

Aus dem Zentrum für Operative Medizin der Philipps – Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Griss

Klinik für Neurochirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. H. Bertalanffy

**Die Wirkung intrathekaler Baclofenapplikation auf die Freisetzung von
Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure aus dem Nucleus
paraventricularis hypothalami der Ratte**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps – Universität Marburg**

vorgelegt von

David Czell

aus

Bad Mergentheim

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps – Universität Marburg am 04.12.2003
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Priv. Doz. Dr. Becker
Correferent: Prof. Dr. Oertel

Für Nova und Lorena

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
1.1. Die Ausgangshypothesen	6
1.2. Die anatomischen, physiologischen und pharmakologischen Grundlagen	6
1.2.1. Der Nucleus paraventricularis hypothalami	6
1.2.2. GABA – Rezeptoren	12
1.2.3. Baclofen	15
1.2.4. Noradrenalin, Adrenalin und Homovanillinsäure (HVA)	16
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.1.1. Chemikalien für die Mikrodialyse	21
2.1.1.2. Chemikalien für die HPLC	21
2.1.1.2.1. Chemikalien für die Herstellung der Standards für die Katecholamin/Hydroxyindol – Anlage	21
2.1.1.2.2. Chemikalien für die Mobile – Phase: elektrochemische Detektion	22
2.1.2. Materialien	22
2.1.2.1. Materialien für die Mikrodialyse	22
2.1.2.2. Materialien für die HPLC	22
2.1.3. Geräte	22
2.1.3.1. Geräte für die Mikrodialyse	22
2.1.3.2. Geräte für die HPLC	23
2.1.3.2.1. Geräte für die elektrochemische Detektion	23
2.1.4. Tiere und Tierhaltung	23
2.2. Methoden	24
2.2.1. Operationsverfahren	24
2.2.1.1. Narkose	24
2.2.1.2. Stereotaxie	26
2.2.1.3. Implantation der Kanülen	28
2.2.2. Mikrodialyse	29
2.2.2.1. Vorbemerkungen	29
2.2.2.2. Mikrodialyse im Ncl. paraventricularis hypothalami mit/ohne intraventrikuläre Baclofenapplikation	31
2.2.3. HPLC	35
2.2.3.1. Grundzüge	35
2.2.3.2. Untersuchungsmaterial	38
2.2.3.3. Elektrochemische Detektion zum Nachweis von Katecholamin/Hydroxyindol Transmittern	38

2.3. Auswertung der gewonnenen Daten der HPLC	39
2.4. Statistische Bearbeitung der Daten	39
3. Ergebnisse	41
3.1. Qualitätskontrolle HPLC	41
3.2. Ergebnisse der Transmitteruntersuchungen	44
3.2.1. Übersicht	44
3.2.2. Adrenalin	45
3.2.3. Homovanillinsäure	49
3.2.4. Noradrenalin	54
4. Diskussion	56
4.1. Zur Methode	56
4.1.1. Vergleich von in – vivo – Messmethoden	56
4.1.2. Narkoseverfahren	59
4.1.3. Tiermodell	59
4.2. Auswirkung der intrathekalen Baclofenapplikation auf Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure	60
4.2.1. Noradrenalin und Adrenalin	61
4.2.2. Homovanillinsäure	62
4.3. Schlussfolgerung	63
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	65
7. Lebenslauf	78
8. Verzeichnis der akademischen Lehrer	79
9. Danksagung	79

Verzeichnis der Abkürzungen

A

α_1 – und α_2 – Rezeptoren

ATP

β_1 – und β_2 – Rezeptoren

Ca

CAN

Cl

COMT

CRH

D1 – D5

Dopa

Dopac

GABA

GTP

HPLC

HVA

ITB

K

M

MAO

Mg

mm

μm

mL

μl

Na

NA

NMDA

pg

PVN

RVLM

SOM

TRH

VIP

VSA

ZNS

Adrenalin

Adrenorezeptorsubtypen 1 und 2

Adenosintriphosphat

Betarezeptorensubtypen 1 und 2

Calcium

Zentrales autonomes Netzwerk

Chlorid

Katechol – O – Methyl – Transferase

Corticotropin Releasing Hormon

Dopaminrezeptor – Subtyp 1 – 5

3,4 – Dihydroxyphenylalanin

3,4 – Dihydroxyphenylelessigsäure

Gamma – Aminobuttersäure

Guanosintriphosphat

Hochdruck – Flüssigkeits-

Chromatographie

Homovanillinmandelsäure

intrathekale Baclofeninjektion

Kalium

Mol

Monoaminoxidase

Magnesium

Millimeter

Mikrometer

Milliliter

Mikroliter

Natrium

Noradrenalin

N – methyl – D – aspartat

picogramm

Nucleus paraventricularis

hypothalami

Rostrale Ventrolaterale Medulla

Somatostatin

Thyreotropin Releasing Hormon

Vasoaktives Intestinales Polypeptid

Ventraler Septaler Bereich

Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Ausgangshypothesen

Den Anlass für das in dieser Arbeit dargestellte Untersuchungsprojekt gab die Beobachtung an Patienten, die durch cerebrale oder supranukleäre Schädigung an einer Spastik wie auch an vegetativen Regulationsstörungen in Form von arterieller Hypertonie, Tachykardie, Hyperhidrose, Hypersalivation, bronchialer Hypersekretion und motorischer Unruhe litten. Sowohl die Spastik, als auch die vegetativen Regulationsstörungen wurden durch intrathekale Baclofen-applikation gelindert (Becker, 1999). Dass diese positive Beeinflussung vor allem bei intra-ventrikulärer Injektion auftritt, lässt vermuten, dass vegetative Kerngebiete, darunter auch der Nucleus paraventricularis hypothalami, der weiter unten noch näher dargestellt wird, als Angriffspunkt eine wichtige Rolle spielen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht ausreichend erklärt.

Da diverse Studien gezeigt hatten, dass Baclofen auch zu einer blutdrucksteigernden Wirkung im Tierversuch geführt hatte, was aber in der klinischen Beobachtung am Patienten nicht beobachtet wurde, war es wichtig, nochmals der Fragestellung nachzugehen, wie sich der Blutdruck bei intrathekaler Baclofenapplikation verhält.

Des Weiteren sollten die exzitatorischen Neurotransmitter im Mikrodialysat ausgewertet werden, da experimentell ein inhibitorischer Einfluss von Baclofen nachgewiesen wurde (Goudreau, 1994; Wagner, 1994; Westerink, 1992).

Aus diesen klinischen Beobachtungen ergaben sich folgende Hypothesen:

- Intrathekale Baclofeninjektion (ITB) senkt den arteriellen Blutdruck der Ratte
- Intrathekale Baclofeninjektion (ITB) senkt im Mikrodialysat des Nucleus paraventricularis hypothalami exzitatorische Neurotransmitter.

Diese Ausgangshypothesen wollten der Verfasser et al. in einem Gemeinschaftsprojekt untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit geht es nun um die Frage, ob intrathekale Baclofeninjektion die Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin und den Katecholaminmetaboliten Homovanillinsäure senkt.

1.2. Die anatomischen, physiologischen und pharmakologischen Grundlagen

1.2.1. Der Nucleus paraventricularis hypothalami

Der Nucleus paraventricularis hypothalami gehört zur vorderen (rostralen) Gruppe des Hypothalamus und liegt in enger Nachbarschaft zum 3. Ventrikel.

Die Abbildung 1.1 zeigt die anatomischen Verhältnisse im Gehirn der Ratte und die wichtigen Verbindungen des Nucleus paraventricularis hypothalami zu anderen Kerngebieten, die an der Steuerung des Blutdruckes teilhaben.

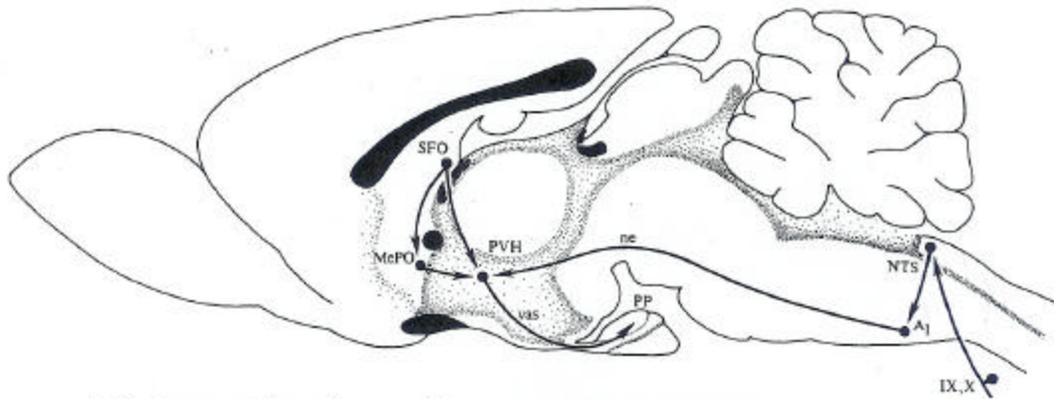


Fig. 6. A summary of known direct neural inputs to magnocellular vasopressinergic (VAS) neurons in the paraventricular (and supraoptic) nuclei of the rat. See text for details. (Reproduced from Swanson (1986), by courtesy of the Publishers.)

Abbreviations: A₁, noradrenergic cell group in ventrolateral medulla; MePO, median preoptic nucleus; nc, nor-epinephrine; NTS, nucleus of the solitary tract; PVH, paraventricular nucleus; SFO, subfornical organ; IX, glossopharyngeal nerve; X, vagus nerve.

Abbildung 1.1: Der Nucleus paraventricularis hypothalami der Ratte und seine Verbindungen aus Swanson, 1986

Histologisch besteht das Kerngebiet aus einem magnozellularen und einem parvozellulären Anteil. Aufgrund ihrer unterschiedlich Expression von Kalium- und Calciumkanälen an ihrer Oberfläche, werden die Neurone des magnozellularen Anteils als Typ I, die des parvozellulären Anteils als Typ II Neurone bezeichnet (Luther, 2000). In den Neuronen des magnozellularen Anteils werden die Hormone Oxytozin und Vasopressin produziert, wobei jede Zelle nur ein Hormon synthetisiert, welche die Neurohypophyse über den Tractus supraopticohypophysialis erreichen.

Die Informationen zur Vasopressinausschüttung erhält das Kerngebiet über Osmorezeptoren, aber auch über sympathische noradrenerge Fasern, die aus den noradrenergen Gruppen A₁, A₂, A₆ und C₂ stammen (Saphier, 1993). Oxytozin regelt die Milchejektion, spielt eine Rolle beim Geburtsvorgang und weiterhin bei der Ejakulation des Mannes.

Die parvozellulären Neurone können in drei Untereinheiten gegliedert werden:

Als erstes ist die Gruppe der neurosekretorischen parvozellulären Neurone zu nennen, die mit ihren Axonen in die externe Zone des hypophysären portalen Kapillarkreislaufs projizieren und über Releasing und Inhibiting Faktoren die Freisetzung von Hormonen aus der Adeno-hypophyse kontrollieren. Als Releasing Faktoren werden das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und das Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) produziert und sezerniert, ebenso Somatostatin (SOM) und Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP).

Als zweite Untereinheit sind die Neuronen des parvozellulären Anteils zu nennen, die über absteigende Fasern zu autonomen Kerngebieten im Hirnstamm und Medulla projizieren und hier sympathische und parasympathische präganglionäre Zellen innervieren. In ihnen werden verschiedene Neurotransmitter, darunter die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin synthetisiert. Sie gehören zu den sogenannten „autonomic upper motor neurons“. In diesem Kerngebiet ist die Konzentration dieser Neurone am höchsten und trägt dazu bei, dass bei Stimulation des Kerngebietes der Körper in einen Alarmzustand versetzt wird. Das heißt, dass eine Umschaltung

der Organfunktionen auf erforderliche Leistungen in Zusammenhang mit Angriffs-, Flucht- oder Verteidigungsreaktion („defence reaction“) umgestellt werden:

somato-sensorische und vegetative Symptome wie beschleunigte Atmung, Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdruckes, Erweiterung der Pupillen, Piloerektion, erhöhte Durchblutung der Muskeln und Verminderung der Darmperistaltik und -durchblutung (Tibirica, 1993; Coote, 1973). Diesem Teil des Nucleus paraventricularis hypothalami galt unser Interesse in der vor-liegenden Studie.

Eine weitere parvozelluläre Untereinheit projiziert in das Limbische System. Hier sind direkte Verbindungen zu dem Ventralen Septalen Bereich (VSA) zu nennen, denen eine Rolle in der Begrenzung des Fiebers zugeschrieben wird.

Das Kerngebiet übernimmt damit sowohl neuroendokrinologische als auch kardiovaskuläre Aufgaben (Kiss, 1988). Die Flexibilität in der Zusammensetzung der „Cocktails“ an Neurotransmittern und Hormonen spielt eine Ausnahmerolle in Hinsicht auf die Plastizität vielfältiger physiologischer Regelkreise (Swanson, 1980).

Funktionell wird der Nucleus paraventricularis hypothalami einem übergeordneten Steuerorgan des vegetativen Nervensystems, das als zentrales autonomes Netzwerk (CAN) bezeichnet wird, zugeordnet. Zu diesen funktionellen Steuerorgan gehören unter anderen der Nucleus amygdaloideus, die noradrenerge Gruppe A5, die rostrale ventrolaterale Medulla und der Tractus solitarius. Die einzelnen Kerngebiete und ihre Afferenzen und Efferenzen wurden in den letzten 20 Jahren entdeckt und untersucht (Loewy, 1990). Die Abbildungen 1.2 und 1.3 geben einen Überblick über diese Strukturen und deren Verbindungen.

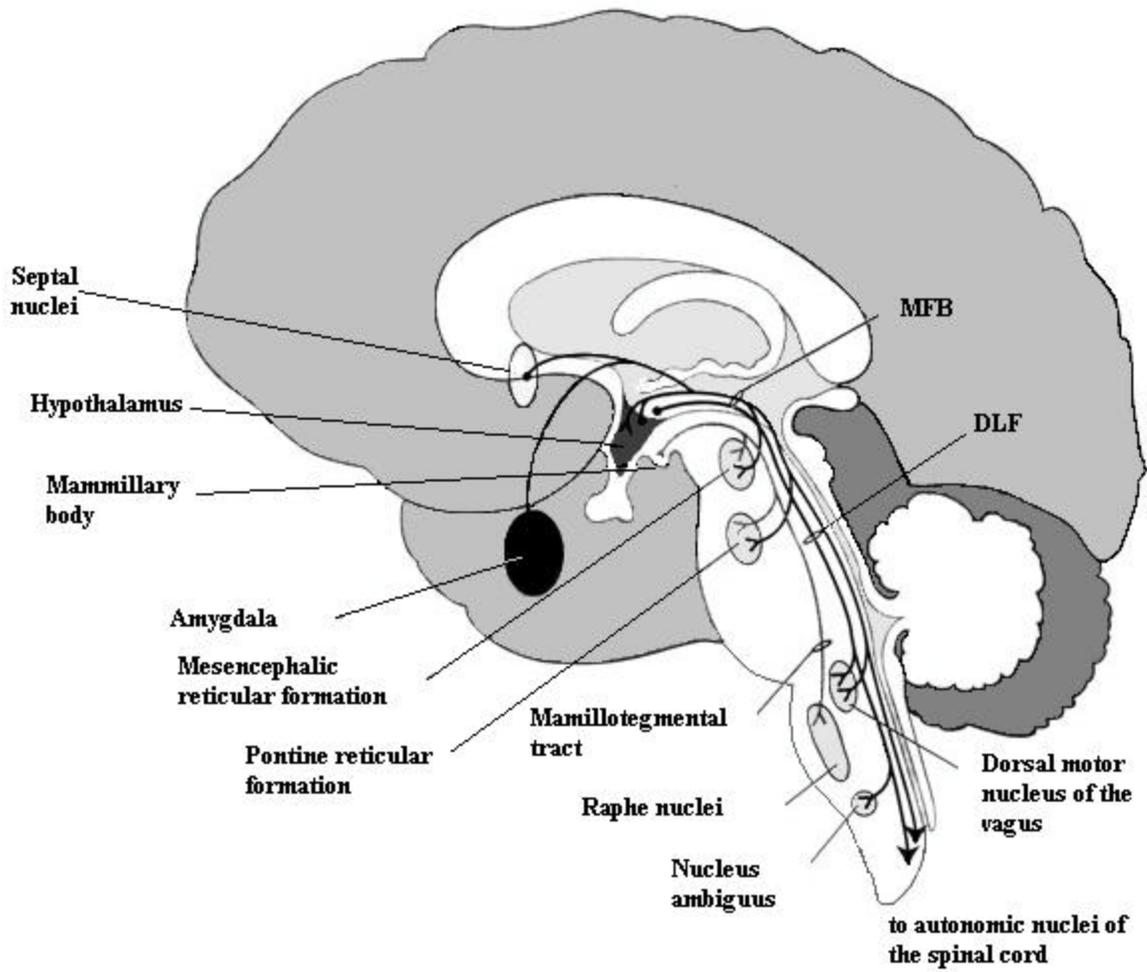


Abbildung 1.2: Das zentrale autonome Netzwerk (CAN) aus Dougherty and Gottesfeld, 2000

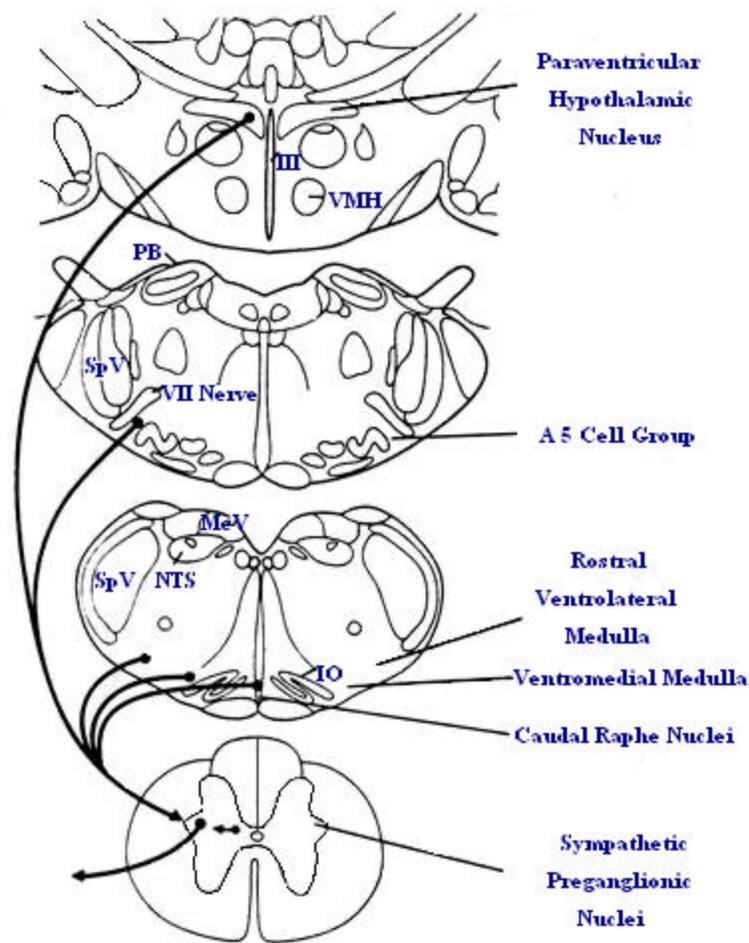


Abbildung 1.3: Das zentrale autonome Netzwerk (CAN) aus Dougherty and Gottesfeld, 2000

In der Abbildung 1.2 wird die anatomische Beziehung des Hypothalamus mit seinen Kerngebieten zu den verschiedenen autonomen Nervengebieten wiedergegeben.

Die Abbildung 1.3 zeigt den Sitz der Nucleus paraventricularis hypothalami zur noradrenergen Gruppe A5, zur rostralen ventrolateralen Medulla und zu den sympathischen präganglionären Nuclei und deren anatomischen Sitz im Hirnquerschnitt. Eine wichtige Funktion übernimmt der Nucleus tractus solitarius, der eine zentral modulierende, integrative und regulierende Aufgabe besitzt. Zentrale Afferenzen erhält dieser Kern aus dem Kortex, hier vor allem aus dem Cingulum und Stirnhirn, der Hippocampusformation, Thalamus, Basalganglien, Hirnstamm und Rückenmark. Periphere Informationen erhält das Kerngebiet über den N. vagus und N. glossopharyngeus von den Barorezeptoren aus dem Sinus caroticum, von sympathischen Fasern aus dem weiteren kardiovaskulären, aber auch gastrointestinalen Bereich. Afferenzen vom Kerngebiet des N. vagus informieren ihn über die parasympathischen Abläufe. Efferente Verbindungen besitzt der Kern unter anderem zur rostralen ventrolateralen und ventromedialen Medulla und zum Nucleus ambiguus, der den Nucleus intermediolateralis innerviert. Durch diese Verbindungen nimmt er einen wichtigen Platz in der Blutdruckregulation ein.

Der Nucleus tractus solitarius wäre aufgrund seiner funktionellen Stellung als idealer Angriffspunkt für Baclofen vorstellbar. In experimentellen Studien, bei denen in den Nucleus tractus solitarius lokal

Baclofen injiziert wurde, kam es zu einer Blutdrucksteigerung (Sved, 1992; Takenaka, 1994; Takenaka, 1995; Landulpho, 2003). Der Barorezeptorreflex wird über GABA – B – Rezeptoren am Nucleus tractus solitarius vermittelt und führt zu einer Steigerung des Blutdruckes (Yin, 1996). Daher führt eine direkte Stimulation dieser Rezeptoren durch den GABA – B – Agonisten Baclofen zu einer Blutdruckerhöhung. Da man aber bislang klinisch und experimentell in den meisten Studien eine blutdrucksenkende Wirkung bei Baclofengabe beobachtet hat, kann der Nucleus tractus solitarius nicht der primäre Angriffspunkt des GABA – B – Agonisten sein.

Zwar gibt es Studien, bei denen die intraventrikuläre bzw. intraperitoneale Baclofeninjektion zu einer Blutdrucksteigerung führte (Singh, 1987; Trippenbach, 1994; Takenaka, 1996). Dies ist aber möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in diesen Studien eine zu hohe Dosis Baclofen bzw. ein zu großes Volumen in verhältnismäßig kurzer Zeit in den Ventrikel injiziert wurde und dies zu einer Blutdruckerhöhung führte, also aufgrund einer mechanischen Auswirkung und nicht aufgrund der Pharmakonwirkung der Effekt zustande kam. Andere Studien belegen deutlich den blutdrucksenkenden Effekt von intrathekal appliziertem Baclofen (Becker, 1999; Goudreau, 1994; Hayakawa, 2002; Hong, 1991; Takenaka, 1996) Die andere Überlegung, dass die Blutdruckregulation bei der Ratte anderen Regelmechanismen unterliegt als beim Menschen, ist eher unwahrscheinlich, da in zahlreichen Studien die vortreffliche Übereinstimmung des Blutdruckregulationssystems der Ratte mit dem des Menschen hervorgehoben wurde (Bonham and McCrimmon, 1990; Brooks, 1990; Feldman and Smith, 1989; Hayashi and Lipski, 1992; Murakoshi and Otsuko, 1985; Okada, 1993; Persson and Henny, 1980; Siemers, 1982; Sved and Isukamoto, 1992; Vardhan, 1993; Wang and Dun, 1990).

Ein Kerngebiet, das neben dem Nucleus paraventricularis hypothalami, der noradrenergen Gruppe A5, der kaudalen Rapheregion und ventromedialen Medulla zur zentrale Steuerung des sympathischen Systems beiträgt, ist die rostrale ventrolaterale Medulla (Strack, 1989). Für sie konnte die blutdrucksenkende Wirkung bei Mikroinjektion von Baclofen in das Kerngebiet (Amano, 1993) und die blutdrucksteigernde Wirkung bei lokaler Gabe eines GABA – B Antagonisten (Avanzino, 1994) nachgewiesen werden. Die Blutdrucksenkung wird über GABA vermittelt (Smith, 1990). Dies erklärt den Blutdruckabfall nach Gabe des GABA – B – Agonisten Baclofen. An Gewebeabschnitten durchgeführte Einzelableitungen bestärkten dessen beobachtete inhibitorische Wirkungen an Neuronen der rostralen ventrolateralen Medulla (Li, 1995).

Beiden Kerngebieten, sowohl der rostralen ventrolateralen Medulla, als auch dem Nucleus paraventricularis hypothalami ist die anatomische Nähe zum 3. Ventrikel gemeinsam. Dadurch verringert sich die Diffusionstrecke, die Baclofen bei intrathekaler Applikation zurücklegen muss. Somit erlangen diese beiden Kerngebiete besonderes Interesse bezüglich der Untersuchung des blutdrucksenkenden Effekts bei intraventrikulärer Baclofeninjektion.

Einen größeren Anteil als die rostrale ventrolaterale Medulla an der Blutdruckregulation hat wahrscheinlich der Nucleus paraventricularis hypothalami, da er, wie oben erwähnt, eine Vielzahl von integrativen und regulativen Aufgaben im kardiovaskulären System als auch neuroendokrine Funktionen übernimmt (Martin, 1997; Joyner, 1993; Swanson und Sawchenko, 1980; Porter und Brody, 1986).

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Nucleus paraventricularis hypothalami den Blutdruck nicht wie oben beschrieben nur über Vasopressin steuert, sondern dass

auch zum Beispiel GABA eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation spielt. Dabei spielen sowohl GABA – A – Rezeptoren, als auch GABA – B – Rezeptoren eine wichtige Rolle (Takenaka, 1995). Zum Beispiel konnte durch Mikroinjektion von Bicucullin, einem GABA – A – Antagonisten (Martin, 1997), ein blutdrucksteigernder Effekt nachgewiesen werden. Dieser zeigte sich auch bei einer Studie, in der Barorezeptoren stimuliert wurden und Verbindungen vom Nucleus supraoptikus zum Nucleus paraventricularis hypothalami nachgewiesen werden konnten (Takenaka, 1993). Auf die Stellung der GABA – B – Rezeptoren wird, da wir in dieser Studie einen GABA – B – Agonisten (Baclofen) benutzten, im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

Ebenfalls zu einer Blutdrucksteigerung führt die Gabe von NMDA ins periaquäduktale Grau der Ratte, das Efferenzen zum Nucleus paraventricularis hypothalami besitzt und die Mikroinjektion von Glutamat in den Nucleus paraventricularis hypothalami (Martin, 1992), die darüber hinaus zu einer Erhöhung des myocardialen Sauerstoffverbrauchs führt (Tibirica, 1995). Diese Reaktion kann durch intravenöse und intrathekale Applikation bei Th 9 aufgehoben werden (Monassier, 1995). Die Akutgabe führt häufig zu einem bedrohlichen Blutdruckabfall, der bei Langzeitgabe ausbleibt (Tibirica, 1995). Inhibitorische Fasern ziehen zum Nucleus tractus solitarius, wodurch sich ebenfalls ein blutdrucksenkender Effekt erklären lässt (Mifflin, 1988). Direkte und indirekte Verbindungen bestehen darüber hinaus zum Sympathikus und den obengenannten Kontrollzentren des Sympathikus, vor allem der rostralen ventrolateralen Medulla (Badoer, 2001).

1.2.2. GABA – Rezeptoren

Mehr als 50 Jahre ist es her, seit der Neurotransmitter GABA im Gehirn nachgewiesen wurde (Roberts and Frankel, 1950). Die sich anschließenden Studien in diesen Jahren zeigten, dass GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS ist. Es gibt 3 Rezeptortypen an denen GABA bindet. Zum einen gibt es GABA – A – Rezeptoren, von denen es 16 Unter-gruppen gibt. Diese Rezeptoren sind an Cl – Kanäle gekoppelt und sind unter anderen ein Angriffspunkt für Barbiturate und Benzodiazepine (De Blas, 1996). Daneben gibt es noch GABA – C – Rezeptoren, von denen es 5 Untergruppen gibt. Zu finden sind sie in der Retina, im Rückenmark, in den Colliculi superiores und dem Magen. Sie sind involviert am Seh-, Merk- und Schlafwandelprozess (Enz, 2001; Johnston, 2002; McCall, 2002). GABA – A - und –C – Rezeptoren bezeichnet man auch als ionotrope Rezeptoren, da sie wie oben beschrieben an Chloridkanäle gekoppelt sind, wodurch es zu einer kurzzeitigen Hyperpolarisation der Nerven-zelle kommt.

Die für die vorliegende Arbeit wichtigeren Rezeptoren, die GABA – B – Rezeptoren, werden als metabotrope Rezeptoren bezeichnet. Sie führen zu modulatorischen Veränderungen der Nervenzelle und wirken über mehrere Sekunden bis Minuten, da sie zu einer verlängerten Hyperpolarisation führen. Auf die dafür verantwortlichen Mechanismen gehe ich weiter unten ein.

Definiert werden GABA – B – Rezeptoren als Bicucullin insensitive Rezeptoren, für die R - (-) – Baclofen spezifischer Agonist ist und 2 – Hydroxy – Saclofen spezifischer Antagonist. Da Baclofen so spezifisch an dem GABA – B – Rezeptor bindet, wurden die meisten Studien zur Charakterisierung des Rezeptors mit Baclofen durchgeführt.

Der GABA – B – Rezeptor kann wiederum in einen GABA – B – R1, der aus den beiden Splice – Varianten GABA – B – R1 – A und dem - R1 – B – Rezeptor besteht, und einen GABA – B – R2 – Rezeptor unterteilt werden (Jones, 1998; Kaupmann, 1998; White, 1998; Kuner, 1999). Wahrscheinlich entstehen die verschiedenen Rezeptorvarianten durch unterschiedliches "Spleißen" aus der Intron-Exon-Struktur eines einzigen Gens.

Anhand der primären Aminosäuresequenz lassen sich die GABA – B – Rezeptoren in die Superfamilie der G – Protein – gekoppelten Rezeptoren einordnen. Wie für Mitglieder der G – Protein – gekoppelten Rezeptoren erwartet, beginnt die Membrantopologie der 100 – 130 kDa schweren Aminosäureketten mit einer großen, extrazellulären Bindungsdomäne für den Liganden GABA, durchstreift 7 – mal in helikaler Form die Plasmamembran (*Synonym* "7 – Helix – Rezeptoren") und endet mit einem zytosolischen COOH – terminalen Teil sehr ähnlich den metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Nehring , 2000). Die Abbildung 1.4 zeigt das Modell der Leuzin – Zipper Interaktionsdomäne, die Abbildung 1.5 das eines GABA – B – Rezeptors.

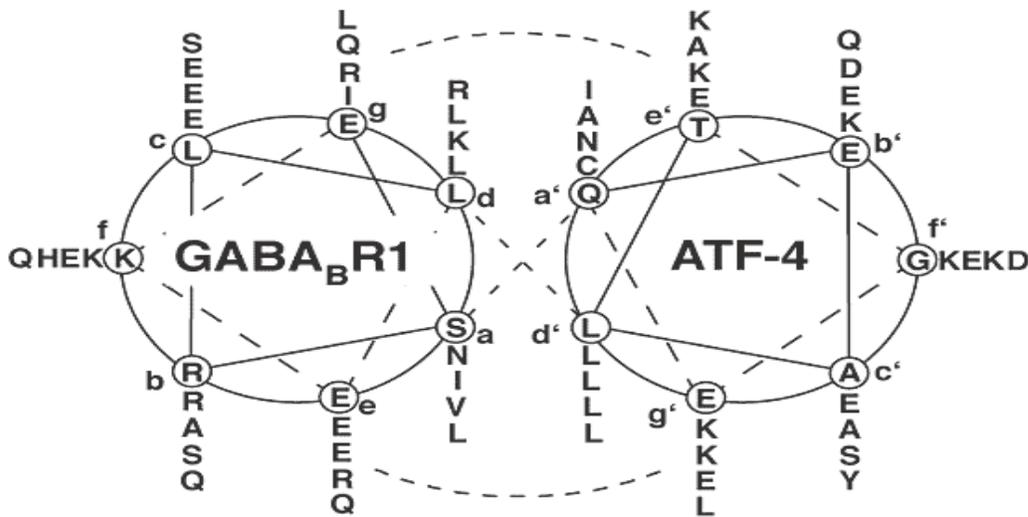


Abbildung 1.4: Modell der Leuzin-Zipper Interaktionsdomäne von GABA-B-R1 und ATF – 4 aus Nehring , 2000

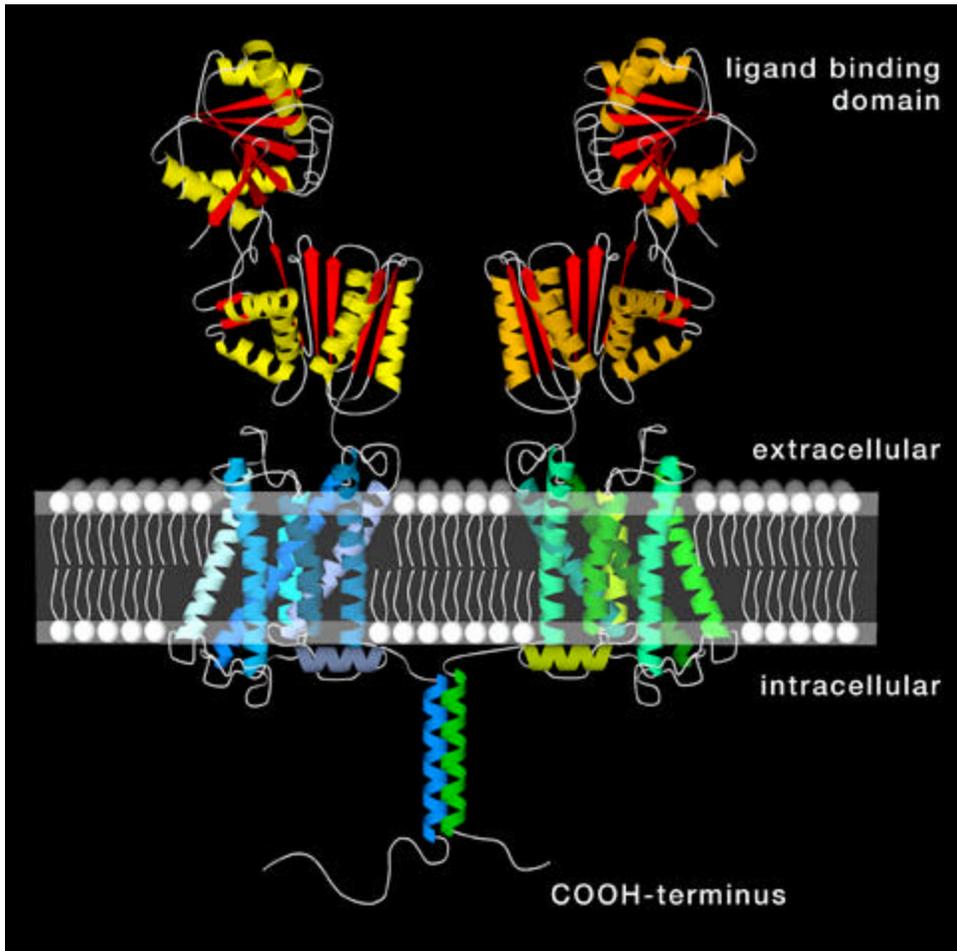


Abbildung 1.5: Der GABA – B – Rezeptor aus Nehring, 2000

GABA – B – Rezeptoren kommen im ZNS (Bowery, 1987) vor. Hier wurden sie vor allem in der Molekularschicht des Kleinhirns (Turgeon und Albin, 1993), genauer an Dendriten der Purkinje-zellen gefunden, den Nuclei vestibulares (Holstein, 1992) und cochleares (Juiz, 1994), im Mittel -und Frontalhirn. Entdeckt wurden sie auch im peripheren Nervensystem (Bowery, 1989), hier überwiegend in den Ganglien und Nerven vom parasympathischen und sympathischen Nervensystem und im Rückenmark (Price, 1987; Price, 1984), hier in den Laminae I – IV und X nach Rexed, in der höchsten Konzentration aber in den Laminae II (Substantiae gelatinosa) und III (Waldvogel, 1990). GABA – B – Rezeptoren sind sowohl prä – als auch postsynaptisch lokalisiert. Im Vergleich zu GABA – A – Rezeptoren, die integrale Ionenkanäle beinhalten, sind sie über pertussistoxinsensitive GTP – bindende Proteine (Scott, 1991; Dolphin, 1992) an Ca^{2+} - und K^{+} - Kanäle, in den Hinterwurzelganglienzellen vor allem präsynaptisch an Ca^{2+} -Kanäle gekoppelt. Die Aktivierung erfolgt über eine Hemmung des Ca^{2+} - Einwärtsstroms, der eine Verkürzung der Aktionspotentiale zur Folge hat, was wiederum zu einer Hemmung der Freisetzung exzitatorischer Neurone führt. Über den gleichen Mechanismus wirken sie auch als präsynaptische Autorezeptoren, zur Hemmung der Transmittersekretion an derselben Synapse.

Postsynaptische GABA – B – Bindungsstellen sind wahrscheinlich über G – Proteine an K – Kanäle oder an die Adenylatcyclase gekoppelt (Bormann, 1988). Beide postsynaptischen Rezeptoren führen zu einer Hyperpolarisation (Bowery, 2002) und leisten einen Beitrag zur Entstehung eines späten inhibitorischen postsynaptischen Potentials, das in hippokampalen Pyramidenzellen (Schwartz, 1988) und im präfrontalen Kortex der Ratte nachgewiesen wurde (Karlson, 1989).

Im nicht – neuronalen Gewebe wurden GABA – B – Rezeptoren bislang an der glatten Muskulatur des Eileiters beim Kaninchen (Erdo, 1984), an endokrinen Strukturen, wie der Glandula pinealis (Demeneix, 1984) und den β - Inselzellen im Pankreas (Kawei und Unger, 1983) und neuromuskulären Synapsen gefunden. Wichtig im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist eine Studie, in der nachgewiesen wurde, dass die Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks durch Stimulation von GABA – B – Rezeptoren an den Zellen verhindert werden kann (Oset – Gasque, 1990).

1.2.3. Baclofen

Bei Baclofen handelt es sich um ein Medikament, das mittlerweile seit 30 Jahren gegen Skelettmuskelspastizität bei multipler Sklerose oder bei Rückenmarksschädigung mit traumatischer oder neoplastischer Genese eingesetzt wird. Es entsteht durch Substitution eines Chlor – Phenyl – Ringes am Beta – C – Atom der γ – Aminobuttersäure. Dadurch kommt es zu einem Chiralitätszentrum, womit Baclofen in zwei optisch aktiven Formen vorliegt: eine im polarisierten Licht rechts- und eine linksdrehende, wobei die letztgenannte Form (R - (-) – Enantiomer) die biologisch aktive ist (Olpe, 1978).

Die Abbildung 1.6 zeigt das Molekül Baclofen mit seinem Chiralitätszentrum im Vergleich zu GABA.

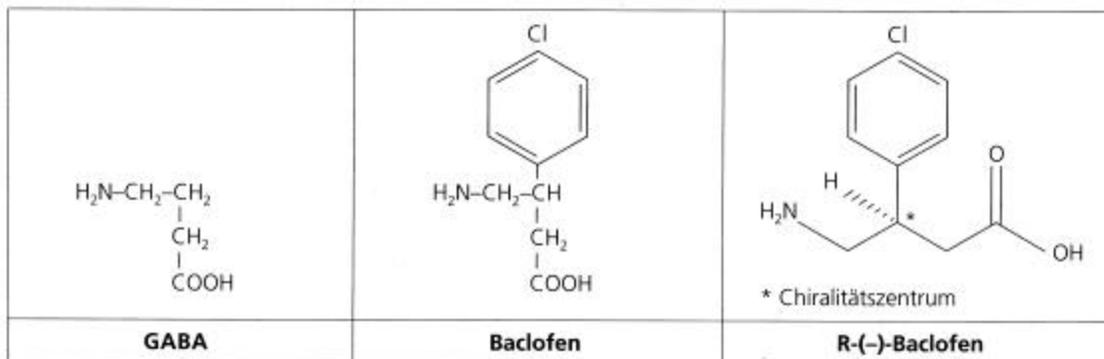


Abbildung 1.6: Das Molekül Baclofen im Vergleich zu GABA aus Ochs, 1995

Die Wirkung von Baclofen wird sowohl über prä-, als auch postsynaptische GABA – B – Rezeptoren vermittelt. Baclofen ist ein selektiver GABA – B – Rezeptor – Agonist. Mithilfe von Baclofen konnten auch die physiologischen Funktionen des GABA – B – Systems charakterisiert werden (Ogata, 1990). Seine Wirkung entfaltet es demnach an den Rezeptoren durch Verminderung der Wirkung der Adenylatcyclase, Verminderung des Einstroms von Calcium an präsynaptischen und Kalium an den

postsynaptischen Rezeptoren, wodurch es bei den letztgenannten zur einer Verminderung der Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter kommt.

Pharmakokinetik: Nach oraler Gabe wird Baclofen rasch resorbiert. Die mittlere absolute Bioverfügbarkeit liegt zwischen 70 und 80 % (Krauss, 1988).

Die maximalen Plasmakonzentrationen werden nach 1 bis 6 Stunden erreicht (Hulme, 1985; Faigle, 1972; Wuis, 1990).

Die mittleren Plasmakonzentrationen nach therapeutischer Dosierung liegen bei zwischen 80 und 400 ng/l (Young, 1981; Young, 1981).

Die Eliminationshalbwertszeit wird zwischen 2 und 9 Stunden angegeben (Wuis, 1989; Kochak, 1985; Hulme, 1985; Faigle, 1980; Faigle, 1972; Anderson, 1984).

Die Plasmaclearance liegt zwischen 122 bis 237 ml /min (Kochak, 1985; Wuis, 1989), die renale Clearance zwischen 103 – 170 ml/min (Kochak, 1985; Wuis, 1989) und die nicht – renale Clearance zwischen 15 bis 95 ml/min (Wuis, 1990).

Nachdem bei oraler Baclofenanwendung häufig keine ausreichende Wirkung erzielt wird und Nebenwirkungen in Form von Müdigkeit und Verwirrtheit auftreten, wurde frühzeitig die intrathekale Anwendung vorgeschlagen (Penn, 1984). Dies führte zu einer hohen Liquor-konzentration bei relativ geringer Plasmakonzentration und damit zu einer deutlichen Verbesserung der Wirksamkeit, bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen. Weitere Nebenwirkungen sind eine verminderte Krampfschwelle, im Gegensatz zu GABA – A – Rezeptor – Agonisten, Übelkeit, Hypotonie, Obstipation und Pollakisurie, die sich durch die Wirkung an den obenbeschriebenen Rezeptoren und deren Verteilung erklären lässt.

1.2.4. Noradrenalin, Adrenalin und Homovanillinsäure (HVA)

Noradrenalin und Adrenalin gehören, wie auch Dopamin zu den sogenannten Katecholaminen. Die Bezeichnung Katecholamine stammt aus dem Englischen und bezeichnet ein Molekül mit ähnlicher Strukturformel (im Englischen Catechol, im Deutschen Brenzcatechin). Zusammen mit Serotonin und Histamin werden sie unter den Begriff Monoamine zusammengefasst.

Adrenalin und Noradrenalin sind Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Peripher erfüllt Noradrenalin seine Aufgabe als Überträgersubstanz an sympathischen, postganglionären Nervenendigungen, Adrenalin wird vom Nebennierenmark ins Blut abgegeben. Die Zielzellen für die beiden Katecholamine besitzen sogenannten Adrenorezeptoren. Hierbei handelt es sich um transmembranale Proteine mit 7 Helixstrukturen in der Membran der Effektorzelle und je einer Endkette an der extrazellulären Seite (Rezeptor) und an der intrazellulären Seite (Signalweg). Man unterscheidet α - und β - Adrenorezeptoren. Hier wiederum α - und α_2 -Rezeptoren, von denen es 3 Untergruppen gibt, und β_1 und β_2 - Rezeptoren. An den α_1 -Rezeptoren wird die Phospholipase C aktiviert und damit die Signaltransduktion über den Phosphoinositidstoffwechsel eingeleitet. α_2 - Rezeptoren, die am häufigsten im ZNS vor-kommen, sind an die Adenylatcyclase oder über G – Proteine an Ionenkanäle gekoppelt. Beide β - Rezeptoren entfalten ihre Wirkung über die Adenylatcyclase. Noradrenalin und Adrenalin haben etwa gleichstarke Wirkung am α_1 - Rezeptor.

Noradrenalin wirkt stärker als Adrenalin am β_1 - Rezeptor und Adrenalin stärker am α_2 - und β_2 -Rezeptor (Glabella, 1976).

Synthetisiert werden die Katecholamine aus der Aminosäure Tyrosin, die durch die Tyrosinmonooxygenase/Tyrosinhydroxylase (Nr. 1 in Abbildung 1.7) zu Dopa hydroxyliert wird. Dopa wird durch die Dopamindecarboxylase (Nr. 2 in Abbildung 1.7) zu L - Dopa decarboxyliert. In einem weiteren Schritt kommt es durch Seitenkettenhydroxylierung durch die Dopamin - Monooxygenase (3 in Abbildung 1.7) zur Bildung von Noradrenalin. Das Enzym Methyl-transferase (Nr. 4 in Abbildung 1.7) bewirkt durch eine Methylierung an der Aminogruppe des Noradrenalins die Entstehung von Adrenalin.

Die Abbildung 1.7 gibt einen kurzen Überblick über diesen Synthesevorgang.

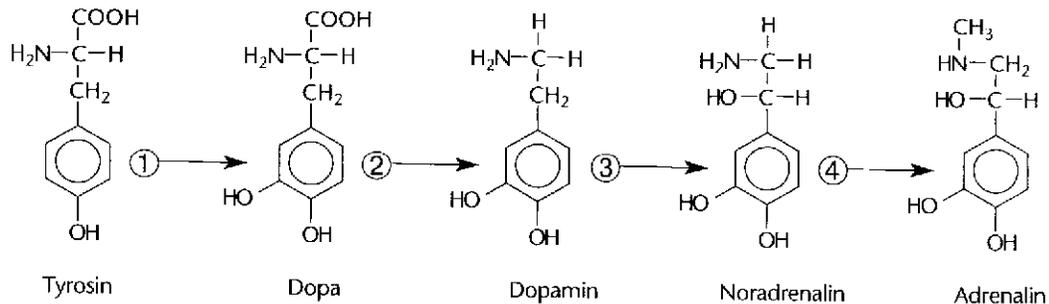


Abbildung 1.7: Synthese der Katecholamine aus Kreutzig, 1994

Der Abbau der Katecholamine wird durch 2 Enzyme katalysiert. Zum einen durch die Katecholamin - O - Methyl - Transferase (COMT, Nr.1 in Abbildung 1.8), die Adrenalin und Noradrenalin zu 3 - Methoxy - Adrenalin bzw. - Noradrenalin umwandelt. In einem zweiten Schritt wird dann das Zwischenprodukt durch die Monoaminoxidase (MAO, Nr.2 in Abbildung 1.8) zu 3 - Methoxy - 4 - Hydroxy - Mandelsäure (Nr. 2 in Abbildung 1.8) abgebaut. Das Enzym Monoaminoxidase liegt im ZNS in 2 Formen vor der MAO - A und MAO - B , wobei die erstere die Katecholamine Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin und die MAO - B überwiegend Dopamin abbaut.

Die Abbildung 1.8 veranschaulicht den beschriebenen Abbauprozess.

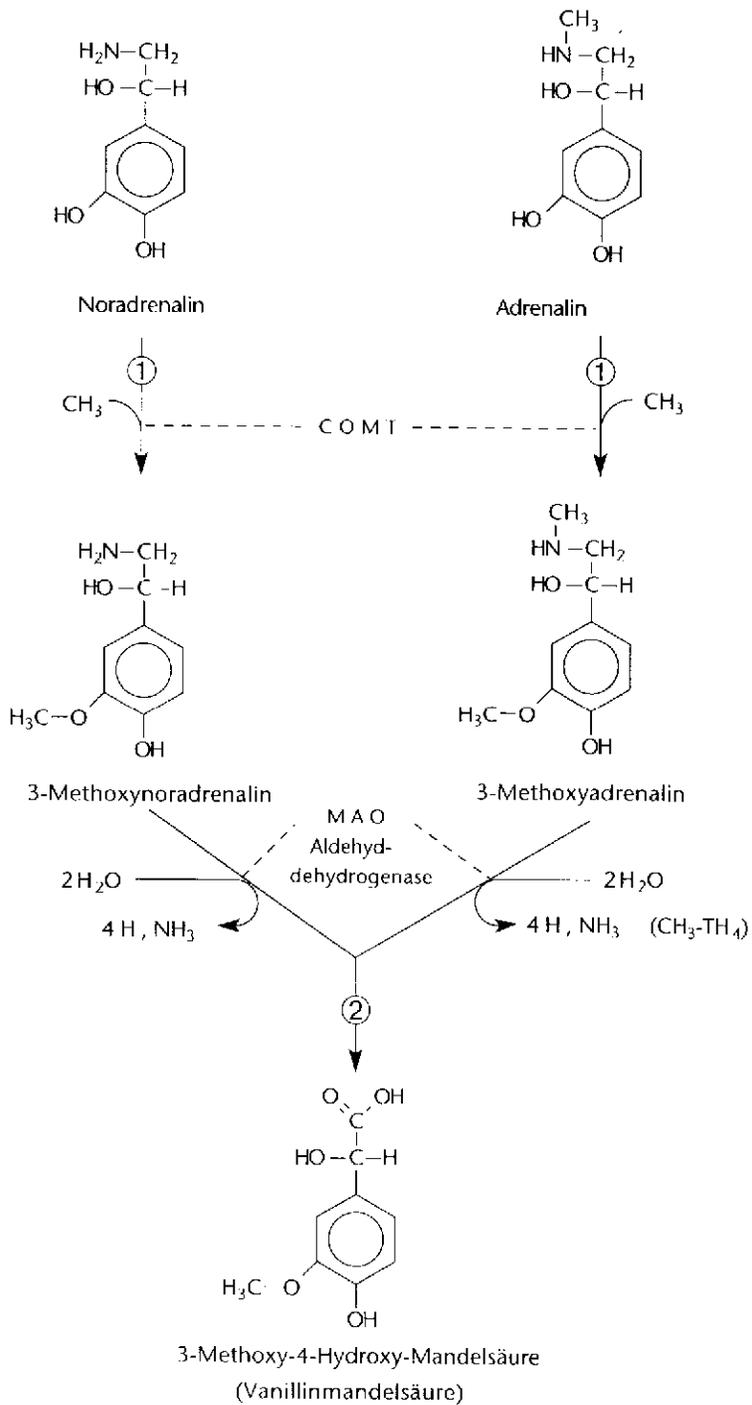


Abbildung 1.8: Abbau der Katecholamine aus Kreutzig, 1994

Am Nucleus paraventricularis hypothalami setzen, wie oben erwähnt, sympathische Fasern, die von noradrenergen Zellgruppen stammen, an.

Dabei findet man diese noradrenergen Fasern bevorzugt im parvozellulären Anteil und an Vasopressin sezernierenden Neuronen (Decavel, 1987).

Die hier am häufigsten vorkommenden Adrenorezeptoren sind α_1 - und α_2 - Rezeptoren. α_1 - Rezeptoren aktivieren dabei das kardiovaskuläre System, haben aber keinen Effekt auf die Ausschüttung von Vasopressin. α_2 - Rezeptoren vermitteln die Ausschüttung von Vasopressin und hemmen das kardiovaskuläre System (Kimura, 1984).

Adrenalin und Noradrenalin werden im Nucleus paraventricularis hypothalami synthetisiert. Bei deren Abbau entsteht Homovanillinsäure.

Homovanillinsäure entsteht aber auch beim Abbau von Dopamin, wobei Dopamin erst über die Monaminoxidase – B (MAOB) zu DOPAC und dann durch die Katechol – O – Methyltransferase (COMT) zu Homovanillinsäure abgebaut wird. Daher kann Homovanillinsäure als Parameter für den Dopaminstoffwechsel, herangezogen werden.

Eine Dopaminsynthese, wie sie oben beschrieben ist, findet auch im Nucleus paraventricularis hypothalami statt (Swanson, 1986). In diesem Gemeinschaftsprojekt war es nicht gelungen Dopamin mit Hilfe der HPLC nachzuweisen. Deshalb wurden Homovanillinsäure und Dopac, ein weiteres Abbauprodukt von Dopamin, als indirekter Nachweis für eine Dopaminsynthese und -ausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami herangezogen. Der Metabolit Dopac ist das Thema einer Studie eines anderen Mitdoktoranden und wird in seiner Dissertation abgehandelt.

Dopamin ist sowohl Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin, aber auch selbst Neurotransmitter. Seine komplexe Wirkung beruht auf der Tatsache, dass Dopamin dosisabhängig sowohl an spezifischen Dopaminrezeptoren, als auch an Alpha – und Beta – Adrenorezeptoren wirkt (Brücke, 1991).

Die Vorstellungen über die Dopaminrezeptoren sind zur Zeit noch nicht genau erforscht und werden kontrovers diskutiert. Kloniert wurden bislang 5 verschiedene Rezeptoren. Die D_1 - und D_2 - Rezeptoren waren die ersten Rezeptoren, die entdeckt wurden. Die 3 später gefundenen werden in „ D_1 – like“ (D_1 , D_5) und „ D_2 -like“ (D_2 , D_3 , D_4) eingeteilt. D_1 - und D_5 – Rezeptoren sind über ein stimulierendes G-Protein aktivierend an die Adenylatcyclase gekoppelt. D_2 -, D_3 - und D_4 – Rezeptoren sind hemmend an die Adenylatcyclase gekoppelt. Neben dieser Verminderung von cAMP kommt es zur Öffnung von Kaliumkanälen und damit zu einer Hyperpolarisation. Dazu trägt auch ein Calciumkanal bei. Im ZNS gibt es 5 wichtige dopaminerge Systeme, in denen Dopaminrezeptoren sowohl prä - als auch postsynaptisch lokalisiert sind: Das mesocorticale – mesolimbische System, das nigrostriatale System, das hypothalamisch – medulläre System, die Chemorezeptor – Triggerzone und das tubero – infundibuläre System. In der Peripherie finden sich D_1 – Rezeptoren vor allem postsynaptisch an Nieren - und Mesenterialgefäßen und D_2 -Rezeptoren an noradrenergen (Heterorezeptoren) und dopaminergen (Autorezeptoren) Nervenendigungen (Civelli, 1993).

Die am häufigsten im Nucleus paraventricularis hypothalami vorkommenden Dopaminrezeptoren sind die Rezeptoren D_1 und D_5 (Rivkees, 1997).

In der vorliegenden Studie wurde nun der Einfluss von Baclofen auf die Neurotransmitterausschüttung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, dessen indirektes Abbauprodukt Homovanillinsäure gemessen wurden, im Nucleus paraventricularis hypothalami untersucht. Experimentell war in vorangegangenen Studien ein Zusammenhang zwischen Blutdruckerhöhung, Noradrenalin - (Ebihara, 1993, Bealer und Abell, 1995) und Adrenalinausschüttung (Martin, 1992) aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami nachgewiesen worden. Eine Hemmung des dopaminergen

periventriculären – hypophysialen Systems durch Baclofen, vermittelt über GABA – B – Rezeptoren, wurde beschrieben (Goudreau, 1994; Wagner, 1994). Nun wollten wir herausfinden, ob Baclofen die Freisetzung dieser Neurotransmitter senkt und damit auch zu einer Senkung des Blutdruckes beiträgt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

2.1.1.1. Chemikalien für die Mikro dialyse

Chloralhydrat, Merck; Darmstadt/Deutschland

Lioresal intrathekal 0,05 mg/ 1 ml, Novartis Pharma

NaCl Lösung 0.9%, B. Braun; Melsungen/Deutschland

Perchlorsäure (HClO₄), Merck; Darmstadt/Deutschland

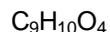
Aqua bidest

2.1.1.2. Chemikalien für die HPLC

2.1.1.2.1. Chemikalien für die Herstellung der Standards für die Katecholamin/Hydroxy-indol – Anlage

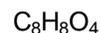
4 – Hydroxy – 3 – Methoxy – Phenylazetat;

Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland



3,4 – Dihydroxyphenylazetat;

Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland



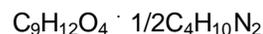
3,4 – Dihydroxyphenylethylamin – Hydrochlorid;

ICN Biomedicals Inc., Ohio/USA



4 – Hydroxy – 3 – Methoxyphenyl – Glycol;

Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland



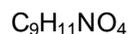
5 – Hydroxyindol – 3 – Essigsäure;

Merck, Darmstadt/Deutschland



3,4 – Dihydroxyphenyl – Alanin;

Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland



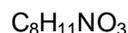
3 – Methoxytyramin – Hydrochlorid;

Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland



Norepinephrin – Hydrochlorid;

Hoechst AG, Frankfurt a.M./Deutschland



Perchlorsäure (70%),

Merck; Darmstadt/Deutschland



2.1.1.2.2. Chemikalien für die Mobile-Phase: elektrochemische Detektion

Natriumacetat wasserfrei; Merck, Darmstadt/Deutschland	CH ₃ COONa
1 – Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat; Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland	C ₈ H ₁₇ O ₃ SNa
Titriplex III (Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat) p.A.; Merck, Darmstadt/Deutschland	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O
Methanolgradient grade; Merck, Darmstadt/Deutschland	CH ₄ O
Essigsäure (99,8%); Merck, Darmstadt/Deutschland	CH ₃ COOH
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. Materialien

2.1.2.1. 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: 6000 Daltons) 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

2.1.2.2. 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

2.1.3. Geräte

2.1.3.1. Geräte für die Mikrodialyse

OP – Tisch, Firma Kobe

Stereotaxiestell, David Kopf Instruments, USA

Mikroinjektionspumpe: CMA/100 und 150, Axel Semrau

GmbH & Co;Sprockhövel/Deutschland

Temperatur Controller: CMA/150, (Heizmatte, Rektalthermometer), Stockholm, Schweden

In vitro Stand (Selbstbau)

2.1.3.2. Geräte für die HPLC

2.1.3.2.1. 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, Model 5020
Analytical-Cell:	ESA, Model 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
Wasserauf- bereitungsanlage:	Milli – Q – Water – System; Millipore, Molsheim/Frankreich

2.1.4. Tiere und Tierhaltung

Männliche Wistar – Ratten (350-400g) der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen) wurden unter konstanten klimatisierten Bedingungen bei zwölfstündigem Hell – Dunkelrhythmus (Raumtemperatur $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$) zu maximal vier Tieren in dafür vorgesehenen Käfigen (42*26*19 cm) gehalten.

Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin®, Lage) und Wasser. Am Abend vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen, bei weiterhin ungehindertem Zugang zu Wasser.

2.2 Methoden

2.2.1. Operationsverfahren

2.2.1.1. Narkose

Anästhesiert wurden die Versuchstiere mit Chloralhydrat. Bei Chloralhydrat handelt es sich um ein Medikament, das sedativ und hypnotisch wirkt. Diese Wirkungen treten sehr rasch ein, da Chloralhydrat eine HWZ von 4 – 5 min besitzt. Die Metabolisierung erfolgt durch die Leber zu Trichlorethanol oder Trichloressigsäure. Wir verzichteten auf den Einsatz von Benzodiazepine und Neuroleptanalgesie aus folgenden Gründen:

- Chloralhydrat beeinflusst die Neurotransmitterausschüttung nur unwesentlich
- Erregungszustände, die bei Barbiturat – und Benzodiazepingabe auftreten können, wurden bei Chloralhydrat bislang nicht beobachtet.

Initial zur Einleitung der Narkose gaben wir 500 – 600mg/kgKG Chloralhydrat intraperitoneal. Zur Erhaltung der Narkose applizierten wir 100mg/kgKG/h in den Bauchraum. Dazu wurde ein Mikrodialyseschlauch in den Bauchraum der Ratte gebracht und fixiert. Über eine Mikrodialysepumpe konnte nun eine kontinuierliche Menge des Medikaments intraperitoneal eingeleitet werden, so dass es nicht zu einem Wirkungsverlust mit konsekutiver Aufhebung der Narkose kam.

Zur Feststellung der Narkosetiefe kniffen wir den Versuchstieren mit einer Pinzette in die Haut zwischen die Zehen, bei nicht ausreichender Narkose kommt es, aufgrund des Schmerzreizes, zu einem Zurückziehen oder Zucken des Fusses. Bleibt diese Reaktion aus, befindet sich das Tier im Narkosestadium III (Analgesie-Stadium).

Diese Reflextestung erfolgte zu Beginn der Operation vor dem ersten Schnitt, vor der Trepanation und während des Versuches.

In der Abbildung 2.1 sieht man den Versuchstisch. Links befindet sich der Operationstisch, daneben befinden sich die Instrumente, die bei der Operation benötigt wurden.



Abbildung 2.1: Arbeitsplatz mit Operationstisch und – besteck

2.2.1.2. Stereotaxie

Die stereotaktische Operationstechnik ermöglicht die Implantation z.B. einer Mikrodialysekanüle oder einer Glaskapillarsonde selbst in kleine Hirnareale mit großer Genauigkeit und minimaler Traumatisierung. Durch diese Technik verringert sich die Störung der funktionellen und morphologischen Integrität des Gehirns bei in – vivo – Messungen.

In einem stereotaktischen Gestell (David – Kopf – Instruments) kann der Kopf eines Versuchstieres in definierter Position fixiert werden. Die Fixierung erfolgt durch in die Meatus acustici externi eingeführte Fixierstifte. Der Kopf wird zusätzlich durch einen Schneidezahnhalter fixiert, um eine Rotation um die Interauralachse zu verhindern.

An dem der Fixierung des Versuchstieres dienenden Stereotaxiestell sind zwei in den drei Raumachsen (vertikal, transversal, sagittal) bewegliche Makromanipulatoren angebracht. Durch die am Makromanipulator befindlichen Halter für die Mikrodialysekanüle bzw. Glaskapillarsonde kann die jeweilige Sonde an eine definierte Stelle bewegt werden. Die Bewegung des Makromanipulators erfolgt durch Feingetriebe. Das Ausmaß der Bewegungen kann mittels einer Noniusskala bestimmt werden. Die Genauigkeit des Manipulators beträgt 0,1 mm.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikrodialysekanüle in den Nucleus paraventricularis hypothalami bzw. eine Glaskapillarsonde in den Seitenventrikel implantiert. Dies geschah mit Hilfe des oben beschriebenen Stereotaxiestelles unter Verwendung der Koordinaten aus einem Stereotaxieatlas (Paxinos, 1986). Dazu wurde die Spitze der Mikrodialysekanüle bzw. der Glaskapillarsonde auf den Nullpunkt des Stereotaxiestelles eingestellt, indem die Spitze der jeweiligen Sonde mit Hilfe des Makromanipulators in die Mitte der beiden symmetrisch eingestellten Fixierstifte bewegt wurde. Die „Nullpunktkoordinaten“ wurden für die entsprechende Sonde abgelesen und zu den theoretischen Koordinaten aus dem Atlas addiert.

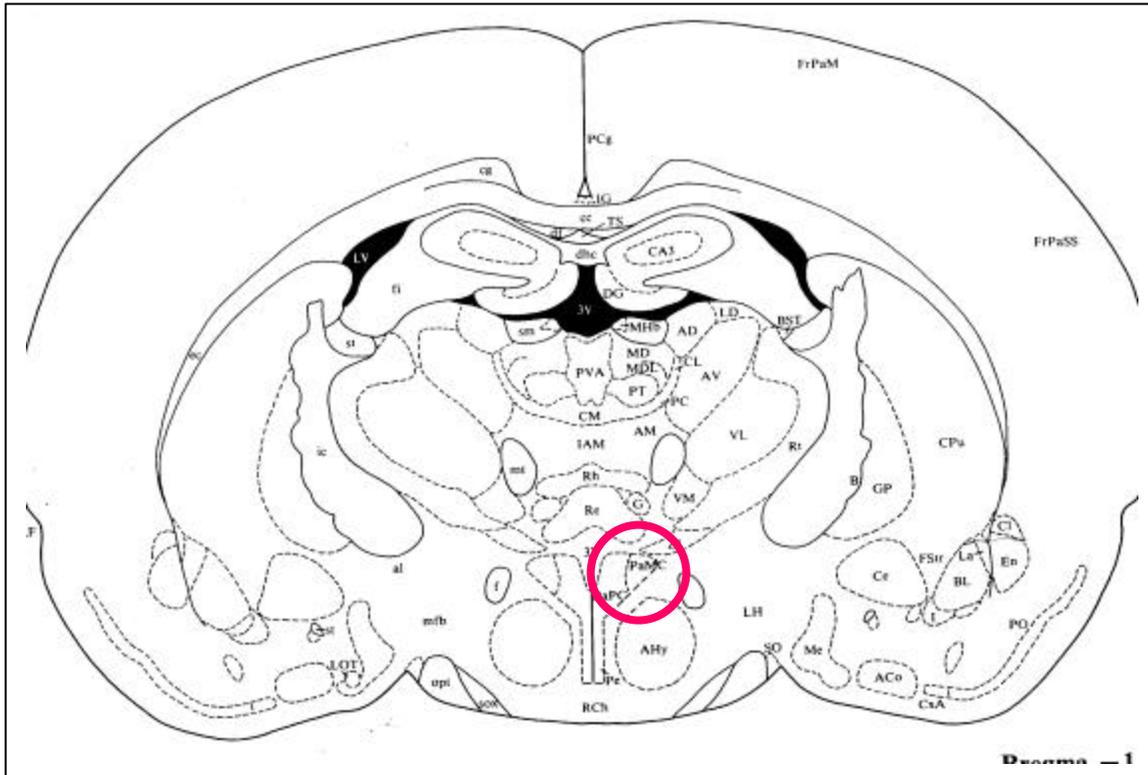


Abbildung 2.2: Zielpunkt Ncl. paraventricularis hypothalami (PVN)

Die ermittelten Koordinaten bezogen auf die Interaurallinie waren für den parvozellulären Anteil des PVN:

PVN

- Anteroposterior: +7,2 mm
- Dorsoventral: +1,9 mm
- Lateral: +0,2 mm

Die Koordinaten für den magnozellularen Anteil, in dem sich die Vasopressin und oxytocinproduzierenden Zellen befinden, weichen nur leicht von denen für den parvozellulären Anteil, in den die Sonde implantiert werden sollte, ab (Anteroposterior: +7,2 mm, Dorsoventral: +2,2 mm, Lateral: +0,6 mm).

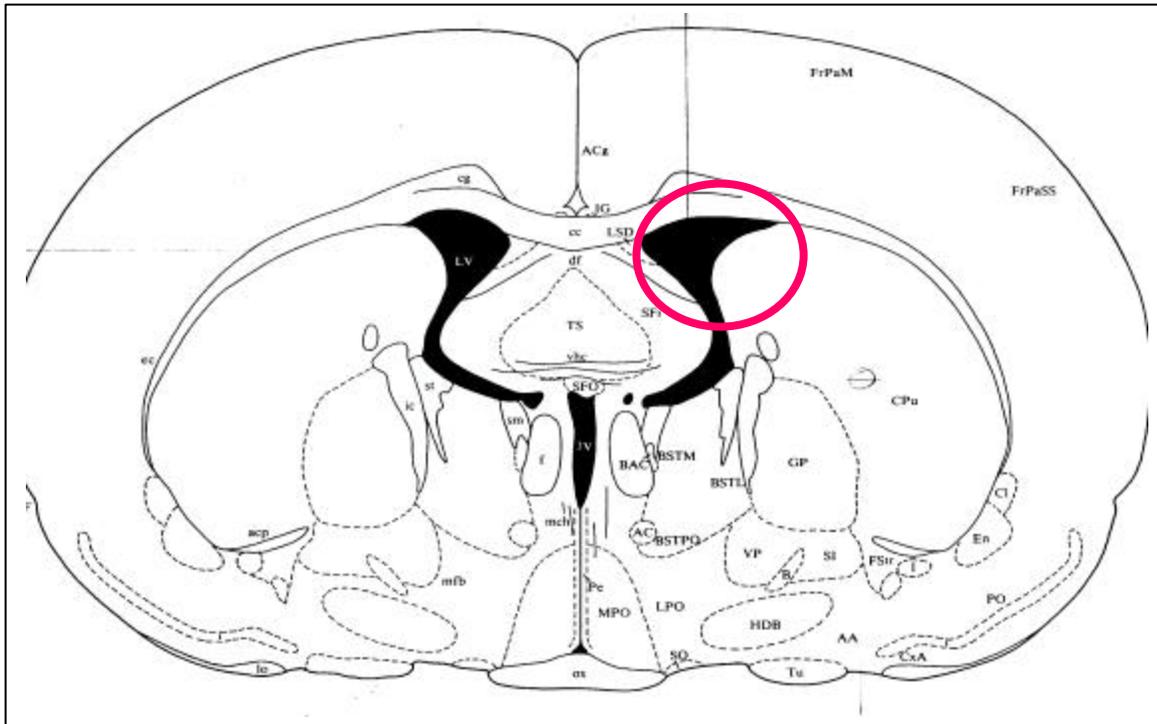


Abbildung 2.3: Zielpunkt Seitenventrikel

Die ermittelten Koordinaten bezogen auf die Interaurallinie waren:

Seitenventrikel

Anteroposterior: +7,7 mm
 Dorsoventral: +6,5 mm
 Lateral: +2,0 mm

Wir führten sowohl die Mikrodialysekanüle als auch die Glaskapillare in einem Winkel von 20° , da es, aufgrund der engen räumlichen Nähe nicht möglich war, die Kanülen senkrecht einzuführen.

2.2.1.3. Implantation der Kanülen

Nachdem die Tiere narkotisiert waren, implantierten wir ihnen eine Blutdruckmesskanüle in die A. femoralis, um parallel den arteriellen Blutdruck zu messen. (Da die Auswirkungen von Baclofen auf den Blutdruck nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, gehe ich nicht weiter darauf ein). Nach Punktion und Fixierung der Blutdruckmesskanüle wurden die Versuchstiere in das Stereotaxiegestell eingespannt.

Am Außenrahmen des Stereotaxiegestelles befindet sich wie oben beschrieben auf jeder Seite ein Fixierstift. Diese wurden in die Meatus acustici externi der Ratte eingeführt, der Kopf mittig positioniert und die Schrauben der Fixierstifte festgezogen, so dass diese Kopfposition fixiert wurde. Außerdem wurde der Oberkiefer in einen in der Höhe verstellbaren Schneidezahnhalter (Tooth bar) eingespannt,

um eine Rotation um die Interauralachse zu vermeiden. Die Position des Scheidezahnhalters wird auf das entsprechende Körpergewicht der Ratte eingestellt. In unserer Studie lag sie 3.3 mm unterhalb der horizontalen Nulllinie. Diese entnahmen wir ebenfalls dem Atlas von Paxinos und Watson (1982). Durch einen medianen Schnitt im Verlauf der Sutura sagittalis wurde die Kopfhaut der Ratte eröffnet. Das Operationsgebiet wurde mit vier als Wundspreizer dienenden Dieffenbachklemmen freigehalten. Die Schädelkalotte wurde durch Abstreifen des Periosts mittels in Wasserstoffperoxid getränkten Watteträgern dargestellt. Eventuell auftretende Blutungen wurden mit einem LötKolben hitzokoaguliert. Die Schädelkalotte trepanierten wir an den Durchtrittsstellen für die Mikrodialysekanüle bzw. Glaskapillare mit einer Handbohrmaschine. Für die Mikrodialysekanüle entfernten wir ein 4 x 5 mm großen, rechteckigen Knochenstück aus der Schädeldecke, linksseitig, etwa 5mm caudal der Sutura coronaria und lateral der Sutura sagittalis. Für die Glaskapillare entfernten wir ein gleichgroßes Knochenstück, rechtsseitig unmittelbar caudal der Sutura coronaria und lateral der Sutura sagittalis. Die freigelegte Dura mater wurde mit einer umgebogenen Stahlkanüle perforiert und anschließend entfernt, um, da wir keine Führungskanülen für die Mikrodialyse benutzten, eine Beschädigung der empfindlichen Membran der Mikrodialysekanüle zu vermeiden. Anschließend konnte sowohl die Mikrodialyse, als auch die Glaskapillare gemäß ihrer vorher ermittelten Koordinaten durch die Hirnoberfläche in das jeweilige Zielgebiet eingebracht werden. Sowohl die Mikrodialysekanüle als auch die Glaskapillare wurden in einem Winkel von 20 Grad implantiert; die Mikrodialysekanüle aufgrund der anatomischen Gegebenheiten mit der Gefahr einer Verletzung des Sinus sagittalis, die Glaskapillare aufgrund der engen räumlichen Beziehung der 2 Halter für Mikrodialysekanüle und Glaskapillare zu einander.

Nach Aussage von Prof. Mennel, Medizinischem Zentrum für Pathologie, Abteilung Neuropathologie der Philipps – Universität in Marburg ist ein histologischer Nachweis der korrekten Lage der entsprechenden Sonden nicht erforderlich, wenn die exakten Koordinaten verwendet wurden (Becker, 2000).

2.2.2. Mikrodialyse

2.2.2.1. Vorbemerkungen

Das Prinzip der Diffusion durch eine selektiv permeable Membran ist für die Mikrodialysetechnik entscheidend. Hierbei wurden CMA/11- Kanülen verwendet. Die Abbildung 2.4 skizziert den Aufbau dieser Kanülen.

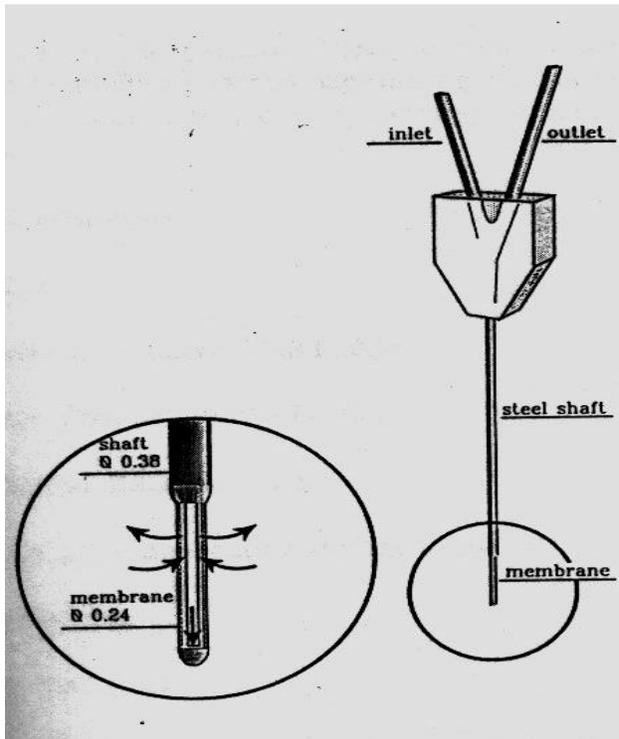


Abbildung 2.4: CMA/11 – Kanüle

CMA/11 – Kanülen gehören zur Gruppe der konzentrischen Sonden. Wie die Abbildung 2.4 zeigt, bestehen sie aus einem Stahlschaft, dessen Durchmesser 0,38 mm beträgt und einer inneren und äußeren Membran. Die innere Membran weist einen Durchmesser von 0,21 mm, die äußere Membran einen Durchmesser von 0,24 mm auf. Die Membran in unserem Versuch hatte eine Länge von 3 mm. Von der hier verwendeten Mikrodialysekanüle (CMA/11) gibt es 4 verschiedene Längen (von 1 – 4 mm). Mit zunehmender Länge erhöht sich die Recovery für die hier in der Studie untersuchten Neurotransmitter. Das Material aus dem die innere Kanüle besteht ist Silikon. Es können nur Moleküle unter 6000 Dalton durchtreten.

Die Perfusion der Kanülen erfolgt mit Ringer – Lactat. 1000 ml Ringer – Lactat enthalten:

Natriumchlorid 6g, Kaliumchlorid 0,4g, Calciumchlorid $2\text{H}_2\text{O}$ 0,27g, Natriumlactat – Lösung 6,34g (entspricht: mmol/l: Na^+ 130,9; K^+ 5,4; Ca^{2+} 1,84; Cl^- 111,7; Lactat 28,3). Titrationsacidität 0,5 - 2,0 mmol NaOH/l, pH-Wert 5 – 7, theoretische Osmolarität 276mosm/l.

Es ist wichtig, dass die Perfusionsflüssigkeit nicht die Substanzen enthält, die untersucht werden soll. Außerdem enthält die Flüssigkeit keine Proteine, dadurch entfällt eine Vorbehandlung des Perfusats, um mögliche Proteine herauszufiltern. Einlass und Auslass der Sonden wurden mit FEP – Schläuchen verbunden.

Zwischen dem Extrazellularraum des Gehirns und der Perfusionsflüssigkeit kommt es zu einem Konzentrationsgefälle. Dieses ist die Grundvoraussetzung für die nun stattfindende Diffusion von Stoffen aus dem Extrazellularraum in die Perfusionslösung. Diese Stoffe besitzen aus den oben beschriebenen Gründen ein Molekulargewicht kleiner als 6000 Dalton. Das trifft auch auf Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure zu.

Das erhaltene Perfusat mit den diffundierten Neurotransmittern wurde über den Auslassschlauch der Kanüle in ein Eppendorf – Cup geleitet und dort gesammelt. Das Perfusat wurde anschließend in der HPLC – Anlage auf seine analytische Zusammensetzung untersucht bzw. es wurde die Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure bestimmt. Auf die Methode der HPLC gehe ich weiter unten ein.

Durch die Mikrodialyse lassen sich keine direkten Proben der interstitiellen Flüssigkeit entnehmen. Die nachgewiesenen Substanzkonzentrationen im Dialysat lassen somit nur bedingt eine Aussage auf den tatsächlichen Substanzgehalt des Extrazellulärraums zu. Deshalb führten wir eine sogenannte „Recovery“ durch. Der Begriff wurde durch Zetterstrom et al. geprägt. Sie waren die ersten, welche die Substanzkonzentration im Dialysat in interstitielle Substanzkonzentration des Gehirns überführt haben (Zetterstrom, 1982).

Die relative Recovery bezeichnet das Verhältnis zwischen der Konzentration einer bestimmten Substanz im Dialysat und der Konzentration derselben Substanz im die Dialyse – Sonde umgebenden Medium. Die absolute Recovery ist definiert als der Gehalt einer gewonnenen Substanz im Dialysat pro Zeiteinheit.

2.2.2.2. Mikrodialyse im Ncl. paraventricularis hypothalami mit/ohne intraventrikuläre Baclofen-applikation

Bei der Durchführung des Versuchs war es wichtig, dass die Rahmenbedingungen den physiologischen und arteigenen Voraussetzungen der Ratten angepasst wurden. Deshalb lagen die Tiere während des Versuchs, der mit Operationszeit über 7 Stunden dauerte, auf einer Heizmatte. Die Temperatur der Ratte wurde rektal gemessen und mit Hilfe der körpertemperaturregulierenden Heizmatte konstant bei 37,5 +/- 0,5 °C gehalten.

Darüber hinaus kontrollierten wir während der Versuche in zweistündigen Intervallen Blutgase, Blutglukose und Elektrolyte. Obwohl wir ohne großen Blutverlust operierten, war es dennoch notwendig, dem Tier, da der Versuch über eine längere Zeit lief, intraperitoneal Ringer – Lösung zu verabreichen, um eine Dehydratation zu vermeiden.

Die CMA/11 – Kanüle wurde am Einlass und Auslass mit FEP-Schläuchen (i. D. 0,12 mm) mit der Milliliterspritze (1 ml) in der CMA/150 Mikroinjektions-Pumpe auf der einen Seite und dem Eppendorfauffanggefäß auf der anderen Seite verbunden. Zum Abdichten der Verbindungsstellen zwischen der Kanüle und den FEP – Schläuchen benutzten wir Sekundenkleber.

Zu Beginn des Versuchs mussten wir das Schlauchsystem gut durchspülen und überprüfen, ob sich Luftblasen gebildet hatten. Das Perfusionsmedium sollte Raumtemperatur aufweisen und entgast sein. Die Dialysemembran musste feucht gehalten werden, da das Glycerol beim Kontakt mit der Perfusionsflüssigkeit herausgespült und die Membran dadurch empfindlich, vor allem für Trockenheit, wurde.

Zuerst führten wir, u.a. um zu kontrollieren, ob die Mikrodialysekanüle intakt war, drei Vorrecoveryes mit einem wässrigen Dopaminstandards durch. Einen Dopaminstandard benutzen wir zum einen da die Retentionszeit von Dopamin kurz, zum anderen, da Dopamin in unserem Labor als Standard etabliert ist. Prinzipiell hätten wir auch einen anderen Standard nehmen können.

Die Flussgeschwindigkeit betrug 1,75 µl/min. Somit wurden in 20 Minuten, nach denen das Dialysat der HPLC zur Auswertung zu geführt wurde, 35 µl gewonnen. Zu diesen 35µl gaben wir 5 µl Perchlorsäure. Dieser diente zum einen zur Stabilisierung der im Dialysat befindlichen Neurotransmitter, zum anderen als Radikalfänger. Jeweils 20 µl von den in den 6 Vorläufen und 6 nach Baclofen- bzw. Ringergabe gewonnenen Dialysaten wurden für die Bestimmung der Neurotransmitter, 20 µl für die Bestimmung der Aminosäuren verwendet. Stellte sich bei den Recoveries heraus, das die Mikrodialysesonde beschädigt war, wurde sie gegen eine neue Kanüle ausgetauscht.

Dann erfolgte die Implantation der Kanülen. Zunächst wurden 9 Proben zur Bestimmung der Transmitterbasiskonzentrationen entnommen, wobei die ersten 6 Proben verworfen wurde, da es durch die Implantation der Sonde zu einer Freisetzung von Neurotransmitter kommt und somit die Probe verfälscht worden wäre.

Nach diesen 3 Stunden applizierten wir 1,5 µg Baclofen oder Ringerlösung über einen Zeitraum von 20 min. 6 weitere Proben, übereinstimmend in Menge und Zeitintervall der vorhergehenden Proben, wurden nach der Verabreichung des Pharmakons gewonnen.

Zur Kontrolle der Unversehrtheit der Mikrodialysekanüle führten wir zum Abschluss, nach dem wir sie aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami entnommen hatten, 3 Nachrecoveries mit dem Dopaminstandard durch. Die Mikrodialysesonde wurden hiernach mit Aqua bidest durchgespült, um eine Beschädigung der Membran der Kanüle durch die in der Perfusionsflüssigkeit enthaltenden Stoffe zu vermeiden und so die Kanüle im nächsten Versuch wieder zu verwenden. Die Abbildungen 2.5 und 2.6 veranschaulichen noch mal die Anordnung der Sonden und den Versuchsaufbau. In der Abbildung 2.5 wird nochmals deutlich, weshalb man die Mikrodialysesonde und die Glaskapillare aufgrund der engen räumlichen Beziehung und der Größe der Fixiervorrichtung nicht senkrecht, sondern in einem Winkel von 20° einführen musste.



Abbildung 2.5: Auf der linken Seite befindet sich der Makromanipulator mit dem Halter für die Mikrodialysekanüle, auf der rechten Seite, vorne, steht der Makromanipulator mit dem Halter für die Glaskapillarsonde zur intrathekalen Baclofenapplikation

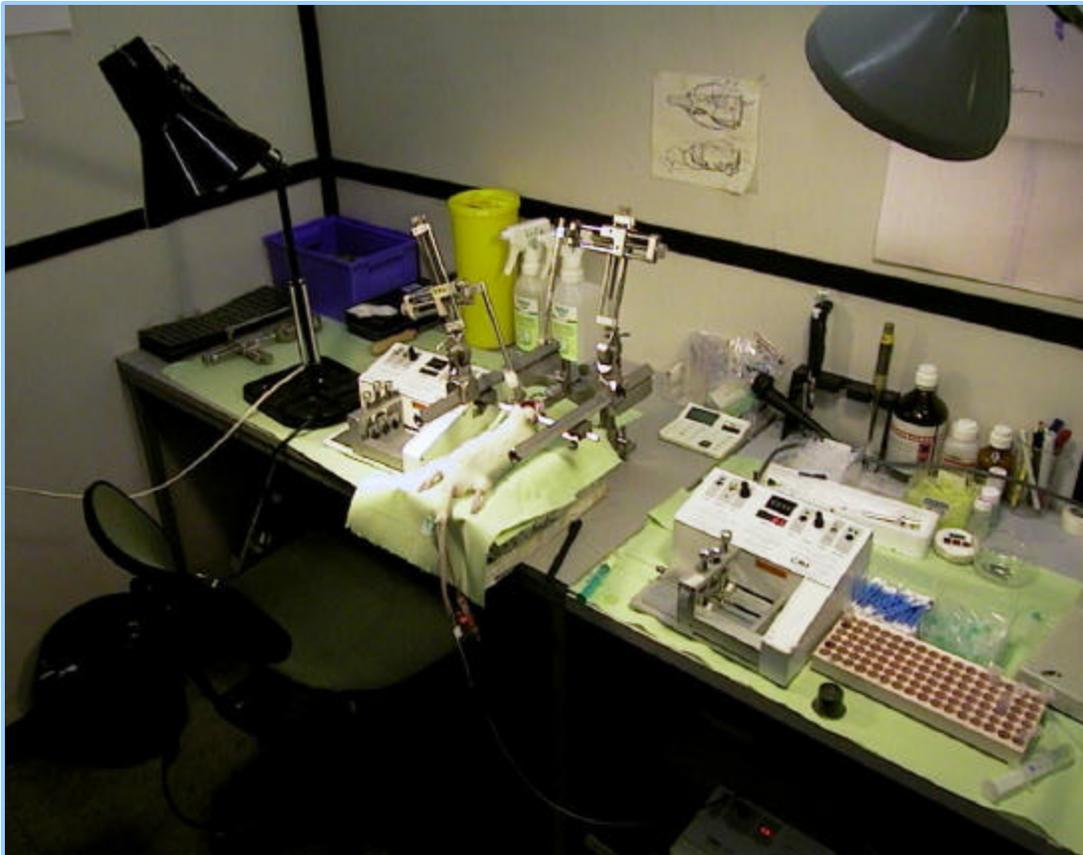


Abbildung 2.6: Links befindet sich das Versuchstier mit den implantierten Sonden, rechts die Mikroinjektionspumpe mit dem daneben stehenden Ständer für die Eppendorf – Cups

2.2.3. HPLC

2.2.3.1. Grundzüge

Unter dem Begriff Chromatographie werden physikalische Methoden zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase erfolgt. Die HPLC (high performance liquid chromatography) ist ein Verfahren der Säulen – Flüssigkeits – Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Diese chromatographische Säule, die verschiedene Substanzen in einer Probe gemäß ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften auftrennt, ist das Kernstück der HPLC – Anlage. Die Auftrennung erfolgt nach dem Prinzip der „differenten Migrationsrate“. Differenten Migrationsrate bedeutet, dass verschiedene Analysate sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Chromatographiesystem bewegen. Die anderen Komponenten der Anlage sind für die Herstellung der Bedingungen, die für die Chromatographie notwendig sind, und für die Kontrolle des Ablaufes, der Bestimmung, der Erfassung und Auswertung der Substanzen zu ständig. Ein einfaches HPLC – System, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: Der mobilen Phase, dem Degaser, der Pumpe, dem Autosampler, der Säule, dem Integrator und dem Detektor, auf die ich nachher eingehen werde. Die Skizze in Abbildung 2.7 informiert über den Aufbau.

Das System ist isokratisch. Das heißt, dass die Zusammensetzung des Eluenten und die Fließmittelstärke konstant bleiben. Im Gegensatz dazu wird bei der Gradientenelution der Eluent während des Trennvorganges variabel zusammengesetzt und die Fließmittelstärke erhöht.

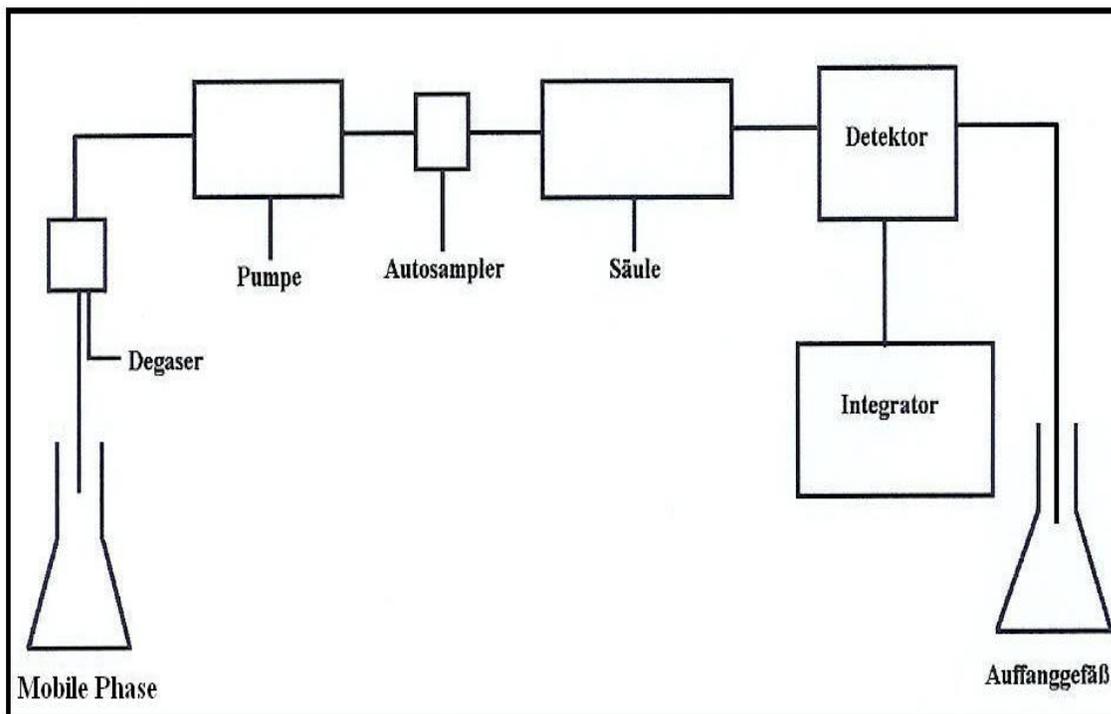


Abbildung 2.7: Aufbau der HPLC – Anlage aus Handbuch der HPLC, K.K. Unger (1998), GIT Verlag; Darmstadt/Deutschland

Die HPLC verwendet Trennpartikel mit Korngrößen von 3 – 10 μm . Sie erreicht hohe Trennstufenzahlen, erfordert aber gleichzeitig die Überwindung eines relativ hohen Gegendrucks beim Transport der mobilen Phase durch die dünne Trennsäule (4 mm). Alle Teile der HPLC – Anlage müssen totvolumenfrei miteinander verbunden werden und druckstabil sein (bis 300 bar).

Die **mobile Phase** fungiert in Form eines Fließmittels, dessen Zusammensetzung konstant ist als Transportmedium für die zu analysierenden Substanzen

In der vorliegenden Arbeit haben wir mit der Reversed – Phase – Chromatographie gearbeitet. Dabei ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Zur einwandfreien Trennung muss das Fließmittel folgende Kriterien erfüllen:

1. Die Substanzprobe muss im Fließmittel löslich sein
2. die stationäre Phase muss vom Fließmittel benetzt werden
3. ein Verteilungsgleichgewicht der gelösten Probe zwischen den beiden Phasen muss sich einstellen
4. die Probe muss die Säule vollständig verlassen können.

In unserer Studie wurden Natriumacetat (0,1 M), Octansulfonsäure (1,8 M), Titriplex III (0,3 M) und Methanol (14 %) in Aqua bidest. und Essigsäure (99,8 %) so gelöst, dass eine Lösung mit einem pH-Wert von 4,0 und einem Gesamtvolumen von 2000 ml entstand. Der **Degaser** (Dionex DG 1310 Degasys) entlüftete das Fließmittel. Die **Pumpe** (Merck/Hitachi, Modell 655 A – 12) gab das Fließmittel mit einem hohen Druck in das System ein. Bei der Pumpe handelte es sich bei dieser Katecholamin-Anlage um eine Doppelkolbenpumpe mit kurzem Hub. Das Fließmittel wird hier direkt von einem aus Saphir bestehenden Kolben verdrängt. Eine Doppelkolbenpumpe hat den Vorteil, dass

sie Pulsschwankungen, die sich auf das Messergebnis auswirken können, verhindert. Die Flussrate betrug 0,9 ml/min.

Der **Autosampler** (CMA 200 Refrigerated Microsampler, Peacock PC mit CMA Software) injizierte die zu analysierenden Dialysate. In der vorliegenden Studie verwendeten wir einen Autosampler mit zwei getrennten Systemen. System A arbeitet mit einem Injektionsvolumen von 20 µl und einer Integrationszeit von 20 Minuten und wurde unter anderen für die Bestimmung der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure benutzt. System B wurde zur Aminosäurenbestimmung eingesetzt.

In der **Säule** (Supelcosil, Modell LC 18) lief der Trennvorgang ab. Sie beinhaltet die stationäre Phase. In der Säule befand sich ein Packungs-material (C18). 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 abgeben können (Desorption). Außerdem spielt noch die Anziehung (Attraktion) der Substanzen durch die stationäre Phase eine große Rolle, da sie sich proportional zur Verweilzeit der Substanz verhält.

Die genannten Faktoren haben natürlich auch Einfluss auf die Retentionszeiten der zu messenden Substanzen. Die Retentionszeit ist die Zeit, die eine Substanz benötigt, um von der Injektionsvorrichtung bis zum Säulenende zu gelangen. Die Retentionszeit ist für die jeweilige Substanz konstant. Diese Gesamtretentionszeit setzt sich aus der Nettoretentionszeit (Aufenthalt in der stationären Phase) und der Durchflusszeit der Mobilphase (ohne Retention) zusammen. Benötigt wird sie, um einen erfassten Peak als eine bestimmte Substanz zu identifizieren.

Der Nachweis der Substanzen erfolgt mittels eines geeigneten **Detektors** (ESA, Coulochem II Multi-Electrode-Detektor). Bei dieser Studie benutzten wir einen elektrochemischen Detektor, der sich für oxidierbare bzw. reduzierbare Substanzen, wie die Katecholamine, eignet. Die untere Nachweisgrenze lag bei etwa 10 pg/20 µl für jede der gemessenen Substanzen. Katecholamine lassen sich oxidieren und reduzieren. Aus den dabei freigesetzten Elektroden resultiert Strom, der sich proportional zu der jeweiligen oxidierten bzw. reduzierten Substanz verhält.

Die vom Detektor abgegebenen Signale wurden durch den **Integrator** (Shimadzu C-R3A Chromatopac) als Fläche dargestellt, die wiederum nach vorheriger Standardisierung in Konzentrationen umgerechnet werden kann. In der vorliegenden Studie verzichteten wir auf die Umrechnung der Peakfläche in Konzentrationen, da es uns um eine relative Veränderung der Transmitterausschüttung nach Baclofen bzw. Ringergabe und nicht um eine absolute Darstellung der Transmittermenge ging.

Vor einer Messung muss der Integrator kalibriert werden. Dabei injizierten wir für jeden zu messenden Neurotransmitter den jeweiligen Standard (von 10 pg/20 µl bis 100 pg/20 µl jeweils um 10 pg/20 µl erhöht) und konnten nun die folgenden analysierenden Proben mit der erstellten Eichkurve vergleichen und die jeweilige Konzentration der Substanz berechnen.

Abbildung 2.8 zeigt beispielhaft ein in dieser Studie gewonnenes Chromatogramm .

Analyse der gewonnenen Dialysate:

Die Dialysate wurden mit einem Injektionsvolumen von 20µl über den Autosampler injiziert. Bei einer Flussrate von 0.9ml/min erfolgte die Trennung in der Supelcosil LC 18 Säule (15cm x4,6mm; 3µm) und Detektion im ESA-Detektor mit einer Laufzeit von 20 min.



Abbildung 2.9: Arbeitsplatz HPLC

2.3. Auswertung der gewonnenen Daten der HPLC

Vom Integrator wurden Peaks aufgezeichnet. Diese wurden mit den entsprechenden Standards verglichen und konnten so identifiziert werden. Möglicherweise anfallende Störpeaks konnten hiermit erkannt werden.

Damit man die hier gewonnenen Messdaten besser vergleichen und um sie einer statistischen Bearbeitung besser zugänglich zu machen, wurden alle Messwerte als Prozentwerte normiert. Das heißt, dass die letzten 3 Werte, die im Vorlauf gewonnen wurden, gemittelt und als Wert 1 angenommen wurden. Alle weiteren Messwerte wurden als Prozentwerte des Vorlaufmittelwertes angegeben. Auf die Angabe von Konzentrationen wurde verzichtet.

2.4. Statistische Bearbeitung der Daten

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde zuerst für jeden individuellen Verlauf die Fläche unter der Kurve (area under the curve = AUC) berechnet. Dann führten wir den U – Test nach Wilcoxon –

Mann – Whitney durch. Dieser Test wird bei unpaarigen, unverbundenen Stichproben durchgeführt. Hier verglichen wir die AUC der Kontrollgruppe mit der AUC der Verumgruppe. Dieses Verfahren macht valide Aussagen für die hier durchgeführte explorative Untersuchung der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin und den Metaboliten Homovanillinsäure (Matthews, 1990). Eine einfachere Methode wird häufig bei seriellen Messungen angewandt: Hier werden Gruppen an einer Serie von Messpunkten verglichen. Allerdings ist dies biomathematisch gesehen nicht ganz korrekt, da vor Beginn der Studien nicht genau definiert wurde, wann die zu überprüfende Hypothese untersucht werden soll. Bei seriellen Messwerten handelt es sich um Messwerte, die nicht unabhängig sind. Sie werden durch die zuvor und danach ermittelten Daten beeinflusst (Matthews, 1990).

Der Friedman-Test stellt das nichtparametrische Äquivalent eines Designs mit Messwiederholungen bei einer Stichprobe bzw. eine Zweifach – Varianzanalyse mit einer Beobachtung pro Zelle dar. Der Friedman – Test überprüft die Nullhypothese, wonach die k verbundenen Variablen aus der selben Grundgesamtheit stammen. Für jeden Fall werden den k Variablen Rangzahlen von 1 bis k zugewiesen. Die Teststatistik wird auf Grundlage dieser Ränge durchgeführt. Vereinfacht ausgedrückt zeigt dieser Test an, ob die angetroffenen Änderungen eher Zufall sind oder systematischer Natur.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der Daten danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. H.H. Müller, Medizinische Informatik, der Philipps – Universität. Ausgewertet wurden die Daten unter Anwendung eines in SAS eigens erstellten Auswerteprogramms.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitätskontrolle HPLC

Zu Beginn der Studie wurde die HPLC – Anlage auf ihre Zuverlässigkeit getestet. Dazu führten wir 25 aufeinander folgende Messungen mit Standards für Noradrenalin, Adrenalin und Homovanillinsäure durch. Hierbei wurden 100 pg/20 µl des jeweiligen Standards pro Messung verwendet.

Die Abbildung 3.1 über die Ergebnisse dieser Einzelmessungen. Hier sind auf der x – Achse die Einzelmessungen, auf der y – Achse die dazugehörigen Werte der Peakflächen aufgetragen. Abbildung 3.2. zeigt deren prozentuale Umrechnung (Einzelwert/ Mittelwert der Einzelwerte x 100). Die Tabelle 3.1. gibt einen Überblick über die in den Abbildungen 3.1 und 3.2 graphisch dargestellten Einzelwerten.

Es geht deutlich daraus hervor, dass die Werte keinen großen Schwankungen unterworfen sind. Die Streuung der Messwerte lag unter +/- 10 %. Dies lässt auf eine große Genauigkeit der Messwerte der Anlage und damit auch der Zuverlässigkeit der hiermit gewonnenen Ergebnisse schließen.

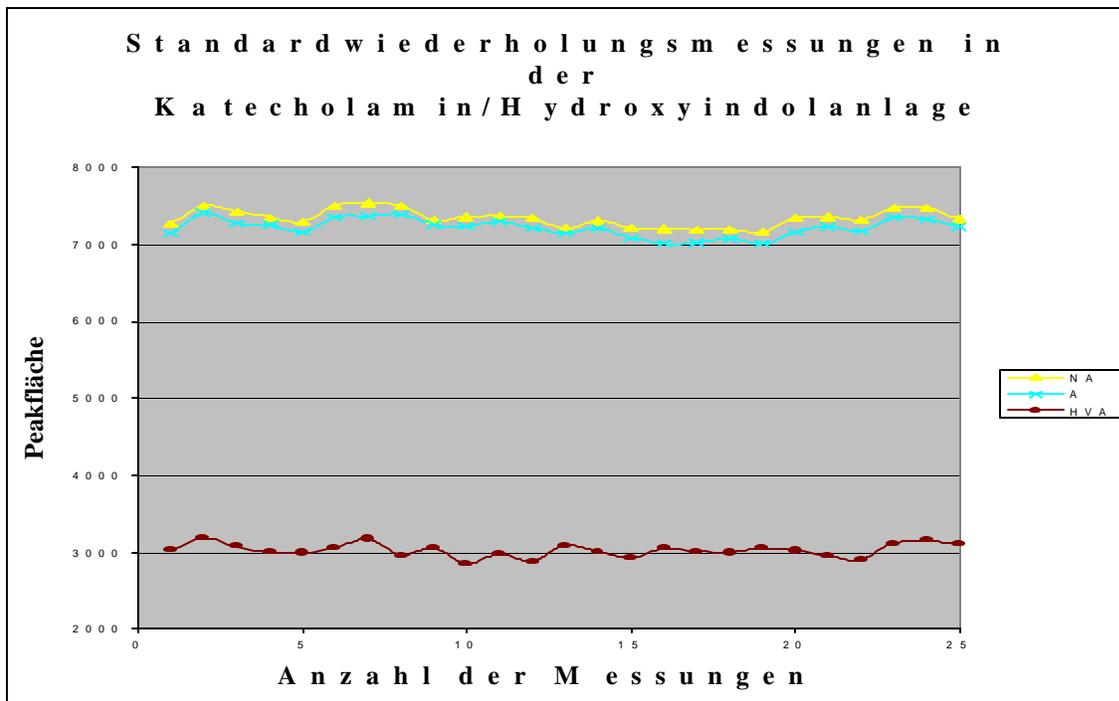


Abbildung 3.1: Ergebnisse der Standardwiederholungsmessungen in der Katecholamin/Hydroxyindol – HPLC

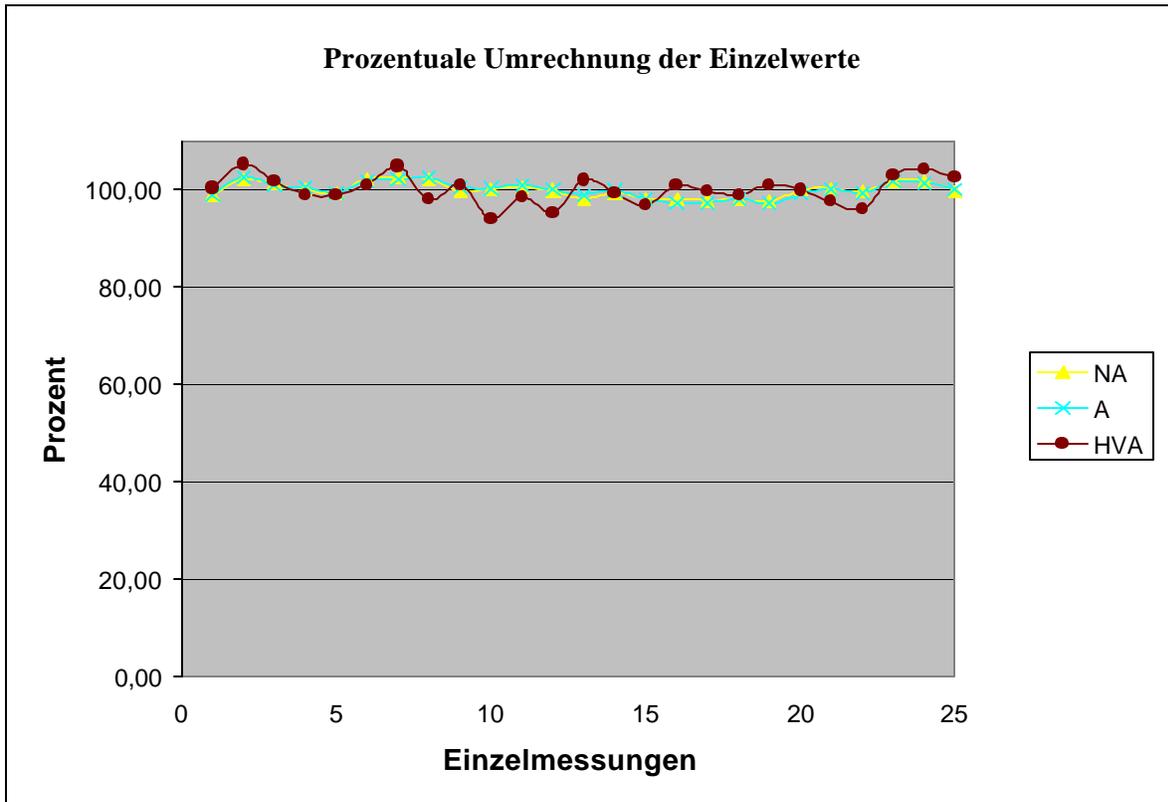


Abbildung 3.2: Prozentuale Umrechnung der Standardwiederholungsmessungen mit der Katecholamin/Hydroxyindol – HPLC

Ergebnisse der Einzelmessungen			Prozentuale Umrechnung (Wert/ Mittelwert x 100)		
NA	A	HVA	NA	A	HVA
7266	7143	3034	98,98	99,02	100,32
7500	7409	3182	102,17	102,70	105,22
7430	7272	3075	101,21	100,81	101,68
7351	7255	2997	100,14	100,57	99,10
7295	7162	2991	99,37	99,28	98,90
7503	7351	3057	102,21	101,90	101,08
7537	7368	3170	102,67	102,14	104,82
7499	7390	2962	102,15	102,44	97,94
7315	7254	3056	99,65	100,56	101,05
7360	7236	2843	100,26	100,31	94,01
7368	7294	2978	100,37	101,11	98,47
7336	7210	2878	99,93	99,95	95,16
7207	7146	3084	98,17	99,06	101,97
7305	7207	3005	99,51	99,90	99,36
7213	7084	2931	98,26	98,20	96,92
7201	7010	3055	98,09	97,17	101,02
7187	7021	3014	97,90	97,33	99,66
7196	7074	2994	98,02	98,06	99,00
7163	7010	3056	97,58	97,17	101,05
7340	7156	3021	99,99	99,20	99,89
7360	7231	2949	100,26	100,24	97,51
7316	7169	2906	99,66	99,38	96,09
7474	7345	3115	101,81	101,82	103,00
7475	7325	3151	101,83	101,54	104,19
7328	7225	3103	99,82	100,15	102,60
Mittelwerte					
Noradrenalin		Adrenalin		HVA	
7341,00		7213,88		3024,28	

Tabelle 3.1.: Darstellung der Einzelergebnisse der Standardwiederholungsmessungen und deren prozentuale Umrechnung

3.2. Ergebnisse der Transmitteruntersuchungen

3.2.1. Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wollten wir die Wirkung intrathekal appliziertem Baclofen auf die Ausschüttung von Adrenalin, HVA und Noradrenalin untersuchen. Hierzu untersuchten wir insgesamt 38 Versuchstiere, von denen 19 Baclofen und 19 Ringerlösung appliziert wurde. Dabei konnten bei 16 von den 19 Tieren, die Baclofen erhalten hatten HVA, bei 14 Adrenalin und bei 8 Noradrenalin nachgewiesen werden. Bei der Kontrollgruppe war HVA bei 13, Adrenalin bei 7 und Noradrenalin bei keinem von den 19 untersuchten Tieren nachweisbar. Abbildung 3.3 gibt hierüber einen Überblick.

Nachweis von HVA, Adrenalin und Noradrenalin bei Baclofen- und Ringergabe

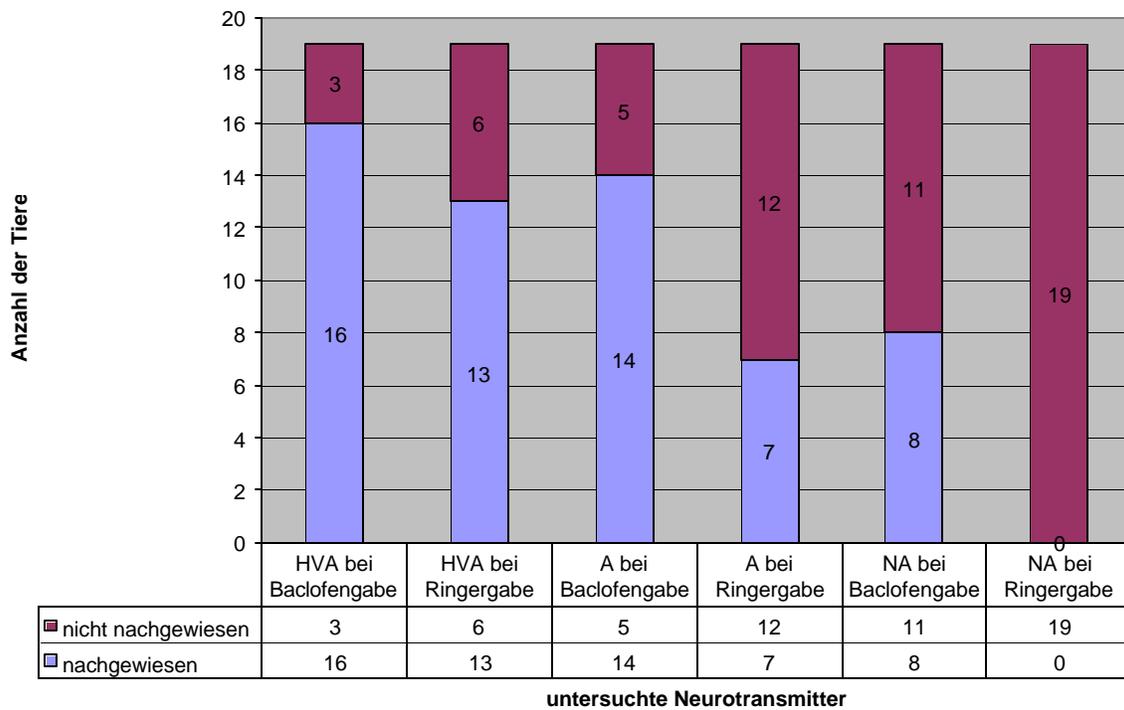


Abbildung 3.3: Überblick über die Anzahl der Tiere aus der Verum- und Kontrollgruppe bei denen Noradrenalin, Adrenalin und HVA nachweisbar und nicht nachweisbar war

3.2.2. Adrenalin

In der vorliegenden Arbeit wollten wir die Wirkung von intrathekal appliziertem Baclofen auf die Adrenalinausschüttung im Nucleus paraventricularis hypothalami untersuchen. Dazu applizierten wir einer Gruppe 1,5 µg Baclofen intrathekal und einer Kontrollgruppe dasselbe Volumen Ringerlösung. Von den insgesamt 38 Tieren gelang der Nachweis von Adrenalin bei 14 Versuchstieren, die Baclofen erhalten hatten, und bei 7 Tieren aus der Kontrollgruppe.

Wegen des fehlenden Nachweises einer Normalverteilung wurden nichtparametrische Lage- und Streuungsmasse wie z.B. der Median und die Perzentile mit in die Analyse einbezogen. Es kamen nichtparametrische statistische Tests (Mann – Whitney, U – Test, Friedman – Test) zum Einsatz.

Die Abbildung 3.4 zeigt den Verlauf der Adrenalinausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami anhand der Mediankurve. Auf der x – Achse wurde die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt - 20 kennzeichnet den Beginn der Verabreichung von Ringer bzw. Verum in den Seitenventrikel. Die Punkte 0 – 100 entsprechen den Messwerten nach der Ringer- bzw. Verumapplikation, die wiederum in 20 Minuten Abständen gemessen wurden. Die y – Achse zeigt die normierten Werte für Adrenalin, wie sie in 2.4 erklärt wurden.

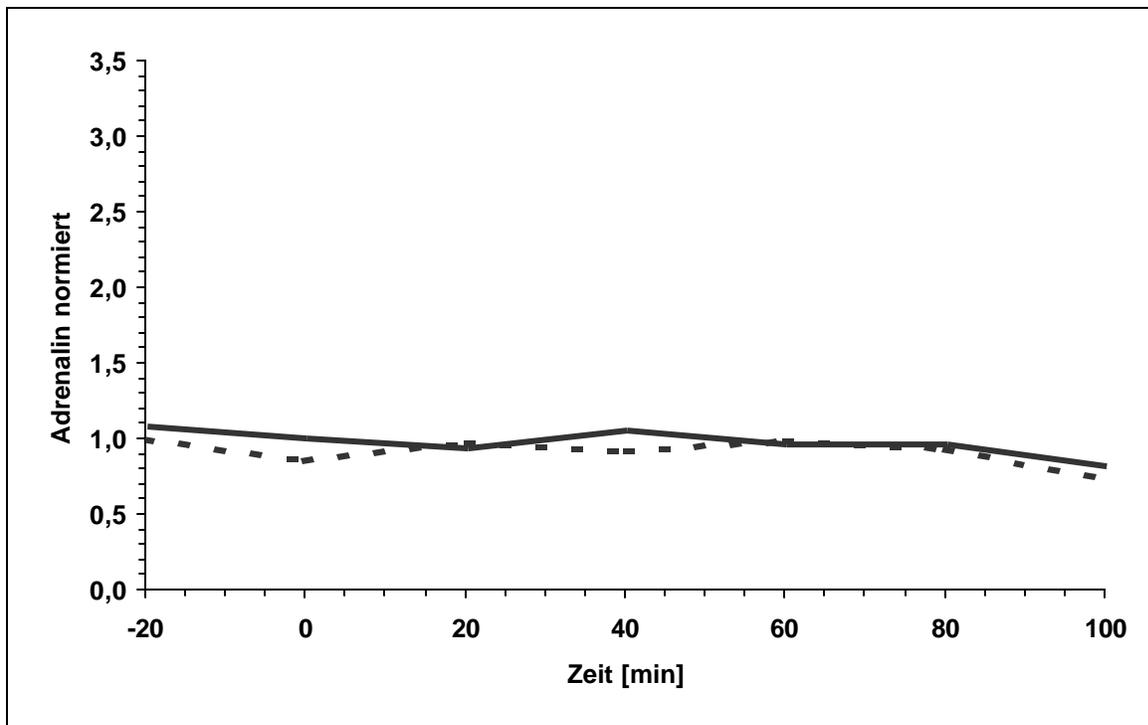


Abbildung 3.4: Mediankurven für Adrenalin in der Baclofen - (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)

Bei den Messungen der Kontrollgruppe kam es wie erwartet zu keinem relevanten Effekt der intrathekalen Ringerapplikation auf die Adrenalinausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami. Wie die Abbildung 3.4. erkennen lässt, zeigte sich weder in der Kontroll- noch der Baclofengruppe eine relevante Änderung der Adrenalinausschüttung. Der in der Abbildung 3.4. vermittelte Eindruck wurde durch eine statistische Analyse mit dem Friedman-Test überprüft. Dieser

ergab, dass innerhalb der Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung der Adrenalin-ausschüttung nachzuweisen war ($p = 0,100$).

Die Abbildung 3.5. zeigt die Mediankurve in der Kontrollgruppe mit Boxplots für die Messungen ab t_0 . Es bestand hier kein nennenswerter Trend in bezug auf den Verlauf der Adrenalin-ausschüttung, die Werte oszillieren lediglich geringfügig um den Ausgangswert.

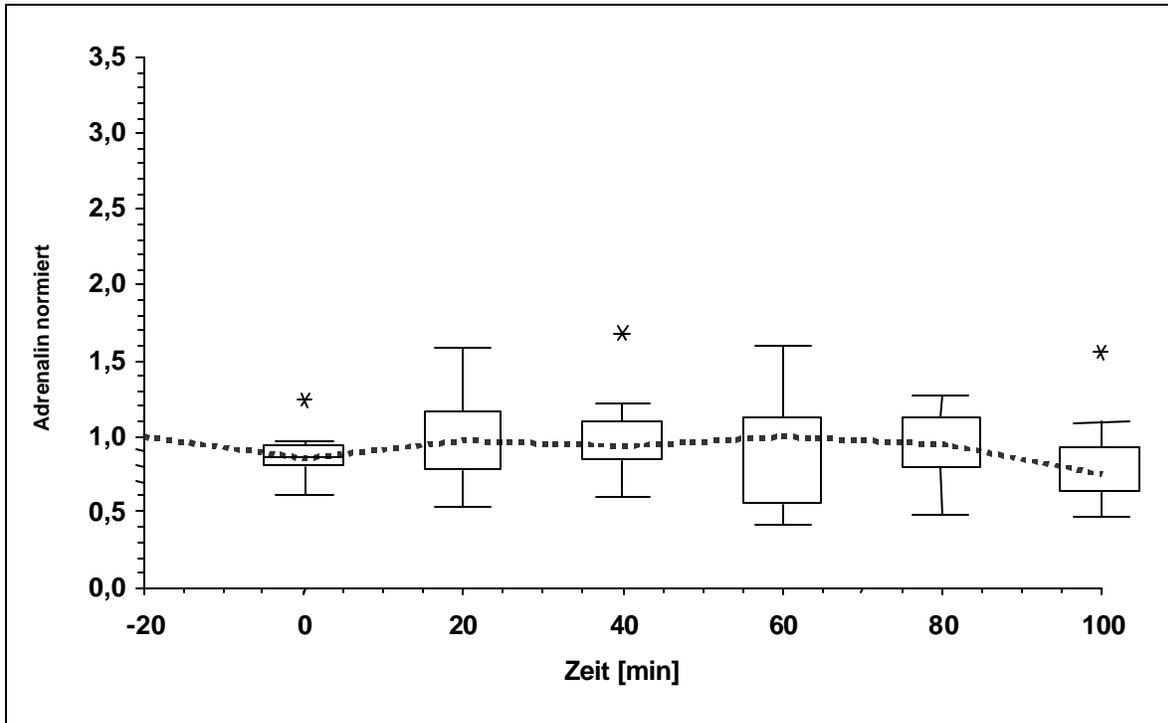


Abbildung 3.5: Mediankurve und Boxplots für Adrenalin in der Kontrollgruppe

Anhand der Messungen in der Verumgruppe ließ sich ebenfalls kein relevanter Zusammenhang zwischen der Applikation von Baclofen und dem Verlauf der Adrenalinausschüttung nachweisen ($p = 0,410$ im Friedman-Test).

Die Adrenalin-Konzentration im Dialysat zeigt nur geringfügige Änderungen, ein systematischer Zusammenhang mit der Applikation des Baclofen ist auch in der Abbildung 3.6 mit der Mediankurve und Boxplots für die Messungen ab t_0 nicht zu erkennen.

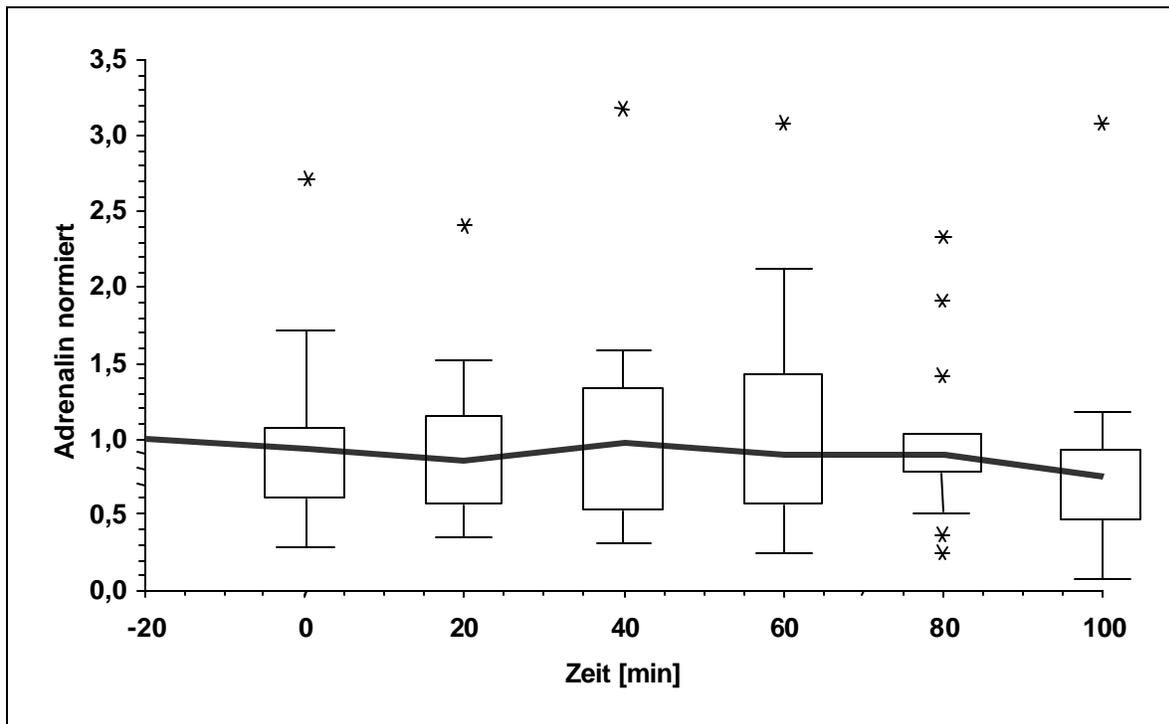


Abbildung 3.6: Mediankurve und Boxplots für Adrenalin in der Baclofengruppe

Zu allen Untersuchungszeitpunkten fanden sich in der Baclofengruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Adrenalinwerte. Mit Hilfe des U – Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney wurde die Adrenalinausschüttung für jeden Zeitpunkt hinsichtlich eines Unterschieds zwischen den beiden Gruppen getrennt analysiert. Dabei zeigte sich, dass zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand.

Auch beim Vergleich der beiden Gruppen mit Hilfe des U – Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney, nach vorangegangener Berechnung der „area under the curve“, zeigt sich, dass kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied nachweisbar ist ($p=0,799$).

Dementsprechend kann anhand der vorliegenden Untersuchung die Hypothese, dass der spezifische GABA – B – Rezeptor – Agonist Baclofen bei intrathekalen Applikation zu einer verminderten Freisetzung des Neurotransmitter Adrenalin führt, nicht bestätigt werden. Diese Hypothese ist zurückzuweisen. Hinweise auf eine mögliche Baclofen vermittelte Beeinflussung der Adrenalinausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami ließen sich nicht nachweisen. Die Tabelle 3.2 fasst die entsprechenden statistischen Angaben zur Adrenalinausschüttung zusammen.

Tabelle 3.2: Verlauf der Adrenalinausschüttung (normiert, in % der Ausgangswerte) in der Kontroll- und Baclofengruppe

		Baclofengruppe						
	Zeitpunkt	-20	0	20	40	60	80	100
MW		100,0	102,4	95,5	105,3	109,5	100,4	82,5
SD		0,0	60,5	54,8	74,2	77,4	58,0	74,6
Min		100,0	28,0	34,3	30,4	24,5	26,9	0,0
Max		100,0	276,0	244,1	316,0	307,1	243,5	316,0
Med		100,0	92,6	85,0	96,9	88,7	88,6	74,3
25. Perz.		100,0	60,9	57,0	53,1	56,1	77,9	45,7
75. Perz.		100,0	108,1	116,3	133,9	143,2	103,6	93,5

**Friedman-Test: p=0,100 für den Verlauf

		Kontrollgruppe						
	Zeitpunkt	-20	0	20	40	60	80	100
MW		100,0	87,1	98,3	99,5	89,3	91,8	82,9
SD		0,0	19,5	34,8	34,2	42,6	27,3	36,7
Min		100,0	59,9	51,9	58,8	40,2	46,9	45,2
Max		100,0	122,7	157,1	164,3	158,2	126,0	153,1
Med		100,0	85,3	97,5	92,6	99,2	94,1	74,3
25. Perz.		100,0	74,1	71,6	76,4	50,8	72,9	53,5
75. Perz.		100,0	95,5	119,7	120,2	118,0	118,2	107,7

**Friedman-Test: p=0,410 für den Verlauf

* Signifikanz im U –Test n. Mann -Whitney	1,000	0,636	0,585	0,856	0,971	0,913	0,799
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Statist. Kennwerte: MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, Min - Minimum, Max - Maximum, Med - Median, 25. Perz. - 25. Perzentile, 75. Perz. - 75. Perzentile, Signifikanzniveau $p < 0,05$

*Signifikanz p für den Vergleich zwischen Baclofen- und Kontrollgruppe separat für jeden Zeitpunkt

** Signifikanz p für einen Trend innerhalb der Werte der jeweiligen Gruppe

3.2.3. Homovanillinsäure

Zur Auswertung der Daten für die Bestimmung der Homovanillinsäure (HVA) aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami konnten die Messwerte von 28 von insgesamt 38 Versuchstieren herangezogen werden. 16 Tiere, denen Baclofen verabreicht worden war und 12 Tiere aus der Kontrollgruppe.

Wegen des fehlenden Nachweises einer Normalverteilung wurden nichtparametrische Lage- und Streuungsmasse wie z.B. der Median und die Perzentile mit in die Analyse einbezogen. Es kamen nichtparametrische statistische Tests (Mann – Whitney, U – Test, Friedman – Test) zum Einsatz.

Die Abbildung 3.7 zeigt den Verlauf der Ausschüttung von HVA aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami für die Baclofen- und die Kontrollgruppe anhand der Mittelwerte. Auf der x – Achse wurde die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt -20 kennzeichnet den Beginn der Verabreichung von Ringer bzw. Verum in den Seitenventrikel. Die Punkte 0 – 100 entsprechen den Messwerten nach der Ringer- bzw. Verumapplikation, die wiederum in 20 Minuten Abständen gemessen wurden. Die y – Achse zeigt die Werte für HVA.

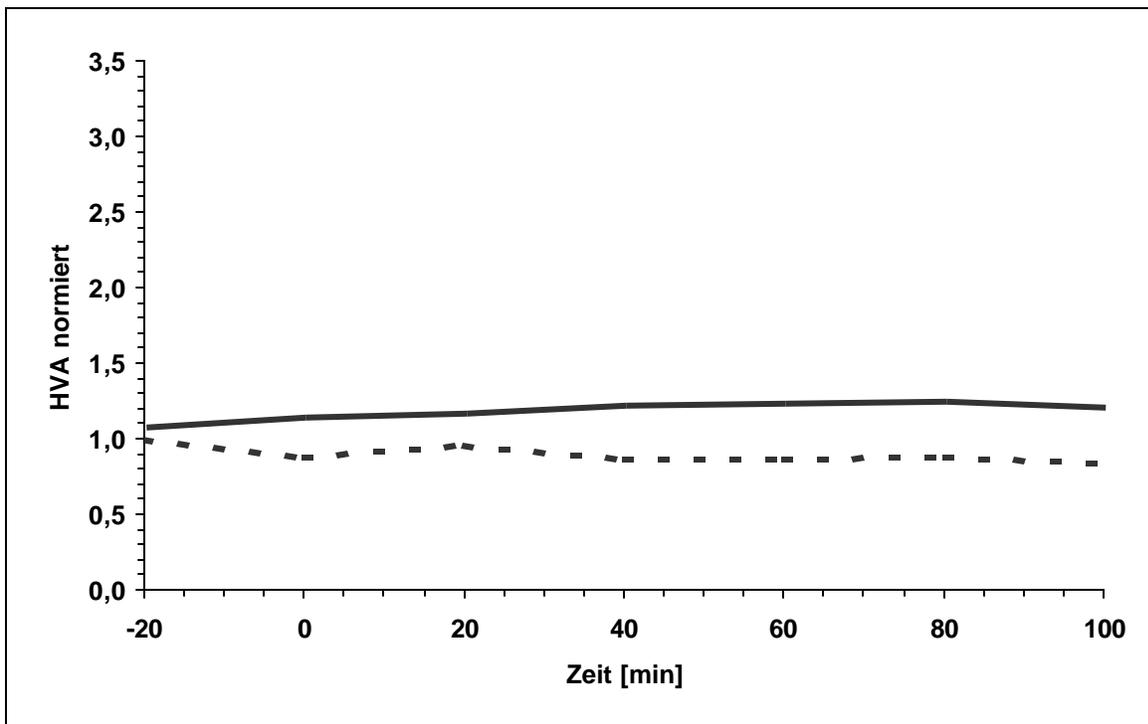


Abbildung 3.7 :Mediankurven für Homovanillinsäure in der Baclofen- (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (unterbrochene Linie)

Bei den Messungen in der Kontrollgruppe traten keine signifikante Schwankungen der HVA – Ausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami auf ($p=0,172$ im Friedman – Test für den Verlauf innerhalb der Kontrollgruppe). Hierbei ist zu erkennen, dass neben den undulatorische Schwankungen um den Ausgangswert eine leichte Abnahme der Messwerte zu verzeichnen war.

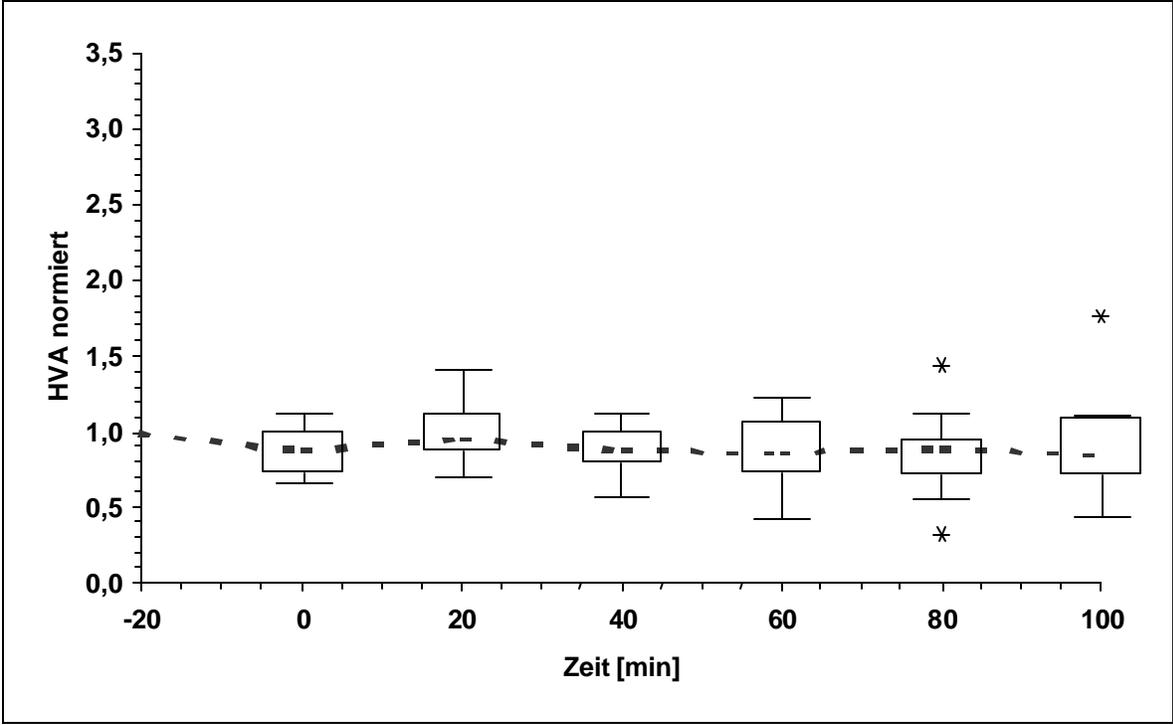


Abbildung 3.5: Mediankurve und Boxplots für HVA in der Kontrollgruppe

Die Messungen in der Verumgruppe mit Baclofengabe ergaben eine Zunahme der Homovanillinsäureausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami bei intrathekaler Baclofenapplikation. Bei $t=60$ erreicht die Konzentration ihr Maximum und fällt danach wieder ab. Im Friedman – Test ließ sich der Trend bei der gegebenen Fallzahl nicht statistisch absichern ($p=0,327$).

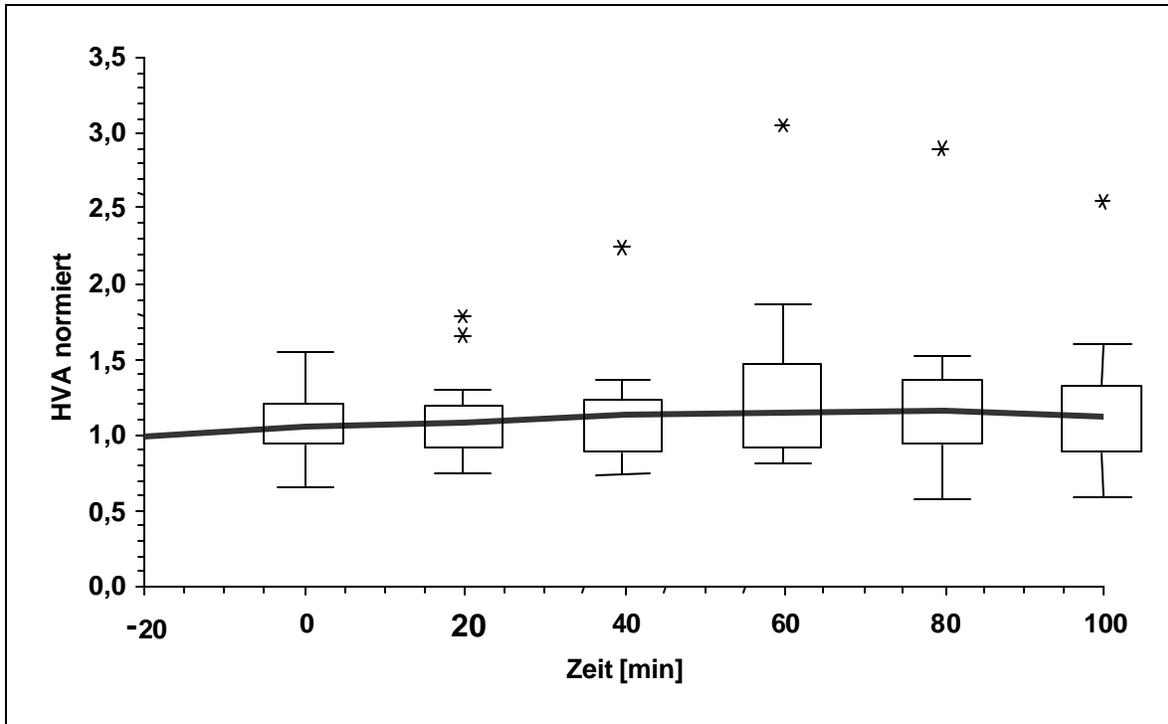


Abbildung 3.6: Mediankurve und Boxplots für HVA in der Baclofengruppe

Zu allen Untersuchungszeitpunkten fanden sich in der Baclofengruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte HVA – Werte. Mit Hilfe des U – Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney wurden die Konzentration für jeden Zeitpunkt hinsichtlich eines Unterschieds zwischen den beiden Gruppen getrennt analysiert. Dabei zeigt sich, dass bis auf den Zeitpunkt $t=20$, also 60 Minuten nach der Applikation von Baclofen bzw. Ringerlösung, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen. Schon zum Zeitpunkt $t=0$, also 20 Minuten nach der Applikation von Baclofen bzw. Ringerlösung, tritt ein signifikanter Unterschied auf.

Beim Vergleich der beiden Gruppen mit Hilfe des U – Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney, nach vorangegangener Berechnung der „area under the curve“, zeigt sich, dass ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied nachweisbar ist ($p=0,007$). In der Baclofengruppe fand sich dementsprechend eine signifikant höhere Ausschüttung des Neurotransmitters Homovanillinsäure (HVA).

Die Tabelle 3.3 fasst die entsprechenden statistischen Angaben zur Ausschüttung von Homovanillinsäure (HVA) zusammen.

Die Hypothese, dass bei intrathekaler Applikation von Baclofen eine vermehrte Freisetzung des Neurotransmitters Homovanillinsäure (HVA) resultiert, kann beibehalten werden. Wie die Tabelle 3.3 auf der folgenden Seite zeigt, sind die vorliegenden Ergebnisse mit dieser Hypothese gut vereinbar.

Tabelle 3.3: Verlauf der Ausschüttung von HVA (normiert, in % der Ausgangswerte) in der Kontroll- und Baclofengruppe

Zeitpunkt	Baclofengruppe						
	-20	0	20	40	60	80	100
MW	100,0	107,5	111,2	114,6	129,8	123,6	118,3
SD	0,0	22,3	28,9	35,2	56,2	51,5	42,6
Min	100,0	66,0	75,7	74,8	82,6	59,4	60,5
Max	100,0	155,5	177,8	225,0	304,7	291,7	246,0
Med	100,0	106,6	109,3	114,6	115,7	116,8	112,7
25. Perz.	100,0	93,4	90,4	88,0	91,2	94,5	87,5
75. Perz.	100,0	123,5	121,0	124,0	148,7	138,2	134,0

**Friedman-Test: $p=0,327$ für den Verlauf

Zeitpunkt	Kontrollgruppe						
	-20	0	20	40	60	80	100
MW	100,0	86,7	98,0	88,1	85,9	85,5	89,5
SD	0,0	13,9	17,1	14,0	21,9	25,9	29,9
Min	100,0	68,4	71,6	59,6	46,3	35,3	47,4
Max	100,0	109,4	134,6	108,9	118,3	139,9	157,8
Med	100,0	87,8	95,8	87,2	86,9	88,8	84,8
25. Perz.	100,0	73,1	84,8	79,4	70,4	68,0	70,0
75. Perz.	100,0	100,2	108,2	99,7	104,7	94,9	106,3

**Friedman-Test: $p=0,172$ für den Verlauf

*Signifikanz im U – Test n. Mann – Whitney	1,000	0,011	0,205	0,011	0,007	0,005	0,026
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Statist. Kennwerte: MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, Min - Minimum, Max - Maximum, Med - Median, 25. Perz. - 25. Perzentile, 75. Perz. - 75. Perzentile, Signifikanzniveau $p < 0,05$

* Signifikanz p für den Vergleich zwischen Baclofen- und Kontrollgruppe separat für jeden Zeitpunkt

** Signifikanz p für einen Trend innerhalb der Werte der jeweiligen Gruppe

3.2.4. Noradrenalin

Noradrenalin war in der Studie schlechter in der HPLC – Anlage messbar. Lediglich bei 8 Baclofen-tieren konnten wir diesen Neurotransmitter nachweisen. In der Kontrollgruppe war er nur bei einem Versuchstier und hier auch nur inkomplett messbar. Damit konnte kein statistischer Gruppenvergleich durchgeführt werden, so dass im Folgenden auf eine Analyse in der Kontrollgruppe verzichtet wurde. Wegen des fehlenden Nachweises einer Normalverteilung wurden nichtparametrische Lage - und Streuungsmasse wie z.B. der Median und die Perzentile mit in die Analyse einbezogen. Es kam der nichtparametrische Friedman – Test zum Einsatz.

Die Abbildung 3.9 zeigt die Mediankurve und Boxplots für Noradrenalin für die Baclofengruppe. Es treten nur geringe Schwankungen um den Ausgangswert auf. Im Friedman – Test zeigte sich, dass die geringen Änderungen in der Noradrenalinausschüttung nicht signifikant sind ($p=0,873$).

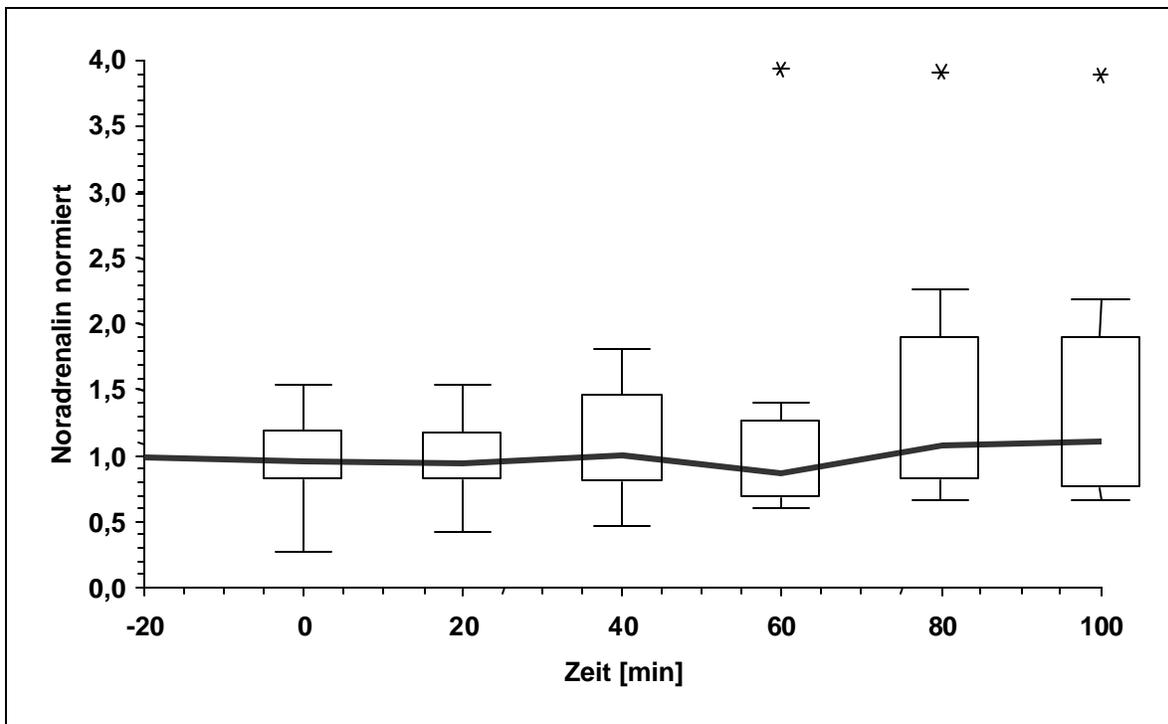


Abbildung 3.9: Mediankurve und Boxplots für Noradrenalin in der Baclofengruppe

Der Tabelle 3.4 sind die entsprechenden statistischen Kennwerte für den Verlauf der Ausschüttung von Noradrenalin in der Baclofengruppe zu entnehmen:

Tabelle 3.4: Verlauf der Ausschüttung von Noradrenalin (normiert) in der Baclofengruppe

Zeitpunkt	Baclofengruppe (n=8)						
	MW	SD	Min	Max	Med	25. Perz.	75. Perz.
-20	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0	97,0	40,3	24,3	156,0	96,0	78,5	131,2
20	97,8	33,7	40,6	154,6	94,1	79,1	118,0
40	111,0	46,8	46,2	185,2	100,3	77,3	157,1
60	125,7	106,5	59,5	380,4	86,9	65,3	134,4
80	151,2	106,9	65,7	380,4	108,3	75,4	211,7
100	150,4	107,1	66,1	380,4	110,9	71,9	207,4

*Friedman-Test: $p=0,873$ für den Verlauf

Statist. Kennwerte: MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, Min - Minimum, Max - Maximum, Med - Median, 25. Perz. - 25. Perzentile, 75. Perz. - 75. Perzentile, Signifikanzniveau $p < 0,05$

* Signifikanz p für einen Trend innerhalb der Werte der Baclofengruppe

4. Diskussion

4.1. Zur Methode

4.1.1. Vergleich von in – vivo – Messmethoden

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss intrathekaler Baclofenapplikation auf die Ausschüttung der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin und auf den Katecholaminmetaboliten Homovanillinsäure, der als indirekter Parameter für die Dopaminausschüttung benutzt wurde, aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami zu untersuchen.

Zur Prüfung neurochemischer Vorgänge, wie zum Beispiel Veränderungen im Transmitterstoffwechsel, stehen in – vivo-, als auch in – vitro – Methoden zur Verfügung. Bei in – vivo – Methoden wird ein bestimmter Sachverhalt – in der vorliegenden Arbeit die Ausschüttung von Neurotransmittern – in einem lebenden Organismus untersucht. In – vitro – Untersuchungen zur Bestimmung von Veränderungen im Transmitterstoffwechsel werden in aufgearbeiteten Gewebeproben durchgeführt. Im Anschluss an die Gewebeaufarbeitung erfolgt die Messung der Transmitter und ihrer Metabolite z.B. mit der HPLC.

In der hier vorliegenden Arbeit gab es drei Gründe, eine in – vitro – Methode nicht anzuwenden:

- Das zu untersuchende Kerngebiet, der Nucleus paraventricularis hypothalami war zu klein, um es einer getrennten Aufarbeitung zugänglich zu machen.
- Es lassen sich mit in – vitro – Untersuchungen nur Gesamtkonzentrationen einer Substanz, also sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Konzentrationen, untersuchen. Mit der Messung der Gesamtkonzentration eines Transmitters können aber keine Rückschlüsse auf dessen Freisetzung und damit seine Neuronenaktivität gezogen werden.
- In der Gemeinschaftsarbeit sollte der Zusammenhang zwischen intrathekaler Baclofengabe und Blutdruck sowie Neurotransmitterausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami untersucht werden.

Bei in-vivo Untersuchungen zum Nachweis der Neurotransmitterausschüttung stehen 3 verschiedene Verfahren zur Verfügung:

1. Die Push – Pull – Technik:

Die Push – Pull – Technik ist eine Methode, bei der eine Flüssigkeit durch das innere Lumen einer doppelumigen Kanüle in ein bestimmtes Areal gegeben wird und über das äußere Lumen der doppelumigen Kanüle wieder abgesaugt wird. Die freigesetzten Neurotransmitter werden im Perfusat gesammelt und anschließend aufgearbeitet.

2. Die Pulsvoltametrie:

Die Voltametrie ist im Prinzip eine elektrochemische Analysemethode, bei der die zu bestimmenden Substanzen an einer Elektrode oxidiert werden und der dabei auftretende Strom gemessen wird. Sie gehört damit zu den polarographischen Verfahren. Da der Oxidationsprozess abhängig vom Redoxpotential bei einer bestimmten Spannung stattfindet, ist es möglich, diese zur Identifizierung der Substanz zu nutzen. Dazu wird die an der Elektrode anliegende Spannung innerhalb eines Bereiches kontinuierlich verändert (Spannungsrampe) und der bei dem entsprechenden Redoxpotential

gemessene Stromfluss zur qualitativen Bestimmung verwendet. Veränderungen der Stromstärke werden ebenfalls aufgezeichnet und geben Hinweise auf Konzentrationsschwankungen der oxidierten Substanz. Der Oxidationsstrom hängt außer von der Konzentration von der Elektrodenoberfläche, der Messdauer, dem Reversibilitätskoeffizienten sowie einem Diffusionskoeffizienten ab (Cespuglio, 1984).

Die Messanordnung besteht aus einem Polarographen sowie einem 3 – Elektrodensystem, aufgebaut aus der Arbeitselektrode, der Referenzelektrode und der Hilfelektrode. An der Arbeitselektrode werden die zu bestimmenden Substanzen oxidiert; der zwischen ihr und der Hilfelektrode fließende Strom wird gemessen. Die Referenzelektrode dient zur Festlegung eines Spannungsnullpunktes; zwischen ihr und der Arbeitselektrode wird die Spannungsrampe angelegt. Diese Spannungsrampe bildet einen bestimmten Bereich, innerhalb dessen die Oxidationsspannung variiert wird. Je nach Redoxpotential und Anzahl der Substanzen kann die Anfangs- und Endspannung dieses Bereichs abgewechselt werden. Neurotransmitter und deren Metabolite sind oxidierbare Substanzen und deshalb durch das beschriebene Verfahren messbar.

3. Mikrodialyse:

Die Mikrodialyse in Kombination mit der anschließenden Bestimmung des Dialysates mit der HPLC ist, wie schon in Kapitel 2 erläutert, ein Verfahren, das der Push – Pull – Technik ähnelt. Die Mikrodialyse wurde 1983 von Ungerstedt et al. eingeführt (Ungerstedt, 1983). Die HPLC kam als chromatographisches Verfahren bereits 1952 durch Kemula zur Anwendung. In den folgenden Jahren fand sie aber nur wenig Anwendung. 1973 wurde die HPLC von Adams und Mitarbeiter zur Analyse von Katecholaminen und Ascorbinsäure eingesetzt (Thrivikramm, 1974; Refshauge, 1974; Kissinger, 1973).

Der Unterschied der Mikrodialyse gegenüber der Push – Pull – Technik liegt darin, dass die bei der Mikrodialyse benutzte Kanüle nicht doppellumig ist, sondern an ihrem einen Ende eine semipermeable Membran besitzt, wodurch das Dialysat nicht mit Gehirngewebe in Kontakt gerät.

Ein Vorteil der Mikrodialyse in Kombination mit der HPLC gegenüber der Voltametrie ist, dass die Neurotransmitter neben ihren Metaboliten einzeln bestimmt werden können. Darüber hinaus ermöglicht es die HPLC, quantitativ zu messen. Mit der Voltametrie lassen sich nur relative zeitliche Veränderungen der Transmittermetabolite untersuchen. Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil der Mikrodialyse gegenüber der Voltametrie stellt die Größe der Kanüle da. Bei der Pulsvoltametrie können Elektroden mit einem Durchmesser von 12 – 50 μm benutzt werden, bei der Mikrodialyse werden Kanülen in einer Größenordnung von 0,25 – 1 mm verwendet. Dadurch kommt es zu einer Gewebeerstörung. Dies hat 3 Auswirkungen zur Folge:

1. Abnahme des Blutflusses um die implantierte Kanüle
2. Abnahme der Sauerstoffaufnahme in den Zellen im umliegenden Gewebe
3. konsekutive Mehrausschüttung von Neurotransmittern.

Vor allem die Katecholamine sind davon betroffen (Santiago, 1990; Westerink, 2000). Diese 3 Effekte können bis zu 24 Stunden anhalten. Darüber hinaus konnte in Studien gezeigt werden, dass sich um die Kanüle eine gliale Barriere bildet, die zu einer Abnahme der extrazellulären Neurotransmitter führt. Diese Gliose beginnt schon in den ersten 24 Stunden, erreicht aber erst nach etwa 3 Tagen ihren Höhepunkt (Benviste, 1990; Chiara, 1996). Zwischen diesen Auswirkungen wählten wir einen

Mittelweg und verwarfen die ersten 6 ach der Implantation gewonnenen Dialysate in der Vorstellung, damit beiden gegensätzlichen Effekten Rechnung zu tragen. Ein weiterer Nachteil gegenüber der Pulsvoltametrie besteht darin, dass das Dialysat nur in Fraktionen in Abständen von 20 Minuten gesammelt werden kann, um eine ausreichende Menge an Untersuchungsmaterial für die HPLC – Anlage zu erhalten (Benveniste, 1989). Bei der Pulsvoltametrie kann man mit nur relativen zeitlichen Veränderungen die Transmittermetabolite untersuchen.

Für die Untersuchung der Neurotransmitter mit Hilfe der Mikrodialyse entschieden wir uns, da uns diese Technik erlaubt, das Verhalten mehrerer Neurotransmitter und ihre Metabolite einzeln zu erfassen (Zhongguo, 1997). Ebenso können mit der anschließenden HPLC gleichzeitig mehrere Neurotransmitter und ihre Metabolite nachgewiesen und quantifiziert werden (Murai, 1988). Darüber hinaus ist die HPLC eine Methode mit einer hohen Validität und Reliabilität hinsichtlich ihrer Genauigkeit, Nachweisgrenze und analytischen Erfassung von Neurotransmittern (Mashige, 1994; Yi, 1991).

Mögliche Fehlerquellen für die HPLC sind vor allem eventuelle Verunreinigungen der Proben oder des Fließmittels, wodurch es zu sogenannten Störpeaks kommen kann. Dies kann dazu führen, dass sich diese Störpeaks über die Peaks der zu messenden Neurotransmitter lagern und somit die Identifikation der Transmitter erschweren oder unmöglich machen. Ebenso kann es bei dem Proben-transport zur Dekonjugation und zum Abbau von Neurotransmittern, vor allem von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin kommen, da diese relativ instabil sind (Chan, 2000). Es hat sich als sinnvoll herausgestellt, dass die Perfusionslösung, die bei der Mikrodialyse verwendet wird, isoosmolar sein und die relevanten physiologischen Ionen enthalten sollte, da die Perfusionsflüssigkeit nicht nur Neurotransmitter, sondern auch kleine Moleküle und Ionen aus der extrazellulären Flüssigkeit extrahiert (Westerink, 2000). Dies könnte dann zu einer homostatischen Imbalance der extrazellulären Flüssigkeit führen. Die in der Mikrodialyse gesammelte Neurotransmittermenge liegt an der unteren Nachweisgrenze. Außerdem sammelt die Mikrodialyse die Neurotransmitter nicht direkt am synaptischen Spalt, sondern relativ weit entfernt vom Ort der Freisetzung. Es wird somit eine nicht unbedeutende Menge in die Nervenzellen wieder aufgenommen, enzymatisch abgebaut oder zerfällt. Vor allem Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin und Serotonin sind davon betroffen. Daher wurden in vorangegangenen Studien spezifische Wiederaufnahmehemmer oder Calcium in erhöhter Menge zum Perfusat dazugegeben, um eine Hemmung der Wiederaufnahme der zu untersuchenden Neurotransmitter zu erreichen und damit eine höhere Ausbeute zu erreichen. Dadurch schafft man aber unphysiologische und artifizielle extrazelluläre Verhältnisse (Westerink, 2000).

In unserer Studie benutzten wir deswegen weder einen Wiederaufnahmehemmer noch enthielt unsere Perfusionsflüssigkeit einen unphysiologisch hohen Anteil an Calcium. Somit wäre es möglich, dass zum Beispiel das im Dialysat befindliche Dopamin unter unserer Nachweisgrenze (10 pg/20 µl) lag und somit nicht nachweisbar war.

Bei der Messung der Neurotransmitter mittels HPLC spielt der pH der mobilen Phase sowie die chemischen Charaktereigenschaften der einzelnen Neurotransmitter eine wichtige Rolle. Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin sind basisch, Dopac und HVA sind von ihrer chemischen Eigenschaft sauer. Daher ist zur Bestimmung der sauren Transmitter bzw. Metabolite ein pH von ungefähr 4 optimal, für die basischen Transmitter ist ein pH von etwa 6 optimal, um nicht an der Säule

haften zu bleiben (Westerink, 2000). Dies wäre bei folgenden Studien, bei denen vorrangig die Ausschüttung von Dopamin aus dem PVN untersucht werden soll, zu beachten.

4.1.2. Narkoseverfahren

Als Medikament zur Einleitung und Erhalt der Narkose benutzten wir, wie in Kapitel 2 beschrieben, Chloralhydrat. Hierbei handelt es sich um ein Medikament, das sedativ und hypnotisch wirkt. Der Nachteil von Chloralhydrat im Vergleich zu anderen zentraldämpfenden und narkotisierenden Medikamenten, wie z.B. Benzodiazepinen, Barbituraten und Neuroleptanalgesie ist, dass es stärker das respiratorische und kardiovaskuläre System hemmt als die eben genannten (Field, 1993). Ebenso werden die adrenergen Rezeptoren für Katecholamine sensibilisiert. Ein weiterer Nachteil von Chloralhydrat besteht in der weniger guten analgetischen Wirkung. In vorangegangenen Studien konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass es bei erhöhtem Stress, so wie somatischen Schmerzen zu einer vermehrten Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nucleus paraventricularis hypothalmi kommt (Palkovits, 1999; Pan, 1999). Gemeinsam ist allen Medikamenten, die in Tierversuchen zur Narkose und Sedierung benutzt werden, dass sie einen Einfluss auf die Neurotransmitterausschüttung haben (Westerink, 1986). In der vorliegenden Studie, in der es um die Freisetzung von Neurotransmittern aus dem Nucleus paraventricularis hypothalmi ging, hatte Chloralhydrat gegenüber Benzodiazepinen und Barbituraten den entscheidenden Vorteil, dass es diese Transmitterausschüttung weniger beeinflusst (Broderick, 1997). Es interferiert auch nicht mit dem gabaergen System und somit auch nicht mit Baclofen. Benzodiazepine und Barbiturate wirken über die Interaktion mit GABA – A – Rezeptoren und können hiermit zu einer vermehrten Freisetzung von Katecholaminen führen (Shimokawa, 1998). Nicht vernachlässigen sollte man hierbei, dass Chloralhydrat selber auch zu einer vermehrten Freisetzung vor allem von Dopamin (Chen, 1996) und Noradrenalin (Shimokawa, 1998) führt. Da der Einfluss aber geringer als bei anderen Narkotika ist und da Chloralhydrat sowohl bei den Kontrollversuchstieren, als auch bei den Baclofentieren appliziert wurde, ist dieser Effekt im Vergleich nicht relevant.

4.1.3. Tiermodell

Bei Untersuchungen, die eine Wirkung eines Medikamentes auf die Neuronenaktivität ergründen wollen, ist es notwendig, diese Beobachtungen an einem lebenden Objekt durchzuführen. Bei in vitro Messungen lassen sich nur die Gesamtkonzentration an Neurotransmittern (intra- und extrazellulär) bestimmen und man bekommt keinen Einblick in die Neuronenaktivität. Daher war es für die vorliegende Studie wichtig, ein geeignetes Versuchstier zu finden, das folgende Voraussetzungen erfüllen sollte:

- relative Übereinstimmung mit der Physiologie und Anatomie des Menschen
- Erfahrung mit dem Versuchstier in vorangegangenen Studien
- einfache Handhabung und Züchtung des Tieres
- keine großen Abweichungen der Tiere untereinander und damit gute Vergleichbarkeit

Diese Bedingungen werden am besten von dem in dieser Studie benutzten Tier, der Ratte, erfüllt. Schon in vorangegangenen Studien wurde darauf hingewiesen, dass die Ratte als Versuchstier aufgrund des nahezu identischen funktionellen anatomischen und physiologischen Aufbaus, vor allem des autonomen Nervensystems, sich seit mehreren Jahren zu Recht bei physiologischen Fragestellungen in Studien als Versuchstier etabliert hat (Bonham and McCrimmon, 1990; Brooks, 1990; Feldman and Smith, 1989; Hayashi and Lipski, 1992; Murakoshi and Otsuko, 1985; Okada, 1993; Perrson and Henny, 1980; Siemers, 1982; Sved and Isukamoto, 1992; Vardhan, 1993; Wang and Dun, 1990).

Da die Tiere aus der gleichen Zucht stammten und in Größe und Gewicht nur minimal von einander abwichen, war eine gute Vergleichbarkeit gegeben.

Darauf hingewiesen werden muss, dass sich in verschiedenen vorangegangenen Studien an der Ratte gezeigt hatte, dass es bei unterschiedlichen Arten von Stress zu einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern, dabei vor allem von Noradrenalin und Adrenalin, kommt (Morris, 1994; Jin, 2000). Diese Faktoren versuchten wir weitestgehend zu vermeiden, sie können aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

4.2. Auswirkung der intrathekalen Baclofenapplikation auf Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure

In der vorliegenden Studie sollte die Wirkung von Baclofen auf die Ausschüttung der Neurotransmitter Noradrenalin und Adrenalin aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami untersucht werden. Wie eingangs erwähnt ist der Nucleus paraventricularis hypothalami ein Kerngebiet im Hypothalamus, das sowohl neuroendokrinologische Aufgaben übernimmt, als auch eine zentrale Stellung im zentralen autonomen Netzwerk (CAN) inne hat (Loewy, 1990).

Histologisch gesehen findet sich im Nucleus paraventricularis hypothalami in magnozellularer Teil, dessen Zellen durch die Ausschüttung von Oxytozin unter anderem beim Geburtsvorgang eine Rolle spielen, als auch den Blutdruck über Vasopressinausschüttung regulieren, sowie ein parvozellularer Anteil, dessen Zellen eine zentrale Rolle für die Kontrolle und Regulation vegetativer Vorgänge einnehmen (Luther, 2000).

Um den letztgenannten Anteil ging es in dieser Studie. Neben dem Nucleus paraventricularis hypothalami sind noch der Nucleus tractus solitarius, sowie die rostrale ventrolaterale Medulla (RVLM) wichtige Kerngebiete, die an der zentralen Blutdruckregulation teilhaben (Philippu, 1991).

In der klinischen Beobachtung hatte es sich gezeigt, dass bei intrathekaler Baclofengabe an Patienten, die sowohl an einer Spastik, als auch an autonomen Dysregulationen wie zum Beispiel unter Blutdrucksteigerung litten, sich sowohl die Spastik als auch die vegetativen Störungen besserten (Becker, 1999). Da sich in vorangegangenen Studien eine Wirkung von Baclofen, einem GABA – B – Agonisten, in Form von einer Blutdrucksenkung an der rostralen ventrolateralen Medulla gezeigt hatte (Amano, 1993) und da bei direkter Injektion von Baclofen in den Nucleus tractus solitarius eine Blutdrucksteigerung aufgetreten war (Sved, 1992, Takenaka, 1994, Takenaka, 1995), wollten wir nun untersuchen, ob die Wirkung von Baclofen über den Nucleus paraventricularis hypothalami vermittelt wird. Ebenso wie die rostrale ventrolaterale Medulla liegt er in enger Nachbarschaft zum Ventrikel-

system und stellt somit einen guten Angriffspunkt intrathekal applizierter Medikamente dar, da der Diffusionsweg relativ gering ist. Neben dem Verhalten des Blutdruckes, der nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, sollten die Ausschüttung der Neurotransmitter, in dieser Studie von Noradrenalin, Adrenalin und HVA nachgewiesen werden. HVA entsteht beim Abbau von Noradrenalin, Adrenalin, aber auch Dopamin. Diese 3 Neurotransmitter spielen eine Rolle in der zentralen Blutdruckregulation.

4.2.1. Noradrenalin und Adrenalin

Die Transmitter Noradrenalin und Adrenalin spielen nicht nur im peripheren sympathischen Nervensystem, sondern auch im ZNS eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation. Bei den Verbindungen der Kerngebiete des zentralen autonomen Systems untereinander ist Noradrenalin eine wichtige Überträgersubstanz (Morris, 1994).

Noradrenerge Fasern finden sich sowohl an vasopressinproduzierenden Zellen im magnozellularen Anteil, als auch an den Zellen der „autonomic upper neurons“ im parvozellulären Anteil (Decavel, 1987), die in Kapitel 1 beschrieben wurden. Neuere Studien zeigen, dass die parvozellulären Neurone größtenteils über glutaminerge Relayzellen vermittelte Signale erhalten und nur wenige parvozelluläre Neurone über direkte noradrenerge Fasern, die hauptsächlich inhibitorisch wirken (Daftary, 2000; Goren 2000). Dies ist daher von Bedeutung, da Glutamat auch in unserer Gemeinschaftsarbeit bestimmt wurde. Es zeigte sich zwar auch hier statistisch gesehen keine Signifikanz zwischen Verum- und Kontrollgruppe, dennoch fiel beim Vergleich der Kurven ein deutlicher Abfall von Glutamat nach Baclofengabe auf. Der Zusammenhang Blutdruckregulation und Glutamat hatte sich schon in vorangegangenen Studien gezeigt. Hierbei war es zu einer Zunahme des Blutdruckes bei Stimulation des Nucleus paraventricularis hypothalami mit L – Glutamat gekommen (Martin, 1992).

Adrenalin wird in Zellen des Nucleus paraventricularis hypothalami produziert (Swanson, 1980) und ihm werden neuromodulatorische Aufgaben zugeschrieben (McCall, 1990).

Die Ergebnisse dieser vorliegende Studie lassen statistisch gesehen keine Aussage zu in wie weit Baclofen Noradrenalin und Adrenalin beeinflusst. Vor allem konnte Noradrenalin nicht bei der Kontrollgruppe nachgewiesen werden und somit ist kein Vergleich möglich. Wie in der Abbildung 3.11, erkennbar hat die Noradrenalincurve einen schwankenden Verlauf. Nach Baclofengabe kommt es zu einem erkennbaren Anstieg von Noradrenalin. Dieser Anstieg könnte ein möglicher Baclofeneffekt sein, wie auch schon in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Nonogaki, 1994; Losada, 1991; Sawynok, 1986). Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass jene Untersuchungen nicht im Nucleus paraventricularis hypothalami durchgeführt wurden und somit nicht direkt vergleichbar sind. Da wir aber zum einen keine Kontrollgruppe zum Vergleich heranziehen können und zum anderen der Friedman – Test zeigte, dass die Änderungen in der Noradrenalinausschüttung nicht signifikant sind, also auch zufälliger Natur sein könnten, haben die Ergebnisse für Noradrenalin keine Aussage in Bezug auf unsere Eingangshypothese.

In unseren Untersuchungen im Nucleus paraventricularis hypothalami konnte von den insgesamt 38 Tieren bei 14 Tieren der Verum- und 7 Tiere der Kontrollgruppe Adrenalin nachgewiesen werden.

Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der beiden Gruppen mit Hilfe des U – Testes nach Wilcoxon, Mann und Whitney ($p=0,799$). Nach Baclofengabe kommt es auch zu einem leichten Anstieg der Adrenalinwerte, was ebenso wie bei Noradrenalin auf einen Baclofeneffekt zurück zu führen sein könnte, was aber hinsichtlich der Ausgangshypothese keine bestätigende Signifikanz aufweist. Exaktere Aussagen würden nur weitere Untersuchungen mit höherer Fallzahl erbringen. Weiterhin offen bleibt auch die Frage, ob diese Freisetzung von Adrenalin tatsächlich aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami stammt oder ob diese Veränderungen anderen an der Blutdruckregulation beteiligten Zentren, die oben beschrieben wurden, zuzuschreiben sind.

Möglicherweise könnten direkt intranukleär applizierte Baclofengaben bei gleichzeitiger Gewinnung der Neurotransmitter mittels reverser Mikrodialyse diese Frage klären. Dies wäre auch für die Bestimmung von Noradrenalin sinnvoll. Mögliche Beeinträchtigungen des Ergebnisses können zum einen auf die oben erwähnten methodischen Einschränkungen (siehe 4.1.1.), zum anderen auf die anatomisch enge Beziehung (wenige μm , siehe Methodikteil 2.2.1.2. Stereotaxie) zwischen parvozellulären und magnozellulareren Anteilen des Nucleus paraventricularis hypothalami zurückzuführen sein, da sich hierdurch Schwierigkeiten in der exakten Implantation der Mikrodialysekanüle ergaben. Zudem kann die Instabilität der Katecholamine, die vor allem auf Temperaturschwankungen stärker anfällig sind, als zum Beispiel der Metabolit Homovanillinsäure, deren Nachweis erschweren.

Zeitgleich zum Anstieg dieser Transmitter nach Baclofengabe kam es zu einer Blutdrucksenkung in unserer Gesamtstudie (Becker, 2001). Diese Blutdrucksenkung zeigte sich direkt nach Baclofengabe. Auch hier fand sich beim Vergleich der Verum- mit der Kontrollgruppe statistisch gesehen kein signifikanter Unterschied.

4.2.2. Homovanillinsäure

Die Ergebnisse bei den Untersuchungen der Homovanillinsäurefreisetzung im Zusammenhang mit der Baclofengabe zeigen signifikant erhöhte HVA – Werte nach Baclofengabe im Vergleich zur Verumgruppe ($p= 0.007$). Bei Homovanillinsäure handelt es sich um eine Substanz, die, wie eingangs erwähnt, sowohl beim Abbau von Adrenalin und Noradrenalin, als auch von Dopamin anfällt. In dieser Studie wurde es wie Dopac als Hinweis für die Dopaminausschüttung aus dem Nucleus paraventricularis herangezogen, da Dopamin in der HPLC nicht nachweisbar war. Dies wurde auch in anderen Studien angewendet, bei denen der Nachweis von Dopamin nicht gelang (Soares – da – Silva, 1990; Megaw, 2001). Für Dopac ist zwar eine Anstiegstendenz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Ringerlösung nach Baclofengabe zu erkennen, aber hier ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen statistisch gesehen nicht aussagekräftig.

Dopamin ist ein Neurotransmitter, der, wie oben erwähnt, in mehreren wichtigen Bereichen des ZNS als Überträgersubstanz eine Rolle spielt. Zu erwähnen sei hier nur noch einmal die Bedeutung seines Mangels in der Substantia nigra für den Morbus Parkinson. In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen Dopamin und zentraler Blutdruckregulation gefunden (Kawabe, 1983; Hutchinson, 1983) . Hier wurde gezeigt, dass ein Mangel an Dopamin zu Blutdruckerhöhung führt (Jose, 1999). Außerdem wurde Dopamin als Neurotransmitter in Fasern, die als Afferenzen des

Barorezeptorreflexes zum Nucleus tractus solitarius und der rostralen ventrolateralen Medulla ziehen, nachgewiesen (Philippu, 1991).

In der Literatur finden sich bezüglich der Wirkung von Baclofen auf das dopaminergen System folgende Ergebnisse: Im Striatum führt es zu keiner Veränderung der Dopaminfreisetzung, dafür hemmt es die Freisetzung in der Substantia nigra und im präfrontalen Cortex (Santiago, 1993). Außerdem kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Baclofen im Hippocampus und dem Mittelhirn (Kabuto, 1988), ebenso im gesamten Kortex nach intraperitonealer Applikation (Anden, 1977). In unserer Studie konnte für ein Stoffwechselprodukt von Dopamin eine Beeinflussung durch Baclofen nachgewiesen werden. Eine verbindliche Aussage über die Wirkung von Baclofen in diesem Bereich auf die Dopaminausschüttung lässt sich dadurch aber nicht machen.

4.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse lassen folgende Aussage zu: Die Eingangshypothese, dass Baclofen die exzitatorischen Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin und den Metaboliten Homovanillinsäure senkt, lässt sich an Hand der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigen und kann nur für HVA widerlegt werden.

Bei den Katecholaminen gibt es zwar Hinweise auf eine mögliche Erhöhung der Ausschüttung Diese stellen aber aufgrund ihrer fehlenden Signifikanz kein aussagekräftiges Ergebnis dar, bei der Betrachtung der Kurven der Verumgruppe erkennt man dennoch eine tendenzielle Erhöhung von Adrenalin bzw. Noradrenalin nach Baclofengabe. HVA ist in der Gemeinschaftsarbeit die einzige Substanz, bei der statistisch gesehen eine signifikante Erhöhung nach Baclofengabe gezeigt werden konnte. Sowohl bei Dopa und Dopac, 5-Hydroxyindolessigsäure, Aspartat und Glycin zeigen sich zwar, wie bei Noradrenalin und Adrenalin deutliche Unterschiede zwischen der Baclofen- und Kontrollgruppe, die für eine mögliche Beeinflussung durch intrathekale Baclofenapplikation sprechen, diese sind, wie auch bei Glutamat, bei dem man, wie oben beschrieben, von einer Senkung ausgehen kann, nicht signifikant (Becker, 2000).

Sinnvoll wären daher auch Versuche in denen Baclofen direkt in den Nucleus paraventricularis hypothalami injiziert wird, um den lokalen Effekt von Baclofen auf die Neurotransmitterausschüttung zu beobachten.

5. Zusammenfassung

Einleitung: In der klinischen Beobachtung an Patienten, die sowohl an einer Spastik, als auch an autonomer Dysregulation unter anderem in Form von entgleister Hypertonie, litten, zeigte sich, dass sich bei intrathekaler Baclofengabe sowohl die Spastik, als auch die Blutdrucksituation besserte. Diese Beobachtung gab Anlass zu einem Gemeinschaftsprojekt, in dem die Neurotransmitter bzw. deren Abbauprodukte Adrenalin, Noradrenalin, HVA, Dopac, 5-HT, Glutamat, Aspartat und Glycin bestimmt wurden. Parallel wurde intraarteriell der Blutdruck gemessen.

Ziel: In dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen intrathekaler Baclofenapplikation und Freisetzung von Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure untersucht werden.

Homovanillinsäure als Abbauprodukt von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin wurde als Parameter für die Ausschüttung von Dopamin verwendet.

Vom Nucleus paraventricularis hypothalami ist bekannt, dass er sowohl neuroendokrinologische Aufgaben übernimmt, als auch eine Rolle in der zentralen Regulation autonomer Funktion, unter anderen der Kontrolle des Blutdrucks spielt. Die erste Aufgabe wird dem magnozellularen Anteil, die zweite Aufgabe dem parvozellulären Anteil des Nucleus paraventricularis hypothalami zugeschrieben. Baclofen ist ein spezifischer GABA – B – Rezeptor Agonist.

Methode: Zur Untersuchung implantierten wir eine Mikrodialysesonde in den Nucleus paraventricularis hypothalami. Von den insgesamt 38 Tieren applizierten 1,5 µg Baclofen 19 Tieren der Verum – und die entsprechende Menge Ringerlösung 19 Tieren der Kontrollgruppe intrathekal. Mit Hilfe der HPLC bestimmten wir gleichzeitig die für diese Studie relevanten Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und den Metaboliten HVA, als auch die Neurotransmitter bzw. deren Abbauprodukte Dopa, Dopamin, Dopac, 5-HT und 5-HIAA, sowie die Aminosäuren Aspartat und Glutamat im Mikrodialysat.

Ergebnis: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und Kontrollgruppe bezüglich der Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami. Für HVA kann eine signifikante Erhöhung der Werte in der Verum - im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden und weisen somit auf eine Beeinflussung durch Baclofen hin.

Daher kann nach dieser Studie die Ausgangshypothese lediglich für HVA widerlegt werden, für Adrenalin und Noradrenalin kann sie weder bestätigt noch widerlegt werden.

Schlussfolgerung: Um eine Antwort über den Einfluss des Nucleus paraventricularis hypothalami in der zentralen Blutdruckregulation und seine Beeinflussung durch Baclofen auf die Ausschüttung u.a. von Adrenalin, Noradrenalin und HVA zu geben ist sind weitere Studien sicher erforderlich.

6. Literaturverzeichnis

1. Amano, M. and T. Kubo (1993). **Involvement of both GABAA and GABAB receptors in tonic inhibitory control of blood pressure at the rostral ventrolateral medulla of the rat.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **348**(2): 146-153
2. Anderson, P., H. Noher, et al. (1984). **Pharmacokinetics in baclofen overdose.** J. Toxicol. Clin. Toxicol **22**: 11-20.
3. Anden, N.E., Wachtel, H. (1977). **Biochemical effects of baclofen (beta-parachlorophenyl-GABA) on the dopamine and the noradrenaline in the rat brain.** Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) **40**(2): 310-320
4. Avanzino, G. L., P. Ruggeri, 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): H1722-1728.
5. Azouvi, P., A. Roby-Brami, et al. (1993). **Effect of intrathecal baclofen on the monosynaptic reflex in humans: evidence for a postsynaptic action.** J Neurol Neurosurg Psychiatry **56**(5): 515-519
6. Badoer, E. (2001). **Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation.** Clin Exp Pharmacol Physiol **28** (1-2): 95-99
7. Bealer, S.L., Abell, S.O. (1995). **Paraventricular nucleus histamine increases blood pressure by adrenoreceptor stimulation of vasopressin release.** Am. J. Physiol. (United States) **269** (1 Pt 2): pH 80-85
8. Becker, R. (2001). **Klinische und experimentelle Beiträge zur intrathekalen Baclofen-applikation.** Habilitationsschrift
9. Becker, R., Sure, U. (1999). **Continuous intrathecal baclofen infusion alleviates autonomic dysfunction in patients with severe supraspinal spasticity [letter].** J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**(1): 114
10. Benveniste, H. (1989). **Brain microdialysis.** J. Neurochem. **52**: 1667 – 1679
11. Benveniste, H. (1990). **Microdialysis – theory and application.** Prog Neurobiol **35**(3):195-215

12. Bonham, A.C., Mc Crimmon, D.R. 1990. **Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer – Hering reflex in rat.** J. Physiol. (London) **427**: 261–280
13. Bormann, J. (1988). **Electrophysiology of GABAB and GABAA receptor subtypes.** Trends in Neurosci. **11**: 112-116
14. Bowery, N. (1989). **GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology.** Trends. Pharmacol. Sci. **10**: 401-407
15. Bowery, N. G. (1993). **GABAB receptor pharmacology.** Annu Rev Pharmacol Toxicol **33**: 109-147
16. Bowery, N. G., A. L. Hudson, et al. (1987). **GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system.** Neuroscience **20**(2): 365-383
17. Bowery, N.G. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. **Mammalian gamma – aminobutyric acid (B) receptors: structure and function.** Pharmacol Rev **54**(2): 247-264
18. Broderick, P.A. (1997). **Alprazolam, diazepam, yohimbine, and clonidine: in vivo CA1 hippocampal norepinephrine and serotonin release profiles under chloral hydrate anaesthesia.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. **21**(7): 1117-1140
19. Brooks, P.A., Glaum, S.R., Miller, R.J., Spyer, K.M. (1992). **The actions of baclofen neurones and synaptic transmission in the nucleus tractus solitarii of the rat in vitro.** J.Physiol. (London). **457**: 115-129
20. Brücke, T, Wegner, T. Podreka, I. , Asenbaum, S. (1991). **Dopamine receptors classification, neuroanatomical distribution and in vivo imaging.** Wien Klein Wochenschrift **103**: 639 – 646
21. Chan, E.C., Wee, P.Y., Ho, P.C. (2000). **Evaluation of degradation of urinary catecholamines and metanephrines and deconjugation of their sulfoconjugates using stability-indicating reversed-phase ion-pair HPLC with electrochemical detection.** J Pharm Biomed Anal **22**(3): 515-526
22. Chen, H.T., Kandasamy, S.B. (1996). **Effect of chloral hydrate on in vivo KCL – induced striatal dopamine release in the rat.** Neurochem Res **21**(6): 695-700
23. Civelli, T., Bunzow, J.R., Grandy, D.K. (1993). **Molecular diversity of the dopamine receptors.** Annu Rev Pharmacol Ther **32**: 281 – 307

24. Coote, J. H., S. M. Hilton, 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
25. Daftary, S.S., Boudaba, C., Tasker, J. G. (2000). **Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus.** *Neuroscience* **96**(4): 743-751
26. De Blas, A.L. (1996). **Brain GABAA receptors studied with subunit specific antibodies.** *Mol Neurobiol.* **12** (1): 55-71
27. Decavel, C., Geffard, M., Calas, A. (1987). **Comparative study of dopamine- and nor-adrenaline-immunoreactive terminals in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat.** (1987). *Neurosci Lett* **77**(2): 149-154
28. Demeneix, B. A., Desaulles, E., Feltz, P. (1984). **Dual population of GABAA and GABAB receptors in rat pars intermedia demonstrated by release of alpha MSH caused by barium ions.** *Br. J. Pharmacol.* **82**(1): p183-190
29. Dolphin, A. C., M. I. Sweeney, et al. (1992). **An electrophysiological and biochemical study of the interaction between GABAB receptors and voltage-dependent Ca²⁺ channels.** *Pharmacology Communications* 2. N. G. Bowery and R. R. Ruffolo jr. Chur/Schweiz, Harwood Academic Publishers: 8-9.
30. Dralle, D., H. Muller, et al. (1985). **Intrathecal baclofen for spasticity** [letter]. *Lancet* **2**(8462): 1003
31. Ebihara, H. Kawasaki, H., Nakamura, S. (1993). **Pressor response to microinjection of clonidine into the hypothalamic paraventricular nucleus.** *Brain Res* **624** (1-2): p44-52
32. Enz, R. (2001). **GABA(C) receptors: a molecular view.** *Biol Chem Aug;* **382**(8): 1111-1122
33. Erdo, S.L., Riesz, M., Karpati, E. (1984). **GABAB receptor-mediated stimulation of the contractility of isolated rabbit oviduct.** *Eur.J. Pharmacol* **99** (4): p 333-336
34. Faigle, J. W. and H. Keberle (1972). **The chemistry and kinetics of Lioresal.** *Postgrad. Med. J. (Suppl.):* 9-13
35. Faigle, J. W., H. Keberle, 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.

36. Feldman, J.L., and Smith, J.C. (1989). **Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals.** Ann. N.Y. Acad. Sci. **563**: 114 – 130
37. Field, K.J., White, W.J., Lang, C.M. (1993). **Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats.** Lab Anim **27** (3):258-269
38. Goren, M.Z., Onat, F., Berkmann, K. (2000). **Participation of NMDA and kainate receptors of paraventricular nucleus in cardiovascular responses to glutamate receptor agonist.** Eur J Pharmacol **388**(1): 77-84
39. Goudreau, J. L., K. J. Lookingland, et al. (1994). **5 – Hydroxytryptamine receptor-mediated regulation of periventricular-hypophysial dopaminergic neuronal activity and the secretion of alpha-melanocyte-stimulating hormone.** J Pharmacol Exp Ther **268**(1): 175-179
40. Goudreau, J. L., E. J. Wagner, 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): 1000-1006
41. Guan, Z., Miao, L., Zhang, W. (1997) **Brain dialysis-a new technique for determining the release of neurotransmitters and neuropeptides.** Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi **13**(2): 185-188
42. Hayakawa, K., Kimura, M., Kamata, K. (2002). **Mechanism underlying gamma – aminobutyric acid – induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats.** Eur J Pharmacol **438**(1-2): 107-113
43. Hayashi, F., and Lipski, J. (1992). **The role of inhibitory acids in control of respiratory motor output in an arterially perfused rat.** Respir. Physiol. **89**: 47-63
44. Hong, Y. Henry, J.L. (1991). **Cardiovascular responses to intrathecal administration of L - and D-baclofen in the rat.** Eur J Pharmacol **192**(1): 55-62
45. Hulme, A., W. J. MacLennan, et al. (1985). **Baclofen in the elderly stroke patient its side effects and pharmacokinetics.** Eur. J. Clin. Pharmacol. **29**: 467-469
46. Hutchinson, J.S., Di Nicolanto, R., Veroni, M., Cleverdon, M. (1983) **Evidence for a functional central dopaminergic insufficiency in the spontaneously hypertensive rat.** Clin Exp Pharmacol Physiol **10**(3): 311-314

47. Jin, Q.H., Kunitake, T., Ishizuka, Y., Kannan, H. (2000). **Increase in norepinephrine but not in nitric oxide metabolite levels in the hypothalamic paraventricular nucleus region in response to air jet and swing rotation in freely moving rats.** Brain Res **876**(1-2): 205-210
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., B. Borowsky, et al. (1998). **GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABABR1 and GABABR2.** Nature **396**(6712): 674-679
50. Jose, P.A., Eisner, G.M., Feldner, R.A. (1999) **Role of dopamine in the pathogenesis of hypertension.** Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **26**: 10-13
51. Joyner, M. J. and J. T. Shepherd (1993). Autonomic Control of Circulation. **Clinical Autonomic Disorders.** P. A. Low. Boston, Toronto, London, Little, Brown and Co.: 55-67.
52. Kabuto, H., Yokoi, I., Mori, A. (1988). **Effects of muscimol and baclofen on levels of monoamines and their metabolites in the mouse brain.** Elsevier **13**(12): 1157-1161
53. Kanzawa, H., Nagata, Y., Shinozuka, N., Wada, H. (1994). **Simultaneous determination of catecholamines, serotonin, and their precursors and metabolites in body fluid by an HPLC system with multielectrode electrochemical detector.** Rinsho Byori **42**(6):591-599
54. Karlson, G. and H. R. Olpe (1989). **Late inhibitory postsynaptic potentials in rat prefrontal cortex may be mediated by GABAB- receptors.** Experientia **45**: 157-158
55. Kaupmann, K., B. Malitschek, et al. (1998). **GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes.** Nature **396**(6712): 683-687
56. Kawabe, H., Kondo, K., Saruta, T. (1983). **Effect of the intracerebroventricular injection of dopamine on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat.** Clin Exp Hypertens A **5**(10): 1703-1716
57. Kawai, Unger, R.H. (1993). **Effects of gamma-aminobutyric acid on insulin, glucagon, and somatostatin release from isolated perfused dog pancreas.** Endocrinology **113** (1): p111-113
58. Kerr, D. I. and J. Ong (1995). **GABAB receptors.** Pharmacol Ther **67**(2): 187-246

59. Kimura, T., Shoji, M., Iitake, K., Ota, K., Matsui, K., Yoshinaga, K. (1984). **The role of central alpha 1 – and alpha2 – adrenoreceptors in the regulation of vasopressin release and the cardiovascular system.** *Endocrinology* **114** (4): 1426-1432
60. Kiss, J. Z. (1988). **Dynamism of chemo architecture in the hypothalamic paraventricular nucleus.** *Brain Res* **20** (6): 699 – 708
61. Kissinger, P. T., J. B. Hart, et al. (1973). **Voltametry in brain tissue - a new neurophysiological measurement.** *Brain Res* **55**(1): 209-213
62. Kochak, G. M., A. Rakjit, et al. (1985). **The pharmacokinetics of baclofen derived from intestinal infusion.** *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**: 251-257
63. Krauss, D. (1988). **Untersuchungen zur Racemat- und Enantiomerenkinetik von Baclofen und seines Fluoranalogs.** Naturwiss. Fakultät. Frankfurt, Johann-Wolfgang-Goethe Universität
64. Kuner, R., G. Kohr, et al. (1999). **Role of heteromer formation in GABAB receptor function.** *Science* **283**(5398): 74-77
65. Lambert, G.W. (2000). **Central nervous system norepinephrine metabolism in hypertension.** *Curr Hypertens Rep* **2**(3): 302-310
66. Landulpho, C.D. (2003). **Cardiovascular mechanisms activated by microinjection of baclofen into NTS of conscious rats.** *Am J Physiol Heart Circ* **284**(3):H987-993
67. Li, Y. W. and P. G. Guyenet (1995). **Neuronal inhibition by a GABAB receptor agonist in the rostral ventrolateral medulla of the rat.** *Am J Physiol* **268**(2 Pt 2): R428-37
68. Loewy, A. D. (1990). **Central autonomic pathways. Central Regulation of Autonomic Functions.** A. D. Loewy and K. M. Spyer. New York, Oxford University Press: 88-103
69. Luther, J.A., Tasker, J.G. (2000). **Voltage – gated currents distinguish parvocellular from magnocellular neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus.** *J Physiol* **523** Pt 1: 193-209
70. Martin, D. S. and J. R. Haywood (1992). **Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus.** *Brain Res* **577**(2): 261-267

71. Martin, D. S., M. C. Rodrigo, et al. (1997). **Disinhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus increases mean circulatory filling pressure in conscious rats.** Brain Res **756**(1-2): 106-113
72. Matthews, J. N., D. G. Altman, et al. (1990). **Analysis of serial measurements in medical research.** BMJ **300**(6719): 230-235
73. Matthews, G., Ayoub, G.S., Heidelberger, R. (1994). **Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors with novel pharmacology.** J Neurosci **14** (3 Pt 1): p1079-1090
74. McCall, R.B. (1990). **Role of neurotransmitters in the central regulation of the cardiovascular system.** Prog Drug Res **35**: 25-84
75. McCall, M.A. (2002). **Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina.** J Neurosci **22**(10): 4163-4174
76. McKenna, K. E. and L. P. Schramm (1984). **Baclofen inhibits sympathetic preganglionic neurons in an isolated spinal cord preparation.** Neurosci Lett **47**(1): 85-88
77. Megaw, P., Morgan, I., Boelen, M. (2001). **Vitreol dihydroxyphenylacetic acid (Dopac) as an index of retinal dopamine release.** J Neurochem **76**(6): 1636-1644
78. Mifflin, S. W., K. M. Spyer, et al. (1988). **Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: modulation by the hypothalamus.** J Physiol **399**: 369-387
79. Milanov, I. G. (1992). **Mechanisms of baclofen action on spasticity.** Acta Neurol. Scand. **85**:305-310
80. Misu, Y., Yue, J.L., Miyamae, T., Goshima, Y. (1995). **Altered L – Dopa systems for blood pressure regulation in the lower brainstem of spontaneously hypertensive rats.** Hypertens Res **18**(4): 267-277
81. Miyamoto, J.K., Ueza, E., Terashima, S. (1991). **Active transport pumps of HVA and Dopac in dopaminergic nerve terminals.** Physiol Behav **49**(1): 141-147
82. Monassier, L., E. Tibirica, et al. (1995). **Evidence for a spinal origin of the effect of baclofen on the myocardial oxygen demand indexes.** Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **352**(5): 550-556

83. Morris, M.J., Hastings, J.A., Pavia, J.M. (1994). **Catecholamine release in the rat hypothalamic paraventricular nucleus in response to haemorrhage, desipramine and potassium.** Brain Res **665**(1): 5-12
84. Morris, M.J., Hastings, J.A., Pavia, J.M. (1997). **Central interactions between noradrenaline and neuropeptide Y in the rat: implications for blood pressure control.** Clin Exp Hypertens **19**(5-6): 619-630
85. Murakoshi, T., Otsuka, M. (1985). **Respiratory reflexes in an isolated brainstem-lung preparation of the newborn rat: possible involvement of gamma-aminobutyric acid and glycine.** Neurosci. Lett. **62**: 63-68
86. Murai, S., Saito, H., Masuda, Y, Itoh, T. (1988). **Rapid determination of norepinephrine, dopamine, serotonin, their precursor amino acids, and related metabolites in discrete brain areas of mice within ten minutes by HPLC with electrochemical detection.** J Neurochem **50**(2): 473-479
87. Nehring, R.B., Horikawa, H.P., El Far, O. (2000). **The metabotropic GABAB receptor directly interacts with the activating transcription factor.** J Bio Chem **275** (45): p 85-91
88. Nonogaki, K., Mizuno, K., Sakamoto, N., Iguchi, A. (1994). **Effects of central GABA receptors activation on catecholamine secretion in rats.** Life Sci **55** (12): PL239 – 243
89. Ogata, N. (1990). **Pharmacology and Physiology of GABAB receptors.** Gen. Pharmacol. **21**: 395-402
90. Okada, Y., Muckenhoff, K., Holtermann, G., Acker, H., and Scheid, P. (1993). **Depth profiles of pH and PO₂ in the isolated brain stem – spinal cord of the neonatal rat.** Respir. Physiol. **93**: 315-326
91. Olpe, H. R., H. Demieville, et al. (1978). **The biological activity of d- and l-baclofen (Lioresal).** Eur. J. Pharmacol. **52**: 133-136
92. Paxinos, G. and C. Watson (1986). **The Rat Brain in Stereotactic Coordinates.** Sydney, Academic Press
93. Penn, R. D. and J. S. Kroin (1984). **Intrathecal baclofen alleviates spinal cord spasticity [letter].** Lancet **1**(8385): 1078
94. Persson, B. (1981). **A hypertensive response to baclofen in the nucleus tractus solitarii in rats.** J. Pharm. Pharmacol. **33**: 226-231

95. Persson, B, and Henning, M. (1980). **Central cardiovascular and biochemical effects of baclofen in the conscious rat.** J. Pharm. Pharmacol. **32**: 417-422
96. Philippu, A., Pfitscher, A., Singewald, N. (1991). **Involvement of catecholaminergic neurones of the nucleus of the tractus solitary tract (NTS) in blood pressure regulation.** J Neural Transm Suppl **34**: 107-112
97. Porter, J. P. and M. J. Brody (1986). **A comparison of the hemodynamic effects produced by electrical stimulation of subnuclei of the paraventricular nucleus.** Brain Res **375**(1): 20-29
98. Price, G. W., J. S. Kelly, et al. (1987). **The location of GABAB receptor binding sites in mammalian spinal cord.** Synapse **1**(6): 530-538
99. Price, G. W., G. P. Wilkin, et al. (1984). **Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord?** Nature **307**(5946): 71-74
100. Refshauge, C., P. T. Kissinger, et al. (1974). **New high performance liquid chromatographic analysis of brain catecholamines.** Life Sci **14**(2): 311-322
101. Rivkees, S.A., Lachowicz, J.E. (1997). **Functional D1 and D5 dopamine receptors are expressed in the suprachiasmatic, supraoptic and paraventricular nuclei of primates.** Synapse **26** (1): 1-10
102. Santiago, M., Westerink, B.H. (1990). **Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **342**(4): 407-414
103. Santiago, M., Machado, A., Cano, J. (1993). **In vivo release of dopamine from rat striatum, substantia nigra and prefrontal cortex: differentially modulation of baclofen.** Br J Pharmacol **109**(3): 814-818
104. Saphier, D. (1993). **Electrophysiology and neuropharmacology of noradrenergic projections to rat PVN magnocellular neurons.** Am J Physiol **264**(5 Pt 2): R891-902
105. Sawynok, J., Reid, A. (1986) **Clonidine reverses baclofen-induced increases in noradrenaline turnover in rat brain.** Neurochem Res **11**(5): 723-731

106. Schwarz, M., T. Klockgether, et al. (1988). **Delta – aminovaleric acid antagonizes the pharmacological actions of baclofen in the central nervous system.** Exp Brain Res **70**(3): 618-626.
107. Scott, R. H., H. A. Pearson, et al. (1991). **Aspects of vertebrate neuronal voltage – activated calcium currents and their regulation.** Prog. Neurobio. **36**: 485-520
108. Shimokawa, A., Jin, Q.H., Ishizuka, Y., Kunitake, T., Takasaki, M., Kannan, H. (1998). **Effects of anaesthetics on norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus of awake rats.** Neurosci Lett **244**(1): 21-24
109. Siemers, E.R., Rea, M.A., Felton, D.L., and Aprison, M.H. (1982). **Distribution of uptake of glycine, glutamate and gamma-aminobutyric acid in the vagal nuclei and eight other regions of the rat medulla oblongata.** Neurochem. Res. **7**: 455-468
110. Singh, R. and M. K. Ticku (1987). **Central cardiovascular effects of baclofen in spontaneously hypertensive rats.** Life Sci **40**(10): 1017-1026
111. Soares-da-Silva, P., Garret, M.C. (1990). **A kinetic study of the rate of formation of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the brain of the rat: implication for the origin of Dopac.** Neuropharmacology **29** (10): 869-874
112. Strack, A. M., W. B. Sawyer, et al. (1989). **A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections.** Brain Res **491**(1): 156-162
113. Sved, A. F., 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 P. E. Sawchenko (1980). **Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms.** Neuroendocrinology **31**(6): 410-417
115. Takenaka, K., S. Sasaki, et al. (1991). **Sympathetic and cardiovascular depressant effects by hypothalamic GABAB receptor stimulation in rats.** Clin exp Hypertension, Part A (USA) **A 13** (3): 441
116. Takenaka, K., S. Sasaki, et al. (1994). **Hypothalamic and medullary GABA A and GABAB-ergic system differently regulate sympathetic and cardiovascular systems.** Clin exp Pharmacol Physiol **Suppl 1**: 17

117. Takenaka, K., S. Sasaki, 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
118. Takenaka, K., S. Sasaki, 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): 964-972
119. Tanaka, J., Nomura, M. (1993). **Median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are sensitive to blood pressure changes.** Brain Res **605**(2): 338-341
120. Thrivikraman, K. V., C. Refshauge, et al. (1974). **Liquid chromatographic analysis of nanogram quantities of ascorbate in brain tissue.** Life Sci **15**(7): 1335-1342
121. Tibirica, E., M. Catelli, 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): 1331-1335
122. Tibirica, E., L. Monassier, 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): 164-171.
123. Trippenbach, T., Lake, N. (1994). **Excitatory cardiovascular and respiratory effects of baclofen in intact rats.** Can J Physiol Pharmacol **72**(10): 1200-1207
124. Turgeon, S.M., Albin, R.L. (1998) **Pharmacology, distribution, cellular localization and development of GABAB binding in rodent cerebellum.** Neuroscience **55** (2): p311-323
125. Ungerstedt, U., Tossman, U. (1983). **Brain amino acids measured by intrathecal dialysis in portocaval shunted rats.** J Neurochem **41**(4): 1046-1051
126. Vardhan, A., Kachroo, A., and Sapru, H.N. (1993). **Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C-fiber endings.** Brain Res. **618**: 23-31
127. Waldvogel, H. J., R. L. Faull, et al. (1990). **GABA, GABA receptors and benzodiazepine receptors in the human spinal cord: an auto radiographic and immunohistochemical study at the light and electron microscopic levels.** Neuroscience **39**(2): 361-385

128. Wang, M.Y., and Dun, N.J. (1990). **Phacofen-insensitive presynaptic inhibitory action of (+) baclofen in neonatal rat motoneurons *in vitro***. Br. J. Pharmacol. **99**: 413-421
129. Westerink, B.H., De Vries, J.B. (1988). **Characterization of *in vivo* dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: methodological aspects**. J Neurochem **51**(3): 683-687
130. Westerink, B.H., Kikkert, R.J. (1986). **Effect of various centrally acting drugs on the efflux of dopamine metabolites from rat brain**. J Neurochem **46** (4): 1145-1152
131. Westerink, B. H., Santiago, M. (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): 637-643
132. Westerink, B.H., Spaan, S.J. **On the significance of endogenous 3-methoxytyramine for the effects of centrally acting drugs on dopamine release in the rat brain**. (1982) J Neurochem **38**(3): 680-686
133. White, J. H., A. Wise, et al. (1998). **Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor**. Nature **396**(6712): 679-682
134. Wojcik, W.J., Holopainen, I. (1992). **Role of central GABAB receptors in physiology and pathology**. Neuropsychopharmacology **6** (4): p201-214
135. Wu, S. Y., Dun, N. J. (1992). **Presynaptic GABAB receptor activation attenuates synaptic transmission to rat sympathetic preganglionic neurons *in vitro***. Brain Res **572**(1-2): 94-102
136. Wuis, E. W., M. J. M. Dirks, et al. (1989). **Plasma and urinary kinetics of oral baclofen in healthy subjects**. Eur. J. Clin. Pharmacol. **37**: 181-184
137. Wuis, E. W., Dirks, M. J. M. (1990). **Pharmacokinetics of baclofen in spastic patients receiving multiple oral doses**. Pharm. Weekbl. Sci. **12**: 71-74
138. Yi, Z., Brown, P.R. (1991). **Chromatographic methods for the analysis of basic neurotransmitters and their acid metabolites**. Biomed Chromatogr **5**(3): 1001-1007
139. Yin, M. (1996). **Role of gamma-aminobutyric acid B receptors in baroreceptor reflexes in hypertensive rats**. Hypertension **27**(6):1291-1298
140. Young, R. R., Delwaide, P. J. (1981). **Drug Therapy I - Spasticity**. N. Engl. J. Med. **304**: 28-33

141. Young, R. R., Delwaide P.J. (1981). **Drug Therapy II - Spasticity.** N. Engl. J. Med. **304**: 96-99
142. Zetterstrom, T., L. Vernet, et al. (1982). **Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre.** Neurosci Lett **29**(2): 111-115

7. Lebenslauf

geb. am: 27.05.1974
in: Bad Mergentheim
Eltern: Dr. Gernot und Dr. Maria Czell geb. Prall
Ehefrau: Lorena Czell geb. Abelenda
Kinder: Nova Czell
Geschwister: Astrid Pfarschner geb. Czell
1980 – 1984 Grundschule Schwerte – Villigst
1984 – 1989 Friedrich – Bährens – Gymnasium in Schwerte
1989 – 1993 Ev. Gymnasium Siegen – Weidenau
6/1993 Abitur
11/1993 – 01/1995 Zivildienst (Rettungsdienst Feuerwehr Siegen)
04/1995 – 11/2001 Studium Humanmedizin, Philipps – Universität in Marburg
09/10 1997 Famulatur in der Internistischen Abteilung des Jüdischen Krankenhauses in Berlin
04/1998 Erstes Staatsexamen
seit 04/1998 Philosophiestudium Philipps – Universität in Marburg
08/1998 Famulatur in der Abteilung Anästhesie/Intensivmedizin des Ev. Jung – Stilling – Krankenhauses in Siegen
09/1998 Famulatur in der Chirurgischen Praxis Wittmann/Höltershinken in Siegen
10/1998 Beginn der Dissertation in der Klinik für Neurochirurgie der Philipps – Universität in Marburg bei Prof. Dr. Bertalanffy (Betreuer: Priv.Doz. Dr. Becker): „Die Wirkung intrathekaler Baclofen-applikation auf die Freisetzung von Adrenalin, Noradrenalin und Homovanillinsäure aus dem Nucleus paraventricularis hypothalami der Ratte“
02 – 03/1999 Famulatur in der Neurologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Siegen
09/2000 Zweites Staatsexamen
10/2000 – 02/2001 Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Allgemein- und Unfallchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Lahnberge in Marburg
03 – 06/2001 Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Neurologischen Abteilung des Universitätsklinikums Balgrist in Zürich
06-09/2001 Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Abteilung des Universitätsklinikums Lahnberge in Marburg
11/2001 Drittes Staatsexamen
02/2002 – 7/2003 Arzt im Praktikum im Klinikum Schloss Pulsnitz bei Dresden
seit 08/2003 Assistenzarzt in der Neurologischen Abteilung der Uniklinik Balgrist in Zürich

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg:

Prof. Aumüller, Prof. Basler, Prof. Baum, Prof. Bertalanffy, Prof. Bien, Prof. Czubayko,
Prof. Gotzen, Prof. Griss, Prof. Grzeschik, Prof. Happle, Prof. Hasilik, Prof. Heeg,
Prof. Klenk, Prof. Klose, Prof. Krieg, Prof. Kroll, Prof. Lange, Prof. Maisch, Prof. Mennel, Prof. Moll,
Prof. Moosdorf, Prof. Müller, Prof. Neubauer, Prof. Oertel, Prof. Renschmidt, Prof. Renz, Prof. Schulz,
Prof. Seybert, Prof. Werner, Prof. Wulf

in Zürich Prof. Dietz

9. Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Bertalanffy, in dessen Abteilung ich die Doktorarbeit schreiben durfte.

Herrn Priv. Doz. Dr. Ralf Becker danke ich für die Überlassung des Themas, insbesondere seine Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.H. Müller danke ich für die statistische Beratung, ebenso den Frau Jennemann (MTA) und Frau Stöhr (MTA) und selbstverständlich meinen Mitdoktoranden Turgay Efe, Matthias „Leo“ Krause, Adrian Schmidt, Thorsten Schulte und Carsten Vossmann für die Zusammenarbeit.

Selbstverständlich bedanke ich mich auch bei meinen Eltern, meiner Ehefrau und meiner Tochter für die seelische Unterstützung bei dieser Arbeit.