

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Etablierung einer Methode zur Durchführung extrazellulärer Einzelzellableitungen an der anaesthetisierten Ratte unter den im Institut gegebenen Bedingungen wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung verschiedener Dosierungen des Antiepileptikums Valproinsäure auf die Spontanaktivität GABAerger Neuronen der Substantia nigra pars reticulata (SNR) untersucht und mit der Wirkung des Antikonvulsivums (E)-2-en-Valproat verglichen. In einem zweiten Teil wurde der Einfluß verschiedener Anaesthetisierungsformen auf die Spontanaktivität und die Wirkung von Valproat in diesem System untersucht.

Der Substanzvergleich im ersten experimentellen Teil wurde an mit 360 mg/kg Chloralhydrat i.p. anaesthetisierten Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden bei der konstanten Atemfrequenz von 70/min mit einem Atemzugvolumen von 2-3,5 ml künstlich beatmet. Fortlaufend während der Experimente wurden die Vitalparameter expiratorischer CO_2 -Gehalt, Herzfrequenz, Blutdruck und Rektaltemperatur aufgezeichnet, um eine stabile Anaesthetisierung zu gewährleisten. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Anaesthetisiertiefe wurde Chloralhydrat mit einer Rate von 140-160 mg/kg/h intravenös infundiert. Nach der Identifizierung eines GABAergen SNR-Neurons mit seinen typischen Charakteristika biphasisches Aktionspotential mit kurzer Dauer von 0,5-1,2 msec und schneller Feuerrate mit 10-40 Aktionspotentialen pro Sekunde wurde die Basisaktivität dieses Neurons nach seiner Stabilisierung über 10 Minuten aufgezeichnet. Die neuronale Aktivität wurde fortlaufend während der Applikation von 50, 100 oder 200 mg/kg Valproat bzw. (E)-2-en-Valproat i.v. über eine Minute aufgezeichnet sowie für weitere 40-50 Minuten. Jede Dosierung der jeweiligen Substanz wurde an einer Gruppe von 7-10 Tieren getestet, pro Tier wurde ein Neuron abgeleitet. Eine mit isotoner Kochsalzlösung behandelte Gruppe diente als Kontrolle.

Die mittlere Spontanaktivität von SNR-Neuronen über 10 Minuten lag bei $19,5 \pm 1$ Aktionspotentialen pro Sekunde ($n=59$). Valproat und (E)-2-en-Valproat bewirkten eine dosisabhängige Reduktion dieser Spontanaktivität mit einer maximalen Depression von 12,7, 14,8 und 42,4% nach entsprechend 50, 100 und 200 mg/kg Valproat bzw. 12,3, 29,5 und 54,2% nach 50, 100 und 200 mg/kg (E)-2-en-Valproat. Die Depression zeigte über 50 Minuten nur nach 50 mg/kg Valproat eine Erholung und blieb bei den übrigen Versuchsgruppen bis zum Ende der Experimente weitgehend erhalten. Beim Vergleich der entsprechenden Dosierungen beider Substanzen zeigte sich die Tendenz zu einer stärkeren Depression unter (E)-2-en-Valproat. Diese wurde beim Vergleich der Flächen unter den Kurven bei der Dosierung von 50 mg/kg ($p < 0,01$) und beim Vergleich der maximalen Depression nach 100 mg/kg ($p < 0,05$) signifikant. Beide Substanzen führten zu einer dosisabhängigen Vertiefung der Anaesthetisierung. Um eine konstante Anaesthetisiertiefe aufrechtzuerhalten, mußte die Infusionsrate für Chloralhydrat auf 86 mg/kg/h nach 50 mg/kg und auf 70 mg/kg/h nach 100 und 200 mg/kg beider Substanzen gesenkt werden.

Aufgrund widersprüchlicher Literaturangaben zur Wirkung von Valproat am anaesthetisierten und nur paralysierten Tier sollte in einem zweiten experimentellen Teil untersucht werden, ob die depressive Wirkung von Valproat auf die Aktivität von SNR-Neuronen möglicherweise nur auf einer Potenzierung mit der zentral depressiv wirkenden Chloralhydrat-Anaesthetie basierte. Alternativ wurde die Wirkung von 100 mg/kg Valproat unter dem dissoziativen Anaesthetikum Ketamin und einer Kombination von Kurzzeitbarbiturat (Methohexital), zentralem Analgetikum (Fentanyl) und peripherem Muskelrelaxanz (Gallamin) untersucht. Die Ketamin-Anaesthetie wurde mit einem initialen Bolus von 200 mg/kg i.p. eingeleitet und mit einer Infusion von 40-50 mg/kg/h aufrechterhalten. Diese Infusionsrate mußte nach Applikation von Valproat auf 30 mg/kg/h gesenkt werden (s.o.). Die Kombinations-Anaesthetie wurde mit einem initialen Bolus von 60 mg/kg Methohexital i.p. und 50 µg/kg Fentanyl i.p. induziert. Das Barbiturat diente nur während der chirurgischen Maßnahmen, während derer es alle 20 Minuten in einer Dosierung von 20 mg/kg i.p. nachdosiert wurde, zur Gewährleistung einer adäquaten Anaesthetie. Nach Beendigung der Präparationsgänge wurde es abgesetzt. Während der elektrophysiologischen Experimente garantierte die kombinierte intravenöse Infusion von 100 µg/kg/h Fentanyl und 20 mg/kg/h Gallamin eine ausreichende Analgesie und Muskelrelaxation sowie konstante Kreislaufbedingungen, um die Experimente durchführen zu können. Nach Applikation von Valproat konnte die Infusionsrate für das Analgetikum auf 75 µg/kg/h gesenkt werden. Die über 10 Minuten gemittelte Basisaktivität von jeweils einer Kontroll- und der mit 100 mg/kg Valproat behandelten Gruppe lag unter Chloralhydrat, Ketamin und Fentanyl/Gallamin bei entsprechend $18,8 \pm 1,4$, $19,8 \pm 2,4$ und $23,5 \pm 1,6$ Aktionspotentialen pro Sekunde. Bei dem Vergleich der über 10 min gemittelten Basisaktivität unterschied sich die Feuerrate zwischen Fentanyl/Gallamin und jeweils einer der anderen beiden Anaesthetieformen signifikant ($p < 0,05$). Unter beiden alternativ gewählten Anaesthetieformen konnte die depressive Wirkung von Valproat auf die Spontanaktivität GABAerger SNR-Neuronen reproduziert werden. 100 mg/kg Valproat i.v. führten unter Chloralhydrat, Ketamin und Fentanyl/Gallamin zu einer Depression von entsprechend 13,8, 35,3 und 48,9%. Entgegen der Arbeitshypothese bewirkte Valproat unter der Anaesthetieform mit höchster Basisaktivität, Fentanyl/Gallamin, sowohl im Vergleich der Flächen unter den Kurven neuronaler Aktivität ($p < 0,001$) als auch im Vergleich der maximalen Depression ($p < 0,05$) eine signifikant stärkere neuronale Depression als unter der Anaesthetie mit niedrigster Spontanaktivität, d.h. Chloralhydrat. Die Tendenz zu einer stärkeren Depression unter Fentanyl/Gallamin gegenüber Ketamin erreichte mit keinem der beiden Vergleichsparameter statistische Signifikanz. Zwischen der Chloralhydrat- und der Ketamin-Anaesthetie unterschied sich die Wirkung von Valproat signifikant im Vergleich der Flächen unter den Kurven neuronaler Aktivität ($p < 0,05$). Die vorliegenden Studien zeigen, daß Valproat und (E)-2-en-Valproat in Dosierungen ab 50 mg/kg i.v. die neuronale Spontanaktivität GABAerger Neuronen der Substantia nigra pars

reticulata reduzieren konnten. Die sowohl in tierexperimentellen Krampfmodellen als auch in neurochemischen und neurophysiologischen Studien beobachtete höhere Potenz des Metaboliten ließ sich auch hinsichtlich der neuronalen Depression beobachten. Die depressive Wirkung von Valproat läßt sich unter einer Anaesthesie mit Chloralhydrat, Ketamin und einer Kombination von Fentanyl und Gallamin beobachten. Sie scheint damit nicht von einer Potenzierung mit einem zentral depressiv wirkenden Anaesthetikum abhängig zu sein, sondern die depressive Wirkung scheint eher unter der zentral dämpfenden Wirkung von Chloralhydrat abgeschwächt zu werden. Wenn auch mit den alternativ zu Chloralhydrat gewählten Anaesthesieformen eine adaequate Anaesthesie mit konstanten Kreislaufbedingungen induziert und aufrechterhalten werden konnte, führte die erforderliche hohe initiale Dosis von Ketamin zu einer erhöhten Inzidenz von Todesfällen nach Einleitung der Anaesthesie. Die Kombinationsanaesthesie erwies sich unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen aufgrund einer erhöhten neuronalen Hintergrundaktivität und starker Schwankungen innerhalb der Aktivität eines einzelnen Neurons als Anaesthesie für die hier gewählte elektrophysiologische Fragestellung als ungeeignet. Somit erwies sich die Chloralhydrat-Anaesthesie als für die elektrophysiologischen Experimente als am besten geeignet.

SUMMARY

Anke Rohlf

Extracellular single unit recordings in the substantia nigra pars reticulata of rats: effects of different anticonvulsant drugs on the spontaneous activity of GABAergic neurons with respect to the influence of anesthesia.

In order to introduce a model of extracellular single unit recordings in anesthetized rats, an initial course of experiments dealt with the effects of different doses of the anticonvulsant valproic acid on the spontaneous activity of GABAergic neurons of the substantia nigra pars reticulata in comparison with its main metabolite (E)-2-en-valproate. In a second set of experiments the influence of different types of anesthesia on the spontaneous activity and the pharmacological effects of valproate were investigated.

The first series of experiments were performed in rats under chloral hydrate (360 mg/kg i.p.) anesthesia. Ventilation of rats was performed with a tidal volume of 2-3,5 ml at a frequency of 70/min. In order to assure stability of anesthesia, expiratory carbon dioxide, heart rate, blood pressure and rectal temperature were continuously monitored. Chloral hydrate was continuously infused at a rate of 140-160 mg/kg/h i.v., in order to maintain the

anesthetic state. After obtaining stable recordings an identified GABAergic neuron of the SNR with its characteristic biphasic action potential of short duration with 0,5-1,2 msec and basic firing rate of 10-40 Hz the spontaneous firing rate was monitored 10 min before and 40-50 min after i.v. application of 50, 100 or 200 mg/kg valproate, or (E)-2-en-valproate, respectively. Each dose of both drugs was tested in a group of 7-10 animals. An additional group treated with saline served as control. Only one neuron was recorded per animal.

The mean basic firing rate of SNR neurons over 10 min was $19,5 \pm 1$ Hz (n=59). Valproate and (E)-2-en-valproate suppressed the activity in a dose dependent manner, yielding a maximal depression of 12.7, 14.8 and 42.4% with 50, 100 and 200 mg/kg valproate and 12.3, 29.5 and 54% after 50, 100 and 200 mg/kg (E)-2-en-valproate respectively. The depression lasted longer than 50 min except for a recovery in the case of 50 mg/kg valproate. When comparing each dose of the two drugs (E)-2-en-valproate showed a greater potency in depressing single unit activity. The difference reached significance when comparing the area-under-the-curve (AUC) at 50 mg/kg ($p < 0,01$) and when comparing the maximal depression at 100 mg/kg. Both drugs deepened the anesthesia in a dose dependent manner. To maintain a stable anesthetic state, the infusion rate of chloral hydrate had to be reduced to 86 mg/kg/h after application of 50 mg/kg and to 70 mg/kg/h after 100 and 200 mg/kg of both drugs, respectively.

With respect to the controversy in literature concerning the effects of valproate in paralyzed or anesthetized animals, a second series of experiments dealt with the question whether the effects of valproate could have been potentiated by the central depressive anesthesia. Therefore the experiments with 100 mg/kg valproate were repeated under the dissociative anesthetic ketamine and a combination of a short acting barbiturate (methohexital), a central analgesic (fentanyl) and a peripheral muscle relaxant (gallamine). Ketamine anesthesia was induced with a bolus injection of 200 mg/kg i.p. and maintained by an infusion rate of 40-50 mg/kg/h. The infusion rate had to be reduced to 30 mg/kg/h after i.v. application of valproate. For induction of the third type of anesthesia, rats were injected with a combination of 60 mg/kg methohexital and 50 μ g/kg fentanyl i.p.. During surgery the anesthetic state was maintained with methohexital 20 mg/kg i.p. every 20 min. Thereafter the application of methohexital was terminated. During the electrophysiological experiments a coinfusion of 100 μ g/kg fentanyl and 20 mg/kg gallamine assured the analgesia, muscle relaxation and a stable cardiovascular state. After application of valproate the infusion rate of fentanyl could be reduced to 75 μ g/kg for maintaining stable analgesia. The mean basic firing rate over 10 min for the control and the valproate group under chloral hydrate, ketamine or the combination anesthesia was $18,8 \pm 1,4$, $19,8 \pm 2,4$ and $23,5 \pm 1,6$ Hz respectively. The mean basic firing rate differed significantly between the combination and either chloral hydrate or ketamine ($p < 0,05$). The depressive effect of valproate 100 mg/kg i.v. under chloral hydrate was reproduced under ketamine and the combination, yielding a

maximal depression of 13.8, 35.3 and 48.9% respectively. In contrast to our initial hypothesis valproate exerted a more potent depression under the type of anesthesia with the highest basic activity, i.e. the combination, than under the anesthesia with the lowest basic activity, i.e. chloral hydrate. This difference reached statistic significance while comparing the values of maximal depression ($p < 0,05$) as well the AUC ($p < 0,001$). The tendency of valproate to exert a deeper depression under the combination in comparison with ketamine did not reach significance. The effect of valproate under ketamine and chloral hydrate differed significantly while comparing the AUC of neuronal activity ($p < 0,05$).

The present study shows a depression of GABAergic neurons of substantia nigra pars reticulata under valproate and (E)-2-en-Valproat at doses as low as 50 mg/kg i.v., which are within the human therapeutic range. The higher potency of (E)-2-en-valproate reported in the literature for anticonvulsive, neurochemical and neurophysiological effects was reflected by a tendency of stronger neuronal depression. The depressive effect of valproate was shown under three different types of anesthesia, i.e. chloral hydrate, ketamine and a combination of fentanyl and gallamine. The depressive effect of valproate seems not to depend on the potentiation with a central depressive anesthetic. In contrast, valproate-induced depression seems to be attenuated when tested under the depressive anesthetic chloral hydrate. In spite of the fact that ketamine and the combination were able to assure a sufficient anesthesia with a stable cardiovascular state, ketamine anesthesia at the employed high initial dose was associated with the problem of death of animals shortly after induction of anesthesia. Under the experimental conditions of this study the combination of fentanyl and gallamine could not assure a stable state of neuronal activity necessary to perform the electrophysiological experiments, because the investigations were limited by high neuronal background activity and large fluctuations in the spontaneous activity of single neurons. The chloral hydrate anesthesia yielded the best electrophysiological results.