

Aus der Klinik für Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Bertalanffy)

**Auswirkung intracerebroventrikulärer Baclofen-  
Applikation auf Glutamat-, Aspartat-, und Glycin-  
Freisetzung und das dopaminerge System im  
Ncl. paraventricularis hypothalami der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität

vorgelegt von

Matthias Krause

aus Schlema

Marburg 2005

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am  
8. Dezember 2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. R. Becker

Coreferent: Prof. Dr. J. Oertel

Für meinen Vater

Dr. med. Siegfried Krause

# Inhaltsverzeichnis

## Seite

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung der Studie</b> .....	<b>9</b>
1.1	Neuroanatomisch-neurochemische Betrachtungen .....	10
1.1.1	Das zentrale autonome Netzwerk .....	10
1.1.2	Der Nucleus paraventricularis hypothalami .....	13
1.2	Der GABA-B Rezeptor .....	16
1.3	Pharmakokinetik des Baclofen .....	19
1.4	Klinische Aspekte der intrathekalen Baclofen-Applikation .....	21
1.5	Aspartat und Glutamat .....	22
1.6	Dopamin und seine Metabolite .....	23
1.7	Zielsetzung der Studie .....	25
<b>2.</b>	<b>Materialien und Geräte</b> .....	<b>26</b>
2.1	Chemikalien .....	26
2.1.1	Chemikalien für die Blutdruckmessung und Mikrodialyse .....	26
2.1.2	Chemikalien für die HPLC .....	26
2.1.2.1	Chemikalien für die Herstellung der Standards für die elektrochemische Detektion .....	26
2.1.2.2	Chemikalien für die Herstellung der Standards für die Fluoreszenzdetektion .....	27
2.1.2.3	Chemikalien für die Herstellung der Mobilien Phase: Elektrochemische Detektion .....	27
2.1.2.4	Chemikalien für die Herstellung der Mobilien Phase: Fluoreszenzdetektion .....	27
2.2	Materialien .....	28
2.2.1	Materialien für die arterielle Blutdruckmessung .....	28
2.2.2	Materialien für die Mikrodialyse .....	28
2.2.3	Materialien für die HPLC .....	29
2.3	Geräte .....	29
2.3.1	Geräte für die arterielle Blutdruckmessung .....	29
2.3.2	Geräte für die Mikrodialyse .....	29
2.3.3	Geräte für die HPLC .....	30
2.3.3.1	Geräte für die Elektrochemische Detektion .....	30
2.3.3.2	Geräte für die Fluoreszenzdetektion .....	30
2.4	Versuchstiere .....	31

<b>3.</b>	<b>Methodik</b> .....	<b>32</b>
3.1	Versuchsablauf .....	33
3.1.1	Narkose .....	33
3.1.2	Blutdruckmessung .....	34
3.1.3	Rahmenbedingungen .....	36
3.1.4	Probengewinnung .....	36
3.2	Die Stereotaxie .....	39
3.2.1	Zielpunktbestimmung .....	39
3.2.2	Implantation .....	40
3.3	Die Mikro dialyse .....	42
3.3.1	Grundlagen .....	42
3.3.1.1	MA/11-Mikro dialyse Kanüle .....	42
3.3.1.2	Perfusionsflüssigkeit .....	43
3.3.1.3	Absolute und relative Recovery .....	43
3.3.2	Methodik der HPLC .....	44
3.3.2.1	Kalibrierung .....	44
3.3.2.2	Probengewinnung durch die Mikro dialyse .....	45
3.4	Die Chromatographie .....	46
3.4.1	Untersuchungsmethoden .....	46
3.4.2	Herstellung der Mobilen Phasen .....	46
3.4.2.1	Herstellung der Mobilen Phase für die Elektrochemische Detektion .....	46
3.4.2.2	Herstellung der Mobilen Phase für die Fluoreszenzdetektion .....	46
3.4.3	Herstellung der Standards .....	47
3.4.3.1	Herstellung der Standards für die Elektrochemische Detektion .....	47
3.4.3.2	Herstellung der Standards für die Fluoreszenzdetektion .....	47
3.4.4	Die HPLC .....	47
3.4.4.1	Grundzüge .....	47
3.4.4.2	Die HPLC-Apparatur .....	48
3.4.4.3	Mobile Phase .....	49
3.4.4.4	Autosampler .....	49
3.4.4.5	Pumpen .....	50
3.4.4.6	Säulen .....	50
3.4.4.7	Detektoren .....	51
3.4.4.8	Integrator .....	51
3.5	Auswertung der gewonnenen Daten .....	52
3.5.1	Blutdruckauswertung .....	52
3.5.2	Qualitätskontrolle und Auswertung der HPLC-Daten .....	53

3.5.3	Statistische Bearbeitung der Daten .....	55
3.6	Histologische Verifikation .....	56
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse der Studie .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemein .....</b>	<b>57</b>
4.2	Blutdruck .....	57
4.3	Messung der Aminosäuretransmitter aus dem Dialysat des PAV .....	59
4.3.1	Glutamat .....	59
4.3.2	Aspartat .....	61
4.3.3	Glycin .....	63
4.4	Messung des Katecholamins Dopamin und seiner Metabolite .....	65
<b>5.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Schlussfolgerungen und Perspektiven .....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturnachweis .....</b>	<b>75</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>84</b>
<b>10.</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>85</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>85</b>
<b>12.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
A1	noradrenerge Zellgruppe A1 = Bereich in der cVLM
A2	noradrenerge Zellgruppe A2 = Zellen des Ncl. tractus solitarius
A5	noradrenerge Zellgruppe A5 = Zellen des Ncl. parafazialis
A6	noradrenerge Zellgruppe A6 = Locus coeruleus
A7	noradrenerge Zellgruppe A7 = Zellgruppen im Ncl. parabrachialis und Ncl. subcoeruleus
Asp	Aspartat
ARS	aszendierendes retikuläres Aktivierungssystem
C1	adenerge Zellgruppe C1 = rVLM
C2	adenerge Zellgruppe C2 = Zellgruppen im NTS und Ncl. Ambiguus
Ca	Calcium
CAN	Zentrales Autonomes Netzwerk
Cl	Chlorid
CNA	Ncl. centralis amygdalae
cVLM	kaudale ventrolaterale Medulla oblongata
D1-D5	Dopaminrezeptorsubtypen 1-5
DA	Dopamin
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylsäure
EAA	excitatory amino acids
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Glu	Glutamat
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
ITB	Intrathekale Baclofenapplikation
K	Kalium
M	Mol
Mg	Magnesium
mm	Millimeter

μm	Mikrometer
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
Na	Natrium
NA	Noradrenalin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTS	Ncl. tractus solitarius
PAV	Ncl. paraventricularis hypothalami
pg	Picogramm
rVLM	rostrale ventrolaterale Medulla oblongata
SFO	Subfornikalorgan
TPPpd	Ncl. tegmenti pedunculopontinus pars dissipata
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung und Zielsetzung der Studie

Ausgangspunkt des in dieser Arbeit erörterten Untersuchungsprojektes war das im klinischen Alltag der neurochirurgischen Intensivstation beobachtete Phänomen, dass Patientin mit schwerer und schwerster cerebraler oder supranukleärer Schädigung neben der Spastik auch an vegetativen Regulationsstörungen in Form dekompensierter arterieller Hypertonie, Tachykardie, Hypersalivation, Hyperhidrose, bronchialer Hypersekretion und motorischer Unruhe litten. Diese Begleitsymptomatik wurde bei intrathekaler Applikation von Baclofen, welches zur Therapie der zentralen Spastik eingesetzt wird, ebenso wie die Spastik selbst, positiv beeinflusst.

Da mehrere Studien im Tierversuch einen blutdrucksteigernden Effekt des Baclofen gezeigt hatten (Singh, 1987; Takenaka, 1996; Trippenbach, 1994), dieses jedoch im Widerspruch zu den klinischen Erfahrungen am Menschen stand, sollte der Baclofenwirkung im Tierexperiment noch einmal genauer nachgegangen werden und zeitgleich versucht werden, neurochemische Zusammenhänge in den vegetativen Regulationsnetzwerken aufzudecken.

Hierzu wurden durch den Verfasser und andere in einem Gemeinschaftsprojekt die tierexperimentellen Versuche durchgeführt.

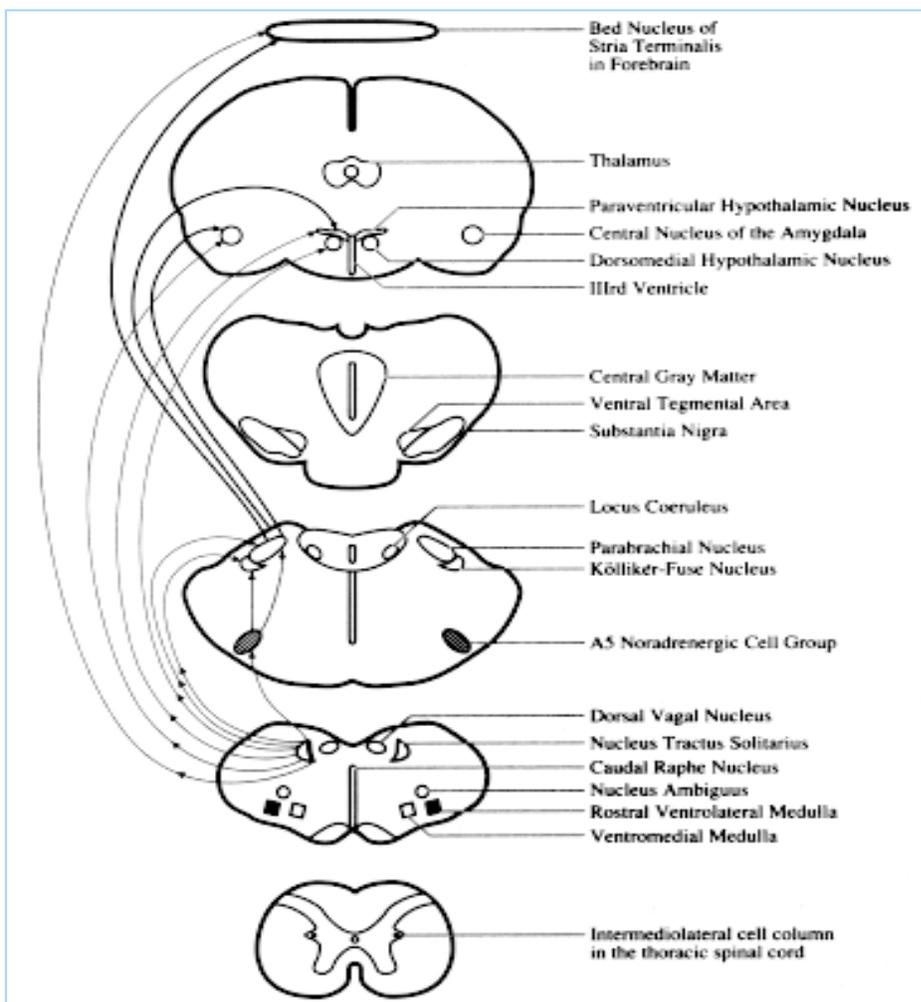
Die vorliegende Arbeit behandelt vornehmlich die Erkenntnisse bezüglich der exzitatorischen Aminosäuretransmitter Aspartat und Glutamat, sowie des inhibitorischen Transmitters Glycin. Das dopaminergen System sollte explorativ auf eventuelle Veränderungen bei Baclofengabe mituntersucht werden.

## 1.1. Neurochemisch-neuroanatomische Betrachtungen

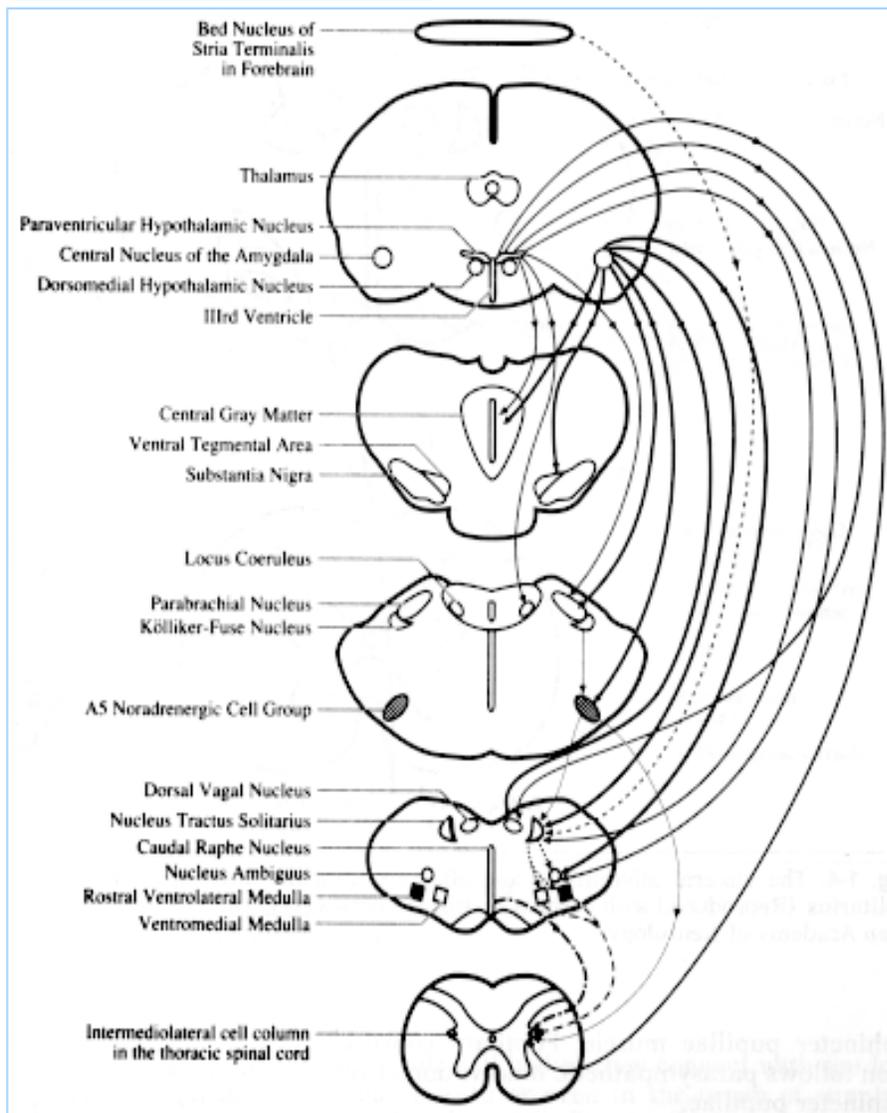
### 1.1.1 Das zentrale autonome Netzwerk

In den letzten 20 Jahren wurde auf dem Gebiet der Neurochemie und –anatomie ein zentrales Neuronennetzwerk charakterisiert, das die wesentlichen autonomen Parameter des vegetativen Nervensystems als höchstgeordnetes Steuerorgan beeinflusst (Loewy, 1990). Dieses sogenannte Zentrale Autonome Netzwerk (CAN) wurde bisher in seinen wesentlichen aufsteigenden und absteigenden Projektionen und Kerngebieten wie in Abbildungen 1.1 und 1.2 modifiziert nach Loewy, 1990, beschrieben.

**Abbildung 1.1:**  
Aufsteigende Projektionen  
des CAN



**Abbildung 1.1:**  
Deszendierende Projektionen  
des CAN



Einleitend soll zunächst ein Überblick der neuroanatomischen und neurochemischen Grundlagen dieses zentralen Steuernetzwerkes gegeben werden.

Von immanenter Bedeutung in diesem Netzwerk ist die hierarchische Verschaltung und Arbeitsweise der Kerne. Spinale und medulläre Kerngebiete wie der Ncl. intermediolateralis des Rückenmarks, der Ncl. tractus solitarius (NTS), die rostrale Ventrolaterale Medulla Oblongata (rVLM) und der Ncl. dorsalis n. vagi stellen eine direkte und wichtige Steuerstelle für den sympathischen bzw. parasympathischen Output dar, wobei verschiedene Transmittersysteme eine Rolle zu spielen scheinen, von denen einige genauer untersucht werden konnten (Li, 1999; Suzuki, 1999; Scislo, 1998;

Kasparov, 1998; Krukoff, 1998; Delfs, 1998; Ashworth-Preece, 1998; Rinaman, 1998; Neff, 1998; Sevoz-Couche, 1998 ).

Als über dieser unteren, medullär-spinalen Regulationseinheit angeordnet und diese mit reziproken Projektionen steuernden Kerngruppe kann man die noradrenergen Zellgruppen A5 (Ncl. parafacialis) und A6 (Locus coeruleus) und A7 (Ncl. subcoeruleus und Ncl. parabrachialis) im ventrolateralen Brückentegmentum definieren, die sowohl ascendierend als auch descendierend reziprok mit den Zellgruppen A1 und C1 (VLM), A2 und C2 (NTS), dem diencephalen Ncl. paraventricularis hypothalami (PAV) und dem Ncl. centralis amygdalae (CNA) (Paxinos, 1990; Loewy, 1990; Guo, 1997) in Verbindung stehen.

Die beiden letzteren stellen das übergeordnete Steuer- und Regelorgan des CAN dar, wobei andere Kerngruppen, wie der Ncl. supraopticus, der Ncl. arcuatus, der Ncl. striae terminalis und das Subfornikalorgan mit eben diesen ebenfalls in reziproker Verbindung stehen (Akert, 1994; Künzle, 1994). Das Subfornikalorgan (SFO) seinerseits ist als chemo- und osmorezeptorhaltiges Organ von offensichtlicher Bedeutung für die Rückmeldung der Kreislaufsituation zum Ncl. paraventricularis hypothalami. Der PAV unterliegt neben dem Einfluss von Osmorezeptoren jedoch auch der Steuerung durch sympathische Afferenzen der Medulla, vor allem des Ncl. tractus solitarius (Saphier, 1993).

### 1.1.2 Der Nucleus paraventricularis hypothalami

Der Ncl. Paraventricularis hypothalami (PAV) setzt sich histologisch zunächst aus zwei Anteilen, einer pars magnocellularis (pm) und einer pars parvocellularis (pc) zusammen. Aufgrund unterschiedlicher Verteilung und Expression der spannungsgesteuerten Calcium- und Kalium-Kanäle auf der Oberfläche der Zellen, können die Zellen des magnozellularen Anteils als Typ-I – Neurone und die Zellen des parvozellulären Anteils als Typ-II – Neurone bezeichnet werden (Luther, 2000). Die magnozellularen Neurone sind gekennzeichnet durch die Synthesierung der überragenden Hormone Oxytocin und Vasopressin. Dabei ist bemerkenswert, dass jedes Neuron nur jeweils eines der Hormone synthetisiert und diese dann über den Tractus supraopticohypophysialis die Neurohypophyse als Ort der intrahumoralen Sekretion erreichen. Damit bildet der magnozellularer Anteil eine funktionelle Einheit mit den hormonaktiven Zellen des Ncl. supraopticus, die mittels der Ausschüttung von Vasopressin über die Neurohypophyse ebenfalls den Blutdruck zu beeinflussen vermögen.

Der parvozelluläre Anteil des Kerngebietes (PAVpc) ist neurochemisch und hodologisch in drei Anteile zu unterteilen. Erstens existieren Zellen, die über die Sezernierung verschiedener Release-Hormone wie des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH), des Somatostatins (SOM) oder des Thyreotropin-Relasing-Hormons (TRH) entscheidend die Funktion der Adenohypophyse steuern.

Zweitens existieren im Ncl. paraventricularis hypothalami, der hier näher untersucht werden soll, derartige Neurone, die einzigartig bei Stimulation alle kardiovaskulären und Verhaltenskomponenten der Fluchtreaktion triggern können (Tibirica, 1993; Coote, 1973). Dabei stellt der Ncl. paraventricularis hypothalami pars parvocellularis (PAVpc) die größte Konzentration sogenannter „autonomic upper motor neurons“ dar.

Weiterhin existiert in der pars parvocellularis desselbigen (PAVpc) ein dritter Anteil, dessen Zellen vor allem in das limbische System, bevorzugt in den ventralen septalen Bereich und den Ncl. centralis amygdalae projizieren. Ersterem wird eine Rolle bei der Fieberregulation zugeschrieben, der letztere ist essentiell für höhere affektive Funktionen im Zusammenhang mit der „Fight-and-Flight-Reaktion“ (Kiss, 1988).

Aus diesem Grunde wird der PAV mit seinen beiden Anteilen auch als übergeordnetes hypothalamisches Integrationszentrum speziell in Bezug auf die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten des kardiovaskulären Systems angesehen (Martin, 1997; Joyner, 1993).

Die Steuerungsfunktion für den Blutdruck, die kardialen Parameter und die Atmung wurden bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen. Glutamaterge Stimulation des PAV erzeugt eine Acetylcholin-Ausschüttung in der rVLM, die mit einer Pressor-Reaktion einhergeht (Kubo, 2000), eine elektrische Stimulation des PAV eine durch Kynurenat blockierbare Exzitation, die auch einen Glutamat-abhängigen Signalweg aufzeigt (Coote, 1998). Glutamatinjektion in den PAV bewirkt außerdem einen Anstieg der Plasmakonzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin, und damit einen Anstieg des Blutdrucks und des Herzminutenvolumens (Martin, 1992). Der modulierende Einfluß des PAV auf den Chemorezeptor-Reflex des Glomus caroticum durch Glutamatausschüttung und alpha-adrenerge Effekte wurde ebenfalls nachgewiesen (Kubo, 2000).

Inhibitorische Projektionen zum Ncl. tractus solitarius erklären ebenfalls eine Blutdrucksteigerung bei Exzitation des PAV. Durch Disinhibition des PAV mit dem GABA-A Antagonisten Bicucullin konnte eine Blutdrucksteigerung erreicht werden (Martin, 1997). Direkte Projektionen des PAV zu phrenischen Motoneuronen wurde mit Hilfe von Tracing-Experimenten (Yeh et al, 1997) nachgewiesen und zeigt eine Möglichkeit der Koordination der respiratorischen und der kardiovaskulären Funktionen im PAV, wobei auch hier Glutamat eine Rolle zu spielen scheint, indem es eine Frequenz- und Amplitudenerhöhung im EMG des Diaphragma erzeugt, wenn es mittels Mikroinjektion in den PAV injiziert wurde. Monassier et al. (1994) zeigten, daß Glutamat nicht nur den Tonus der Vasomotoneurone beeinflusst, sondern durch NMDA-Rezeptoren ebenfalls über eine Steuerung der kardialen Funktion den kardialen Sauerstoffverbrauch moduliert. Malpas und Coote (1994) haben darüberhinaus zeigen können, dass Vasopressin aus dem PAV sogar als spinaler Neurotransmitter einen wesentlichen Einfluß auf die sympathische Aktivität hat.

Auch ein entscheidender Einfluß des PAV und des SOp auf die Regulation der Körpertemperatur unter Einbeziehung des NTS und des Locus coeruleus über muskarinerge cholinerge Effekte konnte gezeigt werden (Takahashi, 2001).

Glutamaterger und Angiotensin-II-erger Input über das Subfornikalorgan seinerseits bewirkt im PAV einen Anstieg des endogenen Angiotensin, sodaß hier ein Rückkopplungsmechanismus vorliegt, in dessen zentraler Position der PAV zu liegen scheint (Wright, 1993).

Injektion von NMDA in das periaquäduktale Grau der Ratte führte zu einer deutlichen Blutdrucksteigerung, die sich durch Blockade des PAV mittels NMDA-Antagonisten 2-APV aufheben ließ (Berrino, 1996). Auch dies verdeutlicht den Einfluß seitens des aufsteigenden retikulären Aktivierungssystems ARS, vor allem des Ncl. tegmenti pedunculopontinus pars dissipata (TPPpd), auf die Kreislauffunktion via des PAV bei Flight-and-Fight-Reaktionen und beim Schlaf-Wach-Rhythmus (Neuhuber, 1994), sowie dessen zentrale Rolle im Zentralen Autonomen Netzwerk.

Es konnte bezüglich des CAN gezeigt werden, dass nahezu der gesamte sympathische Output über lediglich fünf Kerngebiete gesteuert wird. Dabei handelt es sich um den Ncl. paraventricularis hypothalami, die erwähnten noradrenergen Zellgruppen A5 und A1 (cVLM), die adrenerge Gruppe C1 (rVLM) und die kaudale Rapheregion mit dem Ncl. raphe caudalis, der die serotonergen Zellgruppen B1 bis B4 enthält.

Da die noradrenergen und adrenergen Zellgruppen ihrerseits der Steuerung des PAV zumindest modulierend unterliegen und der PAV auch Projektionen zur Raphe-Region entsendet, kann man den PAV als das Hauptkontrollorgan des Netzwerkes betrachten.

## 1.2. Der GABA-Rezeptor

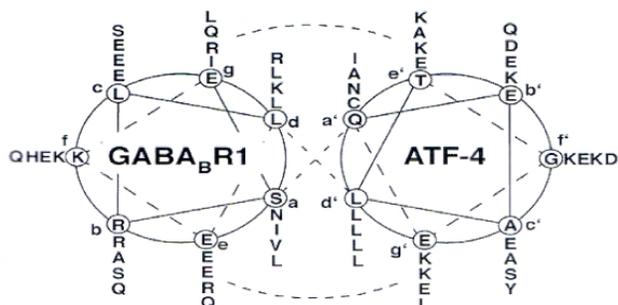
Vor mehr als fünfzig Jahren wurde die Aminosäure GABA als Neurotransmitter im Gehirn durch Roberts und Frankel nachgewiesen. Die sich anschließenden Studien erbrachten den Nachweis, dass GABA und seine Rezeptoren das wichtigste inhibitorische Transmittersystem im ZNS darstellen.

Der GABA-Rezeptor konnte im Verlauf in drei Typen subklassifiziert werden, wobei der GABA-A-Rezeptor an Chlorid-Kanäle koppelt, die unter anderem Angriffspunkt der Barbiturate und Benzodiazepine sind (De Blas, 1996). GABA-C-Rezeptoren, denen fünf Subtypen zuzuordnen sind, finden sich in der Retina, im Rückenmark, in den Colliculi superiores und auch im Magen. Sie sind neben Seh- und Merkprozessen auch am Schlafwandelpheänomen beteiligt (Enz, 2001; Johnston, 2002; McCall 2002). GABA-A- und GABA-C-Rezeptoren werden auch als ionotrope Rezeptoren angesprochen, führen sie doch durch ihre Kopplung an Chlorid-Ionen-Kanäle zu kurzzeitigen Hyperpolarisationen der Neurone.

Für diese Arbeit wichtiger sind jedoch die GABA-B-Rezeptoren, die als metabotrope Rezeptoren bezeichnet werden. Sie bewirken neuromodulatorische Effekte an den Neuronen, die durch mehrere Sekunden bis zu Minuten anhaltende Hyperpolarisationen vermittelt werden.

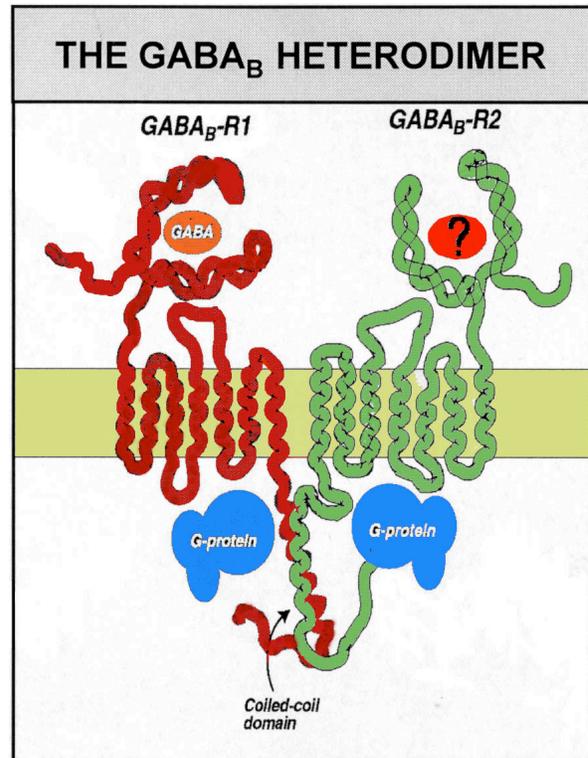
Der GABA-B-Rezeptor ist definiert als Bicucullin-insensitiver Rezeptor. R(-)-Baclofen ist an ihm spezifischer Agonist, 2-Hydroxy-Saclofen der spezifische Antagonist. Der GABA-B-Rezeptor kann in die Varianten R1 mit Splice-Varianten R1-A und R1-B und R2 unterteilt werden, die wahrscheinlich alle durch nur ein Gen kodiert werden, welches durch differentes Splicen der Intron-Exon-Struktur die einzelnen Varianten ergibt (Jones, 1998; Kaufmann 1998; White; 1998, Kuner 1999).

**Abb1.2.1 Modell der Bindungsdomäne des GABA-B-Rezeptors.** (aus Nehring, 2000)



Der GABA-B-Rezeptor lässt sich aufgrund seiner Primärstruktur zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen, und besitzt deshalb die typische Struktur mit sieben membrandurchspannenden Aminosäurehelices und eine Leuzin-Zipper-Interaktionsdomäne (Abb 1.2.1).

In Abbildung 1.2.2 ist die heutige Vorstellung über den GABA-B-Rezeptor-Heterodimer dargestellt. Der GABA-B-Rezeptor ist im Gegensatz zum Typ-A und Typ-C GABA-Rezeptor kein integraler Ionenkanal, sondern ist über pertussistoxin-sensitive GTP-bindende Proteine (Scott,1991; Dolphin 1992) indirekt an  $Ca^{2+}$ - und  $K^{+}$  - Kanäle gekoppelt.



**Abbildung 1.2.2:**  
Der GABA-B-Rezeptor  
Nach Kuner, 1999

GABA-B-Rezeptoren finden sich im gesamten peripheren Nervensystem (Bowery, 1989). Im Gehirn selbst (Bowery, 1997) konnten dabei vor allem GABA-B-Rezeptoren an den Dendriten der Purkinje-Zellen des Kleinhirns, in den Ncll. vestibulares und cochleares (Holstein, 1992), sowie im Frontal- und Mittelhirn nachgewiesen werden. Darüberhinaus finden sie sich in hoher Konzentration im Rückenmark in den Laminae I-IV und X nach Rexed, wobei aber in der Substantia gelatinosa (Lamina II) und Lamina III die höchsten Konzentrationen ermittelt werden konnten (Waldvogel, 1990).

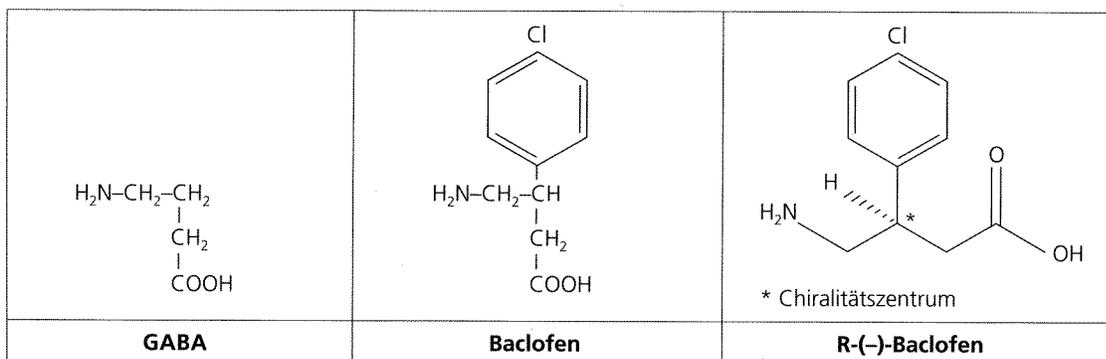
Ihre Wirkung entfalten die Rezeptoren prä- und postsynaptisch, wobei auf spinaler Ebene in den Hinterwurzelganglien hauptsächlich die präsynaptischen, an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gekoppelten GABA-B-Rezeptoren im Wesentlichen über eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstroms in die Zellen die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter (vor allem Glutamat und Aspartat) durch Verkürzung der Aktionspotentialdauer bewirken (Allerton, 1989; Kangrga, 1991).

In hippocampalen Pyramidenzellen (Schwarz, 1988) und im präfrontalen Kortex der Ratte (Karlson, 1989) konnte eine postsynaptische GABA-B-Wirkung über G-Protein-gesteuerte  $\text{K}^+$ -Kanäle dargestellt werden, die zur Entstehung eines späten inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) beiträgt, wobei allerdings die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit nicht beeinflusst wird. Daraus leiteten Bormann (1988) und Bowery (1989) den Schluß ab, dass GABA-B-Rezeptoren postsynaptisch an  $\text{K}^+$ -Kanäle und präsynaptisch an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gekoppelt sind.

### 1.3. Pharmakokinetik des Baclofen

Baclofen wird seit mehr 30 Jahren als zentral angreifendes, orales Antispastikum bei Multipler Sklerose oder auch traumatischer oder neoplastischer Rückenmarksschädigung eingesetzt. Baclofen entsteht bei der Substitution eines Chlorphenyl-Ringes am  $\beta$ -C-Atom der  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), die wie in Abb. 1.2 zu einem Chiralitätszentrum führt, wobei nur der R-(-)-Enantiomer die biologische Form darstellt (Olpe, 1978).

**Abbildung 1.3: Strukturformeln von GABA und Baclofen** aus Ochs, 1995



Baclofen entwickelt seine Wirkung am GABA-B-Rezeptor, einem Untertyp des GABA-Rezeptors sowohl prä- als auch postsynaptisch. Der Mechanismus der Baclofen-Wirkung wurde erst lange nach der Markteinführung der Substanz nachvollziehbar mit der Subtypisierung des GABA-Rezeptors in GABA-A und GABA-B durch Dunlap und Hill. Baclofen als selektiver Agonist am GABA-B-Rezeptor wurde aufgrund seiner Selektivität auch in der Grundlagenforschung eingesetzt, um die physiologischen Funktionen des Transmittersystems näher charakterisieren zu können (Ogata, 1990).

Seine Wirkung entfaltet Baclofen an den Rezeptoren durch Verminderung der Wirkung der Adenylatzyklase, sowie der Verminderung des präsynaptischen Kalzium- und des postsynaptischen Kalium-Einstroms. Hierdurch bewirkt Baclofen wie GABA eine verminderte Freisetzung exzitatorischer Transmitter.

Baclofen ist nach oraler Gabe rasch resorbierbar mit einer mittleren absoluten Bioverfügbarkeit von 70 bis 80% (Krauss, 1988). Maximale Plasmakonzentrationen werden nach 1 bis 6 Stunden gefunden (Hulme, 1985; Wuis, 1990). Therapeutische Plasmaspiegel für Baclofen liegen im Bereich von 80 und 400 ng/l (Young, 1981).

Die Elimination aus dem Körper, deren Halbwertszeit zwischen 2 und 9 Stunden liegt (Wuis, 1989; Hulme, 1985; Kochak, 1985; Faigle 1980), erfolgt renal mit einer Clearance von 103 bis 170 ml/min (Kochak, 1985; Wuis, 1989) und nicht-renal mit einer Clearance von 15 bis 95 ml/min (Wuis, 1990). Daraus ergibt sich eine Plasmaclearance von 122 bis 237 ml/min (Kochak 1985; Wuis 1989).

Baclofen kann aufgrund seiner Polarität die Blut-Liquor- bzw. die Blut-Hirn-Schranke nur schlecht überwinden, weshalb orale Verabreichung nur zu unzureichenden Wirkstoffspiegeln im Hirn führt und häufig bereits in therapeutischen Dosierungen (60 – 100 mg Baclofen / dies per os) Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Verwirrtheit auftreten. Weitere Nebenwirkungen sind vor allem die Verminderung der Krampfschwelle und - im Gegensatz zu GABA-A-Rezeptoragonisten – auch Übelkeit, Hypotonie, Obstipation und Pollakisurie. Diese sind durch die Wirkung an oben beschriebenen Rezeptor mit seiner besonderen Verteilung im Nervensystem zu erklären.

Penn und Kroin schlugen deshalb erstmals 1984 die intrathekale Applikation von Baclofen vor, mit der die Wirkstoffkonzentration am Rückenmark gezielt erhöht werden konnte. Bei dieser intrathekalen Applikation mit Dauerinfusion von Baclofen in Größenordnungen von 0,05 und 1,2 mg konnten Liquorkonzentrationen von 130 bis 950 ng / ml gemessen werden, wobei die Plasmakonzentrationen stets unter 5 ng/ml und somit 100-fach niedriger als bei oraler Maximaldosierung lagen (Penn, 1988; Müller, 1988). Die Liquoreliminationshalbwertszeit liegt in vergleichbarer Größenordnung wie die des Plasmas, jedoch beträgt die Liquor-Clearance mit im Mittel 30 ml/h nur ein Viertel der des Plasmas. Bei lumbaler Applikation von Baclofen konnten durch Kroin Konzentrationsgradienten gegenüber der Cisterna magna von 4:1, d.h. viermal höhere Baclofenkonzentrationen lumbal als zisternal gemessen werden (Kroin et al., 1992; Kroin, 1992).

## **1.4 Klinische Aspekte der intrathekalen Baclofen-Applikation**

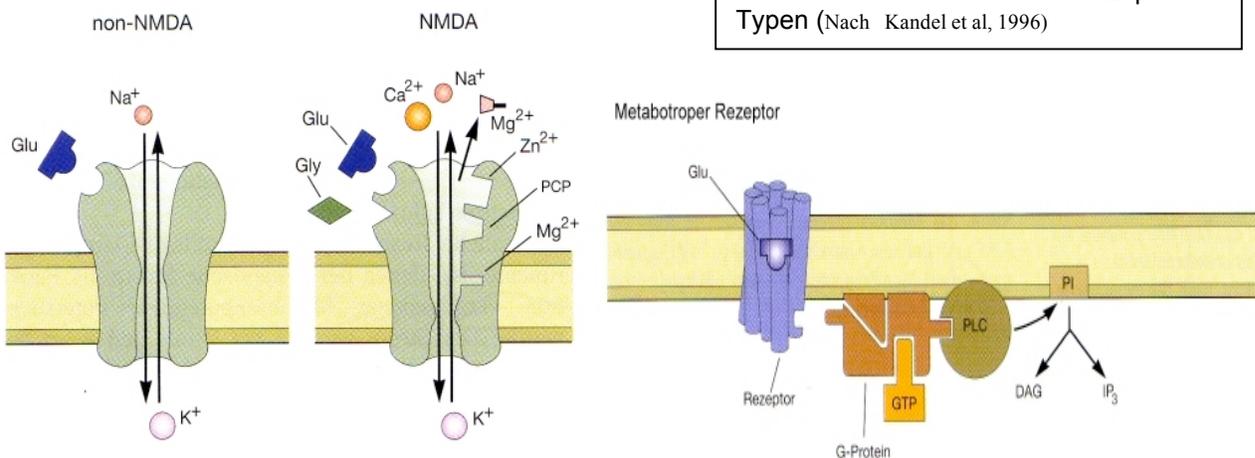
Baclofen wird in der Klinik bereits seit einiger Zeit neben der eigentlichen Indikation zur Behandlung spinaler Spastik besonders bei zentralen neuropathischen Schmerzsyndromen wie z.B. im Rahmen der Trigeminusneuralgie (Terrence, 1993; Fromm, 1992) eingesetzt, wobei hier Carbamazepin-ähnliche Effekte beschrieben wurden, die auch tierexperimentell bestätigt werden konnten (Yaksh, 1981; Levy, 1977). Aufgrund der fehlenden Antagonisierbarkeit durch den Opiatantagonisten Naloxon ist jedoch eine Beteiligung von Opiatrezeptoren bei der Vermittlung dieses Effektes ausgeschlossen. In mehreren Studien (Albright, 1991; Albright, 1993; Meythaler, 1996; Meythaler, 1999) konnten positive Effekte von intrathekaler Baclofen-Applikation bei Patienten mit traumatischer Hirnschädigung oder Cerebralparese, die an supraspinaler Spastik litten, gezeigt werden. Dabei konnten vor allem Tonusreduktion, Reduktion spontaner Spasmen und funktionelle Verbesserungen dokumentiert werden. In einigen Fällen (Becker, 1997) wurde auch eine positive Beeinflussung der vegetativen Regulationsstörungen der Patienten mit traumatischer, hämorrhagischer oder hypoxischer Hirnschädigung und Spastik gezeigt. Diese vegetativen Regulationsstörungen, die mit antiadrenerger Therapie nur schlecht zu beherrschen waren, konnten unter intrathekaler Applikation von Baclofen zum Teil ohne weitere antiadrenerge Therapie beherrscht werden.

## 1.5 Glutamat und Aspartat

Die Aminosäuren Aspartat und Glutamat erfüllen neben ihrer allgemeinen metabolischen Funktion im Proteinstoffwechsel im Zentralnervensystem zusätzlich die Aufgaben exzitatorischer Neurotransmitter, weshalb sie auch unter dem Begriff excitatory amino acids (EAA) geführt werden. Ihr Wirkort sind die Glutamat-Rezeptoren, wobei neben den Subtypen Kainat-, AMPA- (auch non-NMDA-Rezeptoren genannt) und dem metabotropem Rezeptor vor allem der NMDA-Rezeptor von herausragender Bedeutung ist (Krogsgaard-Larsen et al., 1991).

Dieser NMDA-Rezeptor-Komplex spielt bei der Vermittlung exzitatorischer Impulse auch im Ncl. paraventricularis eine besondere Rolle, kann die Instillation von Glutamat doch durch Aktivierung der sogenannten „upper-motor-neurons“ eine Pressorrektion in den sympathischen Output-Arealen A1 und C1 hervorrufen (Kubo, 2000).

Der NMDA-Rezeptor, benannt nach seinem potentesten Agonisten N-Methyl-D-Aspartat, besteht aus einem unspezifischen Kationenkanal, der in aktivierter Form für Calcium-, Kalium- und Natrium-Ionen permeabel ist. Er besitzt Bindungsstellen für Glutamat, Magnesium-Ionen, Glycin, Zink und PCP (Phencyclidin, „Angel dust“). Diese weiteren Bindungsstellen können die Aktivität des Kanalproteins modulieren, z.B. Magnesium-Ionen blockieren den Kanal im Ruhezustand (Kandel, et al. 1996). Abb. 1.5.1 gibt in schematischer Darstellung einen Überblick über die Glutamatrezeptoren vom non-NMDA-, NMDA- und metabotropen Typ.

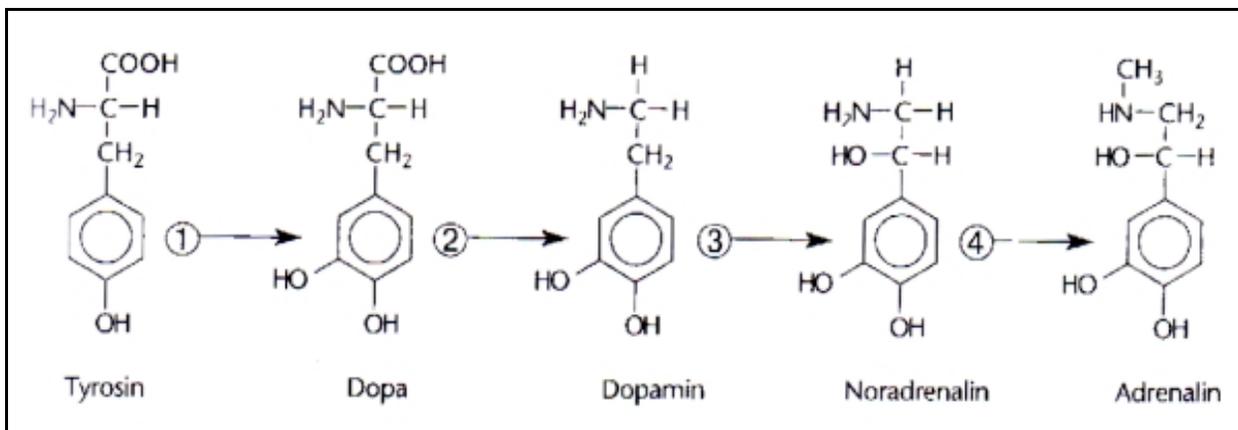


**Abbildung 1.5.1:**  
Überblick über die Glutamat-Rezeptor-  
Typen (Nach Kandel et al, 1996)

## 1.6 Dopamin und seine Metabolite

Dopamin ist ein Neurotransmitter der Klasse der Katecholamine, wobei Dopamin vor allem wegen seiner Wirkung auf die extrapyramidale Bewegung durch Projektionen der Substantia nigra pars compacta (SNpc) in das Striatum als Neurotransmitter bekannt ist (Morbus Parkinson). Es erfüllt aber im Zentralnervensystem noch viele weitreichende Funktionen, z.B. ist es identisch mit dem Prolactin Inhibiting Hormon (PIH). Insgesamt stellt Dopamin mehr als die Hälfte der gesamten Katecholaminmenge im ZNS (Bloom, 1996).

**Abb 1.6:** Die Katecholamin-Synthese (nach Kreutzig, 1994)



Alle Katecholamine, also auch Dopamin, werden aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Dabei wird zunächst durch die Tyrosinmonooxygenase/Tyrosinhydroxylase Tyrosin zu DOPA hydroxyliert (Schritt 1 in Abb 1.6). Aus DOPA wird durch die Dopamindecarboxylase Dopamin erzeugt (Schritt 2). In weiteren Schritten können dann durch Seitenkettenhydroxylierungen alle weiteren Katecholamine des Körpers hergestellt werden.

Der Abbau des Dopamins erfolgt wie der aller anderen Katecholamine über zwei relativ unspezifische Enzyme: Zum einen die Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und zum anderen die Monoaminoxidase (MAO). Letzere liegt im ZNS in zwei Formen, der MAO-A und MAO-B vor. Dabei baut die MAO-A vorwiegend Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin zu VMA ab, während die MAO-B hauptsächlich das Dopamin über DOPAC zu HVA metabolisiert (Kreutzig, 1994). Sowohl die Vanillinmandelsäure als auch die Homovanillinsäure werden im Urin ausgeschieden.

Immunhistochemische Studien (Hökfelt, 1978) konnten zeigen, dass wohl drei verschiedene Typen dopaminerger Neurone existieren: (1) ultrashort neurons, zu denen amakrine Zellen der Retina und im Bulbus olfactorius zu zählen sind; (2) intermediate-length neurons, zu denen Neurone des ventralen tuberobasalen und paraventriculären Hypothalamus zählen, die in die Hypophyse, den posterioren Hypothalamus und die Zona incerta projizieren und auch in der Umgebung des motorischen Ncl. nervi vagi, des Ncl. tractus solitarius und im periaquäduktalen Grau vorkommen; und (3) long-projecting neurons, die vor allem von den prominenten dopaminergen Kerngebieten in der Substantia nigra (SNpc) und im ventralen Tegmentum ausgehen und in ihre Zielregionen im Striatum, und im Limbischen Kortex projizieren.

Bisher konnten fünf Subtypen des Dopaminrezeptors nachgewiesen werden, die mit D1-D5 bezeichnet sind. Dabei sind D1 und D5 G-Protein-vermittelte Rezeptoren, die Adenylatzyklase aktivieren, während D2 über G<sub>i</sub>-Protein die Adenylatzyklase inhibiert, Kalzium-Einstrom blockiert und K-Kanäle öffnet (Vallar und Meldolesi, 1989). Die Subtypen D3 und D4 sind bisher noch ungenügend beschrieben (Bloom, 1996), es wurde jedoch beobachtet, dass die antipsychotischen Effekte atypischer Neuroleptika, wie z.B. Clozapin, zumindest auf deren Fähigkeit der Antagonisierung der Stimulation von D3 und D4 Dopamin-Rezeptoren zurückzuführen ist. Die extrapyramidalen Dyskinesien bei Langzeittherapie mit Neuroleptika sind jedoch eher auf einen Anstieg der D2-Rezeptorsubtypen vor allem im Striatum zurückzuführen.

## 1.7 Zielsetzung der Studie

Aufgrund der unzureichenden Datenlage bezüglich der vegetativen Effekte von Baclofen bei vegetativen Regulationsstörungen bei zugrundeliegender Hirnschädigungen unterschiedlicher Genese scheint eine Untersuchung der Auswirkung intrathekalen Applikation des GABA-B-Agonisten an einem Tiermodell ( Ratte) angezeigt. Weiterhin wurde deutlich, daß trotz der enormen Menge an Publikationen die direkten Auswirkungen einer intrathekalen Baclofenapplikation auf den PAV nicht hinreichend untersucht wurden, obwohl die zentrale Rolle dieses Kerns bei der Kreislaufregulation hinreichend bekannt ist und inhibitorische Effekte des GABA-B-Systems auf die Blutdruckregulation ebenso nachgewiesen sind.

Beim Design der Studie fiel die Wahl zunächst auf die Untersuchung eines wichtigen zentralen Regulationspunktes für alle vegetativen Parameter der Ratte. Wie aus den Ausführungen unter Kap.1.1 zu ersehen ist, erschien der Ncl. paraventricularis hypothalami als geeigneter Untersuchungspunkt für die Beeinflussung der vegetativen Funktionen durch Baclofen-Applikation.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluß einer intrathekalen Applikation von Baclofen auf die Transmitter-Konzentrationen von Glutamat, Aspartat und Glycin im PAV zu untersuchen. Explorativ sollte das dopaminerge System auf Veränderungen mituntersucht werden.

Für diese Untersuchungen wurden folgende Hypothesen vor Studienbeginn zur Überprüfung festgelegt:

1. Intrathekale (intraventrikuläre) Baclofenapplikation senkt im Mikrodialysat des PAV exzitatorische Neurotransmitter (Glutamat, Aspartat) und steigert die Konzentration inhibitorischer Transmitter (Glycin).
2. Intrathekale (intraventrikuläre) Baclofenapplikation senkt im Mikrodialysat des PAV die Konzentrationen des Dopamins und seines Metaboliten DOPAC.

## 2. Materialien und Geräte

### 2.1. Chemikalien

#### 2.1.1 Chemikalien für die Blutdruckmessung und Mikrodialyse

- Chloralhydrat , Merck; Darmstadt/Deutschland
- Lioresal intrathekal 0,05 mg / 1 ml, Novartis Pharma
- artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF)
- NaCl Lösung 0.9%, B.Braun; Melsungen/Deutschland
- Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>), Merck; Darmstadt/Deutschland
- Aqua dest

#### 2.1.2 Chemikalien für die HPLC

##### 2.1.2.1 Chemikalien für die Herstellung der Standards Elektrochemische Detektion

Serotonin-Kreatininsulfat; Merck, Darmstadt/Deutschland	$C_{14}H_{21}N_5O_6S \cdot H_2O$
4-Hydroxy-3-Metoxy-Phenylazetat; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	$C_9H_{10}O_4$
3,4-Dihydroxyphenylazetat; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	$C_8H_8O_4$
3,4-Dihydroxyphenylethylamin-Hydrochlorid; ICN Biomedicals Inc., Ohio/USA	$C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$
4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl-Glycol; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	$C_9H_{12}O_4 \cdot 1/2C_4H_{10}N_2$
5-Hydroxyindol-3-Essigsäure; Merck, Darmstadt/Deutschland	$C_{10}H_9NO_3$
L-3,4-Dihydroxyphenyl-Alanin; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	$C_9H_{11}NO_4$
3-Methoxytyramin-Hydrochlorid; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	$C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$
Norepinephrin-Hydrochlorid; Hoechst AG, Frankfurt a.M./Deutschland	$C_8H_{11}NO_3$
Perchlorsäure (70%), Merck; Darmstadt/Deutschland)	$HClO_4$

### 2.1.2.2 Chemikalien für Herstellung der Standards für die Fluoreszenzdetektion

Glutamat; Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim /Deutschland	$C_5H_{10}NO_4$
Glycin; Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim /Deutschland	$C_6H_5NO_2$
Perchlorsäure (70%), Merck; Darmstadt/Deutschland)	$HClO_4$

### 2.1.2.3 Chemikalien für die Mobile-Phase: elektrochemische Detektion

Natriumacetat wasserfrei; Merck, Darmstadt/Deutschland	$CH_3COONa$
1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	$C_8H_{17}O_3SNa$
Titriplex III (Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat)p.A.; Merck, Darmstadt/Deutschland	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$
Methanol gradient grade; Merck, Darmstadt/Deutschland	$CH_4O$
Essigsäure (99,8%); Merck, Darmstadt/Deutschland	$CH_3COOH$
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 4,0 (Citrat-Salzsäure bez.auf SRM von NIST); Merck, Darmstadt/Deutschland	
Pufferlösung gebrauchsfertig pH 10,0 (Borsäure/Kaliumchlorid/Natronlauge); Merck,Darmstadt/Deutschland	
Aqua bidest (Millipore)	

### 2.1.2.4 Chemikalien für die Mobile Phase : Fluoreszenzdetektion

Natriumacetat wasserfrei; Merck, Darmstadt/Deutschland	$CH_3COONa$
Borsäure; Merck, Darmstadt/Deutschland	$H_3BO_3$
Aqua bidest (Millipore)	

## **2.2.Materialien:**

### **2.2.1. Materialien für die Präparation**

- Einwegspritzen (10 ml), B.Braun; Melsungen/Deutschland
- Halbrundnadeln (atraumatisch)
- Scalpell, Aesculap
- Nahtmaterial ( Polyamid monofil, Seralonblau ), Serag Wiessner
- Pinzette ( anatomisch ),Aeskulap
- Pinzette ( chirurgisch ), Aeskulap
- Pinzette ( Dumant ), Aeskulap
- Präparierschere, Aeskulap
- Reaktionsgefäße ( 0,5 ml ), Eppendorf
- Nadelhalter ( geschossen ) nach Mayo, Aeskulap
- Microdialysis Probe ( 0,24 x 1 mm ), CMA Microdialysis; Stockholm/Schweden
- Klemme ( Péan ), Aeskulap

### **2.2.2. Materialien für die Mikrodialyse**

- Dialyseschläuche: FEP tubings, Axel Semrau GmbH & Co;  
Sprockhövel/Deutschland
- Konzentrische Mikrodialysekanülen: CMA/11 (Membran: ä.D.:0,24 mm; Cut-  
Off: 6000Daltons), Axel Semrau GmbH & Co; Sprockhövel/Deutschland
- Mikroliterspritze: 1ml bzw. 2,5 ml, Axel Semrau GmbH & Co;  
Sprockhövel/Deutschland
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,25 ml und 0,50 ml

### **2.2.3. Materialien für die HPLC**

- Vakuumsaugflasche 1000 ml und 2000 ml, Duran, Fa. Schott, Mainz/Deutschland
- Filter, Typ Durapur, 47MM, 0,22MÜL, Fa. Millipore, Eschborn/Deutschland
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,25ml und 0,50 ml
- CMA-Vials 0,2 ml, Axel Semrau GmbH & Co.; Sprockhövel/Deutschland
- Reaktionsgefäße 1ml mit Septa und Schraubkappe; Fa. ScherfCroma, Germany

## **2.3. Geräte**

### **2.3.1. Geräte für die Präparation und Blutdruckmessung**

- Blutdruckmonitor 23 606 010, Servomed
- Infusionsmanschette
- Kleinbohrer, Minimet 40, Proxxan
- LötKolben 260, Ersan
- Microinjection Pump, CMA/100, Stockholm, Schweden
- OP – Tisch, Firma Kobe
- Stereotaxiegestell, David Kopf Instruments, USA
- Temperature Controller, CMA/150, Stockholm, Schweden

### **2.3.2. Geräte für die Mikrodialyse:**

- Mikroinjektionspumpe: CMA/150, Axel Semrau GmbH & Co;  
Sprockhövel/Deutschland
- Temperatur Controller: CMA/150, ( Heizmatte, Rektalthermometer)
- In vitro Stand (Selbstbau)

### **2.3.3. Geräte für die HPLC**

#### **2.3.3.1 Geräte für die elektrochemische Detektion**

Pumpe:	Merck/Hitachi, Modell 655A-12, Flußrate 0,9 ml /min
Autosampler:	CMA 200 Refrigerated Microsampler Peacock PC mit CMA Software
Degaser:	Dionex DG 1310 Degasys
Detektor:	ESA, Coulochem II Multi-Electrode-Detektor
Guard-Cell:	ESA, Modell 5020
Analytical-Cell:	ESA, Modell 5011
Säule:	Supelcosil, Modell LC18 15cm x 4,6mm; 3 µm
Integrator:	Shimadzu C-R3A Chromatopac
Filtrationsgerät:	GVO 50/0 Fa. Schleicher+Schuell, Dassel/Deutschland mit Glasfritte D2 Filtrationsdurchmesser: 50 mm Aufsatz: 250 ml Inhalt
Filter, Typ Durapur, 47MM, 0,22MÜL, Fa. Millipore, Eschborn/Deutschland	
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Water-System; Millipore, Molsheim/Frankreich	

#### **2.3.3.2 Geräte für die Fluoreszenzdetektion**

Pumpe:	Beckmann 114M Solvent Delivery Module
Autosampler:	CMA 200 Refrigerated Microsampler Peacock PC mit CMA Software
Degaser:	Dionex DG 1310 Degasys
Detektor:	Flourescence HPLC Monitor, Model RF-530; Shimadzu Corporation, Kyoto / Japan
Säule:	Nucleosil – 120 C18 3mm ID; Knauer Berlin / Deutschland
Integrator:	Shimadzu C-R3A Chromatopac
Filtrationsgerät:	GVO 50/0 Fa. Schleicher+Schuell, Dassel/Deutschland mit Glasfritte D2

Filtrationsdurchmesser: 50 mm

Aufsatz: 250 ml Inhalt

Filter, Typ Durapur, 47MM, 0,22MÜL, Fa. Millipore, Eschborn/Deutschland

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Water-System; Millipore, Molsheim/Frankreich

## **2.4 Versuchstiere**

Männliche Wistar ( Hannover ) Ratten; 3-6 Monate ( 250 – 300 g ) wurden im 12:12 Hell – Dunkel - Rhythmus gehalten. Die Raumtemperatur betrug 23°C und die Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %. Die Tiere bekamen Futter und Wasser ad libidum.

### **3.0 Methodik**

Über die Technik der Mikrodialyse zur Untersuchung der Veränderungen im Kerngebiet des PAV wurden Daten bezüglich der wichtigen exzitatorischen Aminosäuretransmitter Glutamat und Aspartat, sowie von Glycin als inhibitorischem Transmitter gewonnen und mittels HPLC in Fluoreszenzdetektion quantifiziert. In parallel laufenden Studien wurden die Katecholamintransmitter mittels der elektrochemischen Detektion untersucht.

Da Baclofen einen hohen lumbal-zisternalen Liquorkonzentrationsgradienten von im Mittel 4:1 erwarten lässt (Kroin,1992), wurde eine Injektion des Wirkstoffes in den lateralen Ventrikel gewählt, um ausreichende Konzentrationen des Baclofens am Ncl. paraventricularis hypothalami am lateralen Rand und Boden des 3. Ventrikels zu erreichen.

Zur Kontrolle der vitalen Funktionen und als Kontrollparameter für die Beeinflussung des CAN durch Baclofen wurde der über die A. femoralis invasiv gemessene arterielle Blutdruck verwendet. Darauf soll im folgenden der Vollständigkeit halber neben der reinen Methodik der Gewinnung der Mikrodialyseproben kurz eingegangen werden, da dieser Parameter für die Auswertung der Studie bedeutend sind.

### **3.1 Versuchsablauf**

#### **3.1.1 Narkose**

Anästhesiert wurden die Versuchstiere mit Chloralhydrat, intraperitoneal verabreicht, um eine ausreichende Analgesie und Sedierung zu gewährleisten. Chloralhydrat ist eine im Tierversuch bewährte Substanz, deren Wirkung sehr rasch einsetzt und dennoch aufgrund der geringen Halbwertszeit von 4-5min gut steuerbar ist. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber über Trichlorethanol und Trichloressigsäure.

Auf den Einsatz einer Neuroleptanalgesie oder von Benzodiazepinen wurde aus folgenden Gründen bewusst verzichtet:

- Chloralhydrat beeinflusst die Transmitterausscheidung nur unwesentlich
- Erregungszustände, die bei Barbiturat- oder Benzodiazepingabe beobachtet wurden, sind bei Chloralhydrat bisher nicht beschrieben

Initial wurden 500 – 600 mg/kgKG zur Narkoseeinleitung mittels einer kleinen Kanüle intraperitoneal appliziert. Als Erhaltungsdosis war meist eine Applikation von 100mg/kgKG/h als intraperitoneale Gabe erforderlich. Dazu implantierten wir der narkosierten Ratte einen FEP-Schlauch in den Bauchraum, welcher mittels Kutannaht fixiert wurde.

Das Toleranzstadium (Stadium III der Narkosetiefe wurde sowohl vor dem ersten Schnitt, vor der Trepanation, als auch während des Versuchs mit dem Zwischenzehen–Reflex festgestellt (Kneifen der Haut zwischen den Zehen führt zum Zurückziehen oder Zucken der Gliedmaßen).

Die Körperkerntemperatur wurde rektal gemessen und mit Hilfe eines Heizkissens konstant auf  $37,5 \pm 0,5$  °C gehalten.

### 3.1.2 Blutdruckmessung

Zur intraarteriellen Blutdruckmessung wurde das narkotisierte Versuchstier auf dem OP – Tisch ( Firma Kobe ) mit den dafür vorgesehenen Klemmen fixiert (Abb.3.1.1). Anschließend wurde die A.femoralis freigelegt und unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Kanüle punktiert und mit einer Schlinge (chirurgisches Nahtmaterial )fixiert. Über einen Verbindungskatheter wurde die Kanüle an einen Druckaufnehmer samt Spülsystem angeschlossen. Verbindungskatheter, Druckaufnehmer, und Spülsystem wurde vor Versuchsbeginn luftblasenfrei mit isotoner NaCl – Lösung gefüllt.

**Abbildung 3.1.1:** Arbeitsplatz für die Präparation des Gefäßzugangs



Der Druckaufnehmer wurde an einen Blutdruckmonitor (Blutdruckmonitor 23 606 010, Servomed) angeschlossen, um die kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdrucks zu ermöglichen. Der Druckmeßbereich wurde zwischen 0 und 150 mmHg festgelegt. Eine Digitalanzeige gab Auskunft über systolischen- und Mitteldruck. Diese Werte wurden über einen Schreiber mit einem Vorschub von 5mm / min auf Millimeterpapier aufgezeichnet (Abb. 3.1.2)

**Abbildung 3.1.2:**  
Kontinuierliche  
Blutdruckregistrierung



### **3.1.3 „Akut-Messung“ an der narkotisierten Ratte**

#### **3.1.3. Rahmenbedingungen**

Untersuchungen am narkotisierten Tier sollten unter den arttypischen physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Erforderlich war eine genaue Kontrolle von Anästhesie, Atmung, Hydratation und Körpertemperatur. Die Ratte wurde deshalb während des gesamten Versuches auf einer Heizmatte gelagert. Die Körpertemperatur wurde über ein rektales Thermometer gemessen. Zur Vermeidung von Dehydratation während des lang andauernden Versuches war eine intraperitoneale Injektion von Ringer-Lösung erforderlich, um eine weitere Minimalanforderung an die physiologischen Verhältnisse zu gewährleisten.

#### **3.1.4. Probengewinnung**

Die Experimente wurden über eine Gesamtdauer von ca. neun Stunden durchgeführt. Alle 20 Minuten wurde eine Dialysatprobe gewonnen. Anschließend wurden die Proben mittels der HPLC analysiert. Falls eine sofortige Analyse mittels HPLC nicht möglich war, bestand die Alternative, nach Zugabe von 5µl PCA in jedes Dialysat die Proben in einem Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}$  aufzubewahren.

Die Mikrodialyse-Sonde wurde an einen in vitro Stand (Eigenbau) befestigt und mit der Membran in eine Standard-Substanz eingebracht. Hierfür wurde eine wässrige Dopaminlösung verwendet. Die Mikroinjektions-Pumpe wurde auf ein Durchflußvolumen von 35 µl und eine Durchflußrate von 1,75 µl/min eingestellt, die während des gesamten Versuchsablaufs konstant gehalten wurde. Als Perfusionsflüssigkeit diente künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF, siehe Mikrodialyse). Ergo wurden alle 20 Minuten Mikrodialyse-Proben mit einem Volumen von 35µl gewonnen, denen 5µl Perchlorsäure zugesetzt wurden. Letztere diente zum einen zur Stabilisierung der Substanzen in der Mikrodialyseflüssigkeit, als auch als Radikalfänger und erhöhte damit die Lebensdauer der Proben bei Aufbewahrung in  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Vor dem eigentlichen Versuch wurde nun die Unversehrtheit der empfindlichen Mikrodialyse-Membranen in der Standard-Substanz getestet mit Hilfe dreier Vorrecoveries.

Defekte Sonden konnten somit vor Versuchsbeginn identifiziert und getauscht werden.

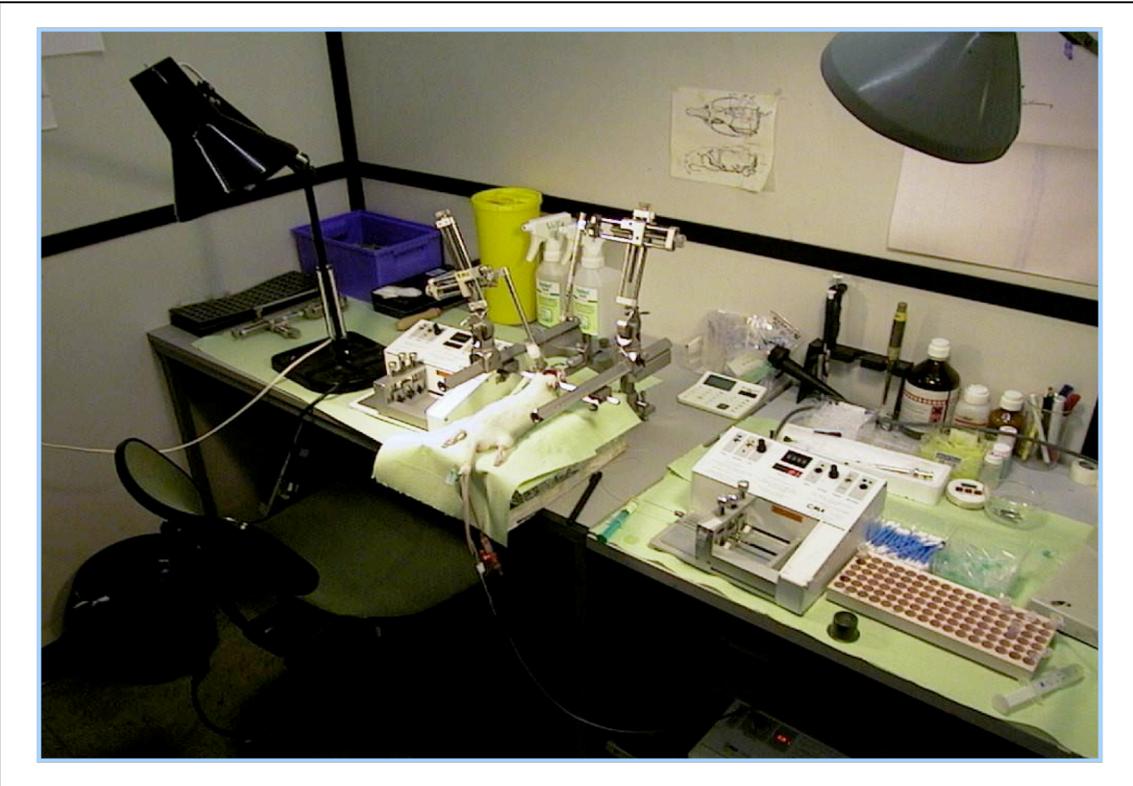
Es erfolgte nun die stereotaktische Implantation der CMA/11-Sonde in das zu untersuchende Kerngebiet der Ratte (s. Methodik: Stereotaxie). Hiernach schloß sich ein dreistündiger Vorlauf an. Dieser war aufgrund der Erfahrung anderer Autoren (Ungerstedt et al., 1995) notwendig, um Artefakte durch die mechanische Zellschädigung bei Implantation der Mikrodialysesonden sicher aus der Messung auszuschließen. Aus dem zu untersuchenden Kerngebiet wurden somit insgesamt zunächst 9 Dialysate als Baseline entnommen, und sechs davon verworfen, die drei übrigen als Baseline-Konzentrationen verwendet.

Das Durchflußvolumen, die Durchflußrate und die Perfusionsflüssigkeit blieben entsprechend der Recovery über den ganzen Versuchszeitraum konstant. Dem schloß sich das eigentliche pharmakologische Experiment an.

Das Pharmakon wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  durch die Injektions-Sonde intraventrikulär in das entsprechende Gebiet appliziert. Dabei kam hier Lioresal intrathekal (Wirkstoff: Baclofen; Fa. Ciba-Geigy) zur Anwendung. Sowohl beim Pharmakon als auch beim für die Kontrollgruppe verwendeten Placebo (aCSF) war das Durchflußvolumen der Mikroinjektionspumpe auf  $20\mu\text{l}$  bei einer Geschwindigkeit von  $1,00\ \mu\text{l}/\text{min}$  eingestellt. Dies entsprach einer absoluten Wirkstoffmenge von  $1,5\mu\text{g}$  Baclofen. Dem Vorlauf entsprechend folgte alle 20 Minuten eine Abnahme der Dialysate bis zu einer Anzahl von 6.

Zum Abschluß wurde die Sonde wieder aus dem Gehirn der Ratte entnommen, an den in vitro Stand befestigt und mit der Standard-Substanz 3 Nachrecoveries entnommen. Die Pumpeneinstellungen entsprachen denen der Recovery.

Abbildung 3.1.4: Arbeitsplatz Stereotaxie und Mikrodialyse mit Pumpen und Stereotaxierahmen



Um einem Verkleben der Sonden-Membran vorzubeugen, wurde die Sonde mit Aqua dest durchgespült und bis zum nächsten Gebrauch in derselben Flüssigkeit belassen, um die empfindliche Membran gegen Austrocknung zu schützen.

Die Bestimmung der Vor- und Nachrecoveries diente lediglich zur Überprüfung der Mikrodialysekanülen auf deren Unversehrtheit.



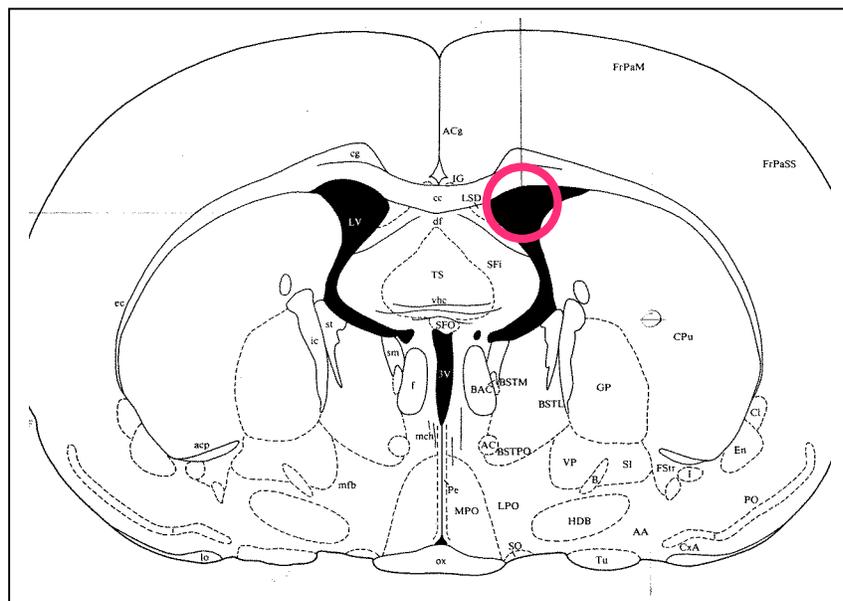
Austausch der zu implantierenden Kanülen als Koordinaten für die Stereotaxie, danach wurde eben geschildertes Procedere wiederholt.

Die Injektionskanüle zur intraventrikulären Baclofengabe wurde ebenfalls in einem Winkel von 20 Grad, allerdings von anterior implantiert. Daher mußte auch hier die Koordinatenbestimmung, wie bereits geschildert, indirekt mit dem Dummy erfolgen.

Die ermittelten Koordinaten bezogen auf die Interaurallinie besaßen folgende Werte:

**Abbildung  
3.2.2:  
Zielpunkt  
Seitenventrikel**

Anterioposterior : +7,7 mm  
Lateral : +2,0 mm  
Ventrodorsal : +6,5 mm

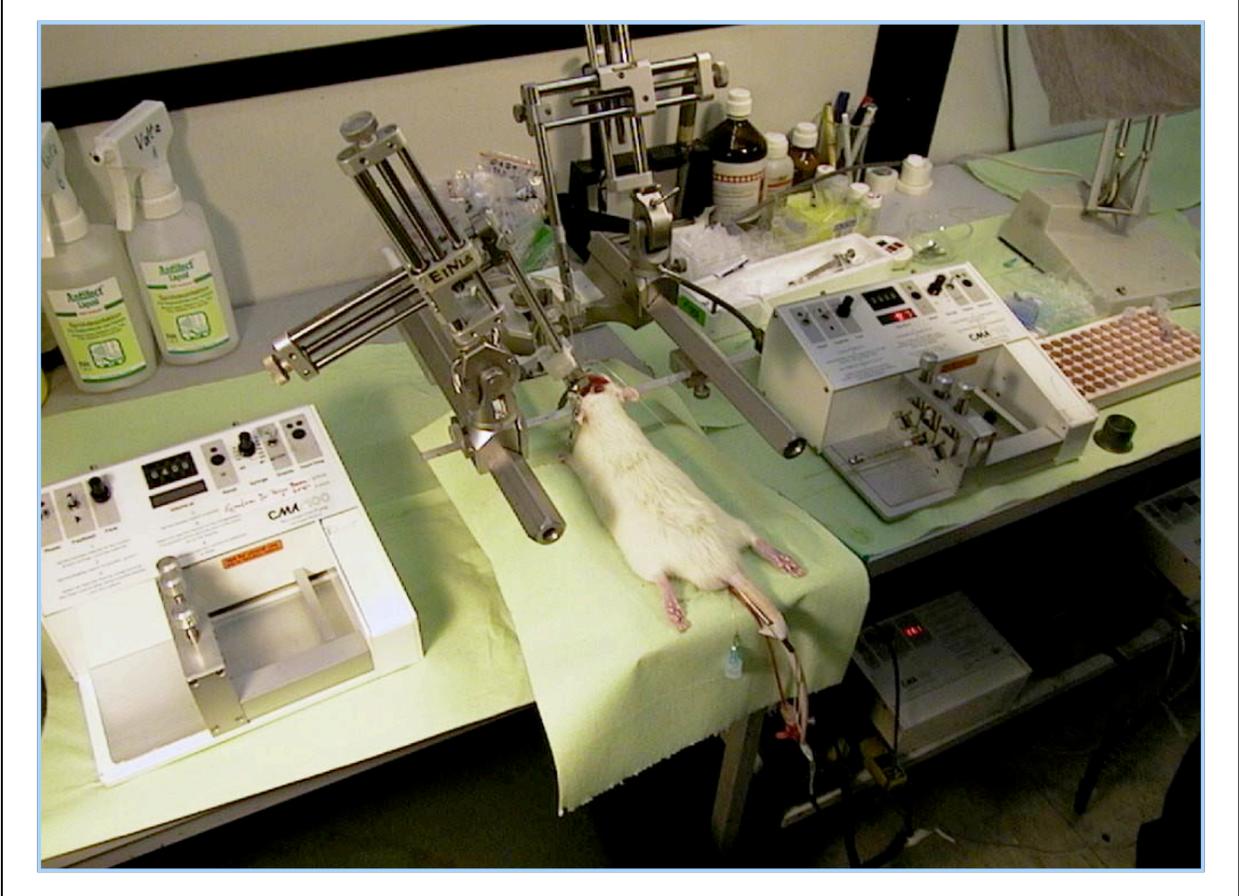


### 3.2.2 Implantation

Nach Narkoseinduktion und Anlage der Blutdruckmeßkanüle wurden die Tiere in das Stereotaxiegestell eingespannt. Dazu wurden die beiden Fixierstifte in die Gehörgänge eingeführt, der Kopf mittig positioniert und der Oberkiefer mit Hilfe eines in der Vertikalen zur Interauralebene verstellbaren Schneidezahnhalters nach Vorschrift des Stereotaxieatlanten (Paxinos, 1989) auf +1 mm fixiert. Nach Freilegung des Schädelknochens und eventuell nötiger Blutstillung an der Galea, wurde linksseitig etwa 5 mm caudal der Sutura coronaria und lateral der Sutura sagittalis rechteckig auf einer Größe von ca. 5 x 4 mm mit Hilfe eines Kleinbohrers trepaniert und die freigelegte Dura mater mit einer umgebogenen Stahlkanüle perforiert und anschließend retrahiert, um eine Beschädigung der empfindlichen Mikrodialyse-Kanülen zu vermeiden. Die Trepanation für den Zugang der Injektionskanüle zum Seitenventrikel wurde rechtsseitig

unmittelbar caudal der Sutura coronaria und lateral der Sutura sagittalis in gleicher Weise angelegt. Die beiden Kanülen wurden mit Hilfe des Stereotaxierahmens implantiert und die Messungen durchgeführt (siehe Abb.3.2.3).

Abbildung 3.2.3: Arbeitsplatz Stereotaxie und Mikrodialyse



## 3.3 Die Mikrodialyse

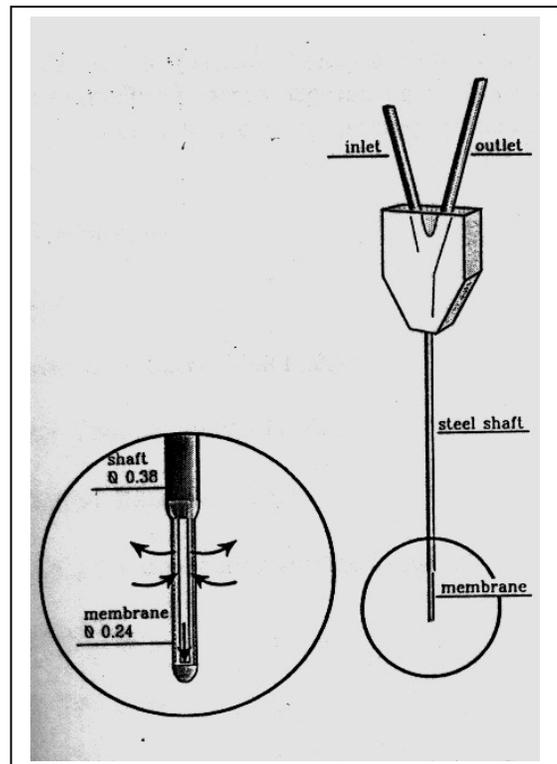
### 3.3.1 Grundlagen

Die Mikrodialyse-Technik beruht auf dem Prinzip der Diffusion durch eine selektiv permeable Membran. Hierbei werden CMA/11- Kanülen verwendet, deren Membran nur für Moleküle mit einer Größe von bis zu 6000 Dalton durchlässig sind. Die Kanülen werden mit artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (aCF) perfundiert. In der Perfusionsflüssigkeit darf sich keine der zu untersuchenden und membrangängigen Substanzen befinden. Durch das Konzentrationsgefälle zwischen dem Extrazellularraum des Gehirns und der Perfusionsflüssigkeit erfolgt eine Diffusion der entsprechenden Substanzen aus dem Extrazellulärraum durch die Dialyse-Membran in die Perfusionsflüssigkeit. Das Perfusat wird über den Auslassschlauch der Kanüle gesammelt und mit den entsprechenden analytischen Techniken (HPLC) auf ihre Zusammensetzung hin untersucht.

#### 3.3.1.1 CMA/11- Mikrodialyse-Kanüle

Die CMA/11-Kanülen gehören in die Gruppe der konzentrischen Sonden. Sie bestehen aus einem Stahlschaft und einer inneren und äußeren Membran (Abb.3.2).

Der Stahlschaft weist einen Durchmesser von 0,38 mm und eine Länge von 14 mm auf. Der Durchmesser der inneren Membran beträgt 0,21 mm , der äußeren 0,24 mm. Die innere Kanüle besteht aus Silikon. Einlaß und Auslaß der Sonde werden mit FEP- Schläuchen verbunden. Die maximale Durchtrittsgröße von Molekülen beträgt 6000 Dalton.



**Abbildung 3.3.1:**  
CMA/11  
Mikrodialysekanüle

### 3.3.1.2 Perfusionsflüssigkeit

Die für die Mikrodialyse benutzte Perfusionsflüssigkeit ist isoosmotisch und proteinfrei und setzte sich wie folgt zusammen:

130,9 mmol/l	Na <sup>+</sup>
5,4 mmol/l	K <sup>+</sup>
1,84 mmol/l	Ca <sup>2+</sup>
111,7 mmol/l	Cl <sup>-</sup>
28,3 mmol/l	Lactat

Die Titrationsazidität betrug 0,5-2,0 mmol NaOH/l, der pH-Wert 5-7. Die theoretische Osmolalität 276 mosm/l. Die Perfusionsflüssigkeit entsprach somit einer Ringer-Lactat-Lösung.

Eine Vorbehandlung des Perfusates zur Proteineextraktion entfiel, da die verwendete Perfusionslösung proteinfrei ist und die Mikrodialysesonden eine Membramgängigkeit nur bis zu einer Molekülgröße von 6000 Da erlaubten, sodass Makromoleküle nicht im Perfusat erscheinen und die Analytik beeinflussen konnten.

### 3.3.1.3 Absolute und Relative Recovery

Die Mikrodialyse mit den hier verwendeten CMA-Mikrodialyse-Sonden wird für die Analyse von Substanzen bis 6000 Dalton Molekulargewicht verwendet. Da die Mikrodialyse keine direkten Proben der interstitiellen Flüssigkeit gewinnt, konnten die im Dialysat gesammelten Substanz-Konzentrationen nur als Spiegelung des tatsächlichen Substanzgehaltes des Extrazellulärraums betrachtet werden. Zetterström et al. (1982) waren die ersten, die die Substanz-Konzentration im Dialysat in interstitielle Substanz-Konzentration des Gehirns überführt und dabei den Begriff „Recovery“ geprägt haben.

Die Recovery oder relative Recovery wurde definiert als das Verhältnis zwischen der Konzentration einer bestimmten Substanz im Dialysat und der Konzentration derselben Substanz im die Dialyse-Sonde umgebenden Medium. Die absolute Recovery bezeichnete den Gehalt einer gewonnenen Substanz im Dialysat pro Zeiteinheit. Für die verwendeten CMA/11 Mikrodialysesonden mit der festgelegten Perfusionsgeschwindigkeit von 1,75 µl/min beträgt die relative Recovery ca. 20-25%.

### **3.3.2 Methodik der Mikrodialyse**

#### **3.3.2.1 Kalibrierung**

Nach Entnahme der CMA/11-Kanüle aus der Packung wurde der Einlaß und Auslaß der Kanüle über FEP-Schläuchen (i. D. 0,12 mm) mit der entsprechenden Milliliterspritze (1 ml oder 2,5 ml) der CMA/150 Mikroinjektions-Pumpe verbunden. Aus Sicherheitsgründen wurde am Verbindungsstück zwischen der Kanüle und den FEP-Schläuchen ein Tropfen Sekunderkleber aufgetragen, um eine optimale Dichte zu gewährleisten. Die Sonde war an einem in vitro Stand Eigenbau befestigt und ragte mit ihrer Membran in einen Eppendorf-Cup mit der entsprechenden Standard-Substanz.

In der Milliliterspritze befand sich aCSF, der Schlauch am Auslaß mündete in ein leeres Eppendorf-Cup, worin die Recovery gesammelt wurde.

Zu Beginn mußte darauf geachtet werden, daß sowohl der Verbindungsschlauch zwischen der Pumpe und der Sonde, als auch der Schlauch am Auslaß einmal mit aCSF Lösung durchgespült wurde und das sich keine Luftbläschen im Schlauch befanden. Auch sollte das Perfusionsmedium Raumtemperatur aufweisen und entgast sein. Sobald die Dialyse-Membran dem Perfusionsmedium ausgesetzt war, wurde Glycerol aus der Membran herausgespült, was die Anfälligkeit für Beschädigung durch Austrocknung erhöhte. An der Mikroinjektions-Pumpe wurde ein Durchflußvolumen von 35µl mit einer Geschwindigkeit von 1,75 µl/min eingestellt. Die Perfusionsflüssigkeit wurde gegen eine wässrige Standard-Lösung mit Dopamin ausgetauscht. Das Perfusionsmedium war mit dem Lösungsmittel der Standard-Substanz identisch. In einem zeitlichen Intervall von 20 Minuten wurden nun drei Recoveries gewonnen, die mittels der HPLC analysiert wurden, um die Funktionsfähigkeit der Mikrodialyse-Sonde zu überprüfen.

### **3.3.2.2 Probengewinnung durch die Mikro dialyse**

Nach Implantation der Mikro dialyse-Kanülen wie unter den Kap. 3.2.2 beschrieben erfolgte die Mikro dialyse und Gewinnung der Proben wie unter 3.1.3 dargestellt über sechs Stunden, sodass bei der Durchflußgeschwindigkeit von 1,75 µl/min durch die Kanüle alle 20 Minuten ein Eppendorf-Cup mit 35 µl Dialysat zur Analyse erhalten wurde. Diese Samples wurden entweder direkt in die HPLC über den Autosampler eingegeben oder zunächst bei –80°C tiefgefroren zwischengelagert nachdem jeweils 5µl Perchlorsäure (PCA) als Radikalfänger zugegeben wurde.

## 3.4 Die Chromatographie

### 3.4.1 Untersuchungsmaterial

Die zu bestimmenden Proben wurden mittels Mikrodialyse (MD) gewonnen. Die Fraktionen wurden für mind. 24h bei  $-80^{\circ}$  C gelagert. Es wurde jeweils ein Injektionsvolumen von 20  $\mu$ l in die HPLC injiziert.

### 3.4.2 Herstellung der Mobilen-Phasen

#### 3.4.2.1 Herstellung der Mobilen – Phase für die Elektrochemische Detektion

Natriumacetat:	0,1 M (41,015g)
Octansulfonsäure:	1.8 M (2,11g)
Titriplex III:	0,3 M (0,58g)
Methanol:	16% (800ml)

Die oben angegebenen Mengen wurden in bidest.Wasser und Essigsäure (99,8%) gelöst, so daß eine Lösung mit einem pH-Wert von 4,45 und einem Gesamtvolumen von 2000 ml entstand (die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf dieses Gesamtvolumen).

#### 3.4.2.2 Herstellung der Mobilen – Phase für die Fluoreszenzdetektion

Natriumacetat:	0,22 M (27,22 g)
Borsäure:	0,013 M (2,06 g)
Methanol:	22% (564ml)

Die oben angegebenen Mengen wurden in bidestilliertem Wasser so gelöst und mit Natriumhydrogenphosphat gepuffert, dass eine Lösung von 2000 ml und einem pH-Wert von 6,75 entstand.

### 3.4.3 Herstellung der Standards

#### 3.4.3.1. Herstellung der Standards für die Elektrochemische Detektion

Die unter 2.1.2.1 genannten Chemikalien wurden mit Perchlorsäure 0,1M verdünnt. Danach wurden alle Einzelsubstanzen so zusammengegeben, daß ein Gesamtstandard von 50 pg und 100 pg / 20µl Injektionsvolumen entstand.

#### 3.4.3.2. Herstellung der Standards für die Fluoreszenzdetektion

Die unter 2.1.2.2 genannten Chemikalien wurden mit Aqua bidest (Millipore) so verdünnt, daß ein Standard mit 100pg / 20µl entstand.

### 3.4.4. Die HPLC

#### 3.4.4.1 Grundzüge

HPLC ist die Abkürzung für **H**igh-**P**erformance-**L**iquid-**C**hromatographie und fand als chromatographisches Meßverfahren bereits 1952 durch Kemula ihre Anwendung, kam aber, bis Adams und Mitarbeiter 1973, (Kissinger et al., 1973, Refshauge et al., 1974; Thrivikraman et al., 1974) die HPLC zu Analyse von Catecholaminen und Ascorbinsäure verwendeten, nur wenig zum Einsatz. Eng mit der HPLC in Verbindung steht die Mikrodialyse, da sie wässrige, filtrierte Lösung polarer Analysate von geringem Volumen liefert.

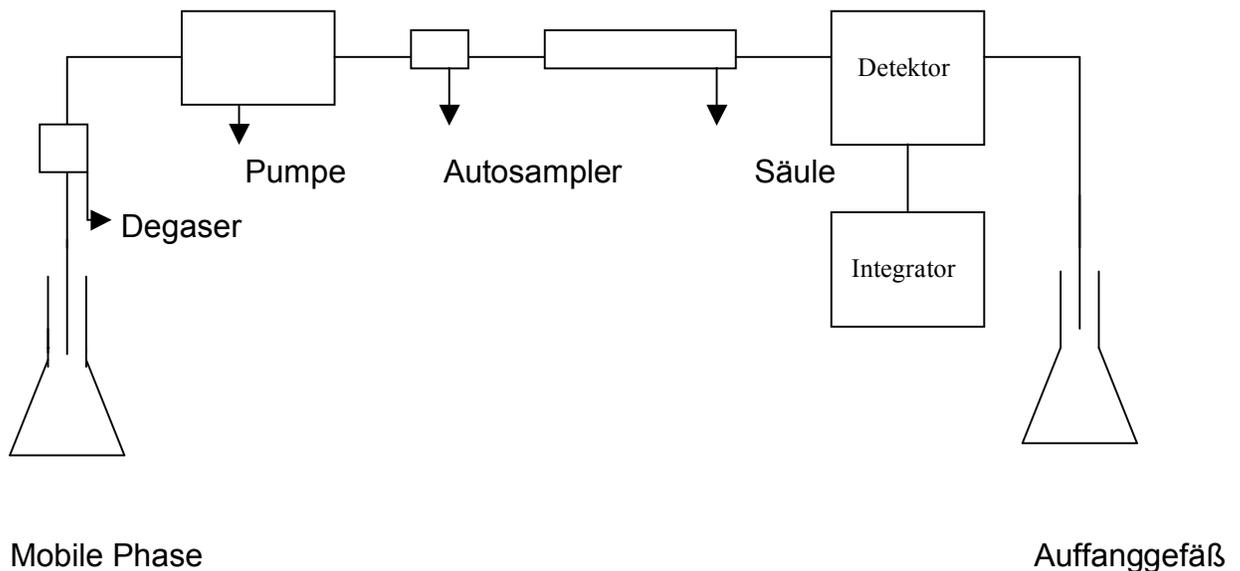
**Abbildung 3.4.4:**  
Arbeitsplatz HPLC



### 3.4.4.2 HPLC-Apparatur

Das HPLC-System besteht aus mehreren Komponenten. Kernstück hierbei ist die chromatographische Säule, die die verschiedenen Substanzen in einer Probe gemäß ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften auftrennt. Stichwort sei hier das Prinzip der „differenten Migrationsrate“, d.h. verschiedene Analysate bewegen sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Chromatographie-System. Die übrigen Komponenten dienen lediglich dazu die chromatographischen Bedingungen herzustellen respektive sie zu kontrollieren, Substanzen zu detektieren, sie zu Erfassen und Auszuwerten.

Ein einfaches HPLC-System, welches wir in unserer Studie benutzten, arbeitet mit einer konstanten Fließmittelzusammensetzung, es ist isokratisch. Folgende Abbildung skizziert den Aufbau einer HPLC-Anlage wie wir sie in unserer Studie verwandten.



Aus: Handbuch der HPLC, K.K. Unger (1998), GIT Verlag; Darmstadt/Deutschland

#### **3.4.4.3 Mobile Phase:**

Die mobile Phase diente als Fließmittel. Wie bereits erwähnt, wurde durch das isokratische HPLC-System eine konstante Fließmittelzusammensetzung verwendet. Diese ist unter Punkt 3.4.2 zusammengestellt. Wir arbeiteten in unserer Studie mit der Reversed-Phase-Chromatographie, d.h. die stationäre Phase ist weniger polar als die mobile Phase. Damit eine erfolgreiche Trennung gewährleistet ist, muß das Fließmittel bestimmte Kriterien erfüllen:

- die Substanzprobe muß im Fließmittel löslich sein
- die stationäre Phase muß vom Fließmittel benetzt werden
- es muß sich ein Verteilungsgleichgewicht der gelösten Probe zwischen den beiden Phasen einstellen
- die Probe muß die Säule wieder vollständig verlassen können

Um diese Kriterien zu erfüllen, verwendeten wir in unserer Studie eine Supelcosil LC18 Säule, für die elektrochemische Detektion, für die Fluoreszenzdetektion eine Nukleosil 120 C18 und eine als stationäre Phase und als Fließmittel die unter 3.4.2 beschriebenen Mobilen – Phasen.

#### **3.4.4.4 Autosampler:**

Der in unserer Studie benutzte Autosampler arbeitet mit zwei getrennt schaltbaren Systemen. System A arbeitet mit einem Injektionsvolumen von 20 µl und einer Integrationszeit von 20 Minuten. Wir verwenden es für die Catecholaminbestimmung und die Hydroxyindolbestimmung. System B, welches wir für die Aminosäurenbestimmung einsetzen, arbeitet zusätzlich mit einer Derivatisierungsfunktion. Bei der Derivatisierung reagiert das aus dem Tierversuch gewonnene Dialysat mit einer Reagenz (OPA-Reagenz) für eine vorgegebene Reaktionszeit, bevor es in den Chromatographiekreislauf injiziert wird. Injektionsvolumen sind auch hier 20 µl, jedoch aus einer Mischung von OPA-Reagenz und Dialysat. Die Integrationszeit für System B beträgt 30 Minuten.

#### **3.4.4.5 Pumpen:**

Bei der in der vorliegenden Studie gebrauchten Pumpen (Punkt 2.3.3) handelt es sich für die Catecholamin/Hydroxyindol – Anlage um eine Doppelkolbenpumpe mit kurzem Hub. Das Fließmittel wird hier direkt von einem aus Saphir bestehenden Kolben verdrängt. Die Aminosäuren – Anlage arbeitet mit einer Einkolbenpumpe. Die Doppelkolbenpumpe hat gegenüber der Einkolbenpumpe den Vorteil, daß Pulsationsschwankungen verringert werden, die sich auf das Meßergebnis auswirken können. Um starke Schwankungen zu verhindern haben wir hinter die Einkolbenpumpe zusätzlich noch einen Pulsationsdämpfer geschaltet.

#### **3.4.4.6 Säulen:**

Die Säule beinhaltet im HPLC-System die stationäre Phase. Vorliegende Studie verwendete in Punkt 2.3.3.1 aufgeführten Säulen. In der Säule befindet sich ein Packungsmaterial - hier C<sub>18</sub>. Die stationäre Phase ist ein dünner Film zwischen den porösen Teilchen an den Porenwänden dieses Packungsmaterials. Von diesem Film gehen Anziehungskräfte aus, die die zu bestimmenden Substanzen für eine gewisse Zeit festhalten können (Adsorption) und sie nach dieser Verweilzeit auch wieder an das Fließmittel abgeben können (Desorption). Außerdem spielt noch die Anziehung (Attraktion) der Substanzen durch die stationäre Phase eine große Rolle, denn sie verhält sich proportional zur Verweilzeit der Substanz.

Sämtliche o.g. Faktoren haben selbstverständlich auch Einfluß auf die Retentionszeiten der zu messenden Substanzen. Unter der Retentionszeit versteht man die Zeit, die eine Substanz benötigt um von der Injektionsvorrichtung bis zum Säulenende zu gelangen. Die Retentionszeit ist für die jeweilige Substanz unter unveränderten Meßbedingungen konstant. Sie ist nötig, um einen erfaßten Peak als eine bestimmte Substanz zu identifizieren (siehe Auswertung).

#### **3.4.4.7 Detektoren:**

In der vorliegenden Studie gebrauchten wir die unter Punkt 2.3.3 beschriebenen Detektoren. Es handelt sich hierbei zum einen um einen elektrochemischen Detektor, der sich lediglich für oxidierbare bzw. reduzierbare Substanzen eignet und mit dem wir eine Nachweisgrenze von 1pg/ml erreichen.

Catecholamine und 5-Hydroxyindole lassen sich oxidieren und wieder reduzieren. Dabei werden durch Oxidation die phenolischen Verbindungen in Chinone überführt, bzw. die Chinole in phenolische Verbindungen überführt. Aus den dabei freigesetzten Elektroden resultiert Strom, der sich proportional zu der jeweilig oxidierten bzw. reduzierten Substanz verhält (Levich 1962).

Für die Aminosäuren verwendeten wir die Fluoreszenzdetektion. Dabei werden die zu untersuchenden Substanzen, in unserem Falle die Aminosäuretransmitter Aspartat und Glutamat, mit einer definierten Dosis und Frequenz elektromagnetischer Strahlung (UV-Licht, 300nm Wellenlänge) angeregt, und die emittierte Strahlung (ebenfalls UV-Licht einer exakt definierten Wellenlänge, 360nm) mit Hilfe einer hochempfindlichen Photozelle gemessen. Die Anregung und Emission elektromagnetischer Strahlung ist physikalisch als Fluoreszenz definiert und gab der Methode ihren Namen.

#### **3.4.4.8 Integrator:**

Der in unserer Studie benutzte Integrator wandelt die vom Detektor kommenden Daten in Graphen um und errechnet ggf. Konzentrationen. Um aus den Daten die Konzentrationen zu gewinnen, muß der Integrator vor einer Messung kalibriert werden. Bei der durchgeführten Zweipunkt-Kalibration injiziert man jeweils einen Standard niedrigerer Konzentration (50 pg) und einen Standard höherer Konzentration (100 pg). Die Genauigkeit der Zeitpunktkalibration ist durch die lineare Adsorptionsgerade der Substanzen gegeben, sodass die Steigung der Eichkurve mittels zweier Messpunkte mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen ist. Die nun folgenden zu analysierenden Proben werden nun mit diesen Richtkonzentrationen im Sinne einer Eichgeraden verglichen und die jeweilige Konzentration der Substanz berechnet.

### **3.5. Auswertung der gewonnenen Daten**

#### **3.5.1 Die Blutdruckauswertung**

Die mit Hilfe des Servomed Blutdruckmonitors (siehe Punkt 2.3.1) auf Millimeterpapier mit einer Papierlaufgeschwindigkeit von 5mm / min aufgezeichneten systolischen und diastolischen Blutdrücke wurden zeitlich mit den während des Versuchs markierten Eventmarks (z.B. für den Beginn des Vorlaufes Nr.1, die Injektion von Chloralhydrat etc.) korreliert. Dabei entsprach 1mm auf dem Papier einer Druckänderung von 2mm Hg. Der zeitliche Verlauf der Druckkurven wurde für diastolischen Druck, der jeweils den rechten Rand des Graphen darstellte, und den systolischen Druck, der durch den linken Rand des aufgezeichneten Graphen dargestellt wurde, getrennt in Intervallen von je fünf Minuten vom Papier abgelesen. Dabei wurde bei jedem Versuch der erste Wert mit Beginn des ersten Vorlaufes erhoben ( in der Regel etwa 120 bis 130 Minuten vor dem Injektionsbeginn in den Ventrikel) und dies fortgeführt bis zum Ende des letzten Dialysats ( in der Regel 120 Minuten nach dem Injektionsbeginn). Die erhaltenen Daten wurden als Datentriplets EDV-technisch gespeichert.

Aus den Daten des Verlaufs wurde jeweils der Mittelwert gebildet und dieser als 100% = 1 angenommen. Zu diesem Mittelwert wurden dann alle weiteren Blutdruckwerte für das Versuchsintervall  $t > 0$  min relativiert und in prozentualen Werte dargestellt. So konnten die interindividuellen Unterschiede im Ausgangsblutdruck statistisch bereinigt werden. Diese so erhaltenen Druckkurven wurden entsprechend dem Versuchsablauf zwei Gruppen zugeordnet:

1. Versuche mit aCSF-Injektion in den lateralen Ventrikel
2. Versuche mit Baclofen-Injektion in den lateralen Ventrikel

Die weiter erhobenen Daten vor allem der Mikrodialyse, der Temperatur und aller applizierten Substanzen (Chloralhydrat, Flüssigkeit) wurden den Experimenten entsprechend zu den Blutdruckkurven im zeitlichen Verlauf zugeordnet, sodass es möglich war, Veränderung des klinischen Parameters arterielle Blutdruck mit bestimmten Events oder Transmitterveränderungen zu korrelieren.

### 3.5.2 Qualitätskontrolle und Auswertung der HPLC-Daten

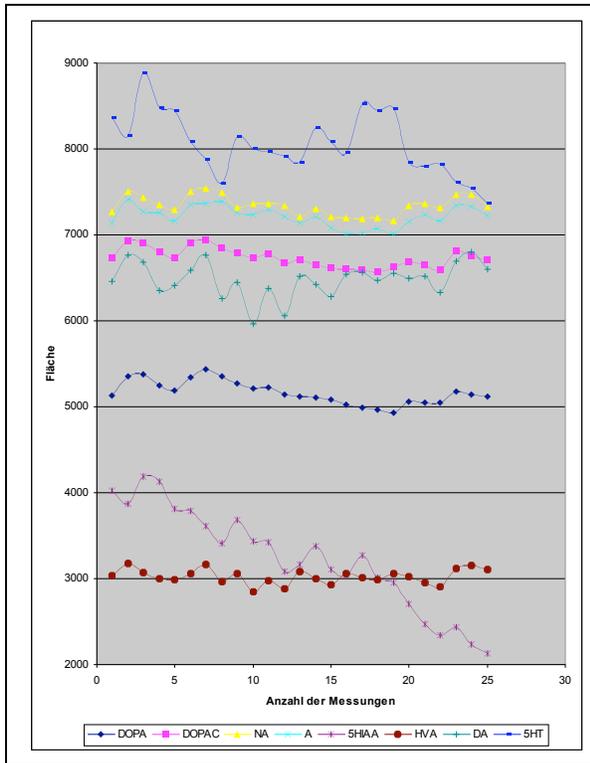
Vor den eigentlichen Versuchen war es zunächst notwendig, die zu messenden Substanzen in einem zu erwartenden „Cocktail“ verschiedenster Aminosäuren und Transmittermetabolite zweifelsfrei zu erkennen und danach auch die Reliabilität der Messwerte unserer HPLC-Anlage zu erfassen.

Hierzu wurden zunächst die einzelnen zu messenden Substanzen in definierter Menge (100pg) in Perfusionsflüssigkeit gelöst und gemessen. Dadurch konnten zunächst die Retentionszeiten für jede Einzelsubstanz bestimmt werden. Danach wurde ein Gemisch aus allen zu messenden Substanzen mit jeweils 100pg erstellt und ebenfalls gemessen, um eventuell auftretende gegenseitige Beeinflussung der Substanzen auszuschließen (Abb. 3.5.2.1 zeigt ein Beispielchromatogramm eines solchen Standards).

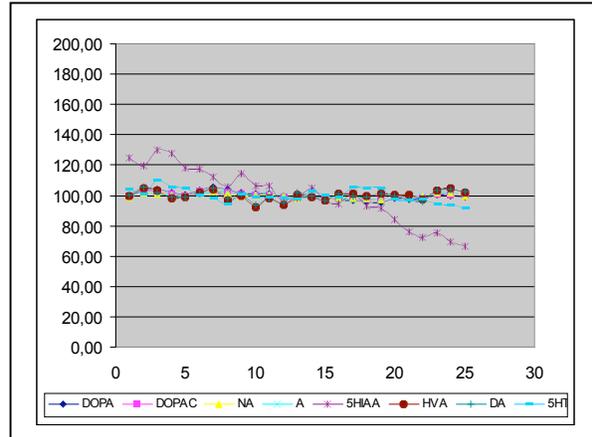
Evtl. auftretende Störpeaks wurden durch Leermessung des reinen Perfusats ohne weitere Substanzen erkannt und eliminiert.

Danach wurde die Genauigkeit des HPLC-System überprüft. Hierzu wurden 25 aufeinanderfolgende Standard-Läufe mit allen zu bestimmenden Substanzen (Glutamat, Aspartat, Dopamin, DOPA, DOPAC durchgeführt. In den Abb. 3.5.2.2 und 3.5.2.3 sind die Ergebnisse der Einzelmessungen auch der weiteren untersuchten Substanzen der anderen Autoren (5HIAA, Serotonin, Adrenalin, Noradrenalin) dargestellt, sowie deren prozentuale Abweichung vom Sollwert (100pg). Die Streuung der Ergebnisse lag unter +/- 10%. Lediglich der lineare Abfall der 5HIAA-Werte um etwa 40% war auffällig, ist aber durch die nichtenzymatische Spaltung der instabilen Verbindung während der Zeit im Autosampler zu erklären und aufgrund der direkten Eingabe der Proben während der Tierversuche in die HPLC ohne Konsequenz für die Studien.

**Abbildung 3.5.2.2:** Ergebnisse der Standard-Wiederholungsmessungen mit der Katecholamin/Hydroxyindol- und der Aminosäure-HPLC



**Abbildung 3.5.2.3:** Prozentuale Umrechnung der Standard-Wiederholungsmessungen mit der Katecholamin/Hydroxyindol- und der Aminosäure-HPLC



Die schließlich in den Dialysaten gemessenen Rohwerte wurden in gleicher Weise, wie für den Blutdruck beschrieben, normiert und in zeitlichen Verlauf gebracht:

Die Vorlaufwerte wurden gemittelt und als Wert 100% = 1 angenommen. Alle weiteren Messwerte wurden auch hier wieder als Prozentwerte des Vorlaufmittelwerts angenommen. Auf die Angabe von Konzentrationen wurde deshalb verzichtet.

### **3.5.3 Statistische Bearbeitung der Daten**

Für die statistische Bearbeitung serieller Messungen wird in der Literatur häufig die Methode verwendet, Gruppen an einer Serie einzelner Messpunkte zu vergleichen. Dabei werden die Werte zu den einzelnen Messzeitpunkten mittels t-Test oder Wilcoxon-Mann-Whitney Test verglichen.

Dieses Verfahren ist aus der Sicht des Biomathematikers nicht einwandfrei, da in der Regel nicht vor Studienbeginn definiert wurde, zu welchem Zeitpunkt die generierte Hypothese überprüft wird. Die seriellen Messwerte sind keine unabhängigen Messwerte, da sie durch die zuvor und danach ermittelten Messwerte beeinflusst werden (Matthews, 1990).

Matthews hat daher vorgeschlagen, Gruppen mit seriellen Messwerten in einer anderen Weise zu vergleichen. In einem ersten Schritt wird für jeden individuellen Verlauf die Fläche unter der Kurve (area under the curve = AUC) berechnet.

In einem zweiten Schritt können dann mit einfachen Testverfahren, wie dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, die AUC der beiden Gruppen verglichen werden. Dieses Verfahren lässt auch für die hier durchgeführte explorative Untersuchung multipler Neurotransmitter und ihrer Metabolite valide Aussagen zu (Matthews, 1990).

Die Auswertung der Daten in dieser Form erfolgte mit Unterstützung von Herrn Dr. H.H. Müller, Medizinische Informatik, der Philipps-Universität unter Anwendung eines in SAS eigens dafür erstellten Auswerteprogramms.

### **3.6 Histologische Verifikation**

Herr Prof. Dr. H-D. Mennel, Institut für Pathologie, Abteilung für Neuropathologie, legte dar, dass für eine stereotaktische Implantation nach einem allgemein anerkannten und standardisierten Atlas (wir verwendeten Paxinos, 1989) eine histologische Verifikation nicht notwendig sei, sondern die Angabe der Zielkoordinaten ausreichend sei. Wir verzichteten deshalb auf eine Gefrierschnittaufarbeitung der entnommenen Gehirne.

## 4. Ergebnisse der Studie

### 4.1 Allgemein

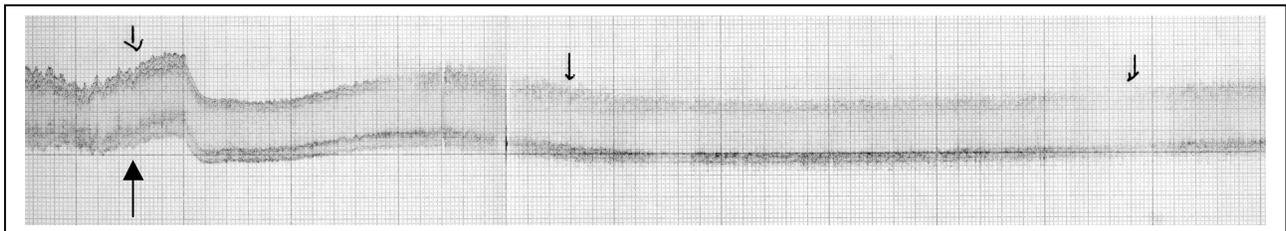
Zur Auswertung konnten in dieser Studie 14 Tiere nach Applikation von 1,5µg Baclofen intrazerebroventrikulär (icv.) und 8 Kontrolltiere mit Applikation eines äquivalenten Volumens aCSF einbezogen werden, bei denen die Aminosäure-Transmitter lückenlos bestimmt werden konnten. Das Injektionsvolumen war mit 20µl standardisiert.

Zum Verständnis der Transmitterergebnisse soll nur kurz auf die Ergebnisse der Blutdruckmessungen eingegangen werden, da dies den entscheidenden erhobenen klinischen Parameter der Versuchsreihe darstellt, ohne den eine Diskussion der Ergebnisse nicht sinnvoll erscheint. Ausführliche Darlegungen zu diesem Thema wurden von Efe T. (2003) veröffentlicht.

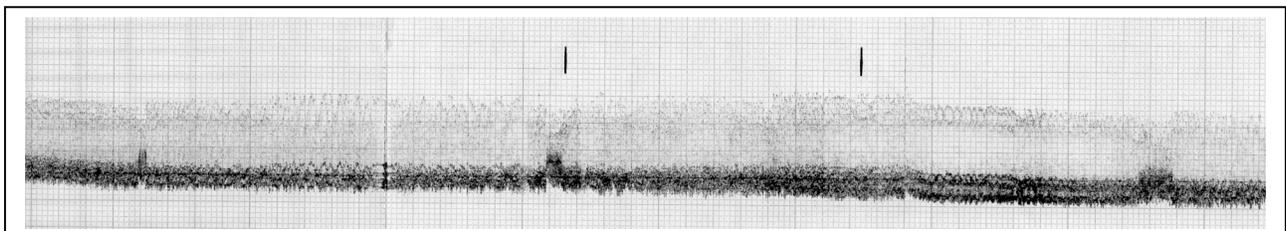
### 4.2 Blutdruck

Die kontinuierliche Blutdruckregistrierung während der Chloralhydratnarkose war gut reproduzierbar, wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, durchzuführen und erbrachte zuverlässige Blutdruckkurven, von denen in Abb. 4.2.1 und Abb. 4.2.2 zwei repräsentative Kurven nach Baclofen-, resp. Placebo-Gabe, in den Seitenventrikel dargestellt sind.

**Abbildung 4.2.1:** Blutdruckverlauf nach 1,5µg Baclofen intraventrikulär ( )



**Abbildung 4.2.2:** Blutdruckverlauf eines Kontrolltiers



Man erkennt im Vergleich beider Graphen deutlich den Blutdruckabfall nach Baclofengabe gegenüber der Kontrollgruppe, sowie den biphasischen Verlauf mit einem Blutdruckanstieg nach etwa zehn Minuten post injektionem und einem weiteren langanhaltenden Blutdruckabfall bei etwa  $t=20$  min (Efe, 2003).

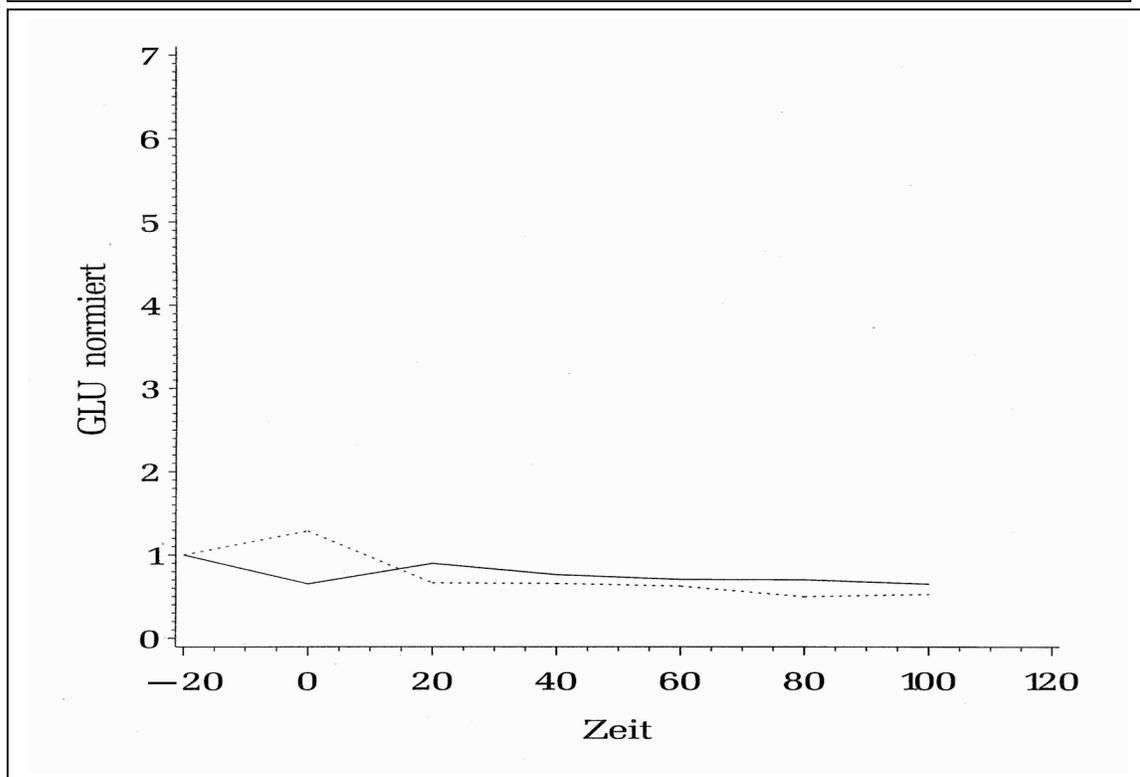
### 4.3 Messung der Aminosäuretransmitter aus dem Dialysat des PAV

Die Aminosäuretransmitter wurden bei 22 Versuchstieren bestimmt. Es handelte sich dabei um 14 Tiere in der Baclofengruppe und 8 Tiere der Kontrollgruppe.

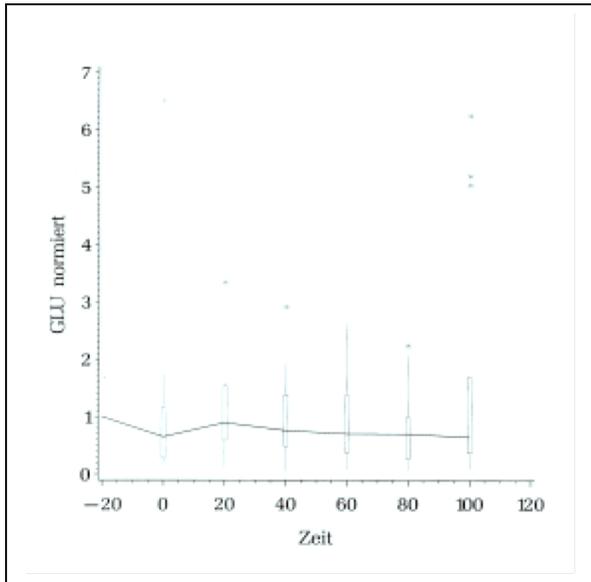
#### 4.3.1. Glutamat

Glutamat konnte bei allen Tieren im Dialysat nachgewiesen werden. Die Mediankurven zeigen in der frühen Phase eine deutliche Auffälligkeit. Glutamat fällt nach der Baclofenapplikation binnen zwanzig Minuten um etwa 35% ab. Dieser Effekt wird noch verstärkt durch einen divergenten Kurvenverlauf im Median der Kontrollgruppe. Die Kurvendifferenz beträgt zu diesem Zeitpunkt sogar 65% (Abb. 4.3.1-3). Würde man einen statistischen Gruppenvergleich mittels t-Test zu diesem Messzeitpunkt durchführen (was methodisch nicht korrekt ist), würde sich hier ein hochsignifikanter Effekt des Baclofens zeigen. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Nivellierung der Verläufe, so dass beim Vergleich der AUC beider Gruppen kein signifikanter Unterschied zu berechnen ist ( $p=0.8746$ ).

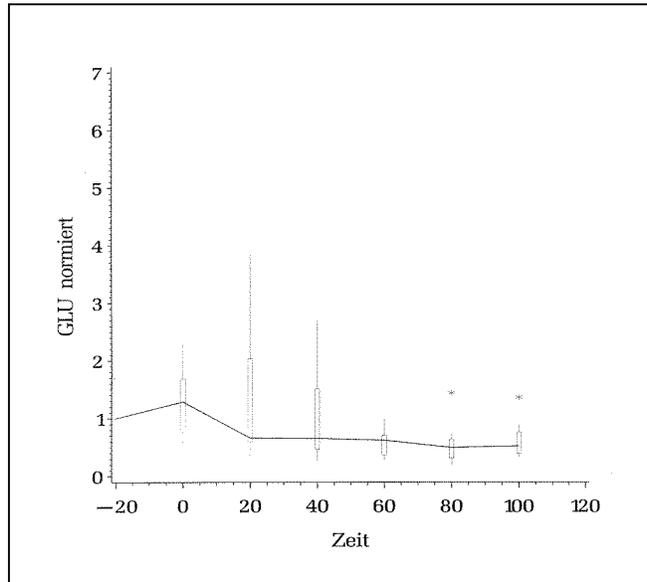
**Abbildung 4.3.1:** Mediankurven für Glutamat in der Baclofen- (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)



**Abbildung 4.3.2:**  
Mediankurve und Boxplots für  
Glutamat der Baclofen­gruppe



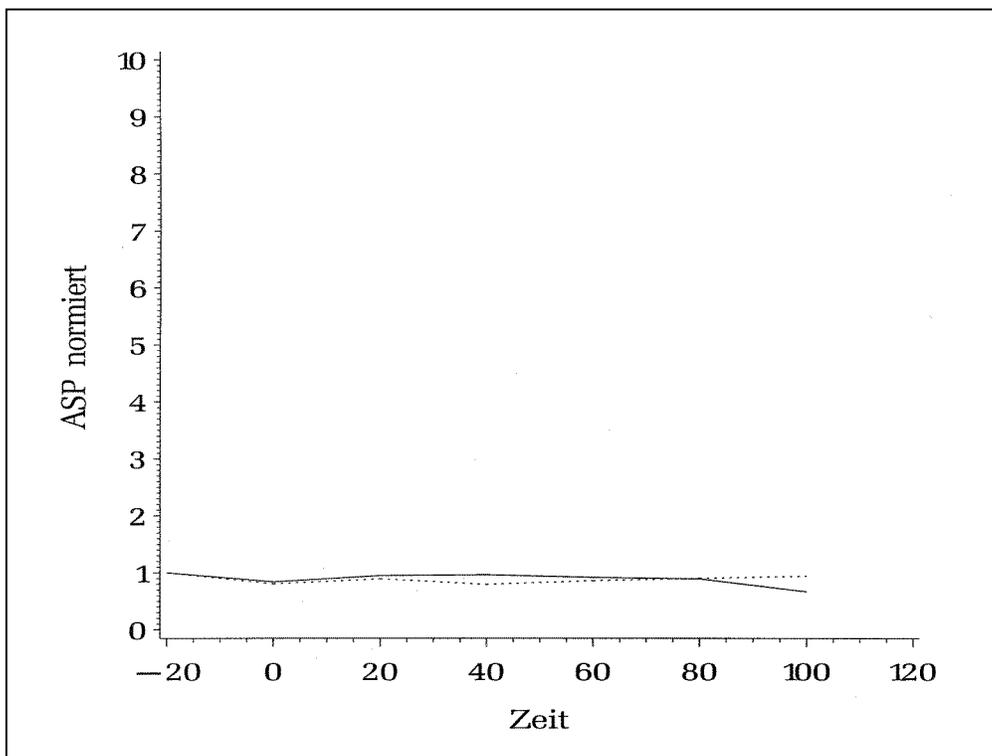
**Abbildung 4.3.3:** Mediankurve und  
Boxplots für Glutamat der Kontrollgruppe



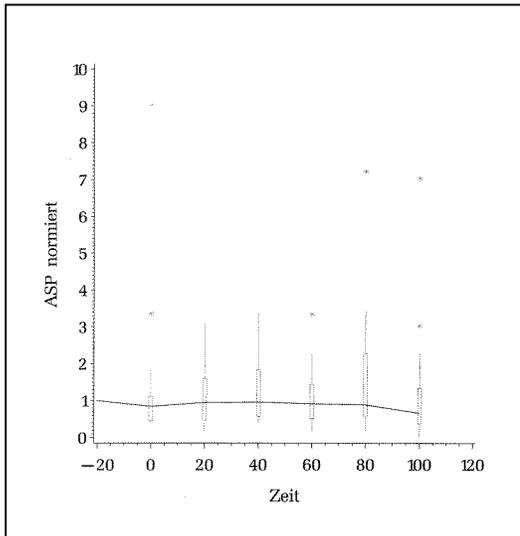
### 4.3.2. Aspartat

Aspartat wurde ebenfalls bei allen 24 Versuchstieren nachgewiesen. Die Verläufe zeigten insgesamt eine geringe Streuung, in der Baclofengruppe etwas stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Die Mediankurven zeigten allenfalls minimale Differenzen der beiden Gruppen (Abb. 40-42). Ein statistisch nachweisbarer Unterschied der AUC ergab sich hieraus nicht ( $p=0.5479$ ).

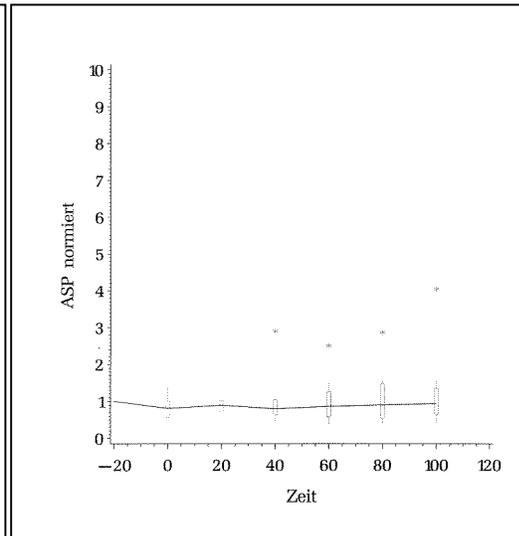
**Abbildung 4.3.4:** Mediankurven für Aspartat in der Baclofen- (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)



**Abbildung 4.3.5:** Mediankurve und Boxplots für Aspartat in der Baclofengruppe



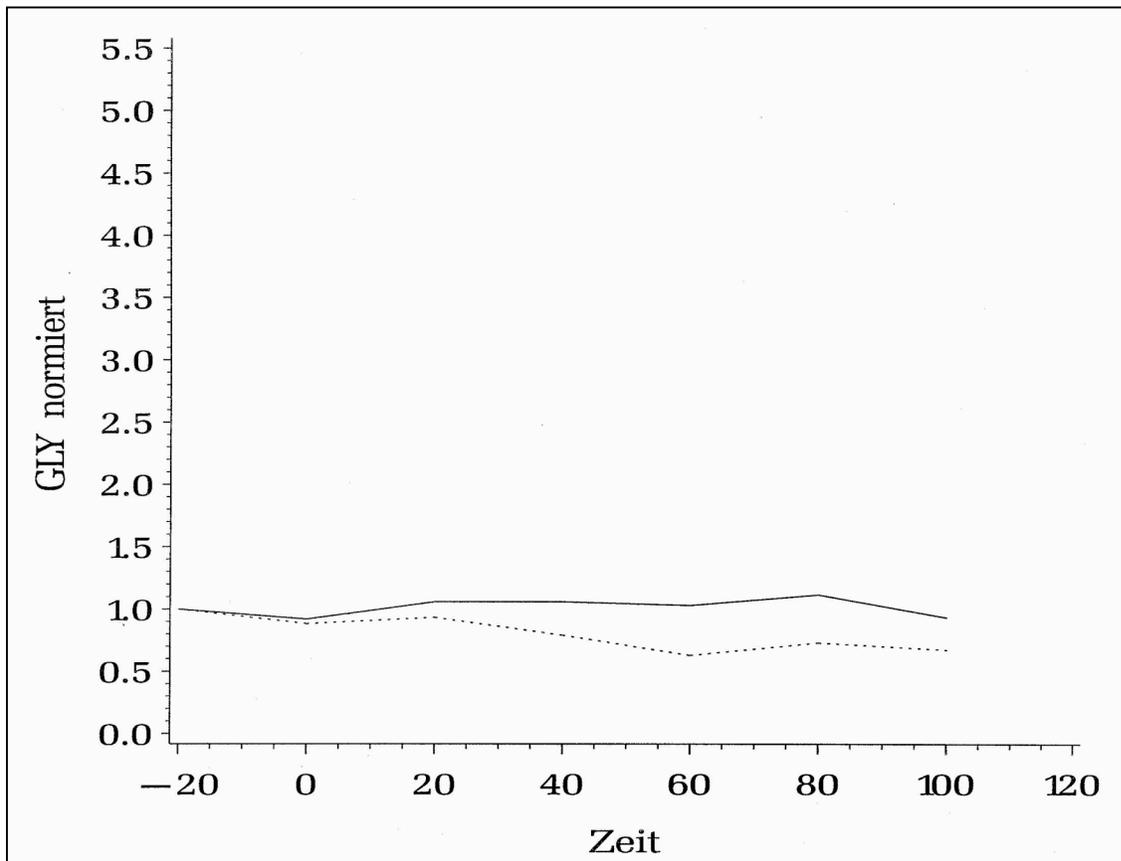
**Abbildung 4.3.6:** Mediankurve und Boxplots für Aspartat in der Kontrollgruppe



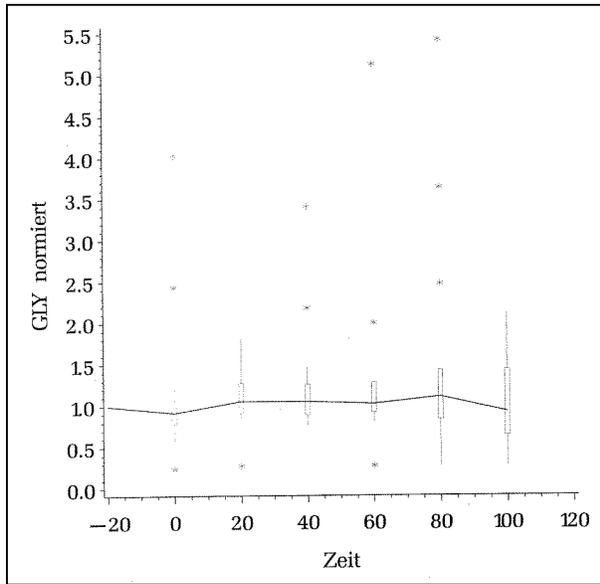
### 4.3.3. Glycin

Die Glycinbestimmung war bei zwei der 14 Baclofenexperimente nicht auswertbar, bei allen übrigen Tieren waren vollständige Messreihen erzielt worden. Die Mediankurven für Glycin in der Verumgruppe zeigten einen progredienten Anstieg der Glycinkonzentrationen nach Baclofengabe divergent zur Kontrollgruppe, der sein Maximum bei  $t=60$  min. hatte. Zu diesem Zeitpunkt lag der Median für die Baclofen-Gruppe um ca. 40% höher als der der Kontrollgruppe (Abb. 4.3.7-9). Der Vergleich der AUC beider Gruppen zeigte ebenfalls einen deutlichen Unterschied, der jedoch aufgrund der langsamen Entwicklung der Kurvendivergenz das Signifikanzniveau nicht erreichte ( $p=0.0756$ ).

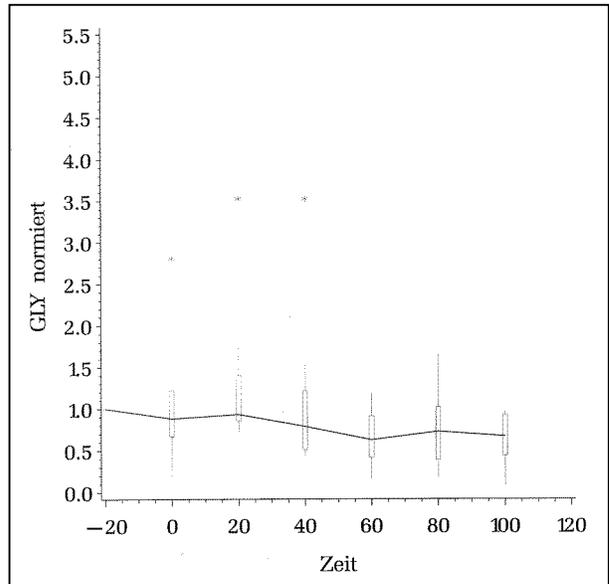
**Abbildung 4.3.7:** Mediankurven für Glycin in der Baclofen- (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)



**Abbildung 4.3.3.2:**  
Mediankurve und Boxplots  
für Glycin in der  
Baclofengruppe



**Abbildung 4.3.3.3:**  
Mediankurve und Boxplots  
für Glycin in der  
Kontrollgruppe

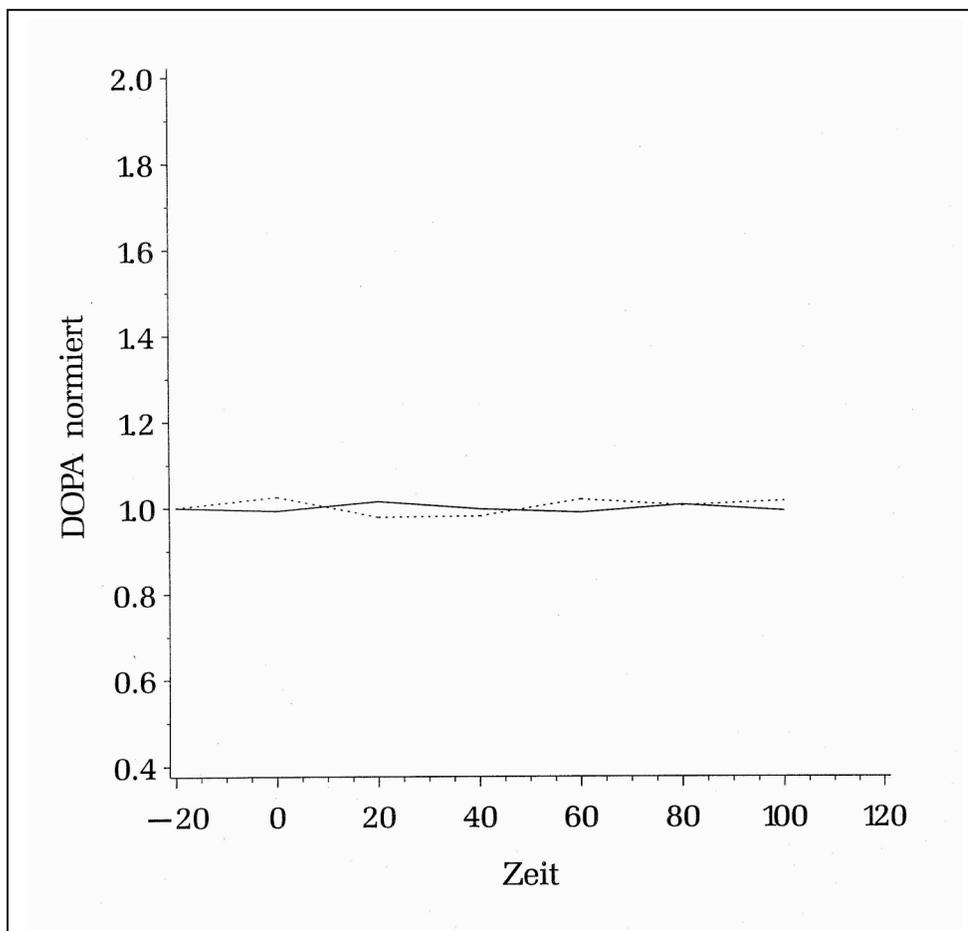


#### 4.4. Messung des Katecholamins Dopamin und seiner Metabolite

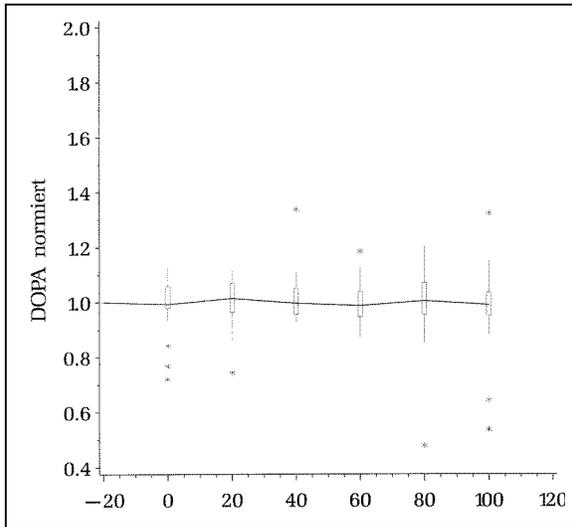
Der eigentliche Transmitter des dopaminergen Systems, das Dopamin, konnte in keiner der erhaltenen Dialysatproben nachgewiesen werden. Daher kann nur indirekt über die Veränderungen des Dopaminvorläufers DOPA und den Dopaminmetabolit DOPAC auf die Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels rückgeschlossen werden.

Dopa konnte bei allen 15 Verumtieren und bei 9 Kontrolltieren gemessen werden. Die Mediankurven (Abbildung 4.4.1) zeigen allenfalls geringe Schwankungen um die Basislinie. Die Kurvenverläufe zeigen insgesamt eine geringe Abweichung (Abbildungen 4.4.2 und 3). Erwartungsgemäß war im Wilcoxon-Mann-Whitney Test kein signifikanter Unterschied zwischen den AUC der Kurven nachweisbar ( $p= 0.8533$ ).

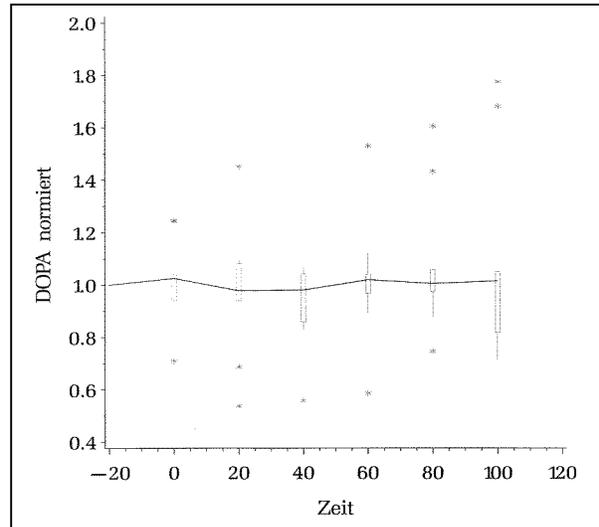
**Abbildung 4.4.1:** Mediankurven für Dopa in der Baclofen- (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)



**Abbildung 4.4.2:** Mediankurve und Boxplots für Dopa in der Baclofengruppe

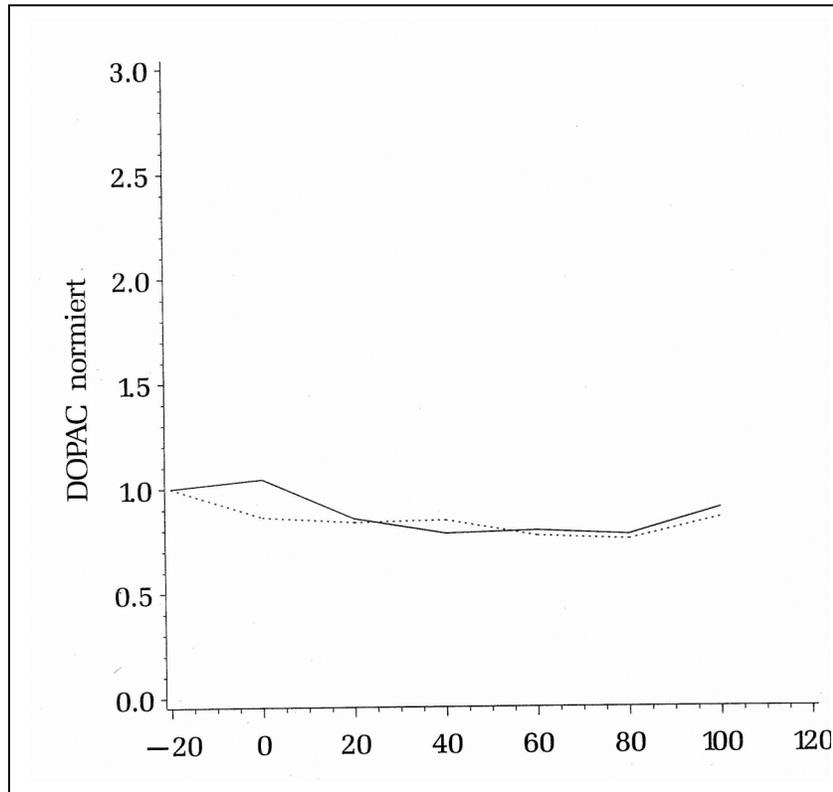


**Abbildung 4.4.3:** Mediankurve und Boxplots für Dopa in der Kontrollgruppe

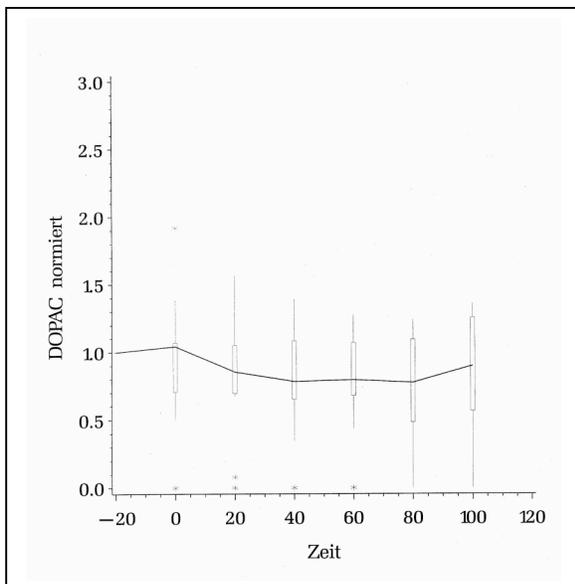


In der Dopac Kurve zeigt sich im ersten Messintervall eine Abweichung der Baclofenkurve von der Kontrollkurve, wobei der Median der Baclofenwerte um etwa 20% höher als der Median der Kontrollgruppe liegt (Abb. 4.4.4). Die Graphen konvergieren danach und zeigen nur geringe Differenzen. (Abb. 4.4.5 und 6). Ein signifikanter Unterschied zwischen den AUC der Kurven wurde nicht nachgewiesen ( $p=0.9396$ ).

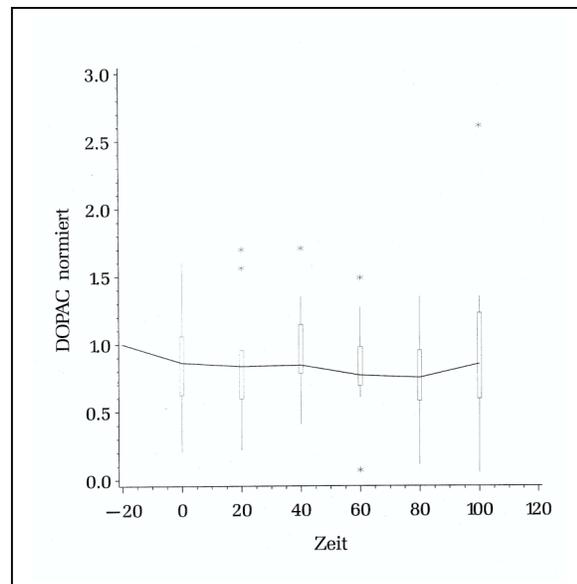
**Abbildung 4.4.4:** Mediankurven für Dopac in der Baclofen- (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)



**Abbildung 4.4.5:** Mediankurve und Boxplots für Dopac in der Baclofengruppe



**Abbildung 4.4.6:** Mediankurve und Boxplots für Dopac in der Kontrollgruppe



## 5. Diskussion der Ergebnisse

Die Diskussion des Ergebnisse ist am besten im Gesamtkontext auch der parallel durchgeführten Studien zum Blutdruck (Efe, 2003), zu Glycin und GABA (Schulte, 2002), Noradrenalin, Adrenalin und Homovanilinsäure (Czell, 2003). und des serotonergen Systems (Schmidt, 2003) zu betrachten, welche in Methodik und Durchführung mit der hier vorgelegten Studie identisch sind.

Bei den Untersuchungen zur Wirkung von Baclofen in dieser Studie zeigte sich deutlich eine Reduktion des arteriellen Blutdrucks bei intraventrikulärer Baclofenapplikation. Damit können wir Ergebnisse anderer Autoren, die von einem Blutdruckanstieg unter intraventrikulärer oder gar intraperitonealer Gabe von Baclofen dokumentierten (Singh, 1987; Takenaka, 1996; Trippenbach, 1994), nicht bestätigen. Der Blutdruckabfall ist aufgrund der fehlenden Blutdruckwirkung bei Gabe des Placebos aCSF und des äußerst geringen Applikationsvolumens nicht auf eine intrakranielle Druckänderung zurückzuführen.

Die gefundenen Ergebnisse der Transmitterbestimmungen passen sich ein in das durch andere Publikationen gebildete Gesamtbild der Baclofenwirkung. Vorrangiges Interesse hatten wir an der Frage, ob und in welchem Maße Aminosäuretransmitter im Ncl. paraventricularis hypothalami durch die icv-Gabe von Baclofen beeinflusst werden und ob ein Zusammenhang mit dem Verhalten des Blutdruckes gesehen werden kann, zumal diese Kernregion als übergeordnetes Steuerorgan des gesamten CAN gesehen werden kann und für die vegetative Beeinflussung des gesamten Organismus das oberste Effektororgan zu sein scheint.

Leider konnten die Messungen von Aspartat, Glutamat und des arteriellen Blutdrucks nicht die notwendige Signifikanz bei dem durch den Biomathematiker vorgeschlagenen Meßverfahren liefern. Grund hierfür ist meiner Meinung nach die beobachtete relativ kurze Wirkdauer des Baclofens am Ncl. paraventricularis, die – wie in Abb. 4.1.1-7 gezeigt – zumindest bei der Blutdrucksenkung auf 80 min beschränkt war und selbiger danach das Ausgangsniveau wieder erreicht hatte. Ob hierbei die Abdiffusion des

Baclofens über die physiologische Liquorzirkulation (man bedenke die Liquorkonzentrationsgradienten bei lumbaler Applikation!), Clearance-Effekte über die Blut-Hirn-Schranke, Abbauprozesse oder antagonisierende Transmittersysteme eine Rolle spielen, ist hieraus nicht ersichtlich.

Festzustellen bleibt, dass es ca. 5 min. nach Verumgabe regelmäßig zu einem Abfall des arteriellen Blutdrucks um im Mittel ca. 10% gegenüber den Kontrolltieren, die mit dem Abfall der Glutamatspiegel im PAV um etwas 35% zeitlich gut korreliert.

Unter Anbetracht der Daten für Glutamat während der ersten 20 min. und des Langzeiteffektes des Glycins nach 20min. erscheint jedoch die Baclofenwirkung zumindest indirekt mehrere Transmittersysteme zu beeinflussen. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass GABA-Rezeptoren, und insbesondere auch die GABA-B-Rezeptoren als Angriffspunkt des Baclofens, im Zentralnervensystem die Hauptrolle bei der Vermittlung hemmender Einflüsse darstellen und mit großer Wahrscheinlichkeit neben dem glutamatergen System auch dopaminerge, serotonerge oder noradrenerge Neurone beeinflussen, die im Ncl. paraventricularis hypothalami ebenfalls vorhanden und an der Regulation der Homöostase beteiligt sind.

Wenn man von einem kurzfristigen initialen Glutamatabfall im PAV ausgeht, der bei  $t=20\text{min}$  von einem relativen Anstieg gefolgt wird, so sind diese Veränderungen recht gut mit der Blutdruckkurve in Deckung zu bringen, die ebenfalls einen biphasischen Verlauf mit initialem Blutdruckabfall, einem erneuten Anstieg bei  $t=20\text{min}$ . und einem darauf folgenden weiteren Abfall des arteriellen Blutdrucks zeigte. Man könnte aus diesen Ergebnissen schließen, daß Baclofen zumindest initial über die Hemmung der Glutamataufreisetzung im Ncl. paraventricularis hypothalami eine Beeinflussung des Blutdruckes bewirkt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Baclofen nicht direkt in dieses Kerngebiet appliziert wurde, sondern intracerebroventrikulär, sodass ein Override durch andere Hirnareale oder gar eine retrograde Beeinflussung des PAV z.B. durch tiefergelegene Zentren wie den Ncl. tractus solitarius vorliegen könnte. Nur die gezielte intranukleäre Applikation des Baclofen mit Hilfe der bereits von mir erprobten reversen Mikrodialyse mit simultaner Messung im PAV und im NTS könnte hier zur Klärung beitragen und sollte diese Studie ergänzen.

Der zweite Anteil der blutdrucksenkenden Wirkung des Baclofens ist wohl nicht dem glutamatergen System zuzuschreiben, da die Glutamatspiegel nach  $t=25\text{min}$  relativ konstant blieben. Vielmehr käme hier das zweite inhibitorische System des Glycins mit seinem eher langsamen Spiegelanstieg während der ersten 20min auf ein Maximum von 40% höheren Werten gegenüber der Kontrollgruppe bei  $t=60\text{min}$  in Frage, wobei der Wirkmechanismus bzw. das Effektorsystem noch zu bestimmen sein wird (Schulte, 2002). Möglich erscheint hier die Vermittlung u.a. über die glycin-bindende Domäne des NMDA-Rezeptors, an der Glycin synergistisch zum Glutamat wirkt. Dies würde zumindest den Anstieg des Glutamat-Konzentrationen erklären können.

Da im Ncl. paraventricularis hypothalami inhibitorische Effekte nachgewiesen werden konnten (Kubo, 2000; Martin ;1997), die über den Ncl. tractus solitarius als efferentes Zielorgan den Blutdruck zu steuern vermögen, scheint eine Baclofenwirkung jedoch wahrscheinlich, zumal die Latenz bis Wirkeintritt nach Injektion fast konstant lediglich 2 bis 5 min. beträgt, was bei Diffusion und Liquorzirkulation des Baclofens bis zum Ncl. tractus solitarius in den unteren Hirnstamm eine zu kurze Zeitspanne zu sein scheint.

GABA-A Agonisten wie Bicucullin haben bekanntlich einen blutdrucksteigernden Effekt über Disinhibition der Projektionen des PAV zur rVLM und zum NTS (Martin, 1997), während Glutamat eine Pressorreaktion in der rVLM über einen cholinergen Signalweg auszulösen vermag, wenn es in den PAV injiziert wird. Dies legt den Schluß nahe, daß durch Aktivierung von GABA-B-Rezeptoren im PAV präsynaptisch über Hemmung von spannungssensitiven  $K^+$ -Kanälen über ein IIPSP die Ausschüttung von Glutamat gehemmt wird und diese Inhibition zu einem Blutdruckabfall via rVLM und NTS führt, wie dies Bormann (1988) und Bowery (1989) bereits für den präfrontalen Kortex und den Hippocampus beschrieben haben.

Der Langzeiteffekt von Glycin, das über einen ionotropen Rezeptor der Acetylcholin-Familie (nicotinische AChR, GABA-A) fungiert, ist aus den erhobenen Daten nicht zu erklären, da hier gegenregulatorische Einflüsse anderer Systeme und Kerne nicht

ausgeschlossen werden können. Die Möglichkeit der Langzeitmodulation und –depression des Blutdruckes im PAV über cholinerge Projektionen zu den Pressorarealen des Hirnstammes auf der Grundlage einer längerfristigen Elevation der Glycin-Spiegel ist jedoch denkbar. Hier wäre ein möglicher Angriffsort die hemmende Modulation der Rückkopplungsmechanismen zum PAV, die hauptsächlich für glutamaterge und noradrenerge Projektionen des NTS und des Subfornikalorgans beschrieben sind (Tibirica, 1994; Wright, 1993).

Ebenso konnten bezüglich des Aspartats keine relevanten Aussagen getroffen werden, da dieser Transmitter praktisch keine Veränderungen über die gesamte Versuchszeit sowohl bei Verum- als auch Placebo-Gruppe geboten hat. Dies ist umso verwunderlicher, als dass ja sowohl Glutamat als auch Aspartat aufgrund ähnlicher Struktur, als Liganden an gleichen Rezeptoren mit gleicher Wirkung agieren.

Interessanterweise konnten im Verlauf der Versuche von uns die Beobachtungen der klinischen Kollegen bezüglich der vegetativen Regulationsstörungen und Blutdruckkrisen zumindest in ähnlicher Weise bestätigt werden, ohne sie quantifizierbar darstellen zu können. Bei allen Tieren der Baclofengruppe, die zur Auswertung gelangten, ließ sich nach Baclofenapplikation eine stabilere und schwankungsärmere Blutdruckkurve aufzeichnen als vor der Medikamentengabe oder bei der Kontrollgruppe (siehe auch Abb. 4.1.1 und 4.1.2). Selbst bei Ausbleiben einer deutlichen Blutdrucksenkung unter das Ausgangsniveau konnte dieser Stabilisierungseffekt nachgewiesen werden und wurde von uns im weiteren Verlauf der Versuche auch als intraoperativer Anhaltspunkt für die korrekte Implantation und Funktion der Injektionskanüle verwendet.

## 6. Schlußfolgerungen und Perspektiven

1. Baclofen scheint direkt im PAV inhibitorisch über eine kurzfristige Senkung des Glutamatspiegels zu wirken.
2. Der arteriell gemessene Blutdruck der Ratte korreliert eng mit den gemessenen Transmitterkonzentrationen des Glutamat in dem Sinne, dass eine Senkung des Glutamatspiegels mit einem Blutdruckabfall einhergeht. Ein Anstieg der Glycin-Konzentrationen im Verlauf nach 20min p.i. ist möglicherweise für den Langzeiteffekt des Baclofen verantwortlich.
3. Nach den Ergebnissen ist zu vermuten, daß die klinischen Beobachtungen über Blutdrucksenkungen und –stabilisierung im Rahmen vegetativer Krisen durch eine baclofeninduzierte direkte Beeinflussung zentraler vegetativer Kerngebiete des CAN ausgelöst wird. Der PAV ist hierbei als übergeordnetes Integrationszentrum zu sehen, bei dem wir auch inhibitorische Effekte nachweisen konnten. Man kann also davon ausgehen, daß die beschriebene Blutdrucksenkung zumindest bei intracerebroventrikulärer Applikation direkt über den PAV vermittelt wird.

Da die hier durchgeführte Studie zu nicht signifikanten Ergebnissen führte, sollten weitere Studien des PAV mit selektiver Injektion des Verums in den Kern erfolgen (intranukleäre Applikation von Baclofen mittels reverser Mikrodialyse). Anzustreben ist eine Studie mit simultaner Mikrodialyse-Untersuchung von PAV und NTS mit Dual-Probe-Mikrodialyse zur Quantifizierung der gegenseitigen Beeinflussung dieser beiden wichtigen Kernareale. Wünschenswert wäre darüber hinaus noch die Durchführung solcher Dual-Probe-Studien nach systemischer Applikation verschiedener selektiver Rezeptoragonisten, um die Vermittlung der Baclofenwirkung über ein spezifisches Transmittersystem weiter eingrenzen zu können. Unter Umständen können so auch bereits bestehende hodologische Untersuchungsergebnisse auch in Hinblick auf deren neurophysiologische Signifikanz besser eingeordnet werden.

## 7. Zusammenfassung

Bei der hier vorliegenden tierexperimentellen Studie sollte der Einfluß intracerebroventrikulärer Baclofenapplikation auf die Konzentration exzitatorischer Aminosäuretransmitter im Ncl. paraventricularis hypothalami der Ratte untersucht werden. Dieses hypothalamische Kerngebiet wurde bereits in verschiedenen Studien als wichtiges, übergeordnetes Kerngebiet des Zentralen Autonomen Netzwerkes (CAN) identifiziert und spielt somit auch eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation. Baclofen ein GABA-B-Agonist ist als Therapeutikum bei zentraler Spastik ein häufig eingesetztes Mittel, bei dem bereits häufiger auch positive Wirkungen auf vegetative Dysregulationen festgestellt wurden. Diesem Effekt und seiner möglichen Ursache sollte anhand der Blutdruckbeeinflussung im Tierexperiment näher nachgegangen werden. Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche Wistar-Hannover Ratten verwendet.

Bei den chloralhydratnarkotisierten Ratten wurden mittels femoralarterieller Katheter kontinuierliche Blutdruckmessungen durchgeführt und nach entsprechenden Trepanationen stereotaktisch eine Injektionskanüle in den Ventriculus lateralis cerebri und eine Mikrodialyse-Kanüle in den Ncl. paraventricularis hypothalami (PAV) implantiert. Mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik und einer HPLC-Analytik auf Fluoreszenz- und elektrochemischer Detektionsbasis konnten über den Zeitraum des Versuchsverlaufes Katecholamine und Aminosäuretransmitter aus dem PAV in einem Messintervall von zwanzig Minuten gewonnen und quantifiziert werden. Als Verum dienten 1,5µg Baclofen in 20µl aCSF, die nach 2stündigem Dialyse-Vorlauf intracerebroventrikulär appliziert wurden, während für die Kontrollgruppe lediglich 20µl aCSF für die Applikation verwendet wurden. Diese wurden nach dreistündigem Vorlauf zum Zeitpunkt t=0 min injiziert. Als Baseline wurden die Messwerte bis t=-60min verwendet, um Implantationsartefakte durch Gewebstraumatisierung an der Mikrodialysesonde auszuschließen.

Der systolische Blutdruck wurde in fünfminütigen Intervallen, das Mikrodialysat in 20minütigen Intervallen registriert. Es wurde ein nichtsignifikanter systolischer Blutdruckabfall ( $p=0.09$ ) von 10% in den ersten 10-15 Min. nach Baclofen-Applikation

gefunden, der mit einem nichtsignifikanten Abfall der Glutamatspiegel ( $p=0.8746$ ) in den ersten 20 Min einherging. Der Aspartatspiegel zeigte zu keiner Zeit eine signifikante Änderung auf die Baclofenapplikation ( $p=0.5479$ ). Der inhibitorische Aminosäuretransmitter Glycin zeigte im Zeitverlauf eine verzögerte, aber gegenüber der Kontrollgruppe divergent ansteigende Konzentrationen, deren Maximum bei  $t=60\text{min}$  um 40% über der Kontrolle lagen, aber aufgrund der langsamen Dynamik in der AUC kein Signifikanzniveau erreichten ( $p=0.0756$ ). Der Katecholamintransmitter Dopamin konnte nicht direkt, sondern nur über seine Metaboliten DOPAC indirekt beurteilt werden, wobei die DOPAC-Spiegel kurzfristig und damit nichtsignifikant ( $p=0.9396$ ) um bis zu 20% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert waren. DOPA als Vorstufe des Dopamins zeigte nur geringste Schwankungen, die zeitlich nicht zu korrelieren waren.

Trotz der durch die statistischen Meßverfahren bedingten nicht-signifikanten Ergebnisse der AUCs von Blutdruck, Glutamat und Aspartat, Glycin, sowie der Dopaminmetabolite konnte gezeigt werden, daß die klinisch beobachtete Blutdrucksenkung bei vegetativen Krisen durch Baclofen durch dessen zentrale Wirkung höchstwahrscheinlich am Ncl. paraventricularis hypothalami durch inhibitorischen Anstieg des Glutamatspiegels initial, und langfristig durch Steigerung der Glycinspiegel erfolgt, da sich die Änderungen der intranukleären Transmitterkonzentrationen zeitlich mit dem Blutdruckverlauf korrelieren ließen. Weitere Untersuchungen mittels intranukleäre Gabe von Baclofen unter Zuhilfenahme reverser Mikrodialysetechniken sollten dies verifizieren.

## 8. Literaturnachweis

1. Akert, K. (1993). Limbisches System; In: Benninghoff, Alfred: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen / Benninghoff. Hrsg. von D.Drenckhahn und W. Zenker, München,Wien,Baltimore. Band 2,15.Auflage; Urban&Schwarzenberg. 615-21
2. Albright, A.L. (1996). Intrathecal baclofen in cerebral palsy movement disorders. *JChildNeurol* 1996 11 Suppl 1: S29-35
3. Albright, A.L. , Barron, W.B. et a (1993). Continuous intrathecal baclofen infusion for spasticity of cerebral origin. *JAMA* 270(20): 2475-7
4. Amano, M. and Kubo, T. (1993). Involvement of both GABAA and GABAB in tonic inhibitory control of blood pressure at the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348(2): 146-53
5. Anderson, P., Noher H. , et al. (1984). Pharmacokinetics in baclofen overdose. *J. Toxicol. Clin. Toxicol* 22: 11-20.
6. Araki, T., Kato, H. et al. (1991). Comparative protective effects of vinconate, baclofen, and pentobarbital against neuronal damage following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil brain.*Res Exp Med* 191(6): 371-8.
7. Armstrong, R. W., Steinbok P., et al. (1997). Intrathecally administered baclofen for treatment of children with spasticity of cerebral origin. *J Neurosurg* 87(3): 409-14.
8. Ashworth-Preece, M.A. et al. (1998). Nicotinic acetylcholine receptor mediated modulation of evoked EAA Release in the NTS of the rat: evidence from in-vivo microdialysis. *BrainRes Sep28;* 806(2): 287-91
9. Avanzino, G. L. , Ruggeri P. , et al. (1994). GABAB receptor-mediated mechanisms in the RVLM studied by microinjections of two GABAB receptor antagonists. *Am J Physiol* 266(5 Pt 2): H1722-8.
10. Baklavadzian, O.G. et al. (1998) . Neuron mechanisms of the regulation of bulbar vagosolitary activity by structures of basolateral amygdala nuclei in cats. *RossFiziolZhImIMSechenova Mar;* 84(3): 164-72
11. Barron, K. D. and Chokroverty S. (1993). *Anatomy of the Autonomic Nervous System: Brain and Brainstem. Clinical Autonomic Disorders. P. A. Low.* Boston, Toronto, London, Little, Brown and Co.: 3-15.
12. Bathnagar, T. et al.(1999). Cardiovascular responses to microinjection of excitatory amino acids into the Area postrema of the rat. *BrainRes Mar20;* 822(1-2): 192-9
13. Becker, R., Alberti O. , et al. (1997). Continuous intrathecal baclofen infusion in severe spasticity after traumatic or hypoxic brain injury. *J Neurol* 244(3): 160-6.

14. Bell, A. A., Butz, B. L. et al. (1999). Cardiovascular responses produced by microinjection of serotonin-receptor agonists into the paraventricular nucleus in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 33(2): 175-80.
15. Berrino, L., Pizzirusso A., et al. (1996). Hypothalamic paraventricular nucleus involvement in the pressor response to N-methyl-d-aspartic acid in the periaqueductal grey matter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353(2): 157-60.
16. Blessing, W.W. et al.(1999). Medullary projections of rabbit carotid sinus nerve (*BrainRes* Jan23; 816(2): 405-10)
17. Boom, F.E. (1996): Neurotransmission and the Central Nervous System. In: Goodman L.S., Gilman A.G., Hardman J.G., Limbird L.E.: *Pharmakological Basis of Therapeutics*. 9<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill, New York, 1996, p.267-293.
18. Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABAB and GABAA receptor subtypes. *Trends in Neurosci.* 11: 112-116.
19. Bowery, N. (1989). GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10: 401-407.
20. Bowery, N. G. (1993). GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 109-47.
21. Bowery, N. G., Hudson, A. L. et al. (1987). GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20(2): 365-83.
22. Callera, J. C., Sevoz, C. et al. (1997). Microinjection of a serotonin<sub>3</sub> receptor agonist into the NTS of unanesthetized rats inhibits the bradycardia evoked by activation of the baro- and chemoreflexes. *J Auton Nerv Syst* 63(3): 127-36.
23. Callera, J. C., Bonagamba, L. G. et al. (1997). Cardiovascular effects of microinjection of low doses of serotonin into the NTS of unanesthetized rats. *Am J Physiol* 272(4 Pt 2): R1135-42.
24. Callera, J. C. et al (1999). Activation of GABA(A) but not GABA(B) receptors in the NTS blocked bradycardia of chemoreflex in awake rats. *AmJPhysiol* Jun; 276 (6 Pt 2): H1902-10
25. Coote, J. H., Hilton, S.M. et al. (1973). The ponto-medullary area integrating the defence reaction in the cat and its influence on muscle blood flow. *J Physiol* 229(2): 257-74.
26. Coote, J. H. et al. (1998). Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus (*ClinExpPharmacolPhysiol* Jun; 25(6) 461-3)
27. Delfs, J. M. et al.(1998). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the ACC: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat (*BrainRes* Sep28; 806(2): 127-40)
28. De Blas, A.L. (1996). Brain GABAA receptors studied with subunit specific antibodies. *Mol Neurobiol* 12(1): 55-71
29. Dolphin, A. C., Sweeney, M. I. et al. (1992). An electrophysiological and biochemical study of the interaction between GABAB receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Pharmacology Communications* 2. N. G. Bowery and R. R. Ruffolo jr. Chur/Schweiz, Harwood Academic Publishers: 8-9.

30. Dunlap, K. (1981). Two types of g-aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* 74: 579-585.
31. Durgam, V. R. et al.(1999). Enhanced GABA(B)-receptor agonist responses and mRNA within the NTS in hypertension (*Hypertension* 1999 Jan; 33(1 Pt 2): 530-6)
32. Dutar, P. and Nicoll R. A. (1988). Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1(7): 585-91.
33. Eccles, R. M. and Lundberg A. (1959). Supraspinal control on interneurons mediating spinal reflexes. *J. Physiol. London* 147: 565-584.
34. Enz, R. (2001). GABA(C)-receptors: A molecular view. *Biol Chem* Aug; 382(8): 1111-1122.
35. Faigle, J. W. and Keberle H. (1972). The chemistry and kinetics of Lioresal. *Postgrad. Med. J.* (Suppl.): 9-13.
36. Faigle, J. W., Keberle, H. et al. (1980). Chemistry and pharmacokinetics of baclofen. Spasticity: disordered motor control. R. G. Feldman, R. R. Young and W. P. Koella. Chicago, London, Symposia Specialists Medical Books, Year Book Medical Publishers: 461-475.
37. Foley, C. M. et al.(1999). Cardiovascular response to group I mGluR activation in NTS (*AmJPhysiol* May; 276 (5 Pt 2) R 1469-78
38. Gill, C. F. et al.(1999). A subpopulation of neurons in the rat rNTS that project to the parabrachial nucleus express glutamate-like immunoreactivity. *BrainRes* Mar13; 821(3): 251-62.
39. Goshima, Y. et al.(1999). The evidence for tonic GABAergic regulation of L-DOPA release via the activation of inhibitory GABA(A) receptors in the NTS of anesthetized rats. *NeurosciLett* Feb19; 261(3) 155-8.
40. Goudreau, J. L., Wagner, E. J. et al. (1994). gamma-Aminobutyric acid receptor-mediated regulation of periventricular-hypophysial dopaminergic neurons: possible role in mediating stress- and 5-hydroxytryptamine-induced decreases in neuronal activity. *J Pharmacol Exp Ther* 271(2): 1000-6.
41. Goudreau, J. L., Lookingland, K. J. et al. (1994). 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor-mediated regulation of periventricular-hypophysial dopaminergic neuronal activity and the secretion of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 268(1): 175-9.
42. Guo, J. et al.(1997). Effects of microinjection of CRH into rat central nucleus of amygdala on blood pressure and its central mechanism. *ShengLiHsuehPao* Feb; 49(1): 110-4.
43. Haibara, A. S. et al. (1999). Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *AmJPhysiol* Jan;276 (1 Pt 2): R69-80.
44. Horiuchi, J. et al. (1999). Distribution of neurons projecting to rVLM pressor region that are activated by sustained hypotension (*Neuroscience* 1999 Apr; 89(4):1319-29.
45. Johansen, F. F. (1993). Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia. Morphometric, functional, and therapeutic investigations. *Acta Neurol Scand Suppl* 150(6): 1-32.

46. Johansen, F. F. and Diemer, N. H. (1991). Enhancement of GABA neurotransmission after cerebral ischemia in the rat reduces loss of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Acta Neurol Scand* 84(1): 1-6.
47. Johansen, F. F., Christensen, T. et al. (1991). Inhibition in postischemic rat hippocampus: GABA receptors, GABA release, and inhibitory postsynaptic potentials. *Exp Brain Res* 84(3): 529-37.
48. Johnston, G. A. (2002): Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology of GABA(C )-Receptors. *Curr Top Med Chem Aug* 2(8): 903-913.
49. Jones, K. A., Borowsky, B. et al. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396(6712): 674-9.
50. Jones, R. F. and Lance, J. W. (1976). Baclofen (Lioresal) in the long-term management of spasticity. *Med. J. Aust.* 1: 654 - 657.
51. Joyner, M. J. and Shepherd, J. T. (1993). Autonomic Control of Circulation. *Clinical Autonomic Disorders*. P. A. Low. Boston, Toronto, London, Little, Brown and Co.: 55-67.
52. Kandel R. E., Schwartz J. H., Jessell, T. M. (eds 1996): *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996: 225-312.
53. Kangrga, I., Jiang, M. et al. (1991). Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons. *Brain Res.* 562: 265-275.
54. Karlson, G. and Olpe H. R. (1989). Late inhibitory postsynaptic potentials in rat prefrontal cortex may be mediated by GABAB- receptors. *Experientia* 45: 157-158.
55. Kasparov, S et al (1998)., Angiotensin II-receptors within the NTS mediate the developmental attenuation of the baroreceptor vagal reflex in pre-weaned rats (*JAutonNervSyst* 1998 Dec11; 74(2-3): 160-8)
56. Kiss, J. Z. (1988). Dynamism of chemo architecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *BrainRes* 20 (6): 699-708.
57. Kissinger, P. T., Hart, J. B. et al. (1973). Voltammetry in brain tissue--a new neurophysiological measurement. *Brain Res* 55(1): 209-13.
58. Knutsson, E., Lindblom, U. et al. (1974). Plasma and cerebrospinal fluid levels of baclofen (Lioresal) at optimal therapeutic responses in spastic paresis. *J Neurol Sci* 23(3): 473-84.
59. Krauss, D. (1988). Untersuchungen zur Racemat- und Enantiomerenkinetik von Baclofen und seines Fluoranalogs. *Naturwiss. Fakultät. Frankfurt, Johann-Wolfgang-Goethe Universität.*
60. Krosggaard-Larsen, P. L. et al. (1991): Excitatory amino acid Receptors: Multiplicity and structural requirements for activation and blockade. In: Wheal, H. and Thomson, A. (eds.), (1991): *Excitatory amino acids*. London, San Diego, New York, Academic Press 1991: p1-17
61. Kroin, J. S. (1988). Report of a pharmacokinetic study of lumbar intrathecal baclofen in cerebrospinal fluid of spasticity patients, *IND22*: 747.
62. Kroin, J. S. (1992). Intrathecal drug administration. Present use and future trends. *Clin. Pharmacokin.* 22: 319-326.

63. Kroin, J. S. and Clasen, R. (1989). Site specific toxicity testing of intrathecal baclofen. Chicago, Rush-Presbyterian, St Lukas Medical Centre.
64. Kroin, J. S. and Penn, R. D. (1992). Cerebrospinal fluid pharmacokinetics of lumbar intrathecal baclofen. *Parenteral Drug Therapy in Spasticity and Parkinson's Disease*. Lakke, J. W. W. F., Delhaas, E. M. and Rutgers, A. W. F., Parthenon, Lancs UK: 67-77.
65. Kroin, J. S., Penn, R. D. et al. (1984). Reduced spinal reflexes following intrathecal baclofen in the rabbit. *Exp Brain Res* 54(1): 191-4.
66. Krukoff, T. L. et al.(1999). Hypertensive rats exhibit heightened expression of corticotropin-releasing factor in activated central neurons in response to restraint stress. *BrainResMolBrainRes* Feb19; 65(1): 70-9.
67. Krukoff, T. L. (1998). Central regulation of autonomic functions: No brakes? *ClinExpPharmacolPhysiol* Jun; 25(6): 474-8.
68. Kubo, T. et al. (1997) EAA receptors in the paraventricular hypothalamic nucleus mediate pressor response induced by carotid chemoreceptor stimulation in rats. *ClinExpHypertens* Oct; 19(7): 1117-34.
69. Kubo, T. et al. (2000). Cholinergic inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *BrainResBull* Oct; 53(3): 275-82.
70. Kuner, R., Kohr, G. et al. (1999). Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283(5398): 74-7.
71. Künzle, H. (1993): Aufbau und Verbindungen des Zwischenhirns; In: Benninghoff, Alfred: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen / Benninghoff. Hrsg. von D.Drenckhahn und W. Zenker, München,Wien,Baltimore 1993. Band 2,15.Auflage; Urban&Schwarzenberg. 544-70
72. Kuypers, H. (1981). Anatomy of the descending pathways. *Handbook of Physiology (Section I: The Nervous System, Vol.II, Motor Control*. V. B. Brooks. Bethesda, American Physiological Society: 597-666.
73. Lee, H. Y. et al. (1998). APO removal abolishes the stimulatory effects of intravenous interleukin-1beta on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-fos RNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *BrainResBull* Aug; 46(6): 495-503.
74. Levy, R. A. and Proudfit, H. K. (1977). The analgesic action of baclofen [beta-(4-chlorophenyl)-gamma-aminobutyric acid]. *J Pharmacol Exp Ther* 202(2): 437-45.
75. Li, Z. et al. (1989). Multimodal medullary neurons and correlational linkages in the respiratory network. *JNeurophysiol* Jul; 82(1): 181-201.
76. Malpas, S. C. and Coote, J. H. (1994). Role of vasopressin in the sympathetic response to paraventricular nucleus stimulation in anesthetized rats. *AmJPhysiol* Jan; 266 (1 Pt 2): R228-36.
77. Martin, D. S. and Haywood, J. R. (1992). Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. *Brain Res* 577(2): 261-7.

78. Martin, D. S., Rodrigo, M. C. et al. (1997). Disinhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus increases mean circulatory filling pressure in conscious rats. *Brain Res* 756(1-2): 106-13.
79. Martin, D. S. et al. (1992). Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. *BrainRes* Apr17; 577(2): 261-7.
80. McCall, R. B. (1990). Role of neurotransmitters in the central regulation of the cardiovascular system. *Prog Drug Res* 35: 25-84.
81. McCall, R. B. (2002). Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C)-Receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. *J Neurosci* 15; 22(10): 4163-4174.
82. McCulloch, P. F. et al. (1999). The rVLM mediates the sympathoactivation produced by chemical stimulation of the rat nasal mucosa. *JPhysiol(Lond)* Apr 15; 516 (Pt 2): 471-84.
83. Meythaler, J. M., McCary, A. et al. (1997). Prospective assessment of continuous intrathecal infusion of baclofen for spasticity caused by acquired brain injury: a preliminary report. *J Neurosurg* 87(3): 415-9.
84. Meythaler, J. M., DeVivo, M. J. et al. (1996). Prospective study on the use of bolus intrathecal baclofen for spastic hypertonia due to acquired brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 77(5): 461-6.
85. Meythaler, J. M., Guin-Renfroe, S. et al. (1999). Long-term continuously infused intrathecal baclofen for spastic-dystonic hypertonia in traumatic brain injury: 1-year experience [published erratum appears in *Arch Phys Med Rehabil* 1999 Apr;80(4):474]. *Arch Phys Med Rehabil* 80(1): 13-9.
86. Monassier, L., Tibirica, E. et al. (1995). Evidence for a spinal origin of the effect of baclofen on the myocardial oxygen demand indexes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352(5): 550-6.
87. Monassier, L. et al. (1994). Prevention by NMDA receptor antagonists of the centrally-evoked increases of cardiac inotropic responses in rabbits. *BrJPharmacol* Apr; 111(4): 1347-54.
88. Neff, R. A. et al. (1998). Stimulation of the NTS activates NMDA and non-NMDA receptors in rat cardiac vagal neurons in the Ncl. *Ambiguous. BrainRes* May11; 792(2): 277-82.
89. Neuhuber, W. (1993). Innerer Aufbau und Leitungsbahnen des Hirnstamms; In: Benninghoff, Alfred: *Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen* / Benninghoff. Hrsg. von D.Drenckhahn und W. Zenker, München,Wien,Baltimore 1993. Band 2,15.Auflage; Urban&Schwarzenberg. 489-492
90. Ochs, G. and Reimann, I. W. (1995). *Baclofen intrathekal - Leitfaden für die praktische Anwendung*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
91. Ochs, G., Struppler, A. et al. (1989). Intrathecal baclofen for long-term treatment of spasticity: a multi-centre study [see comments]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52(8): 933-9.
92. Ogata, N. (1996). Pharmacology and Physiology of GABAB receptors. *Gen Pharmacol* 21: 395-402.
93. Olpe, H. R., Demieville, H. et al. (1978). The biological activity of d- and l-baclofen (Lioresal).
94. Paxinos, G. und Watson, C. (1989). *Atlas der stereotaktischen Anatomie des Rattenhirns*, Academic Press, Sydney, New York, London, Berlin.

95. Paxinos, G. and Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotactic Coordinates*. Sydney, Academic Press.
96. Penn, R. D. (1988). Intrathecal baclofen for severe spasticity. *Ann N Y Acad Sci* 531(6): 157-66.
97. Penn, R. D. (1992). Intrathecal baclofen for spasticity of spinal origin: seven years of experience. *BrainRes Apr27*; 791(1-2): 256-65.
98. Pires, J. G. et al.(1998). Evidence that 5HT<sub>3</sub>-receptors in the NTS and other brainstem areas modulate the vagal bradycardia evoked by activation of the von Betzold-Jarisch reflex in the anesthetized rat. *BrainRes Apr27*; 791(1-2): 229-34.
99. Price, G. W., Wilkin, G. P. et al. (1984). Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature* 307(5946): 71-4. *J Neurosurg* 77(2): 236-40.
100. Price, G. W., Kelly, J. S. et al. (1987). The location of GABAB receptor binding sites in mammalian spinal cord. *Synapse* 1(6): 530-8.
101. Refshauge, C., Kissinger, P. T. et al. (1974). New high performance liquid chromatographic analysis of brain catecholamines. *Life Sci* 14(2): 311-22.
102. Rinaman, L. (1998). Oxytocinergic inputs to the NTS and dorsal motor nucleus of the Vagus in neonatal rats. *JcompNeurol Sep14*; 399(1): 101-9.
103. Sallerin-Caute, B. (1989). Pharmacokinetic study of baclofen in CSF after lumbar intrathecal administration. Toulouse, Frankreich, Paul Sabatier University.
104. Sallerin-Caute, B., Lazorthes, Y. et al. (1991). CSF baclofen levels after intrathecal administration in severe spasticity. *Eur J Clin Pharmacol* 40(4): 363-5.
105. Saphier, D. (1993). Electrophysiology and neuropharmacology of noradrenergic projections to rat PVN magnocellular neurons. *Am J Physiol* 264(5 Pt 2): R891-902.
106. Schwarz, M., Klockgether, T. et al. (1988). Delta-aminovaleric acid antagonizes the pharmacological actions of baclofen in the central nervous system. *Exp Brain Res* 70(3): 618-26.
107. Scislo, T. J. et al. (1998). Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P<sub>2</sub>-purinoreceptors in the NTS. *BrainResBull Sep1*; 47(1): 63-7.
108. Scott, R. H., Pearson, H. A. et al. (1991). Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. *Prog. Neurobio.* 36: 485-520.
109. Sevoz-Couche, C. et al.(1998). Dorsal medullary 5HT<sub>3</sub>-receptors and sympathetic premotor neurons in the rat. *JPhysiol(Lond) May1*; 508(Pt3): 747-62.
110. Shihara, M. et al. (1999). Cholinergic system in the NTS of rats (*AmJPhysiol Apr*; 276 (4 Pt 2): R1141-8)
111. Singh, R. and Ticku, M. K. (1987). Central cardiovascular effects of baclofen in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 40(10): 1017-26.
112. Suzuki, M. et al. (1999). GABA(B)-Receptors in the NTS modulate the carotid chemoreceptor reflex in rats (*NeurosciLett Jan22*; 260(1): 21-4)
113. Sved, A. F. and Tsukamoto, K. (1992). Tonic stimulation of GABAB receptors in the nucleus tractus solitarius modulates the baroreceptor reflex. *Brain Res* 592(1-2): 37-43.

114. Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. (1980). Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31(6): 410-7.
115. Takahashi, A. et al. (2001). Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *BrainRes Aug3; 909(1-2)*: 102-11.
116. Takenaka, K., Sasaki, S. et al. (1991). Sympathetic and cardiovascular depressant effects by hypothalamic GABA-beta receptor stimulation in rats. *Clin exp Hypertension, Part A ( USA ) A* 13 (3): 441.
117. Takenaka, K., Sasaki, S. et al. (1994). Hypothalamic and medullary GABA A and GABA B-ergic system differently regulate sympathetic and cardiovascular systems. *Clin exp Pharmacol Physiol Suppl 1*: 17.
118. Takenaka, K., Sasaki, S. et al. (1995). Hypothalamic and medullary GABAA and GABAB-ergic systems differently regulate sympathetic and cardiovascular systems. *Clin Exp Pharmacol Physiol 22 Suppl 1*: S48-50.
119. Takenaka, K., Sasaki, S. et al. (1996). GABAB-ergic stimulation in hypothalamic pressor area induces larger sympathetic and cardiovascular depression in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens 9(10 Pt 1)*: 964-72.
120. Tanaka, J., Nomura, M. et al. (1993). Median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are sensitive to blood pressure changes. *Brain Res* 605(2): 338-41.
121. Terrence, C. F., Sax, M. et al. (1983). Effect of baclofen enantiomorphs on the spinal trigeminal nucleus and steric similarities of carbamacepine. *Pharmacology* 27: 85-94.
122. Thrivikraman, K. V., Refshauge, C. et al. (1974). Liquid chromatographic analysis of nanogram quantities of ascorbate in brain tissue. *Life Sci* 15(7): 1335-42.
123. Tibirica, E., Monassier, L. et al. (1993). Baclofen prevents the increase of myocardial oxygen demand indexes evoked by the hypothalamic stimulation in rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348(2): 164-71.
124. Tibirica, E., Catelli, M. et al. (1995). Inhibition of the centrally induced increases in myocardial oxygen demand in rabbits by chronic treatment with baclofen, a selective GABAB agonist. *Br J Pharmacol* 115(7): 1331-5.
125. Torrealba, F and Muller, C. (1999). Ultrastructure of glutamate and GABA immunoreactive axon terminals of the rat NTS, with a note on infralimbic cortex afferents (*BrainRes Feb27; 820 (1-2)*): 20-30)
126. Trippenbach, T. and Lake, N. (1994). Excitatory cardiovascular and respiratory effects of baclofen in intact rats. *Can J Physiol Pharmacol* 72(10): 1200-7.
127. Vallar, L. and Meldolesi, J.(1989). Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *TrendsPharmacolSci.* , 10: 74-77.
128. Wagner, E. J., Goudreau, J. L. et al. (1994). GABAergic regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the male rat. *Brain Res* 659(1-2): 194-200.

129. Waldvogel, H. J., Faull, R. L. et al. (1990). GABA, GABA receptors and benzodiazepine receptors in the human spinal cord: an autoradiographic and immunohistochemical study at the light and electron microscopic levels. *Neuroscience* 39(2): 361-85.
130. Westerink, B. H., Santiago, M. et al. (1992). In vivo evidence for a concordant response of terminal and dendritic dopamine release during intranigral infusion of drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346(6): 637-43.
131. White, J. H., Wise, A. et al. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396(6712): 679-82.
132. Wright, J. W. et al. (1993). Hypothalamic angiotensin release in response to A2 or glutamaic acid stimulation of the SFO in rats (*BrainResBull* 31(6): 649-54)
133. Wuis, E. W., Dirks, M. J. M. et al. (1989). Plasma and urinary kinetics of oral baclofen in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 37: 181-184.
134. Wuis, E. W., Dirks, M. J. M. et al. (1990). Pharmacokinetics of baclofen in spastic patients receiving multiple oral doses. *Pharm. Weekbl. Sci.* 12: 71-74.
135. Yaksh, T. L. and Reddy, V. S. (1981). Studies in the primate on the analgetic effects associated with intrathecal actions of opiates, alpha-adrenergic agonists and baclofen. *Anesthesiology* 54(6): 451-67.
136. Yates, B. J. and Stocker, S. D. (1998). Integration of somatic and visceral inputs by the brainstem: functional considerations (*ExpBrainRes* Apr; 119(3): 269-75)
137. Yeh, E. R. et al. (1997). The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat (*NeurosciLett* Aug29;232(2): 63-6)
138. Young, R. R. and Delwaide, P. J. (1981). Drug Therapy I - Spasticity. *N. Engl. J. Med.* 304: 28-33.
139. Young, R. R. and Delwaide, P. J. (1981). Drug Therapy II - Spasticity. *N. Engl. J. Med.* 304: 96-99.
140. Zhang, J. and Mifflin, S. W. (1998). Differential roles for NMDA and non-NMDA receptor subtypes in baroreceptor afferent integration in the NTS of the rat (*JPhysiol(Lond)* Sep15; 511 (Pt 3): 733-45)
141. Zhang, J. et al. (1998). Receptor subtype specific effects of GABA agonists on neurons receiving aortic depressor nerve inputs within the NTS (*JAutonNervSyst* 1998 Dec11; 74(2-3)

## 9. Lebenslauf

geboren am.	26. Juli 1976
in:	Schlema
Eltern:	Dr. med. Siegfried und Elvira Krause, geb. Loos
1983-1990	Polytechnische Oberschule Wilhelm-Pieck in Aue
1991-1995	Clemens-Winkler-Gymnasium Aue
6/1995	Abitur mit Erhalt des Clemens-Winkler-Preises 1995
10/1995-9/1996	Wehrdienst
10/1996-4/2003	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
3-4/1999	Famulatur in der Inneren Abteilung am Bergarbeiterkrankenhaus Schneeberg
7/1999	Erstes Staatsexamen
2-6/2000	Famulatur in der Neurochirurgischen Klinik am Atkinson Morley's Hospital Wimbledon, London, UK
6-9/2000	Famulatur in der Allgemeinchirurgischen Abteilung des St. Thomas' Hospital, London, UK
3/2002	Zweites Staatsexamen
4/2002-7/2002	Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Marburg
8/2002-11/2002	Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Marburg
12/2002-2/2003	Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Allgemein- und Unfallchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Marburg
5/2003	Abschluß des Studiums der Medizin mit der Note 1,8
7/2003- 10/2004	Arzt im Praktikum in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen bei Prof. Dr. Böker
seit 10/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen bei Prof. Dr. Böker

## **10. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Prof. Aumüller, Prof. Basler, Prof. Baum, Prof. Bertalanffy, Prof. Bien, Prof. Czubayko, Prof. Daut, Prof. Gotzen, Prof. Griss, Prof. Grzeschik, Prof. Happle, Prof. Hasilik, Prof. Heeg, Prof. Klenk, Prof. Klose, Prof. Krause, Prof. Krieg, Prof. Kroll, Prof. Lange, Prof. Maisch, Prof. Mennel, Prof. Moll, Prof. Mossdorf, Prof. Müller, Prof. Neubauer, Prof. Oertel, Prof. Remschmidt, Prof. Renz, Prof. Schultz, Prof. Seybert, Prof. Werner, Prof. Weihe, Prof. Wulf.

In London Prof. Bell.

## **11. Danksagung**

Danken möchte ich in erster Linie meinem akademischen Lehrer Herrn PD Dr. med. habil. Ralf Becker, zum einen für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zum Umsetzen dieser Dissertation in seiner Arbeitsgruppe und zum anderen für die Hilfe und Unterstützung, die er mir zu Teil werden ließ.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bertalanffy, in dessen Klinik ich diese Doktorarbeit schreiben durfte.

Ich möchte danken meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe, die mit mir an ähnlichen Fragestellungen eng zusammengearbeitet haben, nämlich Carsten Vossmann, Turgay Efe, Thorsten Schulte, Adrian Schmidt und David Czell, sowie den MTA's der Abteilung, die mich stets unterstützt haben, vor allem Daniela Forge und Regina Stöhr .

## **12. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Auswirkung intracerebroventrikulärer Baclofenapplikation auf Glutamat- und Aspartat-Freisetzung und das dopaminerge System im Ncl. paraventricularis hypothalami der Ratte“ in der Klinik für Neurochirurgie unter der Leitung von Herrn Priv.Doz. Dr. Becker ohne Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 15.03.2004

Matthias Krause