

Therapeutika des neuropathischen Schmerzes blockieren den TTX-resistenten Natriumkanal des peripheren nozizeptiven Systems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Marc Dreimann**

aus Detmold

Gießen 2001

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Physiologisches Institut
Leiter: Prof. Dr. Ch. Baumann
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. M.E. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Tag der Disputation: 17. August 2001

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	7
1.1 Schmerz und Schmerztherapie	7
1.2 Das nozizeptive System	9
1.3 Anatomie	11
1.4 Pharmakodynamik der untersuchten Substanzen	12
1.5 Elektrophysiologische Grundlagen	15
1.6 Erregungsbildung und -ausbreitung am peripheren Nerven	16
1.6.1 Das Ruhemembranpotential	16
1.6.2 Das Aktionspotential	17
1.6.3 Die Erregungsfortleitung	17
1.6.4 Die Ionenkanäle der Nervenmembran	18
1.7 Der Natriumkanal	19
1.8 Der TTX-resistente Natriumkanal	21
1.9 Fragestellung	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Die <i>Patch-clamp</i> Technik	26
2.2 Die Präparation	28
2.3 Lösungen	29
2.3.1 Außenlösungen	30
2.3.2 Innenlösung	30
2.3.3 Präparationslösungen	30
2.3.4 Toxine und kanalmodifizierende Substanzen	30
2.4 Der Lösungswechsel	31
2.5 Elektrophysiologische Technik und Geräte	32
2.5.1 Pipetten	32
2.5.2 Der Versuchsstand	33
2.6 Datenerfassung und Auswertung	33

	Seite
3. Ergebnisse	35
3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des TTX-resistenten Natriumstromes	35
3.1.1 Spannungsabhängigkeit	37
3.1.2 Inaktivierung	37
3.1.3 TTX-Empfindlichkeit	39
3.1.4 Größe der Zellen	40
3.2 Die Untersuchung am Beispiel von Lidocain	41
3.3 Abhängigkeit der Lidocainwirkung vom Haltepotential	43
3.4 Ergebnisse für die klinisch eingesetzten Schmerztherapeutika: Carbamazepin, Mexiletin, Memantin, Amitriptylin und Gabapentin	45
3.5 Zusammenstellung der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen	49
4. Diskussion	50
4.1 Der TTX-resistente Natriumkanal und chronische Schmerzsyndrome	50
4.2 Klinische Therapie	52
4.3 Ausblick	53
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	56
7. Lebenslauf	65
8. Danksagung	66

	Seite
Abbildung 1: Hinterwurzelganglienneurone als Teil des Reflexbogens	12
Abbildung 2: Chemische Struktur von Lidocain	12
Abbildung 3: Chemische Struktur von Mexiletin	13
Abbildung 4: Chemische Struktur von Carbamazepin	13
Abbildung 5: Chemische Struktur von Memantin	14
Abbildung 6: Chemische Struktur von Gabapentin	14
Abbildung 7: Chemische Struktur von Amitriptylin	15
Abbildung 8: Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals	21
Abbildung 9: Chemische Struktur von Tetrodotoxin (TTX)	22
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer <i>Patch-clamp</i> Anordnung in <i>whole-cell</i> Konfiguration	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung verschiedener <i>Patch</i> Konfigurationen	27
Abbildung 12: (A) Ionenströme einer kleinen DRG-Zelle in <i>whole-cell</i> Konfiguration (B) Strom-Spannungs-Kurve des TTX-resistenten Natriumstromes	36
Abbildung 13: Originalregistrierung einer Inaktivierungskurve	38
Abbildung 14: Konzentrations-Inhibitions-Kurven für Tetrodotoxin-sensitive und -resistente Ströme	40
Abbildung 15: Zellkapazitätsverteilung aller untersuchten Zellen	41
Abbildung 16: Registrierung des TTX-resistenten Natriumstromes	42
Abbildung 17: Blockade von Lidocain in Abhängigkeit von der Reizimpulsnummer	43
Abbildung 18: Konzentrations-Inhibitions-Kurven für Lidocain in Abhängigkeit vom Haltepotential für den tonischen (A) und phasischen (B) Block	44
Abbildung 19: Abhängigkeit der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) für Lidocain	44
Abbildung 20: Darstellung des Blockierungsverhaltens der gewählten Substanzen	46
Abbildung 21: Bestimmung der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50})	47
Abbildung 22: Halbmaximale Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) bei verschiedenen Haltepotentialen	48

		Seite
Tabelle 1.	Klassifikation der peripheren Nervenfasern nach Erlanger und Gasser	11
Tabelle 2.	Ionenkanäle des peripheren Froschnerven	19
Tabelle 3.	Halbmaximale Blockierungskonzentration von Lidocain bei den gewählten Membranpotentialen	45
Tabelle 4.	IC ₅₀ für verschiedene Testsubstanzen bei verschiedenen Haltepotentialen	49

1.1 Schmerz und Schmerztherapie

Schmerz nimmt in der heutigen auf Gesundheit ausgelegten Gesellschaft eine bedeutende Rolle ein. Ungefähr 25 % aller Behandlungen sind auf akute Schmerzen zurückzuführen und etwa der gleiche Anteil entfällt auf chronische Schmerzen. Orthopädische Patienten haben sogar in mehr als 50 % der Fälle chronische Schmerzen. Erst in den letzten Jahren hat sich die Anästhesie zunehmend der Aufgabe gewidmet, Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen in speziell eingerichteten Schmerzkliniken zu behandeln. Dabei ist die Pathophysiologie dieser uneinheitlichen Krankheitsbilder nur in Ansätzen verstanden und erforscht.

Um dem Patienten durch eine Ausschaltung des Schmerzes¹ Linderung zu verschaffen, werden akuter und chronischer Schmerz durch unterschiedliche Therapiekonzepte behandelt. Der akute Schmerz, wie zum Beispiel nach einem Trauma, macht in der Behandlung geringe Schwierigkeiten, da hier sehr potente Medikamente zur Verfügung stehen. Chronifiziert der Schmerz hingegen im Sinne von Tumorschmerz, rheumatischem Schmerz oder posttraumatischen Neuralgien, dann muß eine breite Palette von medikamentösen und nichtmedikamentösen Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft werden, um den Patienten von diesen dauerhaften Beeinträchtigungen zu befreien. Gerade hier werden natriumkanalblockierende Pharmaka empirisch als Monotherapie oder in Kombination mit herkömmlichen Analgetika eingesetzt.

Je nach Angriffsort der Schmerztherapeutika werden drei Medikamentengruppen unterschieden: Am Entstehungsort der Gewebeschädigung werden Stoffwechselmetabolite gebildet, die die Reizschwelle für Nozizeptoren senken und eine Algesie hervorrufen. „Periphere Analgetika“ werden therapeutisch eingesetzt, um eine Hemmung der Prostaglandinsynthese zu bewirken. Beispiele für eingesetzte Medikamente dieser Gruppe sind Acetylsalicylsäure als peripheres Analgetikum und Diclofenac als nichtsteroidales Antiphlogistikum.

Ein zweites Konzept verfolgt das Ziel, die Information „Schmerz“ durch hohe Konzentrationen von spezifischen Medikamenten in der Weiterleitung zu blockieren (Leitungsanästhesie). Dieses geschieht im Nerven durch Hemmung des Aktionspotentials mittels natriumkanalblockierender Substanzen (Lokalanästhetika, z.B. Lidocain). Die Medikamente werden durch verschiedene Techniken appliziert: Spinal- und

¹ Schmerz ist definiert als ein „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis in Verbindung mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung oder beschrieben in Begriffen einer solchen Schädigung. Schmerz ist immer subjektiv und wird als körperliches Phänomen erlebt, ist somit nicht lediglich ein sensorischer Wahrnehmungsprozeß.“ (International Association for the Study of Pain, aus Larsen Anästhesie, 5. Auflage).

1. Einleitung und Fragestellung

Epiduralanästhesie, Oberflächenanästhesie, intravenöse Regionalanästhesie und periphere Nervenblockade.

Schließlich kann im zentralen Nervensystem die Verarbeitung und die Wahrnehmung des Symptoms Schmerz beeinflusst werden. Es werden zentral wirksame Medikamente wie Opioide (z.B. Morphin), Neuroleptika (z.B. Promethazin) und Antidepressiva (z.B. Amitriptylin) eingesetzt.

Die Empfindung von Schmerz stellt außerdem eine wichtige Schutzfunktion des Organismus dar. Handlungen, die zu Gewebeschädigungen und somit schlimmeren Folgen führen, werden als schmerzhaft empfunden und somit künftig unterlassen. Beispielsweise wird beim Berühren einer heißen Herdplatte der Finger „reflexartig“ zurückgezogen, um weitere Schäden zu vermeiden.

Bei Operationen wird durch die Verletzung des Körpers die Schmerzkaskade ebenfalls in Gang gebracht. Hier sind Flucht- und Schutzreflexe sowie das Bewußtwerden des Schmerzes nicht erwünscht. Durch gezielten Einsatz intravenöser und/oder inhalativer Anästhetika wird die Wahrnehmung von Schmerz im Zentralnervensystem unterdrückt.

Unterschiedliche Nervenfasern leiten unterschiedliche Informationen (siehe unten). Es gibt Situationen, bei denen nur die Ausschaltung von bestimmten Fasern erwünscht ist. Zum Beispiel sollen in der Geburtshilfe der werdenden Mutter die Schmerzen des Geburtsvorganges genommen werden, gleichzeitig aber andere sensorische und die motorischen Fasern nicht blockiert werden, da sie bei Ausschaltung den Geburtsvorgang erheblich behindern. Gleiches gilt für die Schmerztherapie von Tumorschmerzen oder Neuropathien mittels der kontinuierlichen Lokalanästhesie. Letztendlich soll Schmerzlinderung bei funktionstüchtig gehaltenen motorischen und sensorischen Fasern die Lebensqualität des Patienten verbessern. Ein Lokalanästhetikum wäre wünschenswert, welches selektiv nozizeptive afferente Nervenfasern blockiert und andere Fasern unbeeinflusst läßt. Dieses spezifische Lokalanästhetikum ist noch nicht verfügbar. Aus diesem Grund behilft man sich mit der Applikation von geringen Konzentrationen üblicher Lokalanästhetika.

Eine Langzeittherapie chronisch Schmerzkranker mit einem Analgetikum gestaltet sich wie bereits erwähnt schwierig. Schmerzzustände, die auf pathologische Veränderungen am peripheren Nerven zurückzuführen sind, sprechen auf konventionelle Analgetika häufig nur unzureichend an. Neuere Therapiekonzepte stützen sich auf die systemische Applikation natriumkanalblockierender Pharmaka, da periphere Analgetika und Opioide hier oft einen ungenügenden Erfolg haben. Bei der Suche nach neuen Konzepten zeigten diese

1. Einleitung und Fragestellung

Natriumkanalblocker, die aus den unterschiedlichsten Bereichen der Pharmakotherapie kommen, gute Erfolge. Lokalanästhetika, Antiarrhythmika oder Antikonvulsiva wie Lidocain, Mexiletin, Carbamazepin (Tanelian und Brose, 1991) und Phenytoin sind einige erfolgreich eingesetzten Pharmaka. Andere empirisch überprüfte Substanzen mit gutem Erfolg bei der Therapie von chronischen Schmerzsyndromen sind Amitriptylin (Richeimer *et al.*, 1997), Memantin (Carlton und Hargett, 1995) und Gabapentin (Rosner *et al.*, 1996).

Über den Wirkmechanismus, der die analgetische Potenz dieser Substanzen bei den erwähnten Schmerzzuständen erklären kann, lassen sich nur wenige Aussagen treffen. Eine lokalanästhetische Wirkung kommt nicht in Betracht, da die für eine Nervenblockade benötigten Konzentrationen des Anästhetikums bei der systemischen Applikation nicht erreicht werden. Würden sie erreicht, käme es zur Beeinflussung aller Nerven und somit zur Allgemeinnarkose. Eine Interaktion mit den pathologisch veränderten Neuronen oder den hier verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen scheint wahrscheinlicher zu sein.

1.2 Das nozizeptive System

Schmerzen werden ausgelöst durch Gewebeschäden, die einen intakten Zellverband zerstören. Algogene Substanzen werden aus den geschädigten Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt und dadurch werden Nozizeptoren stimuliert. Dabei kann die Gewebeschädigung unterschiedlichster Natur sein: Traumatische Zerstörung, thermische Schädigung und entzündliche Veränderungen kommen hierbei in Frage. Die aus zerstörten Zellen freigesetzten algetisch wirkenden Substanzen sind K^+ - und H^+ -Ionen, Serotonin und Histamin. Bei Entzündungsprozessen werden auch Arachidonsäuremetabolite (z.B. Prostaglandine) freigesetzt. Diese haben keine direkte Wirkung auf Nozizeptoren, sie erhöhen jedoch die Sensibilität für andere freigesetzte Metabolite und verstärken beziehungsweise ermöglichen so erst deren Wirkung. An den in der Peripherie freiliegenden Nervenendigungen entsteht auf die oben beschriebenen Reize hin die „Information Schmerz“, die durch Aktionspotentiale zum Zentralnervensystem weitergeleitet wird. Das geschieht entweder in myelinisierten A δ -Fasern oder in unmyelinisierten C-Fasern. Der Zellkörper der pseudounipolaren nozizeptiven afferenten Neurone liegt in den Spinalganglien (Hinterwurzelganglien, Abbildung 1). Die Stärke des Schmerzes wird durch die Anzahl der Impulse pro Zeiteinheit kodiert, die Lokalisation wird vermittelt durch die zum geschädigten Gewebe gehörenden Fasern. Die Erregung von A δ -Fasern führt zu einem hellen, gut

1. Einleitung und Fragestellung

lokalisierbaren und schnell auftretenden Schmerz, die Erregung von C-Fasern zu einem dumpfen, schlecht lokalisierbaren und spät einsetzenden Schmerz.

Die zentralen Fortsätze der Nozizeptoren treten über die Hinterwurzeln in das Hinterhorn des Rückenmarkes ein und enden dort in den Laminae I, II und V für die C-Fasern und den Laminae I und V für die A δ -Fasern. Hier projizieren sie über Interneurone auf Motoneurone und bilden so einen polysynaptischen Reflexbogen. Die wichtigste Aufgabe dieses Reflexes ist es, ein geschädigtes Körperteil noch vor Bewußtwerden des Schmerzes von der schädigenden Gefahr zu entfernen (die Hand von der heißen Herdplatte zu nehmen). Neben diesen somatomotorischen Reflexen können über efferente Neurone im Seitenhorn auch vegetative Reflexe wie eine Vasodilatation der Hautgefäße ausgelöst werden.

Die weitere Fortleitung der Informationen erfolgt über die zweiten Neurone der Schmerzleitung, die den Tractus spinothalamicus oder Tractus spinoreticularis beziehungsweise den ipsilateral weiterleitenden Tractus spinocervicalis bilden. Das spinothalamische System endet im Nucleus ventralis posterolateralis des Thalamus und wird von hier auf den somatosensorischen Kortex weitergeleitet (drittes Neuron). Zusammen mit dem Thalamus findet in diesem Gebiet der Großhirnrinde die bewußte Schmerzwahrnehmung statt. Sie ist für die Lokalisation und die Stärke der Schmerzen zuständig.

Der Tractus spinoreticularis wird in der Formatio reticularis umgeschaltet. Die Verknüpfung von dort zu höheren Zentren ist für die schmerzinduzierten vegetativen Reaktionen wie Schweißausbruch und erhöhten Sympathikotonus verantwortlich. Eine Verbindung zum limbischen System (Hippocampus) und dem Frontalkortex (Assoziationsareal) ermöglicht die affektive Bewertung des Schmerzes als negatives Erlebnis und eine Erinnerung daran.

1. Einleitung und Fragestellung

Fasertyp	Funktion	Mittlerer Faserdurchmesser (μm)	Leitungsgeschwindigkeit (m/s)
Aa	primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch zu Skelettmuskeln	15	70-120
Ab	Hautafferenzen für Berührung und Druck	8	30-70
Ag	Motorisch zu Muskelspindeln	5	15-30
Ad	Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption	≤ 3	12-30
B	Sympathisch präganglionäre Efferenzen	3	3-15
C	Hautafferenzen für Nozizeption, sympathische postganglionäre Efferenzen	1 marklos	0,3-2

Tabelle 1: Klassifikation der peripheren Nervenfasern nach Erlanger und Gasser (Erlanger und Gasser, 1932)

1.3 Anatomie

Die Hinterwurzelganglien (Spinalganglien) der Ratte liegen als Abschnitt der Hinterwurzel an den *Foramina spinalia* in der Nähe des knöchernen *Canalis vertebralis* innerhalb der *Dura mater* (Greene, 1949). Sie werden von einer Bindegewebskapsel, dem *Perineurium*, umgeben und von einem gefäßhaltigen Bindegewebe durchzogen. Ihre Ganglienneurone sind das erste Neuron der afferenten sensiblen Fasern. Die dicht gepackten Nervenzellen liegen häufig am Rand der Spinalganglien, die austretenden Fasern bilden den inneren Teil des Ganglions (Andres, 1961).

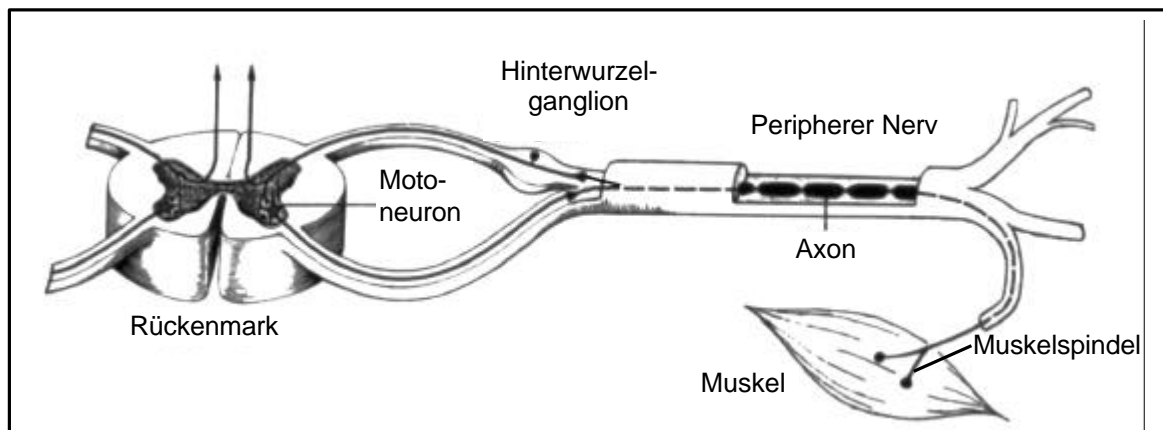


Abbildung 1: Hinterwurzelganglienneurone als Teil des Reflexbogens

1.4 Pharmakodynamik der untersuchten Substanzen

Bei den untersuchten Substanzen handelt es sich um Pharmaka, die bei chronischen Schmerzzuständen Anwendung finden und deren Wirkprinzip die Interaktion mit Natriumkanälen ist.

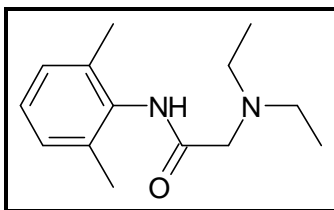


Abbildung 2: Chemische Struktur von Lidocain

Das Amid-Lokalanästhetikum Lidocain gehört entsprechend der Einteilung von Vaughan Williams zur Gruppe der Klasse IB-Antiarrhythmika. Es wirkt über eine Blockade der Natriumkanäle und verhindert so am peripheren Nerv die Weiterleitung der Aktionspotentiale. Am Herzen hemmt es die langsame diastolische Depolarisation der Schrittmacherzellen. Wegen seines hohen First-Pass-Effektes, der den Wirkungsverlust bei Erstpasse durch die Leber darstellt, muß es zur Schmerztherapie intravenös appliziert werden und wird daher meist nur zu Diagnosezwecken benutzt. Als Lokalanästhetikum wird es zur Infiltrations-, Leitungs-, Oberflächen-, Spinal-, und Epiduralanästhesie eingesetzt, wobei es zur Wirkungsverlängerung oft mit Adrenalin versetzt wird. Chemisch gesehen handelt es sich um

1. Einleitung und Fragestellung

2-Diethylamino-N-[2,6-Dimethylphenyl]-acetamid mit der Summenformel $C_{14}H_{22}N_2O$ und einem Molekulargewicht von 234,3 g/mol.

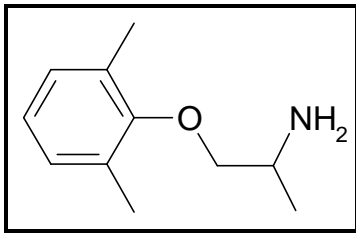


Abbildung 3: Chemische Struktur von Mexiletin

Das Antiarrhythmikum Mexiletin gehört wie Lidocain in die Gruppe IB der Antiarrhythmika und wird klinisch zumeist bei ventrikulären Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Es hat den geringsten proarrhythmischen und negativ inotropen Einfluß auf die Herzaktion aller Klasse I-Antiarrhythmika. Seine Wirkung wird überwiegend durch die Hemmung des schnellen Natriumeinstromes vermittelt. Die Leitungsgeschwindigkeit in partiell depolarisiertem Gewebe wird stärker unterdrückt als in gesundem Gewebe, so daß kreisende Erregungen unterbrochen und Rhythmusstörungen vermieden werden. Chemisch handelt es sich um 1-[2,6-Xylyloxy]-2-Aminopropan mit einer Summenformel $C_{11}H_{15}NO$ und einem Molekulargewicht von 179,3 g/mol.

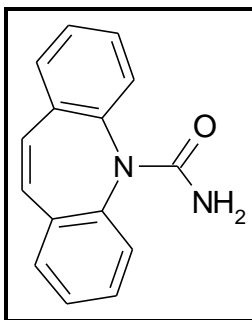


Abbildung 4: Chemische Struktur von Carbamazepin

Carbamazepin ist ein dem Imipramin verwandtes Antiepileptikum, das *in vivo* neben einer antikonvulsiven auch eine psychotrope, antineuralgische und antidiuretische Wirkung aufweist. Es wird davon ausgegangen, daß seine Wirkung vorwiegend durch spannungsabhängige Natriumkanäle vermittelt wird. Klinisch wird das Medikament überwiegend bei Epilepsien vom fokalen Typ und bei sekundär generalisierten tonisch-klonischen Anfällen verabreicht. Außerdem wird seine Potenz häufig bei

1. Einleitung und Fragestellung

Trigeminusneuralgien genutzt. Carbamazepin ist aus chemischer Sicht 5H-Dibenz[b,f]azepine-5-Carboxamid mit einer Summenformel $C_{15}H_{12}N_2O$ und einem Molekulargewicht von 236,3 g/mol.

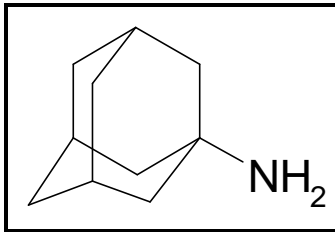


Abbildung 5: Chemische Struktur von Memantin

Das Antiparkinsonmittel Memantin wird klinisch zum einen als Hemmer des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Kanals und zum anderen als Muskelrelaxans zur Senkung des pathologisch erhöhten Skelettmuskulaturtonus benutzt. Als NMDA-Antagonist hat es bei der Monomedikation zur Therapie des Morbus Parkinson nur einen geringen Effekt. Bei einer Kombinationstherapie hilft es jedoch, Levodopa einzusparen und somit unerwünschte Wirkungen zu reduzieren und den allmählich eintretenden Wirkungsverlust des Levodopa hinauszuzögern. Memantin wird bezeichnet als 3,5-Dimethyl-1-Adamantanamin mit einer Summenformel $C_{12}H_{21}N$ und einem Molekulargewicht von 215,8 g/mol.

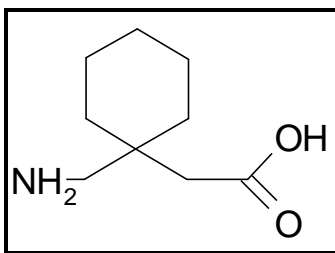


Abbildung 6: Chemische Struktur von Gabapentin

Das Antiepileptikum Gabapentin wurde unter der Vorstellung entwickelt, ein zentral wirksames Gamma-Aminobuttersäure-(GABA)-Analogon herzustellen. Es sollte im Gegensatz zu GABA die Blut-Hirn Schranke leicht durchdringen und so antikonvulsiv wirksam sein. Es zeigte sich jedoch, daß Gabapentin über ein spezielles neuronales Transportsystem für L-Aminosäuren wirkt, das bei der Passage durch die Zellmembran eine Rolle spielt. Klinisch wird es angewendet als Zusatzmedikation bei fokalen Anfällen und sekundär generalisierten tonisch-klonischen Anfällen, die mit einer Monotherapie

1. Einleitung und Fragestellung

unzureichend einstellbar sind und sich als therapierefraktär erweisen. Chemisch gesehen handelt es sich um 1-(Aminomethyl)cyclohexaneacetic Säure mit einer Summenformel $C_9H_{17}NO_2$ und einem Molekulargewicht von 171,2 g/mol.

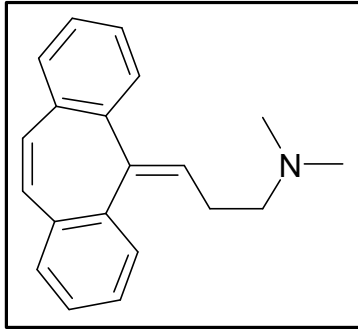


Abbildung 7: Chemische Struktur von Amitriptylin

Amitriptylin gehört zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva. Hier ist es eingeteilt in die Untergruppe der Dibenzocycloheptadien-Derivate. Es wird eingesetzt bei endogenen Depressionen, vor allem bei Patienten mit einer akuten Erregung. Es wirkt hier stimmungsaufhellend und vor allem psychomotorisch dämpfend. Amitriptylin ist 3-(10,11-Dihydro-5H-dibenzo-[a,d]cyclohepten-5-ylidene)-N,N-dimethyl-1-propanamine; 10,11-dihydro-N,N-dimethyl-5H-dibenzo[a,d]cycloheptenpropylamine mit einer Summenformel $C_{20}H_{23}N$ und einem Molekulargewicht von 277,4 g/mol.

1.5 Elektrophysiologische Grundlagen

Für die Funktion von Nerven- und Muskelzellen sind unter anderem Ionenströme notwendig, eine relativ alte Erkenntnis. Schon Luigi Galvani glaubte im Jahre 1791 an das Vorhandensein von „tierischer Elektrizität“.

Im Jahr 1902 wurde von Bernstein (Bernstein, 1902) erkannt, daß Diffusionspotentiale der Membran die Grundlage der elektrischen Weiterleitung sind (Membran Hypothese).

Ende der dreißiger Jahre entwickelten dann Cole und Curtis (Cole, 1949) die Technik der Spannungsklemme. Sie wiesen mit Hilfe dieser die Änderung der Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle während eines Aktionspotentials nach. In wegweisenden Arbeiten von Hodgkin, Huxley und Katz (Hodgkin *et al.*, 1952; Hodgkin und Huxley, 1952a-d) wurde in den

1. Einleitung und Fragestellung

fünfziger Jahren am Riesenaxon der Tintenschnecke (*Loligo*) eine Änderung der Membrandurchlässigkeit für bestimmte Ionen als Korrelat des Aktionspotentials entdeckt.

Ein weiterer Fortschritt gelang der Arbeitsgruppe um Neher und Sakmann, mit der von ihnen entwickelten *Patch-clamp* Technik. Durch Verbesserung der Verstärkertechnik und Modifizierung der Pipetten gelang es den Autoren erstmals, Membranströme bis in den Picobereich zu verstärken, was die Auflösung von Ionenströmen möglich machte (Neher und Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981). Mit Hilfe dieser Technik sind bis heute eine Vielzahl von verschiedenen Ionenkanälen in den unterschiedlichsten Gewebetypen beschrieben und charakterisiert worden (siehe Tabelle 2).

1.6 Erregungsbildung und -ausbreitung am peripheren Nerven

1.6.1 Das Ruhemembranpotential

In neuronalen Zellen herrscht an der Doppellipidmembran eine Potentialdifferenz von -60 bis -90 mV zwischen der Zellinnen- und -außenseite. Das Zellinnere ist gegenüber dem Extrazellulärraum negativ geladen. Die Ursache für dieses Ruhemembranpotential ist eine ungleiche Ionenverteilung zwischen dem Intrazellulär- (IZR) und dem Extrazellulärraum (EZR), die durch einen aktiven Pumpmechanismus für Ionen (Na⁺/K⁺-Pumpe) entsteht. Die Na⁺/K⁺-Pumpe, welche Na⁺-Ionen aus und K⁺-Ionen in die Zelle transportiert, hält das Konzentrationsgefälle aufrecht. Für Natrium liegt es bei 28 zu 1 (EZR / IZR) und für Kalium bei 1 zu 35. Das Ruhemembranpotential ist maßgeblich auf die Durchlässigkeit der nichterregten Membran für Kaliumionen zurückzuführen, es liegt deshalb nahe am Kaliumgleichgewichtspotential.

Mit Hilfe der Nernst Gleichung

Gleichung 1:
$$E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z_x} \cdot \ln \frac{[X]_{\text{außen}}}{[X]_{\text{innen}}}$$

R	= allgemeine Gaskonstante (8,315 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
F	= Faraday-Konstante (9,64 · 10 ⁴ C mol ⁻¹)
T	= absolute Temperatur (K)
z _x	= Wertigkeit des Ions X
[X]	= Konzentration des Ions X

kann ein Gleichgewichtspotential für Kalium von -85 mV und für Natrium von 68 mV berechnet werden. (Es wird von folgenden Annahmen ausgegangen: Raumtemperatur: 295

1. Einleitung und Fragestellung

Kelvin, Wertigkeit des Ions: Natrium und Kalium jeweils +1, für das DRG-Neuron: $[Na^+]_i$: 10, $[K^+]_i$: 155 (in mmol/l) (modifiziert nach: Kostyuk *et al.*, 1981))

1.6.2 Das Aktionspotential

Nervenzellen haben im Organismus die Funktion, Informationen aufzunehmen, zu vergleichen, innerhalb des Systems weiterzuleiten und schließlich die Funktion anderer Zellarten zu steuern. Die Grundlage dieser Aktivität ist das Aktionspotential.

Wird eine Nervenzelle gereizt, steigt das Ruhemembranpotential auf einen Schwellenwert von etwa -50 mV an. An diesem Punkt kommt es zu einer kurzfristigen Erhöhung der Natriumleitfähigkeit und somit zum Einstrom von Natriumionen in die Zelle. Das führt zu einer Depolarisation der Zelle, dem Beginn des Aktionspotentials.

Potentialabhängige Kanäle haben den hauptsächlichen Anteil an diesem Ablauf, sie lassen selektiv Natriumionen durch die Membran passieren. Die Anzahl der bei diesem Verlauf fließenden Ionen ist jedoch gegenüber der Gesamtzahl der intra- und extrazellulär befindlichen Ionen so gering, daß sich die Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran nur sehr geringfügig verändern.

Um möglichst viel Information weiterzuleiten, muß das Aktionspotential kurz sein (1 ms) und die Natriumkanäle müssen eine dementsprechend schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik aufweisen, um den geforderten Kriterien gerecht zu werden. Die Anforderungen an die 100-fach langsamer als $A\alpha$ -Fasern leitende Schmerzfasern sind hier weniger hoch (siehe Tabelle 1).

An der Rückbildung des Aktionspotentials sind verschiedene Mechanismen beteiligt. Die Natriumkanäle inaktivieren, es findet eine Abnahme der Leitfähigkeit statt. Zeitlich verzögert erfolgt eine Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit. Somit wird die Membran repolarisiert und das Ruhemembranpotential wiederhergestellt. Durch Inaktivierung des Natriumkanalsystems bleibt die Membran für eine Zeitdauer unerregbar. Diese Zeitspanne wird als absolute Refraktärzeit bezeichnet.

1.6.3 Die Erregungsfortleitung

Das Aktionspotential, das eine Stelle des Axons erreicht hat, depolarisiert elektrotonisch den vor ihm liegenden Bereich. Wenn durch die Depolarisation das Schwellenpotential in diesem Bereich erreicht ist, wird durch die Überschreitung des Potentials erneut ein Aktionspotential ausgelöst, der Erregungsvorgang hat sich fortgesetzt. Dabei ist die Leitungsgeschwindigkeit eines Nerven von verschiedenen Faktoren abhängig: Eine entscheidende Rolle spielen die

1. Einleitung und Fragestellung

Membrankapazität, der Axonwiderstand, die Steilheit des Aktionspotentials infolge der Amplitude des Natriumstromes in der Zelle und der Faserdurchmesser. Die Schwann-Zellen bilden eine Ummantelung mit Myelin, die sogenannte Myelinscheide. Hier nimmt der Membranwiderstand zu und die Membrankapazität ab. Dadurch gelingt die Auslösung eines Aktionspotentials nur in dem nicht ummantelten Bereich. Da jetzt nur die freien Bereiche depolarisiert werden müssen und myelinisierte Bereiche übersprungen werden, wird eine schnellere Fortleitung der Erregung erzielt (saltatorische Erregungsleitung, zur Übersicht: (Hille, 1992)).

1.6.4 Die Ionenkanäle der Nervenmembran

Mit Hilfe der *Patch-clamp* Technik ist mittlerweile eine große Anzahl von verschiedenen Ionenkanälen des peripheren Nerven entdeckt worden (zur Übersicht: (Vogel und Schwarz, 1995; Jonas *et al.*, 1989; Koh *et al.*, 1992)), denen die unterschiedlichsten Funktionen zugeschrieben werden (siehe Tabelle 2). Eine Untersuchung der Ionenkanäle menschlicher Nervenfasern (Scholz *et al.*, 1993) hat viele Gemeinsamkeiten zu den hier dargestellten Ionenkanälen des Froschnerven gezeigt, so daß von einer engen Verwandtschaft zwischen den Kanaltypen ausgegangen werden muß.

1. Einleitung und Fragestellung

Kanaltyp:	Leitfähigkeit (pS)		Blocker:	Funktion:
	in Ringer	High K ⁺		
Na	11		TTX / LA	Membrandepolarisation, Aktionspotential: Aufstiegsphase
K _i	8	23	TEA ⁺ / 4-AP / DTX / MCDP / Cs ⁺	Repolarisation
K _f		30	TEA ⁺ / 4-AP	Repolarisation
K _s		7	TEA ⁺	Repolarisation
K _{ATP}		44	TEA ⁺ / ATP / Glib	Verbindung zw. Stoffwechsel und Erregbarkeit (Hypoxie)
K _{Ca}	75	132	TEA ⁺	Repolarisation
K _{Na}	34	90	Ba ²⁺ / Cs ⁺ / (TEA ⁺)	Posttetanische Hyperpolarisation; nodales Ruhepotential
K _{Fli}	19	49	LA / Cs ⁺ / Ba ²⁺ / Zn ²⁺	Ruhepotential an dünnen Fasern
Cl	28		Zn ²⁺ / ATP / Mg ²⁺	Stabilisierung des Ruhepotentials

Tabelle 2: Ionenkanäle des peripheren Froschnerven

modifiziert nach Vogel und Schwarz, 1995; Kanaltypen: Na: Natriumkanal; K_i, K_f, K_s: Kaliumkanäle verzögerter Geichrichtung (*delayed-rectifier*) mit mittlerer (*intermediate*), schneller (*fast*) und langsamer (*slow*) Deaktivierungskinetik; K_{ATP}: ATP-sensitiver Kaliumkanal; K_{Ca}: calciumaktivierbarer Kaliumkanal; K_{Na}: natriumabhängiger Kaliumkanal; K_{Fli}: Flickerkaliumkanal; Cl: Chloridkanal
Abkürzungen: 4-AP: 4-Aminopyridin; ATP: Adenosintriphosphat; DTX: Dendrotoxin; Glib: Glibenclamid; LA: Lokalanästhetika; MCDP: Mastzelldegranulierendes Peptid; TEA: Tetraethylammonium; TTX: Tetrodotoxin; High K⁺: hohe Kaliumaußenlösung

1.7 Der Natriumkanal

Natriumkanäle sind aufgrund ihrer entscheidenden Bedeutung für das Aktionspotential genauestens untersucht. Es gibt detaillierte Vorstellungen über das spannungsabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten, die Wirkung einer großen Anzahl von Pharmaka auf den Natriumkanal und verschiedene Reaktionsmodelle für das Öffnungs- und Schließungsverhalten.

1. Einleitung und Fragestellung

Für einige pharmakologische Wirkprinzipien spielt der Natriumkanal eine herausragende Rolle. Nicht nur für Lokalanästhetika bildet er den Hauptangriffspunkt, sondern auch Antiepileptika, Klasse I Antiarrhythmika und hirnpotektive Substanzen vermitteln ihre pharmakologischen Effekte durch Natriumkanäle.

Der Mechanismus der Blockade von Natriumkanälen durch Lokalanästhetika ist bekannt. Nach heutiger Erkenntnis geht das Lokalanästhetikumolekül in der Pore des Kanals eine Bindung ein und führt so zur Blockade des Natriumstromes (Butterworth und Strichartz, 1990). Lokalanästhetika blockieren konzentrationsabhängig und reversibel den Natriumkanal und somit die durch ihn fließenden Ionen (tonische Blockade). Durch wiederholtes Auslösen des Natriumstromes kann ein durch Lokalanästhetika hervorgerufener partieller Natriumstromblock reversibel verstärkt werden. Die Verstärkung ist abhängig von Reizfrequenz, Reizdauer, Membranpotential und Art des Lokalanästhetikums und wird als phasische Blockade (*use-dependent* Block) bezeichnet (Butterworth und Strichartz, 1990).

Durch molekularbiologische Untersuchungen (Marban *et al.*, 1998) ist der genaue Aufbau des Kanals entschlüsselt. Er besteht aus einer α - und zwei β -Untereinheiten, wobei die α -Untereinheit bereits ein funktionelles Kanalprotein bildet. Die β -Untereinheit ist in zwei intrazellulär gelegene Polypeptide (β_1 und β_2) gegliedert, die für die schnelle Kinetik des Kanals verantwortlich sind. Durch Punktmutationen und Sequenzanalysen konnten sogar diejenige Aminosäureabfolgen der α -Untereinheit, die als Bindungsstelle für Lokalanästhetika fungiert, identifiziert werden (Ragsdale *et al.*, 1994). Abbildung 8 zeigt die Sekundärstruktur der α -Untereinheit mit den funktionellen Aminosäuren, die den Kanal inaktivieren.

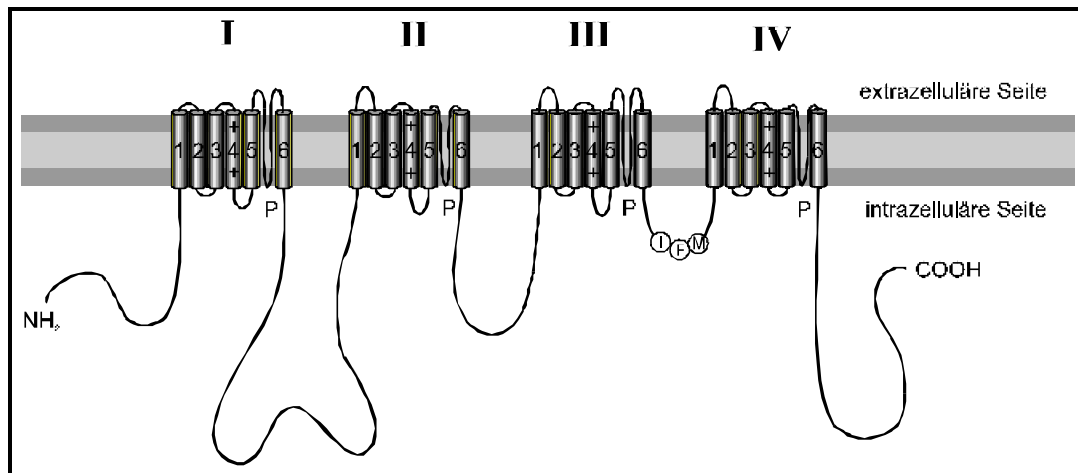


Abbildung 8: Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals (nach Catterall, 1988).

Der Ionenkanal besteht aus vier ähnlichen Motiven (Repeats I-IV), die ihrerseits aus sechs α -Helices aufgebaut sind. Diese sind membrandurchspannend und enthalten die Segmente 1-6. Die intrazellulär gelegene Schleife zwischen den Motiven III und IV enthält die Aminosäuresequenz Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM), die sich nach der Aktivierung des Kanals in die geöffnete Pore legt und zum Verschluss des Kanals führt (Eholtz *et al.*, 1994). Auf dem P-Segment des Motivs I wird der Rezeptor für Tetrodotoxin vermutet. Der Rezeptor für Lokalanästhetika liegt sehr wahrscheinlich auf dem S6-Segment des Motivs IV (Ragsdale *et al.*, 1994).

Die Natriumkanäle des peripheren Nervensystems werden am Endoplasmatischen Retikulum des Zellkörpers (Soma) gebildet und durch axonalen Transport an die Stellen befördert, an denen sie in die Membran eingebaut werden. In der Zellmembran des Somas, das bei sensorischen Fasern in den Spinalganglien liegt, befinden sich Natriumkanäle, die relativ leicht einer Untersuchung zugänglich sind. Bei Untersuchung dieser von Yoshida und Matsuda (Yoshida und Matsuda, 1979) zeigte sich, daß Aktionspotentiale sich bei der Registrierung an kleinen Spinalganglienzellen der Maus durch Tetrodotoxin (TTX, Abbildung 9) nicht blockieren lassen. Diese Aktionspotentiale sind auf einen Natriumkanal zurückzuführen, der gegenüber Tetrodotoxin resistent ist.

1.8 Der TTX-resistente Natriumkanal

Seit der oben beschriebenen ersten Untersuchung TTX-resistenter Aktionspotentiale durch Yoshida und Matsuda im Jahr 1979 sind TTX-resistente Natriumströme von verschiedenen Arbeitsgruppen mit den unterschiedlichsten Techniken untersucht worden. Genutzt worden sind die Mikroelektrodenteknik, die intrazelluläre Perfusionstechnik (Kostyuk *et al.*, 1981)

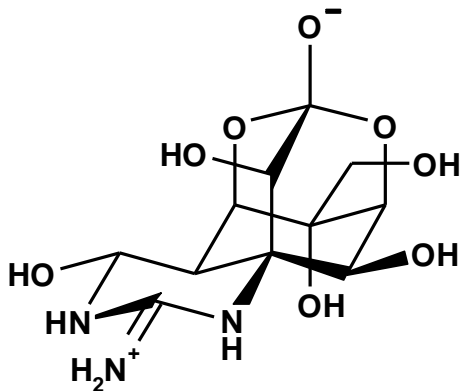


Abbildung 9: Chemische Struktur von Tetrodotoxin (TTX), einem Toxin, das aus der Leber und den Ovarien des japanischen Kugelfisches gewonnen wird. Seine hochspezifische, Natriumkanalblockierende Eigenschaft wurde 1964 von Narahashi und Mitarbeitern beschrieben (Narahashi *et al.*, 1964). Das Wirkprinzip beruht auf einer hochaffinen polaren Bindung der positiv geladenen Guanidiniumgruppe des TTX-Moleküls mit der negativ geladenen und in der Porenregion gelegenen Aminosäure Glutaminsäure des Natriumkanals. Die Pore wird durch das TTX-Molekül auf diese Weise verschlossen.

und die *Patch-clamp* Technik (Caffrey *et al.*, 1992; Elliott und Elliott, 1993; Ogata und Tatebayashi, 1993; Roy und Narahashi, 1992; Schwartz *et al.*, 1990; Yoshimura *et al.*, 1996).

Diese Untersuchungen zeigten, daß TTX-resistente und TTX-sensitive Natriumströme ein unterschiedliches Verhalten haben. TTX-resistente Natriumströme besitzen eine deutlich höhere Aktivierungsschwelle, die Potentialabhängigkeit sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung ist um 20 - 30 mV in depolarisierender Richtung verschoben und auch die Kinetik der Aktivierung und der Inaktivierung ist deutlich langsamer als bei den schnellen TTX-sensitiven Natriumströmen (Elliott und Elliott, 1993). Andere Experimente auf Einzelkanalebene zeigten stets eine geringere Einzelkanalleitfähigkeit als bei TTX-sensitiven Strömen (Bräu *et al.*, 1995; Motomura *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1994).

Des weiteren ist durch molekularbiologische Untersuchungen die gesamte Aminosäuresequenz des Kanals aufgeklärt worden. Die Gruppe um Wood klonierte ein α -SNS Kanalprotein aus 1957 Aminosäuren. Es ist in den Spinalganglienzellen von neugeborenen und erwachsenen Ratten gefunden worden und weist eine 65 prozentige Übereinstimmung mit dem Herzmuskel-Natriumkanal der Ratte auf (Akopian *et al.*, 1996). Dieser Kanal hat einige Sequenzen, denen eine funktionelle Einheit zugeordnet werden kann. So enthält er eine intrazelluläre Schleife zwischen den Domänen III und IV mit der Aminosäuresequenz Isoleucin-Phenylalanin-Methionin (IFM), die den entscheidenden Bereich für die schnelle Inaktivierung des Kanals darstellt (siehe Abbildung 8). Die Gruppe um Hunter aus den USA klonierte das Kanalprotein PN3, das eine Aminosäure kürzer ist als das α -SNS Protein. Es kommt ebenfalls an kleinen Spinalganglienzellen der Ratte vor (Sangameswaran *et al.*, 1996). Als jüngste Ergebnisse präsentierte diese Gruppe eine Klonierung des menschlichen TTX-resistenten Natriumkanals (Akopian *et al.*, 1999). Durch diese Untersuchungen ist die Existenz des Kanals im peripheren Nervensystem bewiesen und durch klinischen Bezug gewinnt die Forschung an diesem Kanal an Bedeutung.

1. Einleitung und Fragestellung

Wie oben bereits erwähnt, ist der TTX-resistente Natriumkanal seit ca. 20 Jahren bekannt und seine elektrophysiologischen Eigenschaften sind genauestens untersucht. Seine Funktion im peripheren sensorischen Nervensystem war bisher nicht genau bekannt. Es verdichten sich jedoch die Hinweise darauf, daß der TTX-resistente Natriumkanal bei der Generierung von Impulsen im peripheren Nerven unter physiologischen (Brock *et al.*, 1998) und pathophysiologischen Bedingungen (Novakovic *et al.*, 1998) eine Schlüsselrolle einnimmt, da er bei depolarisiertem Membranpotential noch aktiv ist, TTX-sensitive Natriumkanäle aber nahezu komplett inaktiviert sind und so nicht mehr zur Impulststehung beitragen können:

- TTX-resistente Natriumströme kommen an kleinen Spinalganglienzellen vor.

Kleine *dorsal-root-ganglion*-Zellen (DRG) haben eine Verbindung zu A δ - und C-Fasern (Harper und Lawson, 1985) und besitzen die Fähigkeit, langsame, gegenüber TTX resistente Aktionspotentiale auszubilden (Villiere und McLachlan, 1996; Yoshida und Matsuda, 1979). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß TTX-resistente Natriumkanäle häufiger an Capsaicin-sensitiven als an Capsaicin-insensitiven Zellen vorkommen (Arbuckle und Docherty, 1995). Capsaicin ist dabei als Stimulator von selektiv polymodalen Nozizeptoren bekannt. Diese Versuche lassen die Vermutung zu, daß TTX-resistente Natriumströme eine Bedeutung speziell für nozizeptive Fasern haben. Weitere molekularbiologische Untersuchungen an klonierten Kanälen (Akopian *et al.*, 1996; Sangameswaran *et al.*, 1996) haben ergeben, daß nur kleine Spinalganglienzellen den untersuchten TTX-resistenten Natriumkanal besitzen.

- TTX-resistente Natriumströme haben eine langsame Kinetik.

In einigen Experimenten sind die elektrophysiologischen Unterschiede zwischen TTX-resistenten und -sensitiven Natriumkanälen an kleinen Spinalganglienzellen erwachsener Ratten beschrieben worden (Elliott und Elliott, 1993; Ogata und Tatebayashi, 1993). Diese Untersuchungen ergaben vor allem eine deutlich langsamere Aktivierung und Inaktivierung der TTX-resistenten Natriumströme. Ein Vergleich zwischen den Eigenschaften der einzelnen Nervenfasern hat gezeigt, daß der Kanal für dicke myelinisierte Nerven (Leitgeschwindigkeit: 15 - 120 m/s) eine zu langsame Kinetik besitzt. Sie ist für Aktionspotentiale in den langsameren C-Fasern (Leitgeschwindigkeit: 0,3 - 2 m/s) völlig ausreichend.

- Die Summenaktionspotentiale in C-Fasern enthalten TTX-resistente Komponenten.

In Untersuchungen an Frosch- (Kobayashi *et al.*, 1993; Buchanan *et al.*, 1996), Kaninchen-, Ratten- (Gaumann *et al.*, 1992) und humanen Nerven wurden Summenaktionspotentiale

1. Einleitung und Fragestellung

gemessen, die gegenüber TTX eine Resistenz zeigten. Durch Messung der Nervenleitgeschwindigkeit konnten sie langsam leitenden C-Fasern zugeordnet werden.

- Die elektrische Aktivität kleiner afferenter Fasern ist gegenüber TTX resistent.

Eine Arbeit von Jęftinija (Jęftinija, 1994b) belegt, daß die elektrische Aktivität kleiner afferenter Fasern gegenüber TTX resistent ist. Außerdem werden diese Fasern durch das in der Schmerzkaskade wichtige Oligopeptid Bradykinin aktiviert (Jęftinija, 1994a).

- Nozizeptor sensibilisierende Substanzen aktivieren TTX-resistente Natriumkanäle.

1996 wurde nachgewiesen, daß Prostaglandin E₂ (PGE₂) die Erregbarkeit kleiner Spinalganglienzellen steigern kann (England *et al.*, 1996). Besonders interessant wird diese Tatsache mit dem Wissen, daß PGE₂ als Schmerzmediator bekannt ist, der die Empfindlichkeit von Nozizeptoren heraufsetzen kann. Von der Arbeitsgruppe um Gold sind die Substanzen Adenosin und Serotonin getestet worden, die Nozizeptoren ebenfalls sensibilisieren (Gold *et al.*, 1996). Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht für das Zyklooxygenaseprodukt Thromboxan E₂ ermitteln.

An pathologisch veränderten Nervenfasern, deren Ruhemembranpotential durch die Schädigung weiter depolarisiert ist, kann der TTX-resistente Natriumkanal zur Impulsenstehung beitragen. Der Grund liegt in seinem im Gegensatz zu den TTX-sensitiven Natriumkanälen deutlich höher liegenden Aktivierungs- und Inaktivierungspotential. Durch die schnellere Erholung nach der Inaktivierung läßt sich dieser Effekt noch verstärken (Elliott und Elliott, 1993). Eine Computersimulation verdeutlicht, daß die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals unter depolarisierten Bedingungen geeignet sind, eine spontane elektrische Depolarisation hervorzurufen und ein Aktionspotential zu bilden (Elliott, 1997). Somit ist eine neuropathische Schmerzentstehung erklärbar.

1.9 Fragestellung

Die Forschung über den TTX-resistenten Natriumkanal hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Eine Ursache dafür ist sicherlich, daß der Kanal eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Weiterleitung von Schmerzen einnimmt.

In der modernen Pharmakotherapie wird versucht, dem Patienten den Schmerz über systemisch applizierte Natriumkanalblocker zu nehmen. Der Wirkmechanismus dieser

1. Einleitung und Fragestellung

empirisch gewählten Therapie ist jedoch unverständlich. Pathophysiologisch scheinen die TTX-resistenten Natriumkanäle ektope Zentren an nozizeptiven Fasern zu bilden, die zu den beschriebenen Schmerzsyndromen führen. Ziel dieser Arbeit ist es nun, die direkte Wirkung von klinisch benutzten Schmerztherapeutika auf den TTX-resistenten Natriumkanal von DRG-Zellen zu untersuchen. Besonderes Interesse gilt dabei der Veränderung des Membranpotentials.

Ausschnitte dieser Arbeit sind auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesie und Intensivmedizin in Würzburg (Bräu *et al.*, 1998b), auf dem 10. Europäischen Anästhesiekongreß in Frankfurt (Dreimann *et al.*, 1998) und auf dem Deutschen Anästhesie Kongreß 2000 in München (Bräu *et al.*, 2000) vorgestellt worden. Außerdem sind der Artikel (Bräu *et al.*, 2001) und das Abstract (Bräu *et al.*, 1998a) aus dieser Arbeit hervorgegangen.

2. Material und Methoden

2.1 Die *Patch-clamp* Technik

Die Experimente dieser Arbeit sind mit Hilfe der *Patch-clamp* Technik durchgeführt worden, deren Prinzip ein enger Kontakt zwischen einer Glaspipette und einer Zelle ist. Dafür wird eine sich verjüngende Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von etwa $1\mu\text{m}$ unter mikroskopischer Sicht an eine Zellmembran herangefahren. Durch Unterdruck in der Pipette wird eine Zelle angesaugt. Man erreicht einen mechanisch und elektrisch stabilen Zustand, der sich unter optimalen Bedingungen in einem Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm (*gigaseal*) widerspiegelt.

Zwei Vorteile sind durch diese Technik im Gegensatz zur konventionellen Mikroelektrodenteknik zu verzeichnen. Der Verletzungsstrom der Zelle wird vernachlässigbar klein, das heißt der Strom fließt nicht durch ein Stromleck, sondern durch die zu untersuchende Zellmembran. Zum anderen wird das elektrische Rauschen (*Johnson noise*), welches umgekehrt proportional zum Abdichtwiderstand ist, so klein, daß Ströme durch einzelne Ionenkanäle meßbar werden.

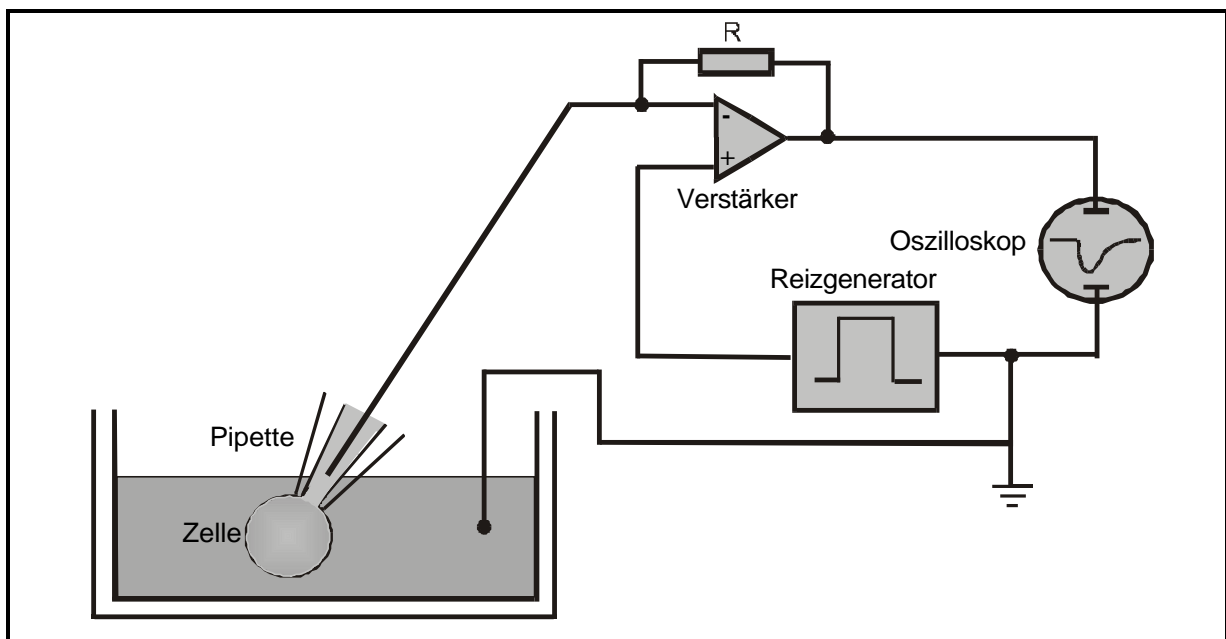


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer *Patch-clamp* Anordnung in *whole-cell* Konfiguration. Erläuterungen siehe Text.

Zur Messung der fließenden Ladungen benötigt man einen elektrischen Verstärker, der das Potential des unter einer Pipette liegenden Membranfleckes (*patch*) mißt und mit einem zuvor gewählten Sollwert ständig vergleicht. Durch entsprechende Stromzufuhr kompensiert er die Differenz zwischen Ist- und Sollwert, so daß das Potential an der Membran konstant gehalten

2. Material und Methoden

wird. Dieses Prinzip wird als Spannungsklemme (*voltage-clamp*) (Hodgkin und Huxley, 1952a) bezeichnet. Dabei entspricht die benötigte Stromzufuhr der Änderung der Leitfähigkeit des Membranflecks und ist Ausdruck von Öffnungen und Schließungen der hier befindlichen Ionenkanäle. Die Klemmströme spiegeln also die durch die Membran fließenden Ionenströme bei vorgegebenem Potential wider.

Durch geeignete Ausstattung ermöglicht der Verstärker eine Kompensation der kapazitiven Ströme und Leckströme der Zellen während des Experimentes und einen Ausgleich der Serienwiderstände um 80-90 %.

Je nach Fragestellung können mit der *Patch-clamp* Methode unterschiedliche Konfigurationen erstellt werden: Man kann intakte Zellen (*cell-attached* und *whole-cell*) sowie Membranabschnitte, sogenannte *cell-free Patches*, untersuchen.

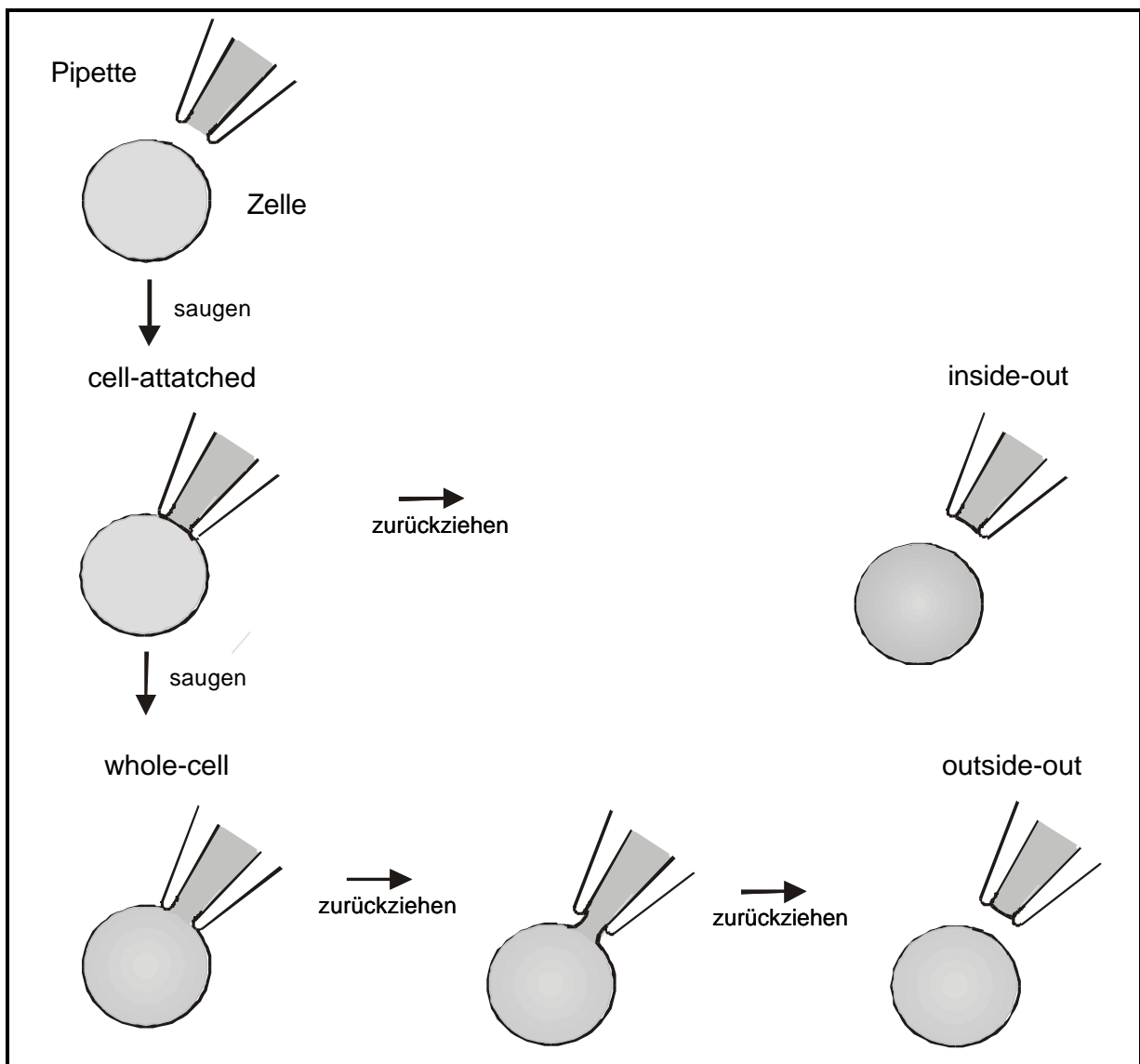


Abbildung 11: Schematische Darstellung verschiedener *Patch* Konfigurationen

2. Material und Methoden

Die *cell-attached* Methode isoliert den unter der Pipette liegenden Membranabschnitt. Durch saugen entfernt man die Membran unter der Pipette und erhält Zugang zum gesamten Zellinnenraum (*whole-cell*). Bei den *cell-free* Patches wird versucht, den umschriebenen Membranfleck, der unter der Pipette liegt, von dem Rest der Zelle abzulösen. Hier ergeben sich die Möglichkeiten der *inside-out* und der *outside-out* Konfiguration. Der *inside-out* Patch entsteht durch rasches Zurückziehen der Patchpipette nach einem dichten Zellkontakt. Das Herauslösen des Membranabschnittes führt dazu, daß die ehemalige Zellinnenseite nun der Badseite zugewandt ist. Beim langsamen Zurückziehen der Pipette bildet sich ein Steg zwischen Pipette und zurückbleibender Zelle. Dieser reißt ab, die Lipiddoppelmembran verschließt sich und die physiologische Außenseite bleibt der Badlösung zugewandt (*outside-out*) (Hamill *et al.*, 1981) .

2.2 Die Präparation

Die untersuchten Spinalganglienzellen stammen ausschließlich von Wistar-Ratten aus eigener Zucht. Sie haben ein Alter von 4-6 Wochen und ein Gewicht zwischen 200 g und 350 g. Sie werden durch Komotion und cervikale Dislokation in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Tierschutzgesetzes getötet, danach werden die Bauch- und Thoraxeingeweide von ventral entnommen. Die Wirbelsäule wird dargestellt, *in toto* herauspräpariert und von lateral eröffnet, indem man mit einer Schere den Rückenmarkskanal in eine obere und untere Hälfte trennt. Das Rückenmark kann unter stereoskopischer Sicht betrachtet werden und durch leichten Zug auf die Hinterwurzeln lösen sich die Ganglien aus ihrem Bindegewebsbett heraus. In einem nächsten Arbeitsschritt werden sie in einer Petrischale von weiteren Bindegewebs- und Nervenanteilen befreit. Nach der Präparation von 20-30 Ganglien werden sie in eine Tyrodelösung gelegt (siehe Kapitel 2.3 Lösungen), nochmals unter mikroskopischer Sicht gereinigt, um dann enzymatisch aufbereitet zu werden.

Hier werden sie in einer Ca^{2+} und Mg^{2+} freien Tyrodelösung mit 3 mg/ml Collagenase (Worthington Typ CLS-II, 280 U/l, Biochrom, Berlin) und 1 mg/ml Trypsin Typ-III-S (Sigma, Deisenhofen) bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Dieser Vorgang wird durch einen sich in der Horizontalebene bewegenden Schüttler unterstützt. Nach dreimaligem Waschen mit einer Ca^{2+} und Mg^{2+} freien Tyrodelösung werden die Zellen für 5 Minuten in Nährmedium mit Desoxyribonuclease II (80 µg/ml, Fluka, Buchs, Schweiz) und Trypsin-Inhibitor Typ II-S (100 µg/ml, Sigma) behandelt. Durch eine mechanischen Dissotiation mit

2. Material und Methoden

vier im Durchmesser abnehmenden Glaspipetten lösen sich die Zellen aus dem Verband und bilden eine Zellsuspension. Diese Flüssigkeit wird auf handelsübliche Plastikpetrischalen (TC 35,0/10 mm, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen) verteilt und unter Carbogen-Begasung (95% O₂, 5% CO₂) für bis zu 48 Stunden bei 24 °C aufbewahrt. Signifikante Änderungen des Natriumstromes, zum Beispiel Amplitude oder Zeitpunkt des Spitzenstromes wurden bei Experimenten innerhalb dieses Zeitraumes nicht beobachtet.

Für einen Versuch wird eine Petrischale mit der benötigten Tyrodelösung 4-5 mal ausgespült, um saubere Experimentierbedingungen zu schaffen. Die Petrischale wird unter kleinster Vergrößerung mit dem Mikroskop durchmustert, und die Zellen werden nach festgelegten Kriterien wie Größe, Gleichmäßigkeit des Cytoplasmas, Reinheit der Membran von Bindegewebe und Form des Zellkerns ausgewählt, um dann einen *Patch* herzustellen.

2.3 Lösungen

Sofern nicht anders erwähnt, sind die Substanzen von der Firma Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen. Für die Lösung der Substanzen wird *aqua bidestillata* verwendet, welches im Physiologischen Institut hergestellt wird. Die Lösungen werden monatlich erneuert und bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. Vor Experimentierbeginn werden sie gefiltert (Filtersystem: 0,2 µm Filter, Renner, Darmstadt), der pH-Wert wird kontrolliert und bei einer Abweichung vom pH-Wert wird eine neue Lösung erstellt. Die Experimente werden bei einer Temperatur von 24 ± 2 °C durchgeführt.

Um TTX-resistente Natriumströme zu untersuchen, werden modifizierte Extra- und Intrazellulärlösungen verwendet. Zur externen Tyrode-Lösung werden zur Blockierung TTX-sensitiver Natriumströme 100 nmol/l Tetrodotoxin (TTX) zugesetzt, die spannungsabhängigen Kaliumströme werden durch 10 mmol/l Tetraethylammoniumchlorid (TEA) blockiert (Hille, 1967). Um für die *whole-cell* Konfiguration ideale Bedingungen zu schaffen und den Strom zu verringern, wird die Natriumkonzentration auf 35 mmol/l gesenkt. Dabei wird die Osmolarität durch entsprechende Zugabe von Cholinchlorid ausgeglichen.

Unter der Abkürzung „Tris-Puffer“ wird Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris)-Base verstanden, die als Puffersubstanz eingesetzt wird. Bei der verwendeten Substanz EGTA handelt es sich um (Ethylenglycol-Bis[β-Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat), bei HEPES um (4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazin-ethansulfonsäure). Der pH-Wert ist bei allen

2. Material und Methoden

Außenlösungen mit Tris-Puffer auf 7,4 eingestellt, für die Innenlösungen wird ein pH von 7,2 verwendet.

2.3.1 Außenlösungen

externe Tyrode mit TEA und TTX:

110 mmol/l Cholinchlorid, 35 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 6 mmol/l Glucose, 10 mmol/l HEPES, 10 mol/l TEA, 100 nmol/l TTX

externe Tyrode:

145 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 6 mmol/l Glucose, 10 mmol/l HEPES

Ca²⁺- und Mg²⁺- freie externe Tyrode:

145 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 6 mmol/l Glucose, 10 mmol/l HEPES

2.3.2 Innenlösung

interne CsF-Lösung:

10 mmol/l NaCl, 140 mmol/l CsF, 3 mmol/l EGTA, 10 mmol/l HEPES

2.3.3 Präparationslösungen

Nährmedium

Das Nährmedium ist eine Mischung aus folgenden Substanzen: 13,05 ml MEM (Minimum Essential Medium Eagle), 0,3 ml einer 200 mmol/l L-Glutamin-Lösung, 0,15 ml einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (3000 IE Penicillin, 3 mg Streptomycin) und 1,5 ml fötalem Kälberserum (FCS). Diese Lösung dient zur Aufbewahrung der Hinterwurzelganglienzellen in der Begasungskammer und auch zur Herstellung der Stammlösung für die Enzymlösung 2 (siehe unten).

Enzymlösung 1:

In 3 ml Ca²⁺ und Mg²⁺-freier Tyrode-Lösung werden 9 mg Collagenase (Worthington Typ CLS-II, 280 U/l, Biochrom, Berlin) und 3 mg Trypsin Typ-III-S (Sigma, Deisenhofen) gelöst.

Enzymlösung 2:

In 2 ml Nährmedium werden 0,2 ml Stammlösung der DNase II und 0,1 ml Stammlösung des Trypsin-Inhibitors gelöst.

Stammlösung DNase II:

13 mg DNase II wird in 16,25 ml Nährmedium gelöst.

Stammlösung Trypsin-Inhibitor:

2. Material und Methoden

25 mg Trypsin-Inhibitor wird in 12,5 ml Nährmedium gelöst.

2.3.4 Toxine und kanalmodifizierende Substanzen

Tetrodotoxin (TTX) ist ein Alkaloid aus der Leber und den Ovarien des sehr giftigen Kugelfisches aus der Familie der Tetraodontidae. Es handelt sich um ein sehr potentes Gift, wobei 1 mg in der Lage ist, mehr als 7000 Mäuse zu töten. Bei einer Konzentration von 100 nmol/l führt seine Anwendung zu einem selektiven und reversiblen Block von TTX-sensitiven Natriumkanälen (Narahashi *et al.*, 1964). Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Wirkung jedoch nur von der Membranaußenseite erreicht wird (Koppenhöfer und Vogel, 1969), so daß es der externen Lösung zugefügt worden ist. Außerdem werden durch TTX weder Potentialabhängigkeit noch Kinetik der Natriumkanäle beeinflusst (Hille, 1968; Schwarz *et al.*, 1973) und die Blockade ist unabhängig vom jeweiligen Membranpotential.

Das quaternäre Ammoniummolekül Tetraethylammonium (TEA) gilt in der Literatur als der klassische Blocker potentialabhängiger Kaliumströme. Hierbei wirkt es sowohl von der Innen- als auch von der Außenseite. Beschrieben ist dies erstmals von Tasaki und Hagiwara (Tasaki und Hagiwara, 1957) für Versuche am Tintenschneckenriesenaxon. Weitere *voltage-clamp* Experimente am peripheren Froschnerven konnten das Blockierungsverhalten von TEA genauer charakterisieren (Hille, 1967; Koppenhöfer und Vogel, 1969).

Neben dem oben erwähnten TEA ist das Cäsium-Ion (Cs^+) ebenfalls ein Blocker von spannungsabhängigen Kaliumströmen (Koh *et al.*, 1992; Quayle *et al.*, 1988). Dieser Effekt wird von der Innenseite der Zellmembran erreicht, indem das Ion in die Kanalpore eindringt und diese verschließt (Hille und Schwarz, 1978). Dieses Phänomen wird von Hille und Schwarz als *multi-ion-block* beschrieben. Cäsium wird in dieser Versuchsanordnung verwendet, um TEA-insensitive Kaliumströme zu blockieren.

2.4 Der Lösungswechsel

Die Applikation der Testsubstanzen erfolgt mit einem nach Yellen modifizierten Lösungswechselsystem. Durch ein hydraulisches System werden handelsübliche 5 ml Spritzen in Glaskapillaren entleert, die für die Versuche in der Petrischale positioniert werden. Durch ein Dauerinfusionsgerät Perfusor 4 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wird eine konstante Strömung nach dem Hydraulikprinzip in dem Applikationssystem erzeugt, um die

2. Material und Methoden

Zellen mit einem Fluß von 1,5 ml/h zu umspülen, was einer Flußgeschwindigkeit von ca. 20 mm/min in den Röhren entspricht.

Nach einem erfolgreichen *whole-cell Patch* wird das Applikationssystem magnetisch am Objektisch fixiert. Dabei werden die Glaskapillaren vorsichtig in der Badlösung positioniert, um dann die Patchpipette mitsamt der zu untersuchenden Zelle zum Lösungssystem zu fahren. Die Pipette wird unter optischer Kontrolle wenige Millimeter in die Glaskapillare hineingefahren, um eine konstante Umspülung mit der Testsubstanz zu gewährleisten. Erst nach einer Umspülung der Zelle mit der Testlösung von mindestens einer Minute werden die Messungen begonnen. Sie werden von der Kontrollregistrierung ausgehend mit der niedrigsten Konzentration gestartet, um dann nach der höchsten Konzentration mit einer weiteren Kontrollmessung die Reversibilität der Wirkung zu kontrollieren.

2.5 Elektrophysiologische Technik und Geräte

2.5.1 Pipetten

Die Patchpipetten werden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm (CEE BEE 101-PS, Chr. Bardram, Svendborg, Dänemark) hergestellt und mit einem Horizontal-Puller (Brown-Flaming Micropipette Puller, Model P-97, Sutter Instrument Company, Science Products GmbH, Hofheim) direkt vor Experimentierbeginn gezogen. Dabei wird die vorher mit Methanol gereinigte Glaskapillare mit Hilfe eines für diese Bedingungen konzipierten Programmes in fünf Schritten durch eine Glühwendel getrennt, um eine sich verjüngende Glasspitze herzustellen.

Dafür wird die Glaskapillare an beiden Enden in eine Schraubvorrichtung eingespannt. Die Mitte des Glasrohres ist von einer Titanwendel umgeben, die mit definierten Stromstärken zum Glühen gebracht werden kann. Durch einen sanften Zug an den beiden eingespannten Enden in Kombination mit der Erhitzung verjüngt sich nun die Kapillare, bis sie schließlich in einer definierten Größe abreißt. Durch diesen variablen Vorgang kann man die Öffnungsgröße der sich bildenden Spitze bestimmen. Direkt vor dem Versuch werden die Pipetten an einem glühenden U-förmigen Platindraht angeschmolzen, um die Spitze nochmals zu verkleinern, Entrundungen zu entfernen und von eventuellen Verunreinigungen zu befreien.

Anschließend werden die Pipetten mit der internen Pipetten-Lösung von der Rückseite befüllt, und die verbleibenden Luftblasen werden durch vorsichtiges Schütteln aus der Spitze entfernt.

2. Material und Methoden

Bei den hier gezeigten Experimenten werden Pipetten mit einem Widerstand zwischen 0,7 und 1,2 M Ω verwendet.

2.5.2 Der Versuchsstand

Die mit Intrazellulärlösung gefüllte Glaspipette wird in einen Pipettenhalter eingeschraubt, der in der Mitte eine Silberdrahtelektrode hat. Hierdurch wird ein elektrischer Kontakt zwischen dem Eingang des Verstärkers und der Lösung beziehungsweise später der Zelle hergestellt. Der Pipettenhalter ist mit einem Mikromanipulator (Mikromanipulator DC 6 Märzhäuser, Wetzlar) verbunden, der in einem Winkel von etwa 45° zur Horizontalebene angeordnet ist. Dieser Mikromanipulator ermöglicht eine dreiachsige Bewegung, mit der man die Patchpipette unter mikroskopischer Sicht an die Zelle heranführen und genau positionieren kann.

Das Mikroskop des Versuchsstandes ist ein invertierendes Mikroskop (Modell IM, Zeiss, Oberkochen) mit wahlweise 63-, 160-, oder 400-facher Vergrößerung. Um Schwingungen weitestgehend auszuschalten, sind der Pipettenhalter und Tisch einerseits und das Mikroskop andererseits auf unterschiedliche Trägersysteme aufgebaut. Diese Konstruktion steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch (IsoStation Vibration Isolated Workstation, Newport, Irvine, CA, USA) mit Druckluft-Schwingungsdämpfern, um Erschütterungen durch die Umgebung fernzuhalten.

Die vorliegenden Untersuchungen werden mit dem *Patch-clamp* Verstärker Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) vorgenommen, der mit einem handelsüblichen Personal Computer (386DX-40MHz, MS-DOS 7.0) verbunden ist. Die Daten werden mit einem 12 bit-AD-Wandler (Labmaster TM-40 AD/DA board, Scientific Solutions, Solon, OH, USA) digitalisiert und zur weiteren Bearbeitung auf einer Festplatte gespeichert.

Die in dieser Arbeit angegebenen Spannungen beziehen sich auf die Innenseite der Membran gegenüber der Außenseite. Des Weiteren stellen bei dargestellten Originalregistrierungen nach unten gerichtete Ströme Einwärtsströme dar.

2.6 Datenerfassung und Auswertung

Zur Auswertung und Analyse der Experimente werden verschiedene Computerprogramme eingesetzt. Die während eines Experimentes gemessenen Ströme werden durch das Programm Clampex pClamp 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) auf der Festplatte eines

2. Material und Methoden

Personalcomputers aufgezeichnet. Mit diesem Programm können zusätzlich Impulsprogramme vorgegeben werden, die auf die jeweiligen Experimente angepaßt sind. Die weitere Auswertung wird mit dem Programm ClampFit vorgenommen (Axon Instruments, siehe oben), das die gewünschten Parameter aus den Versuchen errechnet. Für graphische Darstellung, Kurvenanpassung und statistische Berechnung werden die Programme Fig P 5.0 (Biosoft, Cambridge, England) und Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) verwendet, die Tabellenkalkulation wird mit dem Programm Microsoft Exel 7.0 durchgeführt.

Datenpunkte in Abbildungen sind Mittelwerte, Fehlerbalken entsprechen dabei dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des TTX-resistenten Natriumstromes

Spinalganglienzellen können aufgrund ihrer Eigenschaften in zwei Typen unterteilt werden. Pharmakologisch ist dafür das Gift des Kugelfisches (Tetrodotoxin, kurz TTX) hilfreich. Große DRG-Zellen ($\varnothing > 50 \mu\text{m}$) haben schnelle TTX-sensitive Ströme und bei kleinen und mittelgroßen Spinalganglienzellen ($\varnothing < 50 \mu\text{m}$) findet sich eine Mischung aus TTX-sensitiven und -resistenten Strömen. Durch Zugabe des Toxins werden die TTX-sensitiven Ströme blockiert und die TTX-resistenten Natriumströme isoliert. In dieser Arbeit werden TTX-resistente Natriumströme kleiner und mittelgroßer Neurone von Hinterwurzelganglienzellen erwachsener Ratten mit der *Patch-clamp* Technik untersucht.

Den pharmakologischen Untersuchungen des Stromes geht die Ermittlung der grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle voraus. Ist eine Zelle ausgewählt, wird ein *whole-cell Patch* hergestellt (vergleiche Kapitel 2.1) und man stellt im *voltage-clamp* Modus des Verstärkers ein Membranpotential von -90 mV ein. Mit Hilfe des Impulsprotokolls wird die Zelle einem 50 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls² nach -110 mV ausgesetzt, um die komplette Aufhebung der schnellen Inaktivierung zu gewährleisten. Danach werden Sprünge von 50 ms Dauer zu Potentialen von -80 mV bis 60 mV in 10 mV Schritten vorgenommen, um die Abhängigkeit des Stromes von der Membranspannung zu untersuchen. Die durch diese Reize ausgelösten Ströme sind für eine kleine DRG-Zelle exemplarisch dargestellt.

² Durch diesen Vorimpuls kann man außerdem den Anteil des Leckstromes überprüfen, der ein Kriterium für die Qualität des *Patches* ist. In allen Experimenten ist ein Impuls verwendet worden, der das Membranpotential hyperpolarisierte.

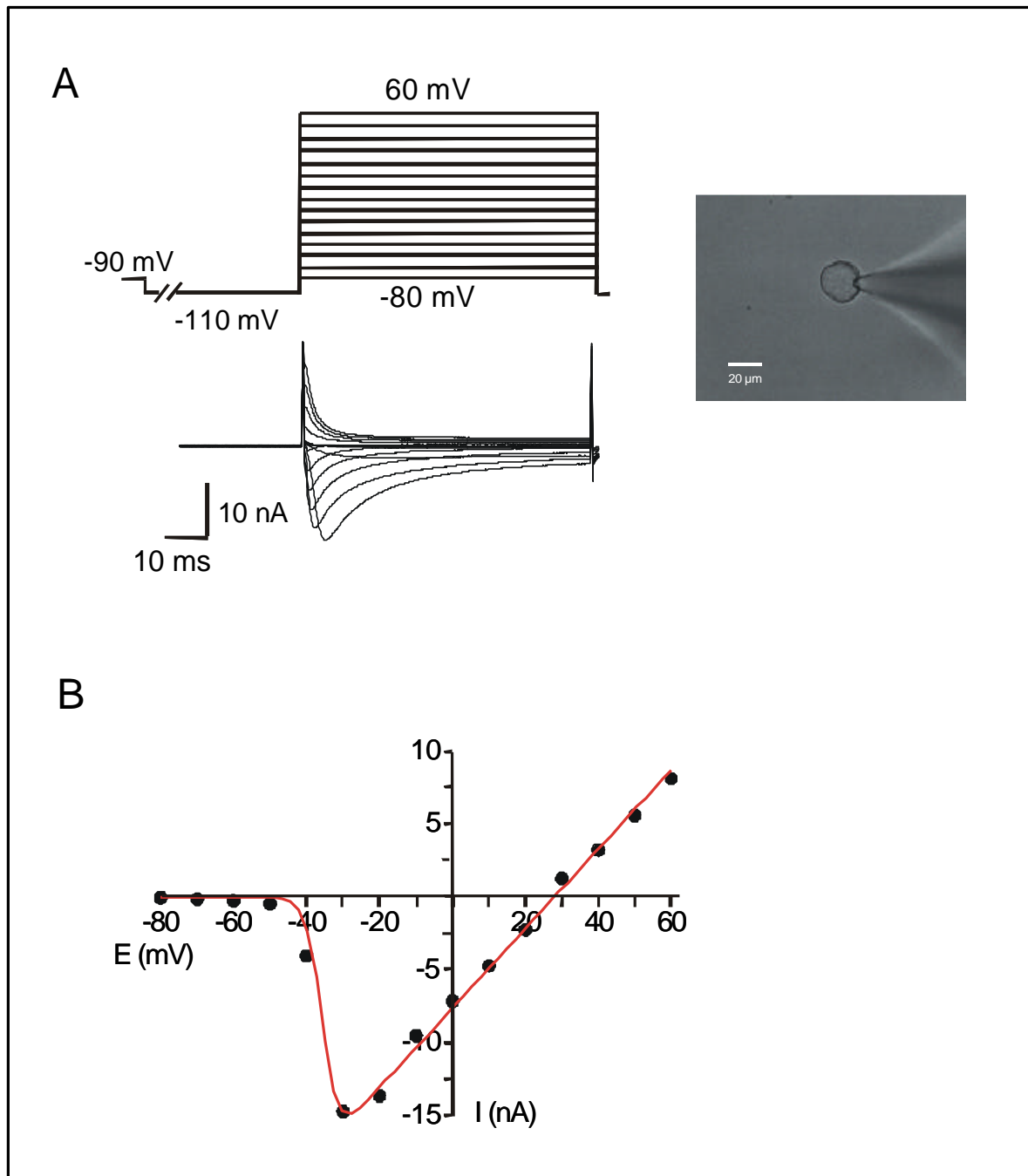


Abbildung 12: (A) Ionenströme einer kleinen DRG-Zelle in *whole-cell* Konfiguration (rechts Fotografie der Zelle mit einer Pipettenspitze). Durch Testimpulse zu verschiedenen Potentialen (Impulsprotokoll oberhalb der Originalregistrierung) werden in Abhängigkeit vom Potential TTX-resistente Natriumströme ausgelöst. (B) Strom-Spannungs-Kurve des TTX-resistenten Natriumstromes: Spitzenstrom der Registrierungen aufgetragen gegen das Testpotential (E). Badlösung: Tyrode mit TEA und TTX, Pipettenlösung: CsF, Haltepotential: -90 mV. Durch Anpassung der Gleichung 4 an die gewonnenen Datenpunkte erhält man die Strom-Spannungs-Kurve.

3. Ergebnisse

3.1.1 Spannungsabhängigkeit

Durch Auftragen des Spitzenwertes der Natriumströme (I_{Na}) gegen das Potential des Testimpulses (E) erhält man eine Strom-Spannungs-Kurve, aus der die Potentialabhängigkeit des Natriumstromes erkannt werden kann (siehe Abbildung 12).

Dabei wird der Natriumstrom (I_{Na}) in Abhängigkeit vom Potential (E) durch das Ohmsche Gesetz beschrieben.

Gleichung 2:
$$I_{Na}(E) = G_{Na} \times (E - E_{Na})$$

$I_{Na}(E)$ = Funktion, die die Abhängigkeit des gemessenen Stromes (I_{Na}) vom Membranpotential (E) beschreibt
 E_{Na} = Umkehrpotential (mV)

E_{Na} stellt das Gleichgewichtspotential und G_{Na} die Natriumleitfähigkeit dar. G_{Na} ist ebenfalls von E abhängig und kann mit der Boltzmann Funktion beschrieben werden.

Gleichung 3:
$$G_{Na}(E) = \frac{G_{Na, max}}{1 + e^{\frac{E_{50, a} - E}{k_a}}}$$

$G_{Na, max}$ = maximale Natriumleitfähigkeit (S)
 k_a = Steilheitsfaktor (mV)
 E = Membranpotential
 $E_{50, a}$ = halbmaximales Aktivierungspotential (mV)

Setzt man Gleichung 3 in Gleichung 2 ein, so erhält man Gleichung 4.

Gleichung 4:
$$I_{Na}(E) = \frac{G_{Na, max}}{1 + e^{\frac{(E_{50, a} - E)}{k_a}}} \times (E - E_{Na})$$

Durch nicht-lineare Kurvenanpassung an die Datenpunkte der Strom-Spannungs-Kurve werden die Parameter ermittelt. Durch Mittelwertbildung der so gewonnenen Parameter aus allen Experimenten erhält man ein halbmaximales Aktivierungspotential ($E_{h,a}$) von -25 ± 1 mV ($n = 128$). Das Umkehrpotential des TTX-resistenten Natriumstromes (E_{Na}) liegt bei 27 ± 1 mV ($n = 128$). Die Zahlenangaben sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

3.1.2 Inaktivierung

Die Potentialabhängigkeit der schnellen Inaktivierung wird anhand von Inaktivierungskurven ermittelt. Hier wird bei einem eingestellten Haltepotential von -90 mV ein 50 ms dauernder

3. Ergebnisse

Impuls zu Potentialen von -130 mV bis 10 mV in 10 mV Schritten gegeben. Mit einem 10 ms dauernden Testimpuls nach -10 mV wird dann der zu untersuchende Natriumstrom ausgelöst.

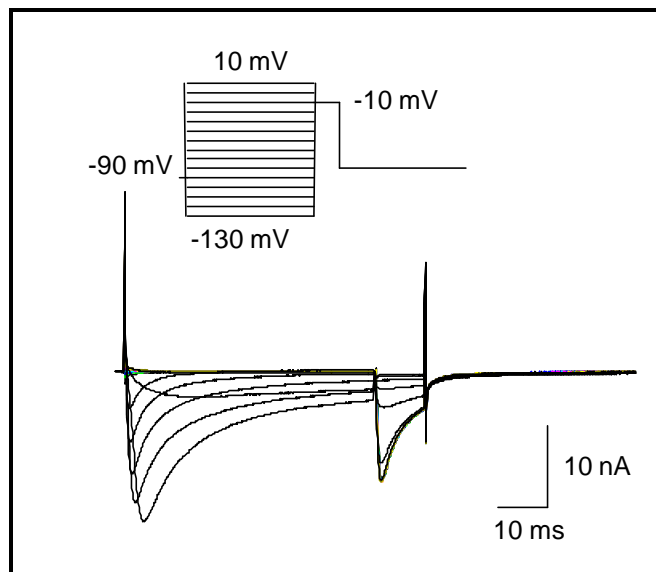


Abbildung 13: Originalregistrierungen zur Gewinnung einer Inaktivierungskurve. Im oberen Teil der Grafik ist das Impulsmuster dargestellt. Ausgewertet wird die maximale Stromamplitude im mittleren Bereich, die dem Natriumstrom entspricht, bei dem die schnelle Inaktivierung durch den Vorimpuls beeinflusst ist. Extrazellulärlösung: Tyrode mit 35 mmol/l Na⁺, Intrazellulärlösung: CsF, Haltepotential: -90 mV.

Bei der Auswertung wird der gemessene Spitzenstrom (I_{Na}) gegen das Potential des Vorimpulses aufgetragen und dann durch Anpassung an Gleichung 5 das halbmaximale Inaktivierungspotential ($E_{50,i}$) bestimmt.

Gleichung 5
$$I_{Na}(E) = \frac{I_{Na, \max}}{1 + e^{\frac{E - E_{50}}{k_i}}}$$

I_{Na} = Natriumspitzenstrom (nA)
 $E_{50,i}$ = halbmaximales Inaktivierungspotential (mV)
 k_i = Steilheitsfaktor (mV)

Bei diesem Potential ist die Hälfte aller Ionenkanäle in den Inaktivierungszustand übergegangen. Der Faktor k_i beschreibt in der Gleichung die Steigung, also die Stärke der Änderung der Inaktivierung in Abhängigkeit vom Potential.

Für das halbmaximale Inaktivierungspotential E_{50} hat sich ein Wert von -28 ± 1 mV, für die Steigung k_i ein Wert von $6,3 \pm 0,1$ mV ergeben ($n = 128$).

Bei allen im weiteren Verlauf dargestellten Versuchen wird bei einem Haltepotential von -90 mV, das annähernd dem physiologischen Ruhepotential entspricht (Safronov *et al.*, 1996), ein hyperpolarisierender Vorimpuls von 50 ms nach -110 mV gegeben, um dann mit einem depolarisierenden Impuls von ebenfalls 50 ms nach -10 mV zu springen. Dieser Impuls wird

3. Ergebnisse

jede halbe Sekunde von neuem wiederholt (2 Hz), wobei eine Anzahl von zehn Impulsen vorgegeben ist.

Bei einem Haltepotential (E) von -90 mV beträgt die Amplitude des TTX-resistenten Natriumstromes bei oben angegebenem Impulsmuster $6,4 \pm 3,3$ nA (27 Zellen). Die Depolarisation des Membranpotentials nach -70 und -60 mV bewirkt eine Abnahme des Stromes auf 89 % beziehungsweise 77 %.

3.1.3 TTX-Empfindlichkeit

Durch Zusatz von Tetrodotoxin zu der Extrazellulärlösung werden schnelle TTX-sensitive Ströme blockiert, während die langsamen TTX-resistenten Ströme unbeeinflusst bleiben. Erst durch extrem hohe Konzentrationen werden auch TTX-resistente Ströme blockiert. Die Abhängigkeit von der Konzentration ist anhand von Konzentrations-Inhibierungs-Kurven bestimmt worden. Dabei wird die Verminderung des Natrium-Spitzenstromes in verschiedenen Toxinkonzentration gegen den Spitzenstrom der Kontrolle in Beziehung gesetzt. Die ermittelten Blockierungswerte werden gegen die logarithmisch dargestellte Konzentration aufgetragen. Durch nicht-lineare Anpassung der Gleichung 6 an die Meßwerte wird die halbmaximale Blockierungskonzentration (IC_{50}) einer Substanz ermittelt.

Gleichung 6

$$fB(c) = \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{c}\right)^n}$$

IC_{50} = halbmaximale Blockierungskonzentration
 C = Konzentration
 n = Hill-Koeffizient

Der Exponent n dieser Gleichung entspricht dem Hill-Koeffizienten. Er gibt die Steilheit der Kurve an und ist ein Ausdruck dafür, wieviele Moleküle für die Blockade eines Kanals benötigt werden. Unter der Annahme, daß ein Molekül mit mindestens einem Kanal interagiert, wird ein Hill-Koeffizienten von $n = 1$ eingesetzt.

3. Ergebnisse

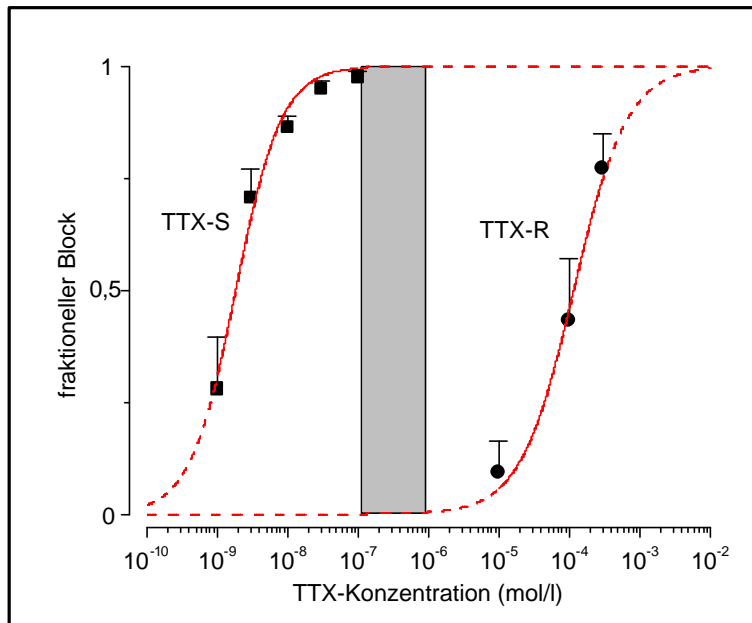


Abbildung 14: Konzentrations-Inhibitions-Kurven für Tetrodotoxin-sensitive und -resistente Ströme. Der TTX-sensitive Strom (v) wird durch deutlich geringere Konzentrationen blockiert als der TTX-resistente (λ). Durch eine nicht-lineare Anpassung der Parameter von Gleichung 6 an die Meßwerte erhält man IC_{50} -Werte von $1,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-9}$ mol/l ($n = 5$) für den TTX-sensitiven und $115 \pm 15 \cdot 10^{-6}$ mol/l ($n = 4$) für den TTX-resistenten Natriumstrom.

Abbildung 14 zeigt, daß die TTX-resistenten Ströme durch ausreichend hohe Konzentrationen im millimolaren Bereich durch Tetrodotoxin ebenfalls blockiert werden können. Diejenige Konzentration, die den TTX-resistenten Strom blockiert, ist jedoch 60.000-fach höher als die von TTX-sensitiven Strömen.

Die Grau unterlegte Fläche stellt den Bereich dar, in dem die Trennung von TTX-resistenten und -sensiblen Strömen am besten erfolgt. Dies ist in einem Bereich zwischen 100 nmol/l und 1000 nmol/l. Für diese Experimente werden 100 nmol/l gewählt, da hier die geringste Beeinflussung der TTX-resistenten Ströme besteht, auf der anderen Seite aber die TTX-sensiblen Ströme auch sicher blockiert werden. So wird sichergestellt, daß die Experimente an einer „reinen“ Subpopulation gemacht werden.

3.1.4 Größe der Zellen

DRG-Neurone haben einen Zelldurchmesser zwischen 10 und 60 μm . Für diese Untersuchung sind Zellen mit einem Durchmesser zwischen 20 bis 40 μm ausgewählt worden, da TTX-resistente Natriumströme überwiegend an kleinen und mittelgroßen Spinalganglienzellen vorkommen. Gezeigt werden kann das durch die Ergebnisse der elektrischen Membrankapazitätsmessung, die proportional zur Zelloberfläche ist und durch den Axopatch-Verstärker gemessen wurde.

3. Ergebnisse

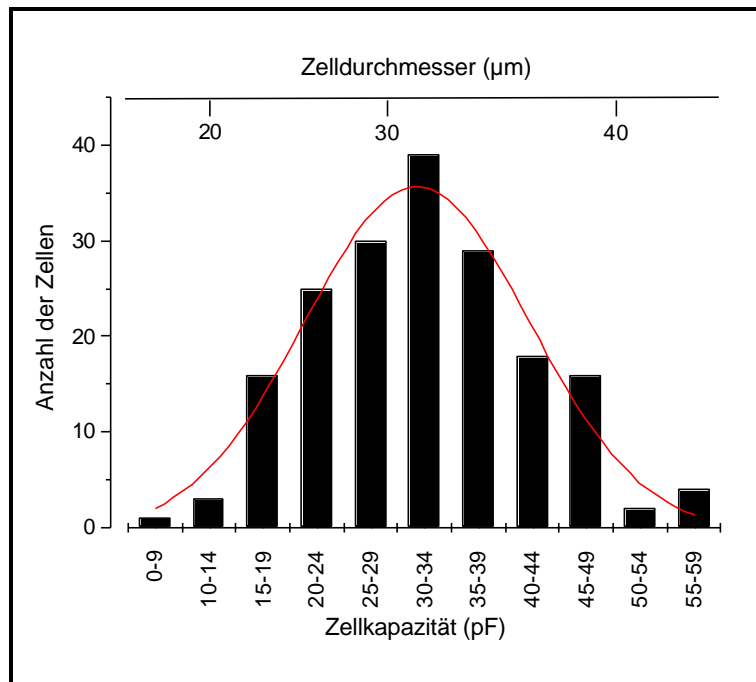


Abbildung 15: Kapazitätsverteilung aller untersuchten Zellen ($n = 183$). Die elektrische Kapazität wird durch die Zellmembran verursacht und ist direkt proportional zu ihrer Oberfläche. Sie wird ermittelt durch geeichte kapazitive Kompensation des Axopatch 200-B Verstärkers. Hierbei wird nach Hille (Hille, 1992) bei einer kugelförmigen Zellform von einer Membrankapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ausgegangen. Durch mathematische Berechnung lässt sich der Zelldurchmesser ermitteln (siehe Achse am Kopfende). Die mittlere Kapazität beträgt $32 \pm 10 \text{ pF}$. Die Linie stellt die Anpassung mit einer Gaußfunktion dar.

3.2 Die Untersuchung am Beispiel von Lidocain

Für die eingehende Untersuchung des TTX-resistenten Natriumstromes ist zunächst das klassische Lokalanästhetikum und Klasse IB Antiarrhythmikum Lidocain ausgewählt worden. Lidocain ist das bekannteste Amid-Lokalanästhetikum, das über einen Block der Natriumkanäle die Depolarisation der Zellmembran verhindert.

Der Strom wird während jedem Impuls registriert und übereinander dargestellt. Dieses Muster wird in ansteigenden Lidocainkonzentrationen von 10, 30, 100 und 300 $\mu\text{mol}/\text{l}$ durchgeführt. Die Zelle wird jeweils mindestens eine Minute von der Testsubstanz umspült.

3. Ergebnisse

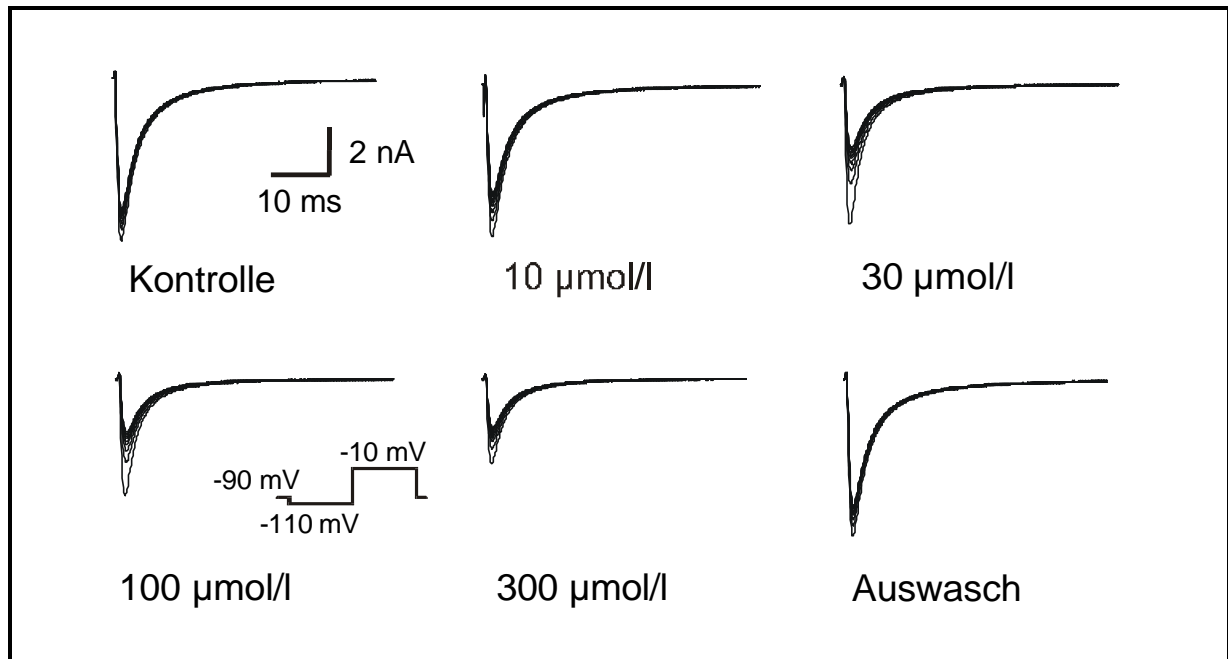


Abbildung 16: Registrierung des TTX-resistenten Natriumstromes in Kontrolllösung, ansteigenden Lidocainkonzentrationen und nach Auswaschen von Lidocain. Die Ströme werden durch das in der Abbildung dargestellte Impulsmuster zehnmals hintereinander im Abstand von 0,5 s (2 Hz) ausgelöst und für jede Konzentration übereinander dargestellt; Extrazellulärlösung: Tyrode mit TEA und TTX, Intrazellulärlösung: CsF; Haltepotential: -90 mV.

Der Natriumstrom wird durch Lidocain konzentrationsabhängig blockiert. Bei geringen Konzentrationen ist die Blockade durch die minimale Verringerung des Spitzenstromes im Vergleich zur ersten Kontrollmessung erkennbar. Die Blockade ist voll reversibel, was durch den Vergleich der Spitzenströme in Kontrolle und Auswasch ersichtlich ist. Die Abnahme des Spitzenstromes des ersten Impulses wird dabei als „tonische Blockade“ bezeichnet. Während der folgenden Impulse reduziert sich der Spitzenstrom kontinuierlich auf einen Minimalwert, der als „phasischer Block“ oder *use-dependent* Block bezeichnet wird. In dieser Arbeit ist mit *use-dependent* Block ausschließlich die Blockade des zehnten Impulses gemeint.

Um die Entwicklung des *use-dependent* Block näher zu verdeutlichen, setzt man den Spitzenstrom des zehnten Impulses in der jeweiligen Badkonzentration in Beziehung zum Spitzenstrom der Kontrolle und bildet die Differenz zu eins. In Abbildung 17 sieht man die graphische Darstellung der Blockierung in Abhängigkeit von der Impulsnummer. Man erkennt für Lidocain einen stark ausgeprägten *use-dependent* Block. Dieser ist abhängig ist von der Reizfrequenz (hier 2 Hz) und von der Reizdauer (hier 50 ms). Erhöht man die Frequenz oder verlängert man die Dauer, so führt dies zu einer Zunahme der phasischen Blockade (nicht dargestellt).

3. Ergebnisse

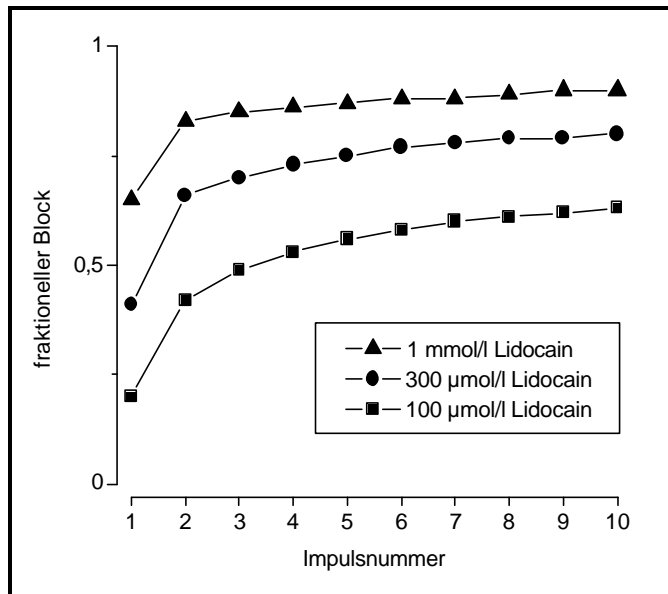


Abbildung. 17: Blockade von Lidocain in Abhängigkeit von der Reizimpulsnummer für unterschiedliche Konzentrationen. Für den ersten Impuls erkennt man einen relativ gering ausgeprägten tonischen Block, der sich im Verlauf der Impulse verstärkt und einem scheinbaren Minimalwert als *use-dependent* Block entgegenstrebt. Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen werden der erste (tonische) und der zehnte Impuls verwendet. Extrazellulärlösung: Tyrode mit TEA und TTX, Intrazellulärlösung: CsF, Haltepotential: -90 mV, Reizfrequenz: 2 Hz.

Da oben genannte Kriterien den *use-dependent* Block verändern, werden im weiteren die Reizparameter konstant gehalten.

Für Lidocain wurde durch Konzentrations-Inhibitions-Kurven mit Anpassung an Gleichung 6 eine halbmaximale Blockierungskonzentration von $277 \pm 17 \mu\text{mol/l}$ ($n = 21$) für den tonischen Block und von $79 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ ($n = 12$) für den *use-dependent* Block bei einem Haltepotential von -90 mV ermittelt (siehe Abbildung 18).

3.3 Abhängigkeit der Lidocainwirkung vom Haltepotential

Wie oben bereits erwähnt, können viele Faktoren die Wirksamkeit eines Kanalblockers verändern. Hierzu zählt die Veränderung des Haltepotentials. Um zu untersuchen, inwieweit die Blockade TTX resistenter Natriumkanäle vom Haltepotential abhängig ist, werden Konzentrations-Inhibitions-Kurven für Lidocain bei weiter depolarisierten Haltepotentialen von -70 und -60 mV gemessen.

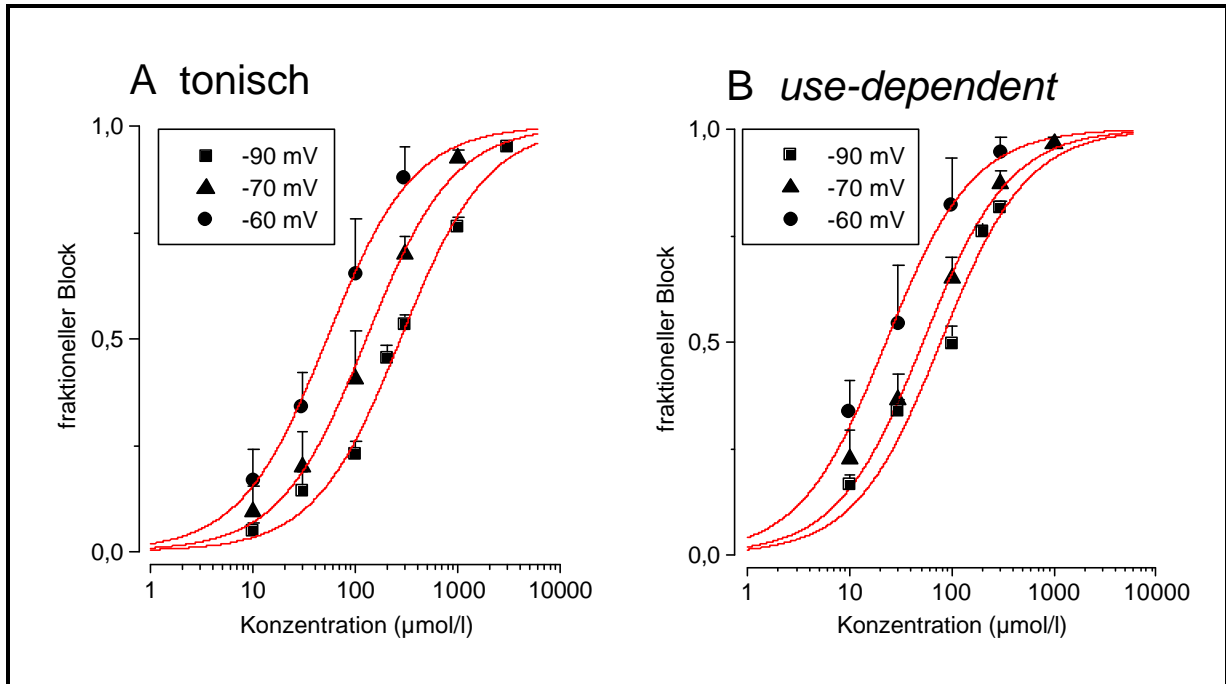


Abbildung 18: Konzentrations-Inhibitions-Kurven für Lidocain in Abhängigkeit vom Haltepotential für den tonischen (A) und *use-dependent* (B) Block. Die Haltepotentiale werden dargestellt durch folgende Symbole: -90 mV: Quadrat ; -70 mV: Dreieck ; -60 mV: Kreis. Die Kurven sind durch Anpassung von Gleichung 6 an die Datenpunkte erstellt.

Es läßt sich zeigen, daß es zu einer deutlichen Zunahme der tonischen und in geringerem Maße auch der phasischen Blockierungspotenz kommt. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 3 dargestellt. Um den Effekt durch die Veränderung des Membranpotentials zu verdeutlichen, werden die halbmaximalen Blockierungskonzentration in Abhängigkeit vom Membranpotential dargestellt.

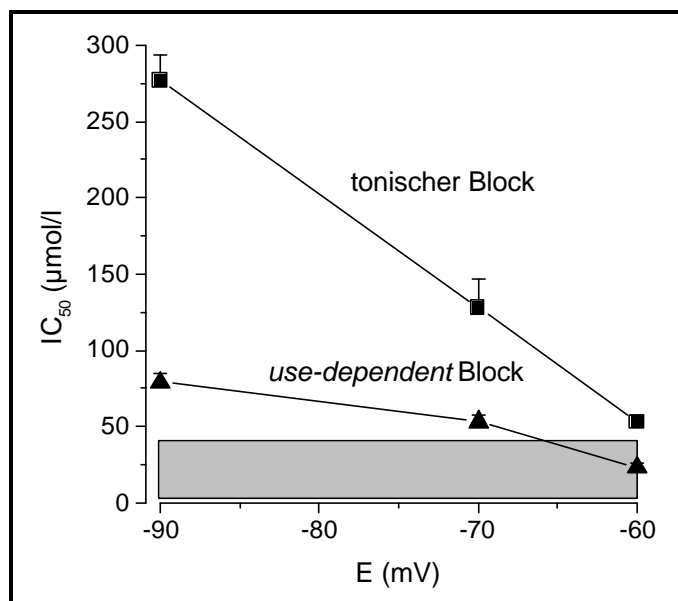


Abbildung 19: Abhängigkeit der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC₅₀) für Lidocain vom gewählten Haltepotential. Dabei entsprechen die eckigen Symbole der tonischen und die dreieckigen Symbole der phasischen Blockade. Die entsprechenden Zahlenwerte sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die grau unterlegte Fläche stellt die systemisch erreichten Konzentrationen von Lokalanästhetika bei der Schmerztherapie dar.

3. Ergebnisse

Folgende Werte haben sich durch nicht-lineare Anpassung an Gleichung 6 ergeben:

Blockade	-90 mV	-70 mV	-60 mV
tonisch ($\mu\text{mol/l}$)	277 \pm 17 (21)	128 \pm 19 (6)	53 \pm 5 (5)
<i>use-dependent</i> ($\mu\text{mol/l}$)	79 \pm 6 (12)	53 \pm 5 (6)	23 \pm 3 (5)

Tabelle 3: Halbmaximale Blockierungskonzentration von Lidocain bei den gewählten Membranpotentialen. Darstellung der Meßwerte als Mittelwert \pm Standardabweichung, untere Zahl: Anzahl der Experimente.

3.4 Ergebnisse für klinisch eingesetzten Schmerztherapeutika: Carbamazepin, Mexiletin, Memantin, Amitriptylin und Gabapentin

Die für Lidocain gezeigte Untersuchung wird nun auch für das Antiepileptikum Carbamazepin, das Antiarrhythmikum Mexiletin, das Antiparkinsonmittel und Neuroprotektivum Memantin, das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin und das Antiepileptikum Gabapentin durchgeführt. Diese Substanzen stellen ein breites Spektrum der Therapie bei chronischen Schmerzzuständen wie Phantomschmerz, diabetischer Neuropathie oder ischämischer Neuropathie dar.

Die Durchführung der Experimente und die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in gleicher Weise wie für Lidocain ausführlich beschrieben. Abbildung 21 zeigt Konzentrations-Wirkungskurven für den tonischen und *use-dependent* Block.

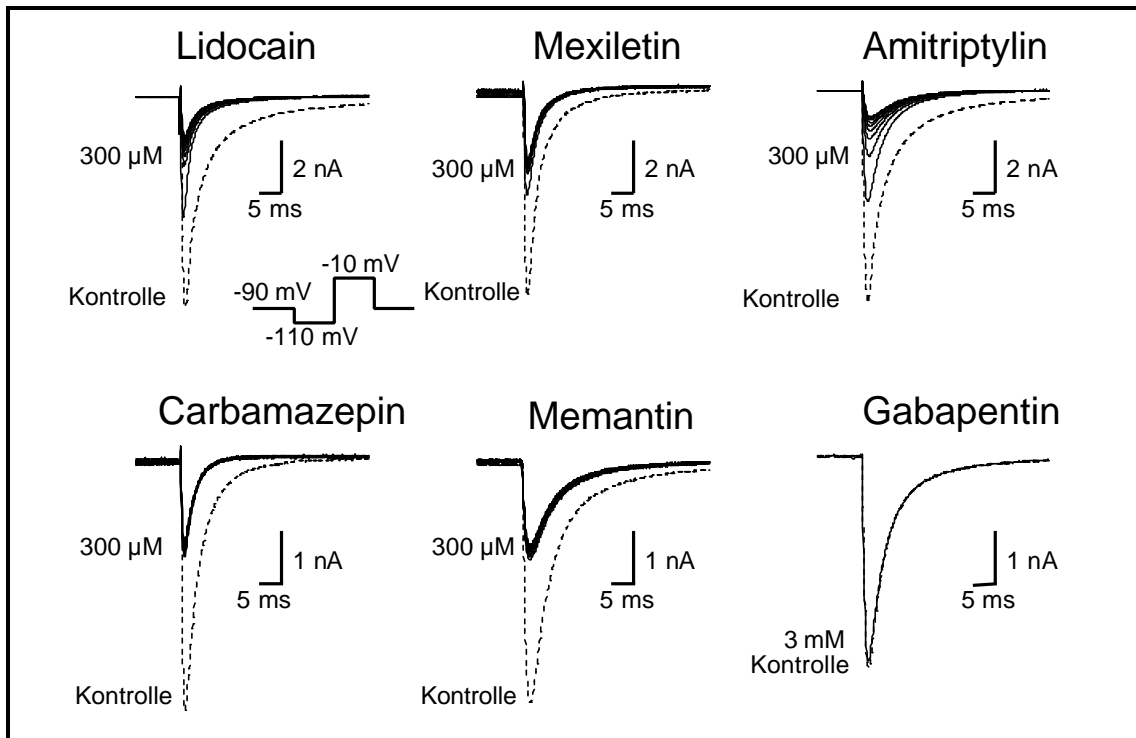


Abbildung 20: Darstellung des Blockierungsverhaltens der Substanzen für 300 µmol/l im Vergleich zur Kontrolle (außer Gabapentin: 3 mmol/l). Das Impulsprotokoll ist in gleicher Weise durchgeführt worden, wie es für das Medikament Lidocain ausführlich beschrieben ist. Extrazellulärlösung: Tyrode mit 35 mmol/l Na⁺, Intrazellulärlösung: CsF, Haltepotential: -90 mV, Reizfrequenz: 2 Hz.

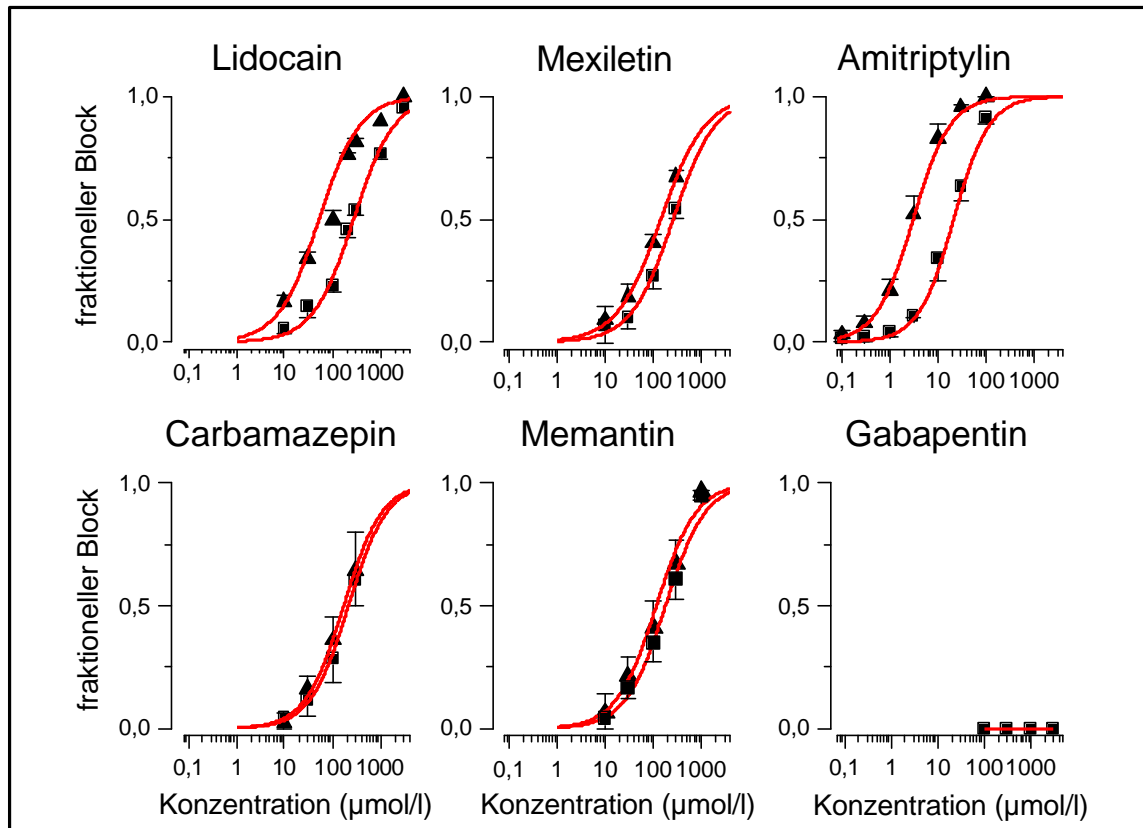


Abbildung 21: Bestimmung der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) von allen geprüften Substanzen für den tonischen und phasischen Block bei einem Haltepotential von -90 mV zu bestimmen. Die eckige Symbole zeigen die tonische und dreieckige Symbole die phasische Blockade.

Das Medikament Gabapentin blockierte bis zu einer Konzentration von 3 mmol/l den TTX-resistenten Natriumkanal nicht. Aus diesem Grund wurde es von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Bei den übrigen Medikamenten wurde das Haltepotential weiter depolarisiert. Abbildung 22 zeigt das Absinken der IC_{50} durch weitere Depolarisation.

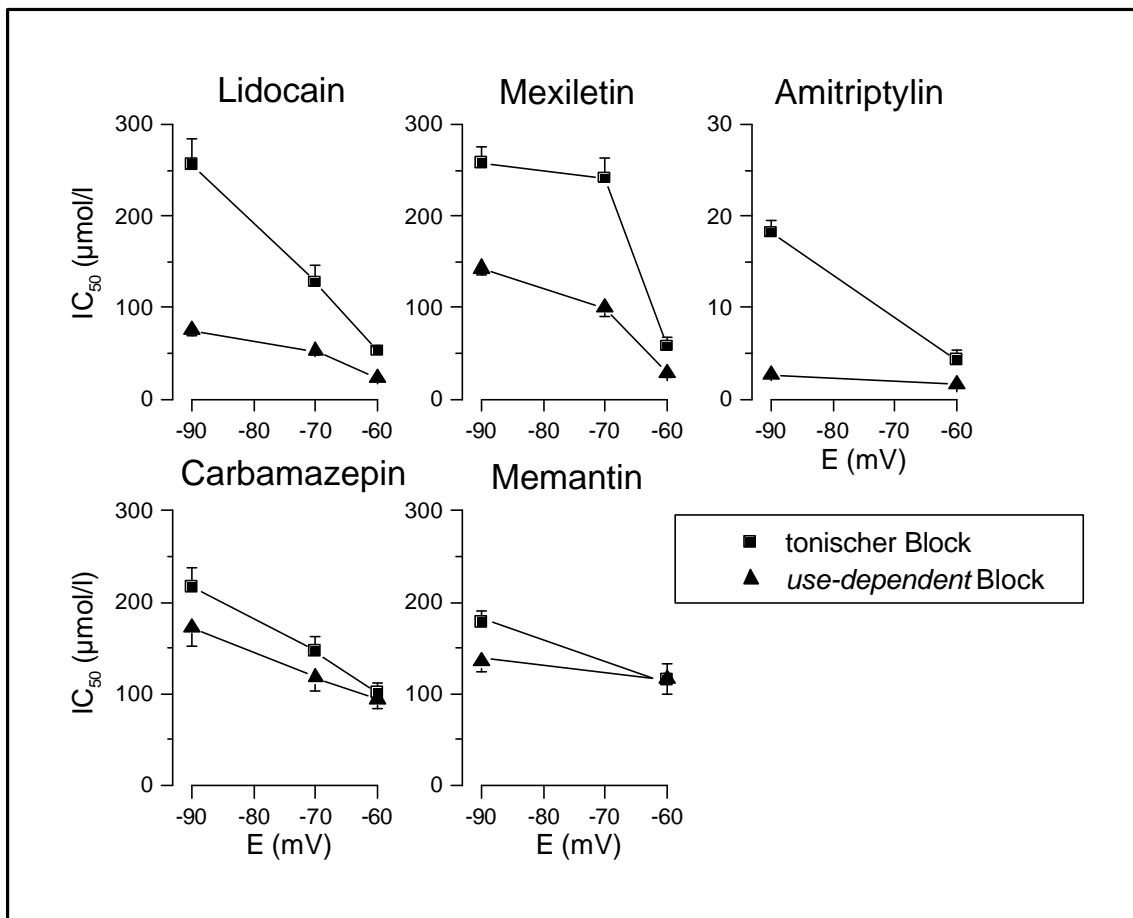


Abbildung 22: Halbmaximale Blockierungskonzentrationen (IC₅₀) bei verschiedenen Haltepotentialen von allen geprüften Substanzen für den tonischen und *use-dependent* Block.

3. Ergebnisse

3.5 Zusammenstellung der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen

Zusammenfassend haben sich folgende Zahlenwerte für die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen der untersuchten Medikamente ergeben.

Haltepotential	Impuls	Lidocain	Mexiletin	Ami- triptylin	Carba- mazepin	Memantin
-90 mV	Tonisch ($\mu\text{mol/l}$)	277 ± 17 (21)	258 ± 18 (5)	18 ± 1 (6)	216 ± 22 (5)	178 ± 13 (5)
	Phasisch ($\mu\text{mol/l}$)	79 ± 6 (12)	143 ± 8 (5)	2,7 ± 0,2 (6)	172 ± 20 (5)	135 ± 12 (5)
-70 mV	Tonisch ($\mu\text{mol/l}$)	127 ± 19 (6)	242 ± 22 (6)		146 ± 17 (8)	
	Phasisch ($\mu\text{mol/l}$)	53 ± 5 (6)	100 ± 9 (6)		118 ± 14 (8)	
-60 mV	Tonisch ($\mu\text{mol/l}$)	53 ± 5 (5)	58 ± 9 (6)	4,3 ± 1,1 (5)	101 ± 11 (5)	115 ± 17 (4)
	Phasisch ($\mu\text{mol/l}$)	23 ± 3 (5)	28 ± 4 (6)	1,6 ± 0,3 (5)	94 ± 11 (5)	116 ± 16 (4)

Tabelle 4: IC_{50} für verschiedene Testsubstanzen bei allen Haltepotentialen. Gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung, untere Zahl: Anzahl der Experimente

4.1 Der TTX-resistente Natriumkanal und chronische Schmerzsyndrome

In den letzten Jahren häufen sich die Beweise, daß der neuronale TTX-resistente Natriumkanal eine entscheidende Rolle bei der peripheren Nozizeption und damit bei der Entwicklung von chronischen Schmerzsyndromen spielt. Die Kanäle sind wichtig für die Generierung von Impulsen an peripher nozizeptiven Endigungen (Brock *et al.*, 1998), ebenso sind sie aber auch in der Lage, bereits generierte Aktionspotentiale in C-Fasern weiterzuleiten (Quasthoff *et al.*, 1995). Trotz Drosselung der Produktion nach Axotomie oder Zerstörung des peripheren Nerven (Rizzo *et al.*, 1995) sammeln sich die Kanäle an der Verletzungstelle des Axons an (Novakovic *et al.*, 1998). Die Anhäufung der Natriumkanäle kann eine repetitive Aktivität zur Folge haben, wie es bereits in Computersimulationen (Matzner und Devor, 1992) und elektrophysiologischen Experimenten (Matzner und Devor, 1994) gezeigt worden ist. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß auch TTX-sensitive Natriumkanäle bezug haben zu ektopen Impulsen (Matzner und Devor, 1994). Die Rolle des TTX-resistenten Natriumkanals im peripheren Nervensystem ist jedoch eindrucksvoll demonstriert in Experimenten an *knockout* Mäusen (Akopian *et al.*, 1999), die diesen Kanal nicht besitzen. Diese Tiere verhalten sich augenscheinlich normal, zeigen aber gegenüber mechanischen Stimuli eine Analgesie und entwickeln verspätet eine inflammatorische Hyperalgesie.

Neuronale TTX-resistente Natriumkanäle in primär sensorischen Nerven von DRG-Zellen haben grundlegend andere elektrophysiologische Eigenschaften als TTX-sensitive. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken sind langsamer und die Spannungsabhängigkeit sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung liegen in depolarisierenderer Richtung als beim TTX-sensitiven Natriumkanal (Elliott und Elliott, 1993). Diese Eigenschaften und ihre kurze Refraktärphase lassen den Kanal ideal erscheinen, Impulse unter pathophysiologischen Bedingungen zu generieren. Der TTX-resistente Natriumkanal ist somit ein ideales Ziel für einen möglichen antinozizeptiven Mechanismus. Mittlerweile ist der TTX-resistente Natriumkanal aus menschlichen Spinalganglienzellen kloniert worden (Rabert *et al.*, 1998), was seine Wichtigkeit für die Nozizeption und mögliche antinozizeptive Therapien unterstreicht. Leider sind bisher noch keine selektiven Blocker für neuronale TTX-resistente Natriumkanäle gefunden worden, welche von großem Wert für die Schmerzbehandlung wären.

Die in dieser Arbeit verwendeten Pharmaka sind alle nichtselektiv und blockieren TTX-sensitive Natriumkanäle sogar wirksamer als TTX-resistente. Die Abhängigkeit der Blockierungspotenz vom Membranpotential kann jedoch von Relevanz sein für den

4. Diskussion

erfolgreichen Einsatz in der Schmerztherapie. In geschädigten peripheren Nerven ändert das depolarisierte Membranpotential das Verhältnis zwischen TTX-resistenten und -sensitiven Natriumkanälen zugunsten erster, dieses bildet die Grundlage für spontane Aktivität (Schild und Kunze, 1997). Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit liegt darin, daß bei Depolarisation der TTX-resistente Natriumstrom ohne Blockierung nur geringfügig reduziert ist, so daß diese Kanäle an spontanen Aktivitäten unter diesen Bedingungen mitwirken können.

Die Arbeit zeigt weitergehend, daß ein depolarisiertes Membranpotential kombiniert mit repetitiver Aktivität starken Einfluß auf die Blockierungspotenz von *use-dependent* Blockern hat. So sinkt die halbmaximale Blockierungskonzentration für Lidocain mehr als zwölfmal von 277 μM bei -90 mV für den tonischen Block auf 23 μM bei -60 mV für den *use-dependent* Block bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz (Tabelle 4).

Da nach intravenöser Verabreichung die therapeutische Plasmakonzentration von Lidocain nahe an oben genannter Konzentration liegt (Tanelian und MacIver, 1991; Wallace *et al.*, 1996), wird der Strom durch den TTX-resistenten Natriumkanal reduziert und damit die von diesen Kanälen generierte spontane Aktivität. Lidocain kann somit direkt den Impulstehungsprozeß in einem ektopen Zentrum eines geschädigten Nerven hemmen. Ähnlich wie für Lidocain steigt bei Depolarisation und wiederholter Stimulation der Zellen die Affinität für Mexiletin (9-fach) und Amitriptylin (11-fach), hat jedoch nur geringe Effekte auf Carbamazepin und Memantin (Tabelle 4).

Natriumkanäle des Zentralnervensystems und des Herzens sind weniger empfänglich für diese Medikamente, weil diese Zellen im physiologischen Zustand ein relativ negatives Ruhemembranpotential besitzen, das eine normale Erregung in diesen Geweben wahrt.

Der Einfluß vom Membranpotential auf das Blockierungsverhalten von Lokalanästhetika ist ein gut untersuchtes Phänomen, welches in anderen Präparationen an TTX-sensitiven Natriumkanälen untersucht worden ist (Strichartz, 1987). So steigt zum Beispiel die halbmaximale Blockierungskonzentration von Bupivacain-Enantiomeren fünfmal bei Änderung eines 5 s langen Vorimpulses von -120 mV auf -70 mV bei TTX-sensitiven Natriumkanälen von GH₃-Zellen der Ratte (Wang und Wang, 1992). Bei IIa Natriumkanälen des Rattenhirns steigt die Affinität zu Lidocain, Carbamazepin und Phenytoin, wenn das Ruhemembranpotential depolarisiert wird (Ragsdale *et al.*, 1991). Jedoch inaktivieren TTX-sensitive Kanäle im Gegensatz zu TTX-resistenten bei einer Depolarisation zu Potentialen, bei denen sich ihre Affinität hebt. Die Depolarisation von -128 mV zu -66 mV verändert die Affinität oben genannter Gehirnzellen zu den Medikamenten radikal, reduziert jedoch auch den Strom um 90 %. Das ist ebenso ersichtlich bei TTX-insensitiven (nicht resistenten)

4. Diskussion

Herznatriumkanälen, wie es von Bean (Bean *et al.*, 1983) gezeigt ist. Hier zeigte sich ein 30-facher Anstieg der Affinität von Natriumkanälen aus Purkinjefasern des Kaninchen zu Lidocain bei einer Depolarisation von -90 mV nach -60 mV. Ebenso ergab sich allerdings auch eine Reduktion des Natriumstromes um 99 %.

Der Anstieg der Potenz in Abhängigkeit vom Membranpotential wird erklärt mit der *Modulated Receptor* Hypothese (Hille, 1977; Hondeghem und Katzung, 1977). Grundlegend basiert diese Hypothese auf der Vermutung, daß Natriumkanäle in inaktiviertem Zustand eine höhere Affinität zu Wirkstoffen haben als Kanäle im Ruhezustand. Da die Anzahl der inaktivierten Kanäle bei weiter depolarisiertem Potential zunimmt, wird die Gesamtaffinität gegenüber Lokalanästhetika höher. Im Gegensatz dazu inaktivieren neuronale TTX-resistente Natriumströme in dem Potentialbereich nicht, in dem eine Zunahme der Medikamentenaffinität beobachtet wurde, so daß bei -60 mV der Natriumstrom noch fast vollständig erhalten ist. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, daß die gestiegene Affinität aus einer Zunahme an inaktivierten Natriumkanälen resultiert. Das wird weitergehend unterstützt durch Inaktivierungskurven, welche bei Lidocain um 5 mV in hyperpolarisierender Richtung verschoben sind, bei TTX-sensitiven Strömen jedoch um 20 mV (Hille, 1977). Weil die *Modulated Receptor* Hypothese jedoch große Verschiebungen der Inaktivierungskurve verlangt, ist dieses nicht passend für den Block des TTX-resistenten Natriumkanal durch Lokalanästhetika. So ist der Übergang in einen zweiten Ruhezustand, eine spontane kurze Öffnung oder eine Induktion der langsamen Inaktivierung eher Ursache für den spannungsabhängigen Block. Hier müssen jedoch noch weitere Analysen der Stromkinetiken von *whole-cell* und *single-channel* Experimenten gemacht werden, um molekulare Mechanismen des Phänomens zu erklären.

4.2 Klinische Therapie

Ektoper Aktionspotentiale des Nerven können sowohl auf peripherer Seite (Nystrom und Hagbarth, 1981; Ochoa *et al.*, 1982), als auch an der Spinalganglienzelle selbst entstehen (Strichartz, 1987; Study und Kral, 1996). Sowohl Lidocain (Devor *et al.*, 1992; Chabal *et al.*, 1989) als auch Mexiletin (Chabal *et al.*, 1989) sind in der Lage, diese Impulsgenerierung zu unterdrücken. Die nötige Lidocain-Konzentration, um neurale Verletzungsimpulse halbmaximal zu unterdrücken, liegt bei 24 µmol/l (5,7 µg/ml) (Tanelian und MacIver, 1991). Die minimale Lidocain-Plasmakonzentration für eine Schmerzunterdrückung liegt bei 6

4. Diskussion

$\mu\text{mol/l}$ (1,5 $\mu\text{g/ml}$) (Wallace *et al.*, 1996), der Plasmaspiegel für Carbamazepin liegt zwischen 21-72 $\mu\text{mol/l}$ (5-17 $\mu\text{g/ml}$) für die Behandlung von Neuralgien (Moosa *et al.*, 1993). Die Plasmakonzentration von Mexiletin liegt bei 4-7 $\mu\text{mol/l}$ (0,75-2,18 $\mu\text{g/ml}$) (Ohashi *et al.*, 1984) bei einer oralen Applikation von 450 mg, und die Konzentration von Amitriptylin liegt zwischen 0,3 - 0,5 $\mu\text{mol/l}$ (93-140 ng/ml) (Perry *et al.*, 1994). Einzubeziehen zu den Konzentrationen ist die Lipophilie der Medikamente. Sie läßt letztendlich im Nerven selbst eine noch höhere Konzentration zu, kann jedoch nicht ermittelt werden.

Aus den hier dargestellten Daten kann geschlossen werden, daß nur Lidocain, Mexiletin und Amitriptylin in der Lage sind, ektope Impulse von TTX-resistenten Natriumkanälen zu unterdrücken. Carbamazepin und Memantin blockieren den Strom nicht in systemischen Konzentrationen und Gabapentin hat keinen Einfluß auf den Strom. In einer Arbeit von Abdi wurde dargestellt, daß Lidocain und Amitriptylin periphere Nervenimpulse in einem chronischen Schmerzmodell der Ratte unterdrücken, wohingegen Gabapentin keine Effekte besitzt (Abdi *et al.*, 1998). In einer Arbeit von Burchiel (Burchiel *et al.*, 1988) reduzierte Carbamazepin Impulse in A-Fasern von Neuromata des *N. saphenus*, welche keine TTX-resistenten Natriumkanäle enthalten, mit einer Konzentration von 33 $\mu\text{mol/l}$ (7,9 $\mu\text{g/ml}$). Effekte auf C-Fasern, die TTX-resistente Natriumkanäle enthalten, wurden nicht untersucht.

4.3 Ausblick

In dieser Studie wurden Ströme von Zellen gemessen, die von gesunden Ratten gewonnen worden sind. TTX-resistente Natriumströme von Zellen eines Rattenmodells mit neuropathischen Schmerzsyndrom (chronische Ligaturverletzung) zeigen andere elektrophysiologische Eigenschaften, zum Beispiel eine Verschiebung der Aktivierung und Inaktivierung zu einem negativeren Potential (Kral *et al.*, 1999). Unter diesen Bedingungen können die Zellen empfindlicher auf *use-dependent* Blocker reagieren, da die Spannungsabhängigkeit der Medikamentenaffinität verbunden ist mit der Spannungssensitivität des Kanals, und diese zu negativeren Potentialen verschoben wird. Weitere Studien an Strömen des chronischen Schmerzmodells werden dieses klären.

Der TTX-resistente Natriumstrom des peripheren Nervensystems setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Mindestens zwei verschiedene Natriumkanäle bilden den gezeigten Strom. Dieses ist demonstriert worden in *whole-cell* Experimenten (Rush *et al.*, 1998; Scholz *et al.*, 1998) Einzelkanalanalysen (Rush *et al.*, 1998), und molekularbiologischen

4. Diskussion

Untersuchungen (SNS/PN3 und SNS2/NaN) (Tate *et al.*, 1998). Durch diese Untersuchungen zeigte sich, daß nur der SNS/PN3 Kanal eine Rolle für die Ausbildung eines neuropathischen Schmerzsyndromes spielt. In der dargestellten Arbeit wurden jedoch nur *whole-cell* Experimente des TTX-resistenten Natriumstromes gemacht. Es war nicht Aufgabe der Untersuchung, unterschiedliche Effekte der Medikamente auf unterschiedliche Typen des TTX-resistenten Stromes zu studieren. Weitergehend müssen erst die physiologische und pathophysiologische Funktionen der peripheren Sensibilität geklärt werden, bevor solche Untersuchungen interpretiert werden können.

Zusammengefaßt ist die analgetische Wirkung der *use-dependent* Blocker Lidocain, Mexiletin und Amitriptylin auf die durch das depolarisierte Membranpotential in geschädigten Zellen bedingte Selektivität für TTX-resistente Natriumkanäle gegenüber TTX empfindlichen Natriumkanälen intakter Zellen zurückzuführen. Die Wechselwirkung höherer Konzentrationen mit TTX-sensitiven Kanälen beschränkt allerdings ihre Verwendung, da hier eine dämpfende Wirkung auf die Erregbarkeit anderer Gewebe vorkommt. In naher Zukunft könnten hoch selektive Blocker des TTX-resistenten Natriumkanals gefunden werden, und es kann davon ausgegangen werden, daß damit neue potente und nebenwirkungsarme Schmerzmittel zur Verfügung stehen.

Systemisch applizierte Natriumkanalblocker können die Schmerzsymptomatik bei bestimmten Schmerzformen verbessern, der hier zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unverstanden. Pathophysiologisch spielen TTX-resistente Natriumkanäle eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung von ektopen Impulsen, die letztendlich zu neuropathischen Schmerzsyndromen führen. In der vorliegenden Arbeit wurden Ströme durch oben erwähnte Ionenkanäle mit Hilfe der *Patch-clamp* Methode in *whole-cell* Konfiguration an enzymatisch dissoziierten DRG-Zellen erwachsener Ratten aufgezeichnet. Hier wurde die Wirkung verschiedener klinisch eingesetzter Natriumkanalblocker an den Natriumkanälen ausgetestet. Dabei wurde besonderen Wert auf die Auswirkung von Membranpotentialänderungen auf die halbmaximale Blockierungskonzentration (IC_{50}) gelegt. IC_{50} -Werte wurden durch Konzentrations-Blockierungskurven bei Haltepotentialen von -90 , -70 und -60 mV bestimmt.

Lidocain, Mexiletin und Amitriptylin blockierten den TTX-resistenten Natriumkanal konzentrationsabhängig und *use-dependent*. Die Medikamente Carbamazepin und Memantin blockierten nicht *use-dependent*, Gabapentin zeigte keinen Effekt bis zu einer Konzentration von 3 mmol/l. Weiterhin reduziert sich der TTX-resistente Natriumstrom bei Depolarisation des Membranpotentials ohne blockierende Substanzen nur geringfügig.

Daraus läßt sich folgern, daß ein weniger negatives Membranpotential und repetitive Aktivität die Sensitivität des TTX-resistenten Natriumkanales für die Medikamente Lidocain, Mexiletin und Amitriptylin erhöhen, so daß die in der klinischen Therapie erreichten systemischen Konzentrationen die Kanalfunktion beeinflussen. Diese Kanaleigenschaft kann eine Verringerung des Schmerzempfindens durch reduzierte Aktivität der ektopen Zentren ohne Beeinflussung von zentralen oder kardialen Erregungen erklären.

6. Literaturverzeichnis

- Abdi S., Lee D.H., Chung J.M. (1998). The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth.Analg.* 87, 1360-1366.
- Akopian A.N., Sivilotti L., Wood J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379, 257-262.
- Akopian A.N., Souslova V., England S., Okuse K., Ogata N., Ure J., Smith A., Kerr B.J., McMahon S.B., Boyce S., Hill R., Stanfa L.C., Dickenson A.H., Wood J.N. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat.Neurosci.* 2, 541-548.
- Andres K.H. (1961). Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Z.Zellforsch.A* 55, 1-48.
- Arbuckle J.B., Docherty R.J. (1995). Expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels in capsaicin-sensitive dorsal root ganglion neurons of adult rats. *Neurosci.Lett.* 185, 70-73.
- Bean B.P., Cohen C.J., Tsien R.W. (1983). Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J.Gen.Physiol.* 81, 613-642.
- Bernstein J. (1902). Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Erster Teil. *Pfluegers Arch.* 92, 561-562.
- Bräu M.E., Dreimann M., Hempelmann G., Vogel W. (1998a). The action of Na⁺ channel blocking drugs used for neuropathic pain therapy on tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. (Abstract)* 24, 1627
- Bräu M.E., Dreimann M., Vogel W., Hempelmann G. (1998b). Die Wirkung von Lidocain, Mexiletin und Carbamazepin auf Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle des sensorischen peripheren Nervensystems. *Der Anaesthesist* 861
- Bräu M.E., Dreimann M., Olschewski A, Vogel W., Hempelmann G. (2001). Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons. *Anaesthesiol.* 94(1), 137-44

6. Literaturverzeichnis

- Bräu M.E., Dreimann M., Vogel W., Hempelmann, G. (2000). Lidocainwirkung auf Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle des peripheren nozizeptiven Systems. DAK 2000
- Bräu M.E., Rush A.M., Elliott J.R. (1995). Single channel analysis of two types of tetrodotoxin-resistant sodium channels in small cells isolated from adult rat (200-350g) dorsal root ganglia (DRG). *J.Physiol.* 487, 184P
- Brock J.A., McLachlan E.M., Belmonte C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J.Physiol.* 512, 211-217.
- Burchiel K.J. (1988). Carbamazepine inhibits spontaneous activity in experimental neuromas. *Exp.Neurol.* 102, 249-253.
- Butterworth J.F., Strichartz G.R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: A review. *Anesthesiol.* 72, 711-734.
- Caffrey J.M., Eng D.L., Black J.A., Waxman S.G., Kocsis J.D. (1992). Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 592, 283-297.
- Carlton S.M., Hargett G.L. (1995). Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. *Neurosci.Lett.* 198, 115-118.
- Chabal C., Russell L.C., Burchiel K.J. (1989). The effect of intravenous lidocaine, tocainide, and mexiletine on spontaneously active fibers originating in rat sciatic neuromas. *Pain* 38, 333-338.
- Cole K.S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archi.Sci.Physiol.* 3, 253-258.
- Devor M., Wall P.D., Catalan N. (1992). Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48, 261-268.
- Dreimann M., Bräu M.E., Vogel W., Hempelmann G. (1998). Effects of memantine and gabapentin on neuronal tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in isolated dorsal root ganglion neurones of adult rats. *AINS* 33: 454

6. Literaturverzeichnis

- Eaholtz G., Scheuer T., Catterall W.A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12, 1041-1048.
- Elliott A.A., Elliott J.R. (1993). Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J.Physiol.* 463, 39-56.
- Elliott J.R. (1997). Slow Na⁺ channel inactivation and bursting discharge in a simple model axon: Implications for neuropathic pain. *Brain Res.* 754, 221-226.
- England S., Bevan S., Docherty R.J. (1996). PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J.Physiol.Lond.* 495, 429-440.
- Erlanger J., Gasser H.S (1932). The compound nature of the action current of nerve as disclosed by the cathode ray oscillograph. *Am.J.Physiol.* 70, 624-666.
- Gaumann D.M., Brunet P.C., Jirounek P. (1992). Clonidine enhances the effects of lidocaine on C-fiber action potential. *Anesth.Analg.* 74, 719-725.
- Gold M.S., Reichling D.B., Shuster M.J., Levine J.D. (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 1108-1112.
- Greene G.C. (1949). *Gross anatomy in the rat in laboratory investigation.* Philadelphia: J.B.Lippincott Company 24-50.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* 391, 85-100.
- Harper A.A., Lawson S.N. (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J.Physiol.* 359, 31-46.
- Hille B. (1967). The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J.Gen.Physiol.* 50, 1287-1302.
- Hille B. (1968). Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve. *J.Gen.Physiol.* 51, 199-219.

6. Literaturverzeichnis

- Hille B. (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J.Gen.Physiol.* 69, 497-515.
- Hille B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes* (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.).
- Hille B., Schwarz W. (1978). Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J.Gen.Physiol.* 72, 409-442.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J.Physiol.* 117, 500-544.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.* 116, 449-472.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952c). The components of membrane conduction in the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.* 116, 473-496.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952d). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.* 116, 497-506.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.* 116, 424-448.
- Hondeghem L.M., Katzung B.G. (1977). Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim.Biophys.Acta* 472, 373-398.
- Jeftinija S. (1994a). Bradykinin excites tetrodotoxin-resistant primary afferent fibers. *Brain Res.* 665, 69-76.
- Jeftinija S. (1994b). The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels of small primary afferent fibers. *Brain Res.* 639, 125-134.
- Jonas P., Bräu M.E., Hermsteiner M., Vogel W. (1989). Single-channel recording in myelinated nerve fibers reveals one type of Na channel but different K channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 86, 7238-7242.

6. Literaturverzeichnis

- Koh D.S., Jonas P., Bräu M.E., Vogel W. (1992). A TEA-insensitive flickering potassium channel active around the resting potential in myelinated nerve. *J.Membr.Biol.* 130, 149-162.
- Koppenhöfer E., Vogel W. (1969). Wirkung von Tetrodotoxin und Tetraäthylammoniumchlorid an der Innenseite der Schnürringsmembran von *Xenopus laevis*. *Pfluegers Arch.* 313, 361-380.
- Kostyuk P.G., Veselovsky N.S., Tsyndrenko A.Y. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. *Neuroscience* 6, 2423-2430.
- Kral M.G., Xiong Z., Study R.E. (1999). Alteration of Na⁺ currents in dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy. *Pain* 81, 15-24.
- Marban E., Yamagishi T., Tomaselli G.F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J.Physiol.Lond.* 508, 647-657.
- Matzner O., Devor M. (1992). Na⁺ conductance and the threshold for repetitive neuronal firing. *Brain Res.* 597, 92-98.
- Matzner O., Devor M. (1994). Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J.Neurophysiol.* 72, 349-359.
- Moosa R.S., McFadyen M.L., Miller R., Rubin J. (1993). Carbamazepine and its metabolites in neuralgias: concentration-effect relations. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 45, 297-301.
- Motomura H., Fujikawa S., Tashiro N., Ito Y., Ogata, N. (1995). Single-channel analysis of two types of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglia. *Pfluegers Arch.* 431, 221-229.
- Narahashi T., Moore J.W., Scott, W.R. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J.Gen.Physiol.* 47, 965-974.
- Neher E., Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Novakovic S.D., Tzoumaka E., McGivern J.G., Haraguchi M., Sangameswaran L., Gogas K.R., Eglén R.M., Hunter J.C. (1998). Distribution of the tetrodotoxin-resistant

6. Literaturverzeichnis

- sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. *J.Neurosci.* 18, 2174-2187.
- Nystrom B., Hagbarth K.E. (1981). Microelectrode recordings from transected nerves in amputees with phantom limb pain. *Neurosci.Lett.* 27, 211-216.
- Ochoa J., Torebjork H.E., Culp W.J., Schady W. (1982). Abnormal spontaneous activity in single sensory nerve fibers in humans. *Muscle Nerve* 5, S74-S77
- Ogata N., Tatebayashi H. (1993). Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. *J.Physiol.* 466, 9-37.
- Ohashi K., Ebihara A., Hashimoto T., Hosoda S., Kondo K., Oka T. (1984). Pharmacokinetics and the antiarrhythmic effect of mexiletine in patients with chronic ventricular arrhythmias. *Arzneimittelforschung.* 34, 503-507.
- Perry P.J., Zeilmann C., Arndt S. (1994). Tricyclic antidepressant concentrations in plasma: an estimate of their sensitivity and specificity as a predictor of response. *J.Clin.Psychopharmacol.* 14, 230-240.
- Quasthoff S., Großkreutz J., Schröder J.M., Schneider U., Grafe P. (1995). Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. *Neuroscience* 69, 955-965.
- Quayle J.M., Standen N.B., Stanfield P.R. (1988). The voltage-dependent block of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle by caesium and barium ions. *J.Physiol.Lond.* 405, 677-697.
- Rabert D.K., Koch B.D., Ilnicka M., Obernolte R.A., Naylor S.L., Herman R.C., Eglen R.M., Hunter J.C., Sangameswaran L. (1998). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. *Pain* 78, 107-114.
- Ragsdale D.S., McPhee J.C., Scheuer T., Catterall W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724-1728.
- Ragsdale D.S., Scheuer T., Catterall W.A. (1991). Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na⁺ channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Mol.Pharmacol.* 40, 756-765.

6. Literaturverzeichnis

- Richeimer S.H., Bajwa Z.H., Kahraman S.S., Ransil B.J., Warfield C.A. (1997). Utilization patterns of tricyclic antidepressants in a multidisciplinary pain clinic: a survey. *Clin.J.Pain* 13, 324-329.
- Rizzo M.A., Kocsis J.D., Waxman S.G. (1995). Selective loss of slow and enhancement of fast Na⁺ currents in cutaneous afferent dorsal root ganglion neurones following axotomy. *Neurobiol.Dis.* 2, 87-96.
- Rosner H., Rubin L., Kestenbaum A. (1996). Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. *Clin.J.Pain* 12, 56-58.
- Roy M.L., Narahashi T. (1992). Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J.Neurosci.* 12, 2104-2111.
- Roy M.L., Reuveny E., Narahashi T. (1994). Single-channel analysis of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 650, 341-346.
- Rush A.M., Bräu M.E., Elliott A.A., Elliott J.R. (1998). Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J.Physiol.Lond.* 511, 771-789.
- Safronov B.V., Bischoff U., Vogel W. (1996). Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J Physiol.* 493, 393-408.
- Sangameswaran L., Delgado S.G., Fish L.M., Koch B.D., Jakeman L.B., Stewart G.R., Sze P., Hunter J.C., Eglén R.M., Herman R.C. (1996). Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J.Biol.Chem.* 271, 5953-5956.
- Schild J.H., Kunze D.L. (1997). Experimental and modeling study of Na⁺ current heterogeneity in rat nodose neurons and its impact on neuronal discharge. *J.Neurophysiol.* 78, 3198-3209.
- Scholz A., Appel N., Vogel W. (1998). Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *Eur.J.Neurosci.* 10, 2547-2556.

6. Literaturverzeichnis

- Scholz A., Reid G., Vogel W., Bostock H. (1993). Ion channels in human axons. *J Neurophysiol.* 70, 1274-1279.
- Schwartz A., Palti Y., Meiri H. (1990). Structural and developmental differences between three types of Na channels in dorsal root ganglion cells of newborn rats. *J.Membr.Biol.* 116, 117-128.
- Schwarz J.R., Ulbricht W., Wagner H.-H. (1973). The rate of action of tetrodotoxin on myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis* and *Rana esculenta*. *J.Physiol.* 233, 167-194.
- Strichartz G.R. (1987). Local anesthetics. *Handbook of experimental pharmacology.* Springer Verlag 81,
- Study R.E., Kral M.G. (1996). Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy. *Pain* 65, 235-242.
- Tanelian D.L., Brose W.G. (1991). Neuropathic pain can be relieved by drugs that are use-dependent sodium channel blockers: lidocaine, carbamazepine, and mexiletine. *Anesthesiology* 74, 949-951.
- Tanelian D.L., MacIver M.B. (1991). Analgesic concentrations of lidocaine suppress tonic A-delta and C fiber discharges produced by acute injury. *Anesthesiology* 74, 934-936.
- Tasaki I., Hagiwara S. (1957). Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *J.Gen.Physiol.* 40, 859-885.
- Tate S., Benn S., Hick C., Trezise D., John V., Mannion R.J., Costigan M., Plumpton C., Grose D., Gladwell Z., Kendall G., Dale K., Bountra C., Woolf C.J. (1998). Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nature Neurosci.* 1 , 653-655.
- Villiere V., McLachlan E.M. (1996). Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *J.Neurophysiol.* 76, 1924-1941.

6. Literaturverzeichnis

- Vogel W., Schwarz J.R. (1995). Voltage-clamp studies in Axons: Macroscopic and single-channel currents. in *The Axon*. S.G. Waxman, J.D. Kocsis, and P.K. Stys, eds. (Oxford: Oxford University Press), pp. 257-280.
- Wallace M.S., Dyck J.B., Ross, S.S., Yaksh T.L. (1996). Computer-controlled lidocaine infusion for the evaluation of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* 66, 69-77.
- Wang G.K., Wang S.Y. (1992). Altered stereoselectivity of cocaine and bupivacaine isomers in normal and batrachotoxin-modified Na⁺ channels. *J.Gen.Physiol.* 100, 1003-1020.
- Yoshida S., Matsuda Y. (1979). Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques. *J.Neurophysiol.* 42, 1134-1145.
- Yoshimura N., White G., Weight F.F., de Groat W.C. (1996). Different types of Na⁺ and A-type K⁺ currents in dorsal root ganglion neurones innervating the rat urinary bladder. *J.Physiol.Lond.* 494, 1-16.

7. Lebenslauf

Name:		Marc Dreimann
Geburtsdatum:		01. Januar 1973
Geburtsort:		Paderborn
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Familienstand:		ledig
Schule:	1979-83	Grundschule Pivitsheide
	1983-92	Gymnasium Leopoldinum, Detmold
	1992	Abitur
Zivildienst:	1992-93	Rettungsdienst bei der Feuerwehr Detmold
Studium:	April 1994 -:	Studium der Humanmedizin an der Justus-
	November 2000	Liebig-Universität, Gießen
	April 1996:	Physikum
	April 1997:	Erstes Staatsexamen
	seit April 1997:	Mitarbeit im Labor Prof. Vogel im Physiologischen Institut der JLU, Gießen
	September 1999:	Zweites Staatsexamen
	November 2000:	Drittes Staatsexamen
Beruf:	seit Januar 2001	Arzt im Praktikum, Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie am Klinikum Lippe Detmold

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. Michael E. Bräu

für eine hervorragende Anleitung zu wissenschaftlicher Arbeit in einem ungewöhnlichen Arbeitsklima

Prof. Dr. Werner Vogel

für fachliche und nichtfachliche Gespräche in allen Lebenslagen

allen im Labor beteiligten sichtbaren und unsichtbaren Helfern

für fruchtbare Diskussionen, lustige Gespräche und eine tolle Stimmung

Martin

für lustige Stunden während und nach der Laborarbeit

meinen Eltern

für die Ermöglichung meines bisherigen Weges