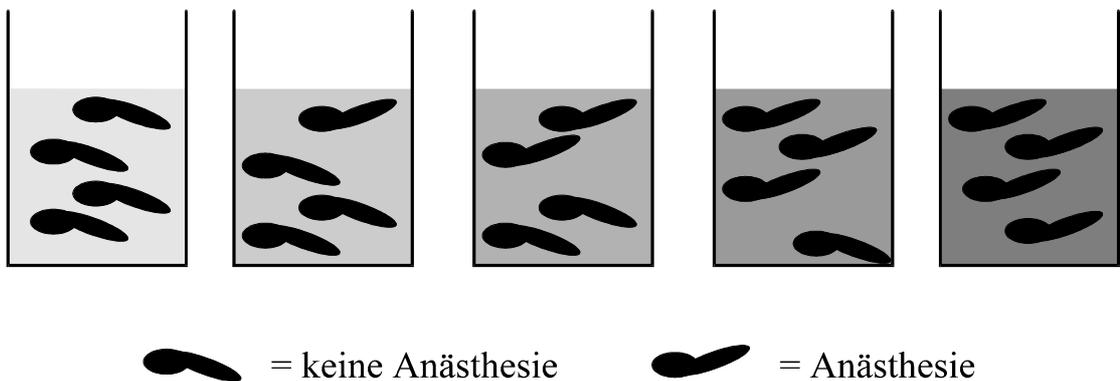


Abb. 2.1 Modell einer Versuchsreihe mit von links nach rechts aufsteigender Konzentration von Anästhetika. Mit zunehmender Konzentration verbleiben die Kaulquappen nach vorsichtigem Wenden in dieser Position. Der Richtungsreflex ist erloschen und die Kaulquappen werden als anästhesiert gezählt.

## 2.3. Substanzen

### 2.3.1. Thiopental

Als Ausgangslösung für die Versuche wurde eine 1 mM Thiopental-Lösung hergestellt. Hierzu wurden 264,3 mg Thiopental (Abb. 2.2) in einem Liter Leitungswasser mit einer Temperatur von 20,0°C unter Rühren auf dem Magnet-rührer gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe des pH-Meters auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$  mit 1 M HCl-Lösung titriert.

Um die gewünschte Konzentration an Substanz in einem Becherglas zu erhalten, wurde eine vorher errechnete Menge Ausgangslösung mit Leitungswasser auf 500 ml aufgefüllt. Die bei den Versuchen benutzten Konzentrationen lagen zwischen 1 und 100  $\mu\text{M}$ . Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration an Thiopental wurde für jedes Becherglas der Anteil an Ausgangslösung entsprechend vermindert. Das für die Verdünnung verwendete Leitungswasser wurde vorher auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$  titriert.

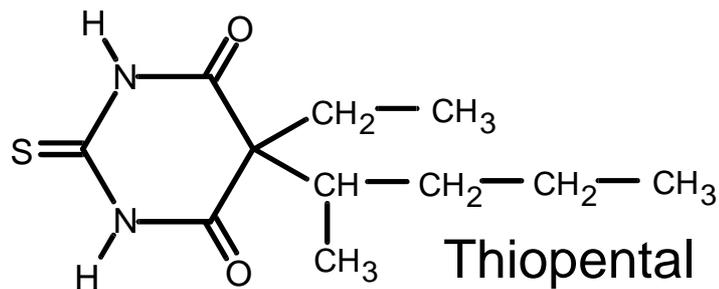


Abb. 2.2. Strukturformel von Thiopental

### 2.3.2. Dexmedetomidin

Dexmedetomidin, 4(5)-[1-(Dimethylphenyl)ethyl]-Imidazol ist ein selektiver  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist (Abb. 2.3). Auch hier wurde zunächst

eine Ausgangslösung mit einer Molarität von 0,1 mM hergestellt, hierfür wurde Trockensubstanz der Firma Orion / Farnos Pharmaceutica, Turku, Finnland verwendet. Die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgte analog zu der von Thiopental. Die verwendeten Konzentrationen für Dexmedetomidin lagen zwischen 0,1 und 20  $\mu$ M.

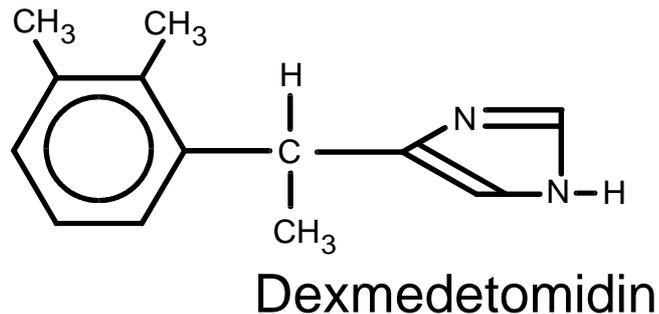


Abb. 2.3. Strukturformel von Dexmedetomidin

### 2.3.3. L-NAME

Als Ausgangslösung wurde eine 10 mM L-NAME Lösung durch Lösen von 2,69 g in einem Liter Leitungswasser hergestellt. Anschließend wurde die L-NAME Ausgangslösung mit Hilfe des pH-Meters unter Verwendung von 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$  titriert.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe für die Versuche mit L-NAME allein fand in gleicher Weise statt, wie es bei den Versuchen mit Thiopental und Dexmedetomidin der Fall war. Es wurden Konzentrationen zwischen 1  $\mu$ M und 10 mM verwendet.

Für die Versuche mit L-NAME in Kombination mit einem Anästhetikum wurde eine vorher errechnete Menge Thiopental bzw. Dexmedetomidin Ausgangslösung mit einem ebenfalls errechneten Volumen L-NAME-Lösung vermischt und anschließend mit Leitungswasser auf 500 ml aufgefüllt. Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration an Anästhetikum wurde für jedes Becherglas der Anteil an

jeweiliger Ausgangslösung entsprechend vermindert. Nach dem Mischen wurde der pH-Wert aller Lösungen der Verdünnungsreihe kontrolliert. Der pH-Wert sollte bei 7,0 liegen, da dieses dem pH-Wert der physiologischen Umgebung der Kaulquappen entspricht. Es wurden L-NAME Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  verwendet.

#### 2.3.4. L-Arginin

L-Arginin ist ein Substrat der NO-Synthase. Es wurde zunächst eine 10 mM Ausgangslösung hergestellt, dazu wurde die abgewogene Menge in Leitungswasser unter Verwendung eines Magnetrührers bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von einer halben Stunde gelöst und anschließend mit Hilfe des pH-Meter mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$  titriert. Die Versuchslösungen setzten sich aus entsprechend errechneten Anteilen der Ausgangslösungen für Anästhetikum, L-NAME und L-Arginin, zusammen. Die jeweilige Menge der Ausgangslösungen wurden miteinander vermischt und mit Leitungswasser auf 500 ml aufgefüllt. Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit abnehmender Anästhetika-Konzentration wurde der jeweilige Anteil an Ausgangslösung des Anästhetikum entsprechend reduziert. Abschließend erfolgte für jedes Becherglas eine erneute pH-Messung mit Einstellung auf eine pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$ . Die verwendete L-Arginin-Konzentration in den Versuchsgläsern lag nach Vermischen mit Anästhetika-Lösung und der übrigen Agenzien und Wasser bei 1 mM.

#### 2.3.5. D-Arginin

D-Arginin ist das Stereoisomer des L-Arginin. Es besitzt die gleichen chemischen Eigenschaften wie L-Arginin, kann aber von der NO-Synthase nicht als Substrat verwendet werden. Auch hier wurde zunächst eine 10 mM

Ausgangslösung mit D-Arginin hergestellt, dazu wurde die abgewogene Menge in Leitungswasser unter Verwendung eines Magnetrührers bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von einer halben Stunde gelöst und anschließend mit Hilfe des pH-Meter mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$  titriert. Zur Herstellung der Versuchslösungen wurden die Ausgangslösungen für Anästhetikum, L-NAME und D-Arginin nach errechneten Anteilen miteinander vermischt und mit Leitungswasser auf 500 ml aufgefüllt. Um eine Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration an Anästhetikum herzustellen, wurde der jeweilige Anteil an Ausgangslösung des Anästhetikums entsprechend reduziert. Abschließend erfolgte für jedes Becherglas eine erneute pH-Messung mit Einstellung auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$ . Es wurde eine Konzentration von 1 mM D-Arginin verwendet.

#### 2.4. Verdünnungsreihen

Als Basisversuch wurde für die Anästhetika Thiopental und Dexmedetomidin die halbmaximale Konzentration  $EC_{50}$  allein bestimmt, hierfür wurden verschiedene Verdünnungsreihen mit 10 Meßpunkten um die  $EC_{50}$  in einem Bereich für Thiopental von 1  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M, und für Dexmedetomidin von 0,1  $\mu$ M bis 20  $\mu$ M gewählt. Im zweiten Schritt wurden Versuche ohne Anästhetikum nur mit L-NAME in einem Bereich von 1  $\mu$ M bis 10 mM durchgeführt. Die darauf aufbauenden Versuche waren eine Kombination einer festen Konzentration von Thiopental, 30  $\mu$ M bzw. 40  $\mu$ M, mit einer Verdünnungsreihe von L-NAME, um die Konzentration von L-NAME mit der maximalen Wirkungsstärke zu finden. Als nächster Schritt wurden die Anästhetika als Verdünnungsreihe mit L-NAME in einer Konzentration von 0,5 mM und 1 mM kombiniert. Daraufhin wurden wieder Versuche in einer Kombination aus Anästhetika und L-NAME durchgeführt, um bei Erreichen von stabilen Reflexantworten

L-Arginin bzw. D-Arginin in die Bechergläser zu geben. Die Konzentrationen in den Versuchsgläser an L-NAME und Anästhetikum wurden hierbei konstant gehalten, um einen Verdünnungseffekt auszuschließen.

## 2.5. Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Verdünnungsreihen wurde eine Konzentrationswirkungskurve berechnet. Hierfür wurden die Konzentrationen der Testsubstanzen in logarithmischer Einteilung auf der Abszisse, die Anzahl der Tiere mit negativer Reflexantwort relativ in Prozent auf der Ordinate aufgetragen. Nach der Methode von Waud (Waud, 1972) für quantale biologische Daten wurden aus den Konzentrationswirkungskurven die  $EC_{50}$  sowie die Steigungen der Kurven berechnet. Der statistische Vergleich unterschiedlicher Konzentrationswirkungskurven der  $EC_{50}$ -Werte erfolgte mit dem Student-t-Test für unverbundene Stichproben. Signifikanz wurde auf dem 5% Niveau ( $p < 0,05$ ) angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 L-NAME

Zur Überprüfung, ob L-NAME eine eigene anästhetische Potenz besitzt, wurde eine Versuchsreihe nur mit L-NAME durchgeführt. Hier zeigte sich, daß bei Lösungen in einem Bereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 10 mM keine Verhaltensänderung der Kaulquappen im Vergleich zur Kontrollgruppe über eine Beobachtungsdauer von zwei Stunden zu beobachten war. Die Kaulquappen der Kontrollgruppe befanden sich unter ansonsten gleichen Bedingungen in reinem Leitungswasser. Es trat kein Verlust des Richtungsreflexes auf, und auch im Vigilanzverhalten zeigten sich keine Anzeichen, die auf eine etwaige Intoxikation hätten schließen lassen. Erst ab einer Konzentration von 100 mM wirkten die Tiere etwas verlangsamt in ihrer Reaktion auf Stimulation, so daß man von einer beginnenden anästhetischen Wirkung bzw. Intoxikation bei diesen Konzentrationen ausgehen kann. Da bei darauf folgenden Versuchen mit L-NAME Konzentrationen von 1 mM bzw. 0,5 mM verwendet wurden, können anästhetische Effekte sicher ausgeschlossen werden.

##### 3.2.1. Thiopental

Bei den Basisversuchen mit Thiopental allein wurde im Vergleich zu den in der Literatur berichteten Ergebnissen (Downes und Courogen 1996) keine wesentliche Abweichung festgestellt. Die berechnete Konzentrationswirkungskurve (Abb. 3.1) zeigte einen sigmoidalen Verlauf mit einer ansteigenden Zahl von anesthesierten Tieren bei steigender Konzentration von Thiopental. Die  $EC_{50}$ , die aus der Konzentrationswirkungskurve berechnet wurde, lag mit  $25,5 \pm 2,0 \mu\text{M}$  und einer Steigung von  $2,1 \pm 0,3$  im erwarteten Bereich (Tab. 3.1).

### 3.2.2. Thiopental plus L-NAME

Bei den Kombinationsversuchen mit Thiopental und L-NAME wurden zunächst Versuche zur Bestimmung der optimalen Konzentration von L-NAME durchgeführt. Zu einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Thiopental wurde mit L-NAME in steigender Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bis 3 mM kombiniert. Bei Konzentrationen, die über 800  $\mu\text{M}$  L-NAME lagen, zeigte sich keine weitere Potenzsteigerung von Thiopental. Alle weiteren Versuche zur genauen Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$  von Thiopental wurden mit einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  L-NAME durchgeführt. Für die Versuche mit 1000  $\mu\text{M}$  L-NAME zeigte die errechnete Konzentrationswirkungskurve

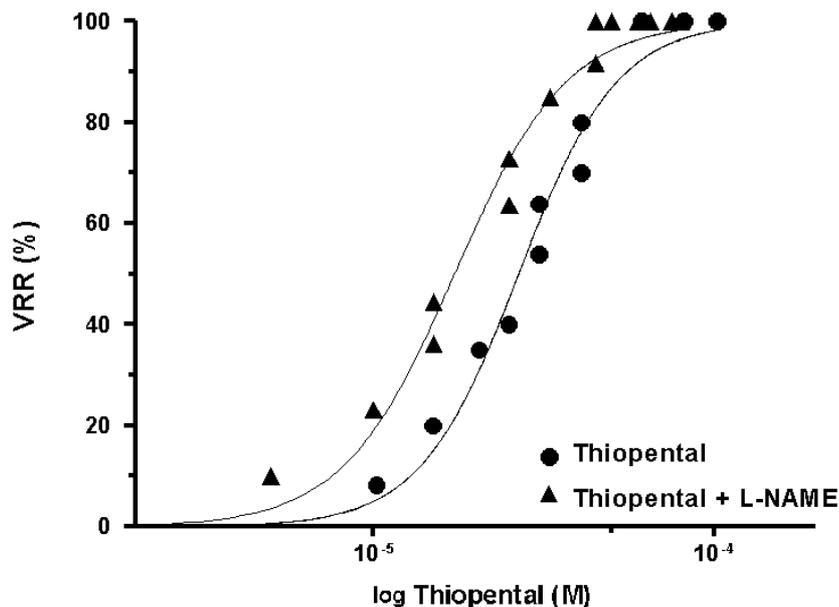


Abb. 3.1 Konzentrationswirkungskurve für Thiopental mit und ohne L-NAME in halblogarithmischer Darstellung für den Verlust des Richtungsreflexes (VRR) bei Kaulquappen. Auf der Abszisse ist in logarithmischer Darstellung die Konzentration von Thiopental aufgetragen. Auf der Ordinate ist der Verlust der VRR in Prozent dargestellt. Die Steigung der Kurve wurde nach der Methode nach Waud (1972) für quantale biologische Daten berechnet.

einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 3.1) und ähnliche Steigung,  $2,3 \pm 0,3$ , wie die Konzentrationswirkungskurve von Thiopental allein. Die  $EC_{50}$  erreichte einen Wert von  $14,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$  (Tab. 3.1), was einer signifikanten Konzentrationsreduktion von 43% entspricht.

### 3.3.1. Dexmedetomidin

Bei den Basisversuchen mit Dexmedetomidin zeigte sich bei logarithmischer Darstellung ein sigmoidaler Kurvenverlauf (Abb. 3.2) mit einer  $EC_{50}$ , errechnet aus der Kurve, von  $7,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$  und einer Steigung der Kurve von  $0,94 \pm 0,1$  (Tab. 3.1). 30 min nach Versuchsbeginn waren die Ergebnisse bei den jeweiligen Versuchen stabil.

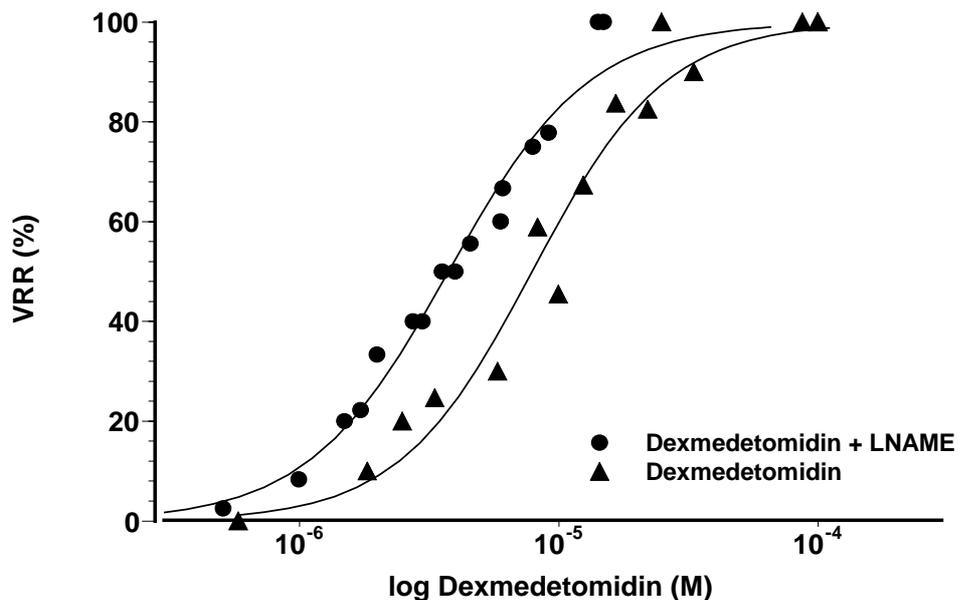


Abb. 3.2 Konzentrationswirkungskurve für Dexmedetomidin mit und ohne L-NAME in halblogarithmischer Darstellung für den Verlust des Richtungsreflexes (VRR) bei Kaulquappen. Auf der Abszisse ist in logarithmischer Darstellung die Konzentration von Dexmedetomidin aufgetragen. Auf der Ordinate ist der VRR in Prozent dargestellt. Die Steigung der Kurve wurde nach der Methode nach Waud (1972) für quantale biologische Daten berechnet.

### 3.3.2. Dexmedetomidin plus L-NAME

Auch bei den Kombinationsversuchen von Dexmedetomidin und L-NAME zeigte sich, daß der Kurvenverlauf dem der Basisversuche ähnelte. Die Steigung der Konzentrationswirkungskurve (Abb. 3.2) betrug  $1,1 \pm 0,2$ . Auch hier zeigte sich eine ähnliche  $EC_{50}$  Verschiebung wie schon bei den Kombinationsversuchen mit L-NAME und Thiopental. Die  $EC_{50}$  für Dexmedetomidin in Verbindung mit L-NAME betrug  $3,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$  (Tab. 3.1), was einer signifikanten Konzentrationsreduktion von 51% entspricht.

### 3.4.1. Thiopental plus L-NAME plus L-Arginin

Bei diesen Versuchen befanden sich die Kaulquappen in einer Lösung aus Thiopental und L-NAME und L-Arginin. Die berechnete Konzentrationswirkungskurve zeigte einen sigmoidalen Verlauf mit einer ansteigenden Zahl von anästhesierten Tieren bei steigender Konzentration von Thio-pental. Die  $EC_{50}$ , die aus der Konzentrationswirkungskurve mit einer Steigung von  $2,1 \pm 0,3$ , berechnet wurde, lag bei  $21,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$  (Tab. 3.1).

### 3.4.2. Thiopental plus L-NAME plus D-Arginin

Diese Versuche waren im Ablauf identisch mit den Versuchen mit L-Arginin, nur wurde hier D-Arginin, das Stereoisomer von L-Arginin, in gleicher Dosis wie bei den L-Arginin-Versuchen zugesetzt. Bei diesen Versuchen konnte eine  $EC_{50}$  von  $14,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$  mit ähnlichem Kurvenverlauf und Steigung wie bei den Vorversuchen beobachtet werden (Tab. 3.1).

Substanzkombinationen	EC <sub>50</sub> in µM	Steigung
Thiopental	25,5 ± 2,0	2,1 ± 0,3
Thiopental + L-NAME	14,6 ± 0,5 *	2,3 ± 0,3
Thiopental + L-NAME + L-Arginin	21,7 ± 4,3	2,1 ± 0,3
Thiopental + L-NAME + D-Arginin	14,6 ± 0,5 *	2,3 ± 0,3
Dexmedetomidin	7,8 ± 0,6	0,9 ± 0,1
Dexmedetomidin + L-NAME	3,8 ± 0,2 *	1,1 ± 0,2

Tab. 3.1 Ergebnisse der verschiedenen Versuche mit errechneten Werten für EC<sub>50</sub> und Steigung mit der mittleren Abweichung anhand der Konzentrationswirkungskurven nach der Methode nach Waud (1972). \* Die errechnete EC<sub>50</sub> der Anästhetika der Kombinationsversuche ist signifikant gegenüber der Monosubstanzversuchen vermindert.

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß die Inhibition der NO-Synthase mit L-NAME eine signifikante Verminderung der  $EC_{50}$  von Thiopental und Dexmedetomidin bewirkt. Dieser Effekt ist reversibel, so daß sich bei Überangebot des Substrates der NO-Synthase L-Arginin der Einsparungseffekt aufheben läßt. Mit D-Arginin läßt sich der Einsparungseffekt hingegen nicht aufheben. L-NAME allein besitzt keine anästhetische Potenz.

Die anästhetischen Effekte waren nach Zurücksetzen der Tiere in reines Wasser alle voll reversibel, so daß die Kaulquappen innerhalb einer Stunde in ihren Ausgangszustand zurückkehrten.

### 4.1. Bestimmung der anästhetischen Potenz an Kaulquappen

Bei Versuchen zur Bestimmung von anästhetischen Effekten ist es unerlässlich, die Anzahl der Störfaktoren möglichst gering zu halten. Dieses ist bei Versuchen am Menschen sehr schwierig, weil hier, allein schon durch die Komplexität des Organismus, Einflüsse wie Plasmaeiweißbindung, Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Elimination der Substanz von Bedeutung sind. Aber auch andere Medikamente, die bei der Anästhesie des Menschen notwendig sind, sind nicht zu kalkulierende Einflüsse. Daraus ergibt sich, daß der Mensch, als ein sehr komplexes Wesen, schwerlich geeignet ist, Wirkmechanismen einzelner Substanzen zu erforschen.

Ziel der Forschung in der Anästhesie ist es, für die erforderliche Art von Versuchen eine Lebensform zu finden, die zwar einfach ist, aber eine Mindestkomplexität des Organismus besitzt, damit sich die Versuchsergebnisse aufgrund von ähnlichen Stoffwechselverhältnissen auf den Menschen übertragen lassen. In diesem Sinne hat Overton um die Jahrhundertwende

schon gezeigt, daß Kaulquappen hierfür sehr gut geeignet sind (Overton 1901). Es wurden unter standardisierten Bedingungen gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt (Johnson und Flagler 1950). Hierzu trägt bei, daß Kaulquappen im Wasser gehalten werden, was den Vorteil der einheitlichen Applikation bietet, da die jeweiligen Substanzen, im Wasser gelöst, über Diffusion in die Tiere gelangen (Janoff et al. 1981).

Die Diffusionsgeschwindigkeit (T) wird nach dem Fickschen Gesetz beschrieben (Gleichung 4.1) als Produkt aus Diffusionskonstanten (D), Diffusionsfläche (F) und Konzentrationsänderung pro Streckenintervall ( $dc / dx$ ) (v. Sengenbusch 1979)

$$T = DF (dc / dx)$$

Gleichung 4.1. Ficksches Diffusionsgesetz: T = Diffusionszeit, D = Diffusionskonstante, F = Fläche, dc = Konzentrationsänderung, dx = Wegänderung

Die Diffusionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Diffusionskonstanten, diese wiederum vom Molekulargewicht. Kleine Verbindungen wandern schneller als große. Zum anderen wird die Diffusionsgeschwindigkeit bestimmt von dem Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Eine große Diffusionsfläche und eine kurze Diffusionsstrecke beschleunigen den Stoffaustausch. Diese beiden Bedingungen werden eher von kleinen Körpern erfüllt als von großen, da kleine Lebewesen im Verhältnis zu ihrer Oberfläche ein kleines Volumen und einen kleinen Körperradius besitzen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kaulquappen hatten eine Gesamtkörperlänge von 10 bis 13 mm und einen Körperradius von 2,5 bis 3 mm. Die Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser bei 20 °C für kleine wasserlösliche Substanzen, wie z.B. für Fluoreszein (mit einem Molekulargewicht von 332) beträgt 0,08 mm/s (Fels 1973). Daraus ergibt sich eine Diffusionszeit von 37 Sekunden für 3 mm Diffusionsstrecke. Da das Molekulargewicht der

von uns eingesetzten Substanzen zwischen 200 und 263 lag, konnte man eine noch größere Diffusionsgeschwindigkeit erwarten.

Die Tatsache, daß konstante Ergebnisse erst zum Teil nach 1 Stunde erreicht werden, hat verschiedene Ursachen: Die Diffusionszeit im Gewebe wird im Wesentlichen von der Fähigkeit einer Substanz, durch biologische Membranen zu wandern, bestimmt; nur lipophile Substanzen und Gase können rein passiv in Zellen diffundieren. Der Übertritt durch die Membranen verlangsamt die Diffusionsgeschwindigkeit. Sie ist in Zellen durch den hohen Eiweißgehalt des Zytoplasmas geringer als in Wasser (Schmidt 1992).

Das Volumen der Testlösung ist im Vergleich zum Volumen der Tiere um ein so Vielfaches größer, daß selbst nach Diffusion der in der Testlösung befindlichen Substanzen in die Kaulquappen ein meßbarer Konzentrationsabfall in den Testlösungen nicht stattfindet. Dieses bedeutet, daß die in den Testlösungen vorhandene Konzentration nach entsprechender Diffusionszeit den Gewebskonzentrationen der Tiere entsprechen.

Der Sauerstoffbedarf der Kaulquappen während der Versuche wird durch den Sauerstoffgehalt der Lösungen ausreichend gedeckt, so daß keine zusätzliche Vorrichtung zur Sauerstoffanreicherung des Wassers notwendig ist. Dieses zeigten Beobachtungen von Dodson und Miller (1985) mit relaxierten Kaulquappen, die mindestens 120 Minuten lang ohne zusätzliche Sauerstoffanreicherung des Wassers beobachtet wurden und keine Einschränkung der Vitalfunktionen erkennen ließen. Da es unter stabilen Bedingungen über einen Beobachtungszeitraum von 60 Minuten zu keinen Reaktionsänderungen der Kaulquappen kam, können Stoffwechselprozesse der Tiere ebenfalls vernachlässigt werden (Dodson und Miller 1985).

Lipnick zeigte 1989, daß sich Overtons Ergebnisse für die anästhetische Wirkung von Alkoholen an Kaulquappen gut auf Säugetiere übertragen lassen (Lipnick 1989), da die Konzentrationsbereiche zur Auslöschung des

Richtungsreflexes bei der Kaulquappe in etwa in dem Bereich der Plasmakonzentrationen lagen, die für den gleichen Effekt beim Säugetier notwendig sind. Das gleiche konnte auch für intravenöse Anästhetika gezeigt werden (Halsey et al. 1986). Da Amphibien und Säugetiere sehr ähnlich auf die unterschiedlichsten Anästhetika reagieren, scheinen bei beiden Arten ähnliche Wirkmechanismen im ZNS stattzufinden. Dieses ist anscheinend insbesondere bei der Ausstattung des ZNS mit Messenger und second-Messenger-Systemen der Fall.

Kaulquappenversuche sind in der Anästhesie ein standardisiertes Verfahren zur Bestimmung der Potenz einzelner Substanzen (Overton 1901, Johnson und Flagler 1950, Halsey et al. 1986, Downes und Courogen 1996). Da schon sehr viele Daten über die Reaktionseigenschaften von Kaulquappen vorliegen, bietet sich dieses Modell an, um ganz neue Substanzen zu untersuchen und die Wirksamkeit dieser Substanzen mit der bereits bekannter Substanzen zu vergleichen.

Einschränkungen für Versuchsmöglichkeiten am Kaulquappenmodell gelten für Substanzen, die über einen spezifischen Wirkmechanismus wirken. Insbesondere für Opioide (Dodson und Miller 1985) ist bei den Amphibien eine um den Faktor 10000 höhere Konzentration für das Unterdrücken eines Schmerzreizes gegenüber dem Säuger nötig. Hier muß man artspezifische Unterschiede in der Rezeptorstruktur annehmen.

Für den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor (Tonner et al. 1995) differieren die Konzentrationen zwischen Amphibium und Säuger nur um den Faktor 100. Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor läßt sich beim Säuger in die Untertypen  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -,  $\alpha_{2C}$ - und  $\alpha_{2D}$ -Adrenozeptor unterteilen. Bei Fröschen konnte gezeigt werden, daß sie über nur eine Art des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors verfügen, der dem  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor pharmakologisch entspricht (Herman et al. 1996). So scheint es, als hätte die evolutionsbiologische Weiterentwicklung des  $\alpha_2$ -Adrenozeptors in seine Untertypen erst bei höheren Spezies stattgefunden.

Dies wäre eine Möglichkeit, die bessere Korrelation ohne völlige Übereinstimmung bei evolutionsbiologisch höheren Arten mit Säugetieren zu erklären.

Eine Kaulquappe wird als anästhesiert gewertet, wenn sie sich nicht nach vorsichtigem Wenden mit einer präparierten Glaspipette innerhalb von fünf Sekunden wieder in die Ausgangslage gedreht hat. Der Verlust des Richtungsreflex ist erstmals um die Jahrhundertwende als ein Zeichen für Anästhesie definiert worden (Overton 1901). Mit dieser Art der Prüfung ist man in der Lage, zwischen Anästhesie und Analgesie zu unterscheiden, da kein schmerzhafter Reiz auf die Tiere ausgeübt wird. (Downes und Courogen 1996). Da das vorsichtige Wenden der Tiere keinen Schmerzreiz bei den Kaulquappen auslöst, beeinflusst reine Analgesie das Reflexverhalten nicht. (Dodson und Miller 1985). Diese Differenzierung ist bei Substanzen mit einer Mischwirkung aus Anästhesie und Analgesie zur Beurteilung der rein anästhetischen Komponente von Bedeutung, wie es bei  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten, wie Clonidin (Paalzow und Paalzow 1982) und dem Dexmedetomidin der Fall ist (Virtanen 1989).

Der NO-Metabolismus ist im Gegensatz zu den hochkomplizierten Rezeptorsystemen eher einfacher Natur. Dieses ist der Grund, weshalb man diesem System einen frühen evolutionsbiologischen Ursprung zuspricht. Diese Auffassung wurde durch den gezielten Nachweis der NO-Synthase in Lebensformen bestätigt, welche insgesamt einen alten evolutionsbiologischen Aufbau besitzen (Moncada 1991). Hierzu zählen insbesondere einige Arthropodenarten, zum Beispiel die nordamerikanische Königskrabbe (Radomski et al. 1991). Dieses second-messenger-System blieb im weiteren Verlauf der Evolution ein fester Bestandteil der Signaltransduktion. So findet sich die NO-Synthase bei Amphibien, so zum Beispiel *Xenopus laevis* (Crowe et al. 1995, Allaerts et al. 1998), aber auch bei Säugetieren (Bredt und Snyder 1992).

#### 4.2. Die Rolle von NO zur Signalübermittlung im ZNS

NO liegt unter physiologischen Bedingungen als Gas vor. Es ist ein sehr kleines Molekül mit lipophilen und hydrophilen Eigenschaften. Es kann daher sehr schnell durch biologische Membranen diffundieren und so leicht den intrazellulären Raum erreichen, ohne auf einen spezifischen Transporter angewiesen zu sein (Ignarro 1990). NO hat eine sehr kurze biologische Halbwertszeit von unter 5 Sekunden, so daß NO nur in unmittelbarer Umgebung des Syntheseortes wirksam ist (Ignarro 1990). Unter physiologischen Bedingungen im Bereich von pH 7 ist NO nicht sehr reaktiv, aber es besitzt paramagnetische Eigenschaften, was seine große Affinität zu Eisen in Hämgruppen erklärt (Ignarro et al. 1982). Es reagiert mit den unterschiedlichen Hämgruppen zu Nitrosyl-Häm, welches sehr viel stabiler als freies NO ist. Das für NO wichtigste Hämoprotein ist die cytoplasmatische Guanylylcyclase (Ignarro 1990), wobei die nitrosylierte Form der Guanylylcyclase den aktivierten Zustand dieses Enzyms darstellt. In der aktivierten Form produziert die Guanylylcyclase unter stöchiometrischem Verbrauch von Guanosintriphosphat (GTP) cGMP, welches den Aktivitätsgrad von Ionenkanälen (Milbourne und Bygrave 1995) und Proteinkinasen (Thomas et al. 1990) verändert, und somit als intrazellulärer Botenstoff identifiziert werden konnte (Thomas et al. 1990, Brann 1997).

Die Herstellung von NO im Organismus wird durch die NO-Synthase katalysiert. Die NO-Synthase kommt in mindestens drei verschiedenen Isoformen vor. In neuronalen Zellen (Bredt und Snyder 1992) ebenso wie in vaskulären Endothelzellen befindet sich jeweils eine durch Ca-Calmodulin stimulierbare NO-Synthase, auch als konstitutive Form bezeichnete NO-Synthase. Die neuronale und die endotheliale Form sind sich funktionell ähnlich, weisen aber dennoch einige Unterschiede in ihrer Feinstruktur auf. Bei den Isoformen der Neuronen und der Endothelzellen führt eine

Konzentrationserhöhung von Ca zu einer Komplexbildung mit dem Calmodulin der NO-Synthase zum Ca-Calmodulin-Komplex, welcher durch Strukturänderung eine Aktivierung der NO-Synthase bewirkt (Ignarro 1990). Nach Exposition gegenüber Zytokinen oder bakteriellen Lipopolysacchariden exprimieren Makrophagen, mesangiale und glatte Muskelzellen, aber auch Endothelzellen eine Ca-unabhängige, durch mRNA induzierbare NO-Synthase (Moncada 1992).

Alle NO-Synthasen verwenden L-Arginin als Substrat und NADPH als Co-Enzym, um die Produkte NO und L-Citrullin zu erzeugen. Schließlich wurde gezeigt, daß die Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat einen Ca-Einstrom in die Zelle bewirkt. Dieses führt über eine Aktivierung der konstitutiven Form der NO-Synthase zur lokalen Konzentrationserhöhung von NO, welche wiederum die Synthese von cGMP bewirkt (Bredt und Snyder 1989). Es läßt sich also eine Signalkette vom Glutamat, welches einen wichtigen Neurotransmitter darstellt, bis zum cGMP über die Bildung von NO durch die NO-Synthase herstellen. Also ist NO als second-messenger ein fester Bestandteil in der rezeptorvermittelten Reizverarbeitung im ZNS.

Der direkte Nachweis von NO ist aufgrund seiner Eigenschaften als sehr kurzlebige flüchtige Substanz zum einen und dem Umstand, daß NO nur lokal in geringer Konzentration vorkommt, sehr aufwendig und in vivo kaum praktikabel (Lowenstein et al. 1994). Man verwendet in den meisten in-vivo- und in-vitro-Studien indirekte Meßmethoden. So wird die Blockade der NO-Synthase durch spezifisch wirkende Substanzen häufig angewandt. Es finden unter anderem L-Arginin-Analoga, welche das Substrat kompetitiv verdrängen, Verwendung. Hierzu zählen zum Beispiel Nitro-L-Arginin (N-Arg), Nitro-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) und L-NAME (Pajewski et al. 1996, Adachi et al. 95). Unter diesen Analoga ist L-NAME die am häufigsten eingesetzte Substanz, für welche daher in der Literatur

eine große Menge an Daten vorliegt (Cameron und Hinson 1993, Johns 1993). Der Effekt von L-NAME auf die NO-Synthase ist reversibel und läßt sich durch die Anwesenheit des Substrates der NO-Synthase L-Arginin im Überfluß wieder aufheben.

#### 4.2.1. Lokalisation der NO-Synthase im ZNS

Bei Messungen der NO-Aktivität in den verschiedenen Teilen des Zentralen Nervensystems findet man die höchste Konzentration im Kleinhirn, gefolgt von Hypothalamus, Mittelhirn, Corpus striatum und Hippocampus, und mit der geringsten Aktivität in der Medulla oblongata (Forstermann et al. 1990, Egberongbe et al. 1994).

Erwähnenswert ist hier, daß Teile des Hypothalamus wesentlich für die Steuerung des Schlaf-Wachzyklus verantwortlich sind (Parkes 1985, Tokunaga et al. 1998). Und so konnte die NOS auch in hoher Konzentration im Hypothalamus nachgewiesen werden (Forstermann et al. 1990). Dieser Teil des Hypothalamus ist in besonderer Weise mit der Steuerung des Schlafes verknüpft. So steuert er unter anderem den Wechsel zwischen REM und NON-REM-Phasen (Parkes 1985).

#### 4.2.2. Wirkung von Anästhetika auf die rezeptorvermittelte Signalübermittlung im ZNS und die Bedeutung von NO

Ein entscheidender Wesenszug von Anästhetika ist die Beeinflussung der Signalverarbeitung im ZNS. Unter anderem sind Rezeptoren im ZNS ein wichtiger Bestandteil im Prozeß der Sinnesverarbeitung. Zentral wirkende Anästhetika nehmen auf verschiedene Rezeptoren Einfluß (Johns 1996). Diese Rezeptoren werden nach ihrer Funktion in aktivierende und hemmende Rezeptoren eingeteilt.

Zu den aktivierenden Rezeptoren, die in der Anästhesiologie eine Rolle spielen, gehören der NMDA-Rezeptor und der Acetylcholin-Rezeptor vom muskarinen Typ (Durieux 1995, Fibiger et al. 1991). Die Aktivierung der Rezeptoren führt über den oben beschriebenen Weg zur NO-vermittelten cGMP-Produktion in der Zelle. (Johns 1996). Volatile Anästhetika wie beispielsweise Halothan wirken hemmend auf den m1-muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor (Durieux 1995). Und so scheint der m1-muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor in die NO-cGMP-Signalkette mit eingebunden zu sein (Wotta et al. 1998), da seine Stimulation zur Veränderung der Ca-Homöostase und damit zu einer Veränderung der Syntheseleistung der NO-Synthase führt. Für den NMDA-Rezeptor ist eine enge Verknüpfung mit der NO-cGMP-Signalkette bereits gezeigt worden (Garthwaite et al. 1989). So konnte für Halothan und Isofluran gezeigt werden, daß sie zu einer verminderten Konzentration von cGMP im Kleinhirn führen (Zuo et al. 1996), wobei Halothan in der Kaskade vom NMDA bis zum cGMP stromabwärts des NMDA-Rezeptors zu wirken scheint, da keine Aktivitätsänderung des NMDA-Rezeptors, wie es beim Isofluran der Fall ist, erkennbar ist (Rengasamy et al. 1997).

In diesem Zusammenhang konnte für Halothan (Johns et al. 1992) und später auch für Isofluran (Pajewski et al. 1996) durch Gabe von L-NAME eine Reduktion der Syntheserate von NO erreicht werden, was sich in vivo in einer Reduktion der MAK um bis zu 51,0% bzw. 35,5% für Halothan bzw. Isofluran auswirkt. Für volatile Anästhetika läßt sich also eine Signalkette über den m1-muskarinergen Rezeptor oder den NMDA-Rezeptor bis zum cGMP herstellen. Auf diesem Weg haben volatile Anästhetika hemmenden Einfluß, so daß sich anscheinend durch zusätzliche Inhibition der Signalkette an einer zweiten Stelle, nämlich der NO-Synthase, eine Steigerung der anästhetischen Potenz volatiler Anästhetika ergibt.

Für das intravenöse Anästhetikum Thiopental wurde in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Reduktion der  $EC_{50}$  durch die Inhibition der NO-Synthase nachgewiesen. Thiopental beeinflusst wie auch Halothan den NMDA-cGMP-Weg. Nach Stimulation des NMDA-Rezeptors mit einem Agonisten kommt es physiologischer Weise zum Anstieg der cGMP-Konzentration. Dieser Effekt bleibt bei Anwesenheit von Thiopental aus (Terasako et al. 1994). Ein Baustein in der Signalkette vom NMDA-Rezeptor zur Guanylylcyclase ist der second-messenger NO. Eine Beeinflussung der NO-Synthase über einen kompetitiven Antagonisten, in dieser Arbeit das L-NAME, führt zu einer Verminderung der NO-Konzentration. Diese zusätzliche hemmende Wirkung auf den NO-cGMP-Weg scheint für die Reduktion der  $EC_{50}$  verantwortlich zu sein.

Zu den hemmenden Rezeptoren zählen der GABA-Rezeptor (Ho und Harris 1981, Nakahiro et al. 1989, Jones et al. 1992) und der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor (Maze und Tranquilli 1991). Für den GABA-Rezeptor ist bekannt, daß er in den gleichen Arealen des ZNS häufig vorkommt, in denen eine hohe Konzentration der NO-Synthase gefunden wurde (Valtschanoff et al. 1992, Valtschanoff et al. 1995). So ist die Ausschüttung von GABA (Guevara-Guzman et al. 1994) und die Funktion des Rezeptors NO-cGMP-moduliert (Bradshaw und Simmons. 1995).

Halothan wie auch die Barbiturate wirken auf den GABA-Rezeptor stimulierend, also hemmend auf die jeweiligen nachgeschalteten Neurone. NO wirkt über cGMP deaktivierend auf den GABA-Rezeptor, also wirken eine Reduzierung von NO und damit cGMP GABA-synergistisch. Daher ließe sich über diesen Weg ebenfalls ein Synergismus zwischen Anästhetika und NO-Synthase-Analoga wie L-NAME herstellen.

Auch für den  $\alpha_2$ -Adrenozeptor ist eine Verbindung mit dem NO-cGMP-System hergestellt worden (Vulliemoz et al. 1996). Die Stimulation des

präsynaptisch gelegenen  $\alpha_2$ -Adrenozeptors mit Dexmedetomidin oder Clonidin führt zu einer Reduktion von cGMP im Kleinhirn. Diese Reduktion der cGMP-Konzentration ist NO-vermittelt (Wood et al. 1990). Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor findet sich ubiquitär im ZNS, so auch im Locus coeruleus. Es ist bekannt, daß die Aktivierung des  $\alpha_2$ -Adrenozeptor mit einem Agonisten direkt im Locus coeruleus (De Sarro et al. 1987) zu einem Absinken der Noradrenalin-Konzentration führt (Aghajanian und VanderMaelen 1982) und gleichzeitig den Verlust des Richtungs-Reflexes bewirkt (Correa-Sales et al. 1992). So haben Anästhetika inhibitorische Einflüsse auf die aktivierenden Rezeptoren und aktivieren die inhibitorischen Rezeptoren (Diagramm 4.1).

Die in vivo gewonnenen Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit liefern einen weiteren Beleg für den Zusammenhang zwischen NO-Metabolismus und dem Wirkungsgrad von Anästhetika.

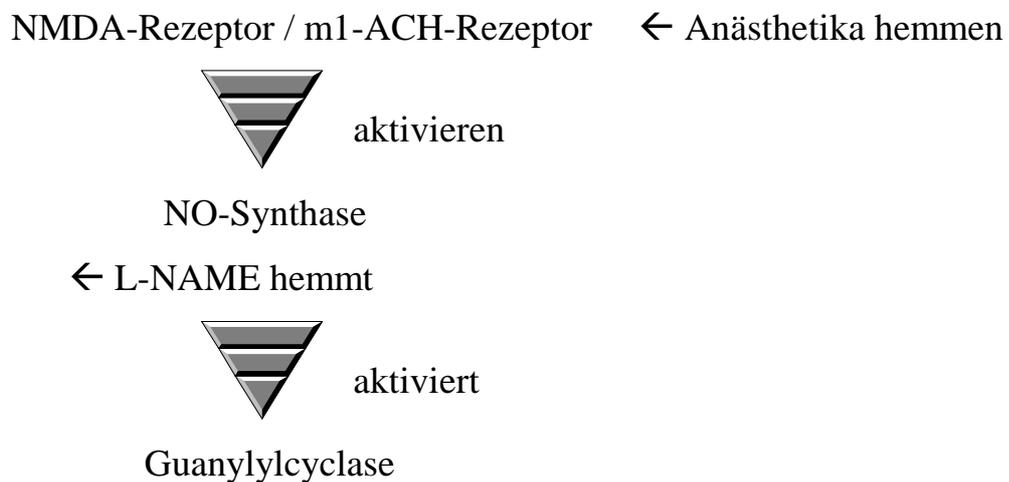


Diagramm 4.1. Einfluß von Anästhetika und L-NAME auf aktivierende Rezeptoren und den NO-cGMP-Weg

Analog führt bei den inhibitorischen Rezeptoren ein Absinken der NO-Aktivität zur Steigerung der inhibitorischen Einflüsse (Diagramm 4.2).

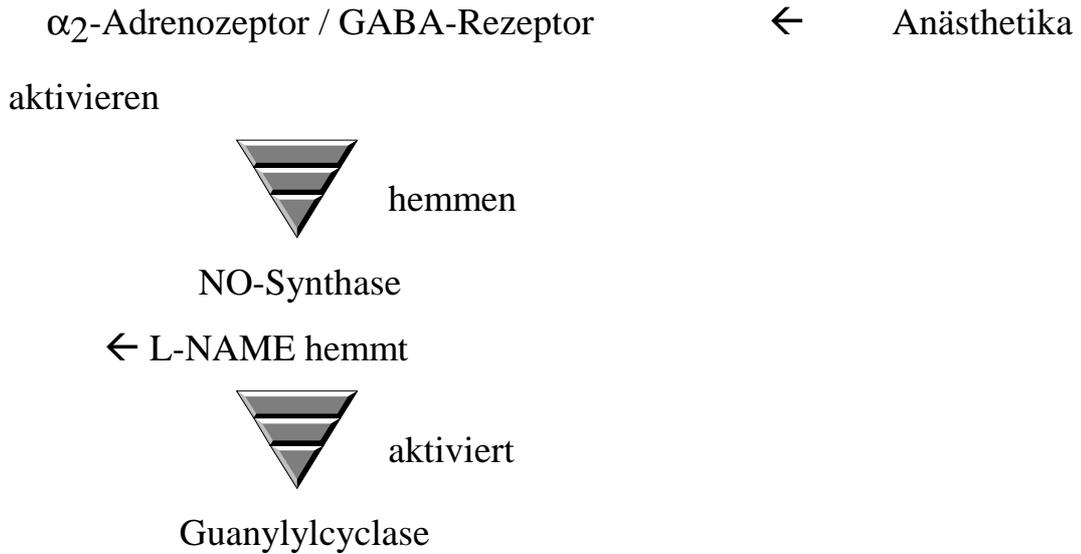


Diagramm 4.2. Einfluß von Anästhetika und L-NAME auf hemmende Rezeptoren und den NO-cGMP-Weg

#### 4.3. Spezifität der L-NAME-Wirkung auf die NO-Synthase

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Reduktion der  $EC_{50}$  um 43% für Thiopental bei Gabe von L-NAME und eine Reduktion der  $EC_{50}$  um 51% für Dexmedetomidin mit L-NAME. Da L-NAME selbst keine anästhetische Potenz besitzt, wie Versuche mit L-NAME allein belegen, ist ein additiver Effekt zweier Substanzen mit anästhetischer Potenz auszuschließen. Die Tatsache, daß sich die Reduktion der  $EC_{50}$  mit dem Substrat L-Arginin der NO-Synthase, wenn es in ausreichender Menge zugesetzt wird, wieder aufheben läßt, zeigt, daß der Reduktionseffekt von L-NAME nur über die NO-Synthase erreicht wird. Dieses wird deutlich, da bei Kontrollversuchen mit D-Arginin, dem Stereoisomer von L-Arginin, keine Änderung der  $EC_{50}$  erreicht wird. Für die NO-Synthase gilt, daß diese nur das L-Arginin binden und zu NO und Citrullin umbauen kann, D-Arginin hingegen nicht.

Diese Beobachtungen stimmen auch mit den von Johns et al. 1992 durchgeführten Versuchen an Ratten überein. Hierbei fand sich eine

maximale Reduktion der MAK um 51% für Halothan mit L-NAME in einer L-NAME-Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht. Auch hier konnte mit einer kompetitiven Verdrängung von L-NAME an der NO-Synthase mit L-Arginin eine Aufhebung der MAK-Reduktion beobachtet werden, welche sich bei Verwendung von D-Arginin nicht zeigte.

Auch für Isofluran und L-NAME konnte eine Reduktion der MAK-Werte um bis zu 35,5% und um bis zu 43,0% für Isofluran und 7-Nitro-Indazol, einen weiteren kompetitiven Antagonisten von L-Arginin, von Pajewski et al. 1995 an Ratten demonstriert werden. Auch hier ließ sich dieser Effekt mit L-Arginin aufheben und mit D-Arginin nicht. Bei beiden Versuchsserien führte die Anwesenheit des Substrates im Überschuß zur Verdrängung des kompetitiven Antagonisten L-NAME bzw. 7-Nitro-Indazol und damit zur Aufhebung der MAK-Reduktion.

#### 4.4. Bewertung anderer Arbeiten zur Rolle von NO in der Anästhesie

Um die Bedeutung des NO-Systems für die Anästhesie weiter zu klären, wurden bei Eizellen von Mäusen, bei denen man das NO-Synthase-Gen lokalisiert hatte, das Gen für die neuronale NO-Synthase zerstört, was zu einem Fehlen der NO-Synthase im erwachsenen Tier führte. An diesen in der Literatur als „Knockout-Mäuse“ (Ichinose et al. 1995) bezeichneten Tieren, wurden im Vergleich zu „Wildtyp-Mäusen“ Versuche mit dem volatilen Anästhetikum Halothan durchgeführt. Es wurden zunächst die MAK-Werte allein bestimmt, und anschließend Versuche mit Halothan und L-NAME durchgeführt. Bei den Versuchen nur mit Halothan fanden sich keine signifikanten Unterschiede der MAK-Werte. Bei den Versuchen mit Halothan und L-NAME trat beim Wildtyp die bis dahin bekannte Reduktion der MAK (Johns et al. 1992) von bis zu 40% ein, während es bei den Knockout-Mäusen zu keiner signifikanten Veränderung kam. Der Reduktions-Effekt bei den Wildtyp-Mäusen ließ sich wie bisher bei allen

Versuchen mit L-NAME durch die Gabe von L-Arginin wieder aufheben, aber nicht mit D-Arginin.

Da die Knockout-Mäuse im wachen Zustand keinen Unterschied zu der Vergleichsgruppe vom Wildtyp zeigten, folgerten Ichinose und seine Mitarbeiter (1995), daß die Knockout-Mäuse einen Weg gefunden hatten, das ausgefallene NO-System zu kompensieren.

Nach bisherigem Kenntnisstand scheinen Anästhetika, sowohl volatile als auch intravenöse, ihre Wirkung über den NO-cGMP-Weg zu entfalten, aber wie an den Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte, scheint es noch mindestens einen anderen maßgeblichen Weg für die Wirkung von Anästhetika zu geben.

In einer Arbeit von Adachi und seinen Mitarbeitern (1995) wurden im Hinblick auf die vorliegende Arbeit kontroverse Ergebnisse erzielt. Es wurden NO-Synthase-kompetenten Ratten über einen Zeitraum von 5 Tagen Injektionen mit dem NO-Synthase-Antagonisten L-NAME intraperitoneal appliziert. Bei anschließenden Versuchen mit Halothan konnte kein Unterschied der MAK im Vergleich zur mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde ebenfalls der Grad der NO-Synthase-Aktivität im Kleinhirn bestimmt. Hierbei stellten Adachi und Mitarbeiter (1995) fest, daß eine Reduktion der NO-Synthase um mehr als 50% nicht überschritten werden konnte. Auch zeigte sich, daß es zu einer deutlichen Abnahme der cGMP-Aktivität im Kleinhirn kam.

Dies legt den Verdacht nahe, daß das NO-System eher ein kurzfristig modulierendes System darstellt, das langfristig durch andere Messenger-Systeme übernommen werden kann. Einen Hinweis dafür bietet auch der Umstand des Gewöhnungseffektes bei der Gabe von Nitraten im Rahmen der Behandlung der angina pectoris. Die Nitrate wirken vasodilatierend über eine Freisetzung von NO an den Endothelzellen der Herzkranzgefäße.

Dieser Effekt läßt aber bei ununterbrochener Gabe von Nitrat-Präparaten bereits nach wenigen Tagen nach. Da nun die Endothel-NO-Synthase und die Neuronen-NO-Synthase strukturell sehr ähnlich sind, ist eine Verbindung dieser beiden Phänomene wahrscheinlich, und könnte die auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse erklären, daß nämlich das NO-cGMP-System nur ein System zur Signalübermittlung für kurzfristige innerhalb von Stunden auftretenden Veränderung im Stoffwechsel moduliert.

Ebenfalls unklar ist die Tatsache, daß L-NAME allein keine nachweisbare anästhetische Potenz besitzt, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen. Dieses unterstreicht die Bedeutung des NO-cGMP-Systems als kurzfristig modulierendes System. So ist eine reine Blockade dieses Systems durch Analoga der NO-Synthase oder sogar durch gentechnische Ausschaltung der Enzymaktivität der NO-Synthase alleine nicht in der Lage, den Wachheitszustand eines Tieres zu verändern. Erst bei zusätzlicher Gabe eines Anästhetikums wird die Bedeutung der NO-Synthase für die Vigilanz eines Tieres deutlich.

## 5. Zusammenfassung

Die molekularen Wirkmechanismen von Anästhetika sind bis heute nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, daß die Inhibition der NO-Synthase und damit die Reduktion der NO-Konzentration bei volatilen Anästhetika zu einer Verringerung der MAK von bis zu 40% führt.

Thema dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen der NO-Inhibition auf die Wirkungsweise von iv-Anästhetika zu untersuchen. Dieses wird am Beispiel des Barbiturates Thiopental und des  $\alpha$ 2-Adrenozeptoragonisten Dexmedetomidin untersucht. Für die Inhibition der NO-Synthase wird L-NAME verwendet, ein Analogon von L-Arginin. Die Versuche werden an Kaulquappen durchgeführt, wobei das Erlöschen des Richtungsreflexes dem Zustand der Anästhesie gleichgesetzt wird.

Die Messungen ergaben bei beiden Substanzen in Verbindung mit L-NAME eine deutliche Reduktion der  $EC_{50}$ . für Thiopental eine  $EC_{50}$ -Reduktion um 43%, für Dexmedetomidin eine  $EC_{50}$ -Reduktion um 51%. Dieser Effekt ließ sich durch Überangebot des Substrates L-Arginin der NO-Synthase wieder aufheben.

Der NO-Metabolismus ist eng mit dem intrazellulären second-messenger cGMP verknüpft und spielt im ZNS eine wichtige Rolle als neuronaler Botenstoff. Für die verschiedenen Anästhetika sind Interaktionen mit Rezeptoren und anderen Zellwand-assoziierten Strukturen beschrieben worden. NO steht über verschiedene Mechanismen mit diesen in Kontakt. Eine Beeinflussung dieses messenger-Systems wirkt sich daher erheblich auf den zentralnervösen Aktivitätszustand aus und führt so zu einer Reduktion der  $EC_{50}$  bei verschiedenen Anästhetika.

Daher scheint eine Beeinflussung des NO-Metabolismus in den Stoffwechsel im ZNS eine wichtige Rolle zu spielen. Letztlich bleibt der genaue Wirkmechanismus von Anästhetika weiterhin unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 6. Literaturverzeichnis

Abu-Soud HM, Wang J, Rousseau DL, Fukuto JM, Ignarro LJ, Stuehr DJ (1995) Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J Biol Chem* 270: 22997- 23006

Adachi T, Shinomura T, Nakao SI, Kurata J, Murakawa M, Shichino T, Seo N, Mori K (1995) Chronic treatment with nitric oxide synthase (NOS) inhibitor profoundly reduces cerebellar NOS activity and cyclic guanosine monophosphate but does not modify minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 81: 862 - 865

Aghajanian GK, VanderMaelen CP (1982) Alpha 2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science* 215: 1394 - 1396

Alifimoff JK, Firestone LL, Miller KW (1987) Anesthetic potencies of secondary alcohol enantiomers. *Anesthesiology* 66: 55 - 59

Allaerts W, De Vente J, Markerink-Van Ittersum M, Tuinhof R, Roubos EW (1998): Topographical relationship between neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate accumulation in the brain of adult *Xenopus laevis*. *J Chem Neuroanat* 15: 41 - 56

Bradshaw DJ, Simmons MA (1995) Gamma-aminobutyric acid receptor function is modulated by cyclic GMP. *Brain Res Bull* 37: 67 - 72

Brann DW, Bhat GK, Lamar CA, Mahesh VB (1997) Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 65: 385 - 395

Bredt DS, Snyder SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in cerebellum. *Proc Natl Acad Sci* 86: 9030 - 9033

Bredt DS, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3 - 11

Braugher JM, Mittal CK, Murad F (1979): Effects of thiols, sugars, and proteins on nitric oxide activation of guanylate cyclase. *J Biol Chem* 254: 12450 - 12454

Cameron LA, Hinson JP (1993): The role of nitric oxide derived from L-arginine in the control of steroidogenesis, and perfusion medium flow rate in the isolated perfused rat adrenal gland. *J Endocrin* 139: 415 - 423

Correa-Sales C, Rabin BC, Maze M (1992) A hypnotic response to dexmedetomidine, an alpha-2 agonist, is mediated in the locus coeruleus in rats. *Anesthesiology* 76: 948 - 952

Crowe MJ, Brown TJ, Bresnahan JC, Beattie MS (1995): Distribution of NADPH-diaphorase reactivity in the spinal cord of metamorphosing and adult *Xenopus laevis*. *Brain Res Dev Brain Res* 86: 155 - 166

De Sarro GB, Ascoti C, Froio F, Libri V, Nistico G (1987) Evidence that the locus coeruleus is the site where clonidine and drugs acting at the alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. *Br J Pharmacol* 90: 675 - 685

Dodson BA, Miller KW (1985) Evidence for a dual mechanism in the anesthetic action of an opioid peptide. *Anesthesiology* 62: 615 - 620

Downes H, Courogen PM (1996) Contrasting effects of anesthetics in tadpole bioassays. *Pharmacol Exp Ther* 278: 284 - 296

Durieux ME (1995) Halothane inhibits signaling through m1 muscarinic receptors expressed in xenopus oocytes. *Anesthesiology* 82: 174 - 182

Egberongbe YI, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW (1994) The distribution of ntric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59: 561 - 578

Fels G. (1973) *Der Organismus - Eine Einführung in die biologischen Grundprobleme.* Fels G. ed. Ernst Klett Verlag Stuttgart: 798

Fibiger HC, Damsma G, Day JC (1991) Behavioral pharmacology and biochemistry of central cholinergic neurotransmission. *Adv Exp Med Biol* 295: 399 - 414

Forstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1990): Regional distribution of EDRF/NO synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 727 - 732

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373 - 376

Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (1989): NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172: 413 - 416

Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62: 807 - 810

Halsey MJ, Wardley-Smith B, Wood S (1986) Pressure reversal of alphaxalone / alphadolone and methohexitone in tadpoles: evidence for different molecular sites for general anaesthesia. *Br J Pharmacol* 89: 299 - 305

Herman CA, Luczy G, Wikberg JES, Uhlen S (1996) Characterization of adrenoceptor types and subtypes in American bullfrogs acclimated to warm or cold temperature. *Gen Comp Endocrinol* 104: 168 - 178

Ho IK, Harris RA (1981) Mechanism of action of barbiturates *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 21: 83 - 111

Ichinose F, Huang PL, Zapol WM (1995) Effects of targeted neuronal nitric oxide synthase gene disruption and nitro-L-arginin-methylester on the threshold for isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 83: 101 - 108

Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wollin MS (1982) Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme: Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 718: 49 - 59

Ignarro LJ (1990) Nitric oxide, a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16: 477 - 483

Ignarro LJ (1991) Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* 28: 67 - 73

Janoff AS, Pringle MJ, Miller KW (1981) Correlation of general anesthetic potency with solubility in membranes. *Biochim Biophys Acta* 649: 125 - 128

Johns RA, Moscicki JC, DiFazio CA (1992) Nitric oxide synthase inhibitor dose-dependently and reversibly reduces the threshold for halothane anesthesia. *Anesthesiology* 77: 779 - 784

Johns RA (1993) Endothelium, anesthetics, and vascular control. *Anesthesiology* 79: 1381 - 1391

Johns RA (1996) Nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and the anesthetic state. *Anesthesiology* 85: 457 - 459

Johnson FH, Flagler EA (1950) Hydrostatic pressure reversal of narcosis in tadpole. *Science* 112: 91 - 92

Jones MV, Brooks PA, Harrison NL (1992) Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl-currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *J Physiol (Lond)* 449: 279 - 293

Lipnick RL (1989) A quantitative structure-activity relationship study of Overton's data on the narcosis and toxicity of organic compounds to the tadpole *Rana temporaria*. *Aquatic toxicology and environmental fate: Eleventh Volume ASTM STP 1007*. G. W. Suter II und M. A. Lewis Eds. American Society for Testing and Materials Philadelphia: 468 - 489

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994) Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120: 227 - 237

Maze M, Tranquilli W (1991) Alpha-2 adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology* 74: 581 - 605

Milbourne EA, Bygrave FL (1995) Do nitric oxide and cGMP play a role in calcium cycling ? *Cell Calcium* 18: 207 - 213

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991): Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109 - 142

Moncada S (1992) The 1991 Ulf von Euler Lecture: The L-Arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145: 201 - 227

Moncada S, Higgs A (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 329: 2002 - 2012

Muldoon SM, Hart JL, Bowen KA, Freas W (1988) Attenuation of endothelium-mediated vasodilation by halothane. *Anesthesiology* 68: 31 - 37

Nakahiro M, Yeh JZ, Brunner E, Narahashi T (1989) General anesthetics modulate GABA receptor channel complex in rat dorsal root ganglion neurons *FASEB J* 3: 1850 - 1854

Nathan C, Xie Q (1994): Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell* 78: 915 - 918

Overton, E. (1901) Studien über die Narkose. Zugleich ein Beitrag zur Allgemeinen Pharmakologie, Gustav Fischer. Jena, Deutschland

Paalzow GHM, Paalzow LK (1982) Separate noradrenergic receptors could mediate clonidine induced antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 233: 795 - 800

Pajewski TN, DiFazio CA, Moscicki JC, Johns RA (1996) Nitric oxide synthase inhibitors, 7-nitro indazole and nitro-L-arginin methyl ester, dose dependently reduce the threshold for isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 85: 1111 - 1119

Parkes JD (1985) Sleep and its disorders. Saunders. London Philadelphia

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987) Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92: 181 - 187

Rengasamy A, Pajewski TN, Johns RA (1997): Inhalational anesthetic effects on rat cerebellar nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production. *Anesthesiology* 86: 689 - 698

Richter JA, Holtman JR (1982) Barbiturates: their in vivo effects and potential biochemical mechanisms. *Prog Neurobiol* 18: 275 - 319

Schmidt RF (1992) Rezeptoren In: *Physiologie - Weinheim; Basel; Cambridge; New York VCH*

Segal IS, Vickery RG, Maze M (1989) Dexmedetomidin decreases halothane anesthetic requirements in rats. *Acta Vet Scand Suppl* 85: 55 - 59

v. Sengenbusch P (1979) *Molekular- und Zellbiologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag*

Snyder SH (1992) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters ? *Science* 257: 494 - 496

Tokunaga Y, Imai S, Matsumura H, Maeda T (1998): Nitric oxide as a regulatory factor in sleep-wakefulness mechanisms. *Nippon Rinsho* 56: 308 - 311

Terasako K, Nakamura K, Miyawaki I, Toda H, Kakuyama M, Mori K (1994) Inhibitory effects of anesthetics on cyclic guanosine monophosphate (cGMP) accumulation in rat cerebellar slices. *Anesth Analg* 79: 921 - 926

Thomas MK, Francis SH, Corbin JD (1990) Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem* 265: 14971 - 14978

Tonner PH, Poppers DM, Miller KW (1992) The general anesthetic potency of propofol and its dependence on hydrostatic pressure. *Anesthesiology* 77: 926 - 931

Tonner PH, Scholz J, Koch C, Schulte am Esch J (1995) Clonidin steigert die anästhetische Wirksamkeit von Thiopental. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 30: 357 - 360

Tonner PH, Scholz J, Koch C, Schulte am Esch J (1997) The anesthetic effect of dexmedetomidine does not adhere to the Meyer-Overton rule but is reversed by hydrostatic pressure. *Anesth Analg* 84: 618 - 622

Urban BW, Duch DS, Frenkel C, Rehberg B, Wartenberg HC (1995): Greifen Allgemeinanästhetika an spezifischen Rezeptoren an? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 30: 375 - 382

Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH (1992) Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of spinal cord. *Neurosci Lett* 148: 6 - 10

Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH (1995) Colocalization of neuronal nitric oxide synthase with GABA in rat cuneate nucleus. *J Neurocytol* 24: 237 - 245

Virtanen R (1989) Pharmacological profiles of medetomidine and its antagonist atipamezole. *Acta vet Scand* 85: 29 - 37

Vulliemoz Y, Shen H, Virag L (1996) Alpha-2 adrenoceptor agonists decrease cyclic guanosine 3'5'-monophosphate in the mouse brain. *Anesthesiology* 85: 544 - 550

Wang Y, Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 12 - 22

Waud DR (1972) On biological assay involving quantal responses. *J Pharmacol Exp Ther* 183: 577 - 607

Wing LM, Reid JL, Davis DS, Neill EA, Tippett P, Dollery CT (1977) Pharmacokinetic and concentration-effect relationships of clonidine in essential hypertension. *Eur J Clin Pharmacol* 12: 463 - 469

Wood PL, Emmett MR, Rao TS, Cler J, Mick S, Iyengar S (1990): Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-methyl-D-aspartate-, quisqualate-, kainate-, harmaline-, and pentylenetetrazole-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. *J Neurochem* 55: 346 - 348

Wotta DR, Parson AM, Hu J, Grande AW, El-Fakahany EE (1998) M1 muscarinic receptors stimulate rapid and prolonged phases of neuronal nitric oxide synthase activity: involvement of different calcium pools. *J Neurochem* 71: 487 - 497

Zuo Z, De Vente J, Johns RA (1996) Halothane and isoflurane dose-dependently inhibit the cyclic GMP increase caused by N-methyl-D-aspartate in rat cerebellum: novel localization and quantitation by in vitro autoradiography. *Neuroscience* 74: 1069 - 1075

## Publikationen

Ein Teil der vorliegenden Ergebnisse wurde bereits wie folgt publiziert:

Tonner PH, Scholz J, Schlamp NO, Schulte am Esch J (1996) NO-synthase-inhibitor nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) enhances anesthetic action of dexmedetomidine. *Anesthesiology* 85: A633

Tonner PH, Scholz J, Lamberz L, Schlamp NO, Schulte am Esch J (1997) Inhibition of nitric oxide synthase decreases anesthetic requirements of intravenous anesthetics in *Xenopus laevis*. *Anesthesiology* 87: 1479 - 1485

Tonner PH, Scholz J, Schlamp NO, Schulte am Esch J (1999) Inhibition of nitric oxide metabolism enhances the hypnotic-anesthetic action of alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine in vivo. *J Neurosurg Anesthesiol* 11: 37 - 41



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Schulte am Esch möchte ich für die Möglichkeit danken, in der Abteilung für Anästhesiologie die für diese Arbeit notwendigen Experimente durchführen, sowie die Laboreinrichtungen nutzen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. P. H. Tonner für die Bereitstellung dieses Dissertationsthemas und die freundliche und hilfreiche Anleitung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. med. vet. J. Dimigen und Herrn Dr. med. vet. F. Iglauer für die Unterstützung und freundliche Bereitstellung der Kaulquappen sowie der Untersuchungsräume der Versuchstierhaltung des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf. Herrn Tierpfleger F. Willmann danke ich für die gute Betreuung der Tiere.

Herrn Dr. rer. nat. U. Troll und Frau Weber aus der Abteilung für Anästhesiologie danke ich für die experimentelle Hilfe im Labor.

Der Firma Orion / Farnos Pharmaceutica, Turku, Finnland danke ich für die freundliche Bereitstellung der Trockensubstanz des Dexmedetomidin.

Des weiteren danke ich Herrn H. J. Höhling für die Durchsicht des Manuskriptes und seine stets hilfreichen Anregungen.

Ebenso danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die mir das Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht hat.