

Die Wirkung von Pethidin und Lidocain an Tetrodotoxin-resistenten  
Natriumkanälen isolierter Spinalganglienzellen der  
erwachsenen Ratte

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

vorgelegt von Schorer, Eva Lili  
aus Werther / Westfalen

Gießen 2004

Aus der Medizinischen Betriebseinheit  
Physiologisches Institut  
Leiter: Prof. Dr. Dr. Pieper  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. med. Michael E. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. Skrandies

Tag der Disputation: 02.06.2004

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Aussagen beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir aufgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

# Index

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Schmerzdefinition.....	1
1.2	Geschichtliche Gesichtspunkte der Schmerztherapie.....	1
1.3	Die Physiologie der Nozizeption.....	2
1.4	Elektrophysiologie .....	3
1.4.1	Das Ruhepotential .....	3
1.4.2	Das Aktionspotential .....	4
1.4.3	Erregungsleitung .....	5
1.5	Der Natriumkanal .....	5
1.6	Lokalanästhetika .....	7
1.6.1	Wirkweise von Lokalanästhetika .....	7
1.6.2	Lidocain .....	8
1.7	Opioide .....	9
1.7.1	Opioidrezeptoren .....	9
1.7.2	Pethidin (Meperidin) .....	10
1.7.3	Pethidin als Lokalanästhetikum .....	11
1.8	Fragestellung .....	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	Die Patch-Clamp-Technik .....	13
2.2	Elektrophysiologische Technik .....	14
2.3	Datenerhebung und -verarbeitung .....	15
2.4	Präparation .....	15
2.5	Toxine und Kanal-modifizierende Substanzen .....	16
2.6	Applikation der Lösungen .....	18
2.7	Pipetten .....	18
2.8	Statistische Analysen .....	19
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
3.1	Zellkapazität und Zellgröße .....	21
3.2	Aktivierung und Inaktivierung .....	22
3.3	Use-dependent Block und Konzentrationsabhängigkeit der Strominhibition .....	23
3.4	Dynamische Blockierung .....	25
3.5	Kompetitionsexperimente .....	26
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>29</b>
4.1	TTX-resistente Natriumströme .....	30
4.2	Blockierungseigenschaften von Lidocain und Pethidin .....	30
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>35</b>

<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>37</b>
8.1	Verwendete Lösungen.....	37
8.1.1	Außenlösungen.....	37
8.1.2	Innenlösung.....	38
8.1.3	Präparationslösungen.....	38
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>40</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>41</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>45</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>46</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Schmerzdefinition

Eine Gruppe von Forschern, die sich mit Schmerzen befassen, kurz IASP (International Association for the Study of Pain) beschrieb den Schmerz im Jahr 1979 wie folgt:

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“

(International Association for the Study of Pain, 1979)

Schmerz ist unter diesem Blickwinkel mehr als die reine Wahrnehmung von Reizen. Mit der Definition werden emotionale Aspekte des Schmerzgeschehens von Schmerzen durch sensorische Wahrnehmungsprozessen unterschieden. Außerdem sagt diese Definition aus, dass Schmerzen dann auftreten, wenn Körpergewebe so stark gereizt werden, dass eine Schädigung droht oder auftritt.

## 1.2 Geschichtliche Gesichtspunkte der Schmerztherapie

Opium wird aus dem eingetrockneten Saft der Kapsel bzw. des Strohs des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) gewonnen. Erstmals injizierte Sir Wren (1633 – 1723) 1655 im Tierversuch eine Opiumtinktur einem Hund intravenös. 1806 gelang dem Paderborner Apotheker Sertürner die Isolierung des Morphiums aus Opium. Er benannte das erste Pflanzenalkaloid nach Morpheus, dem griechischen Gott der Träume. Der Gehalt an Morphin im Opium beträgt ca. 10 – 12%. Es folgte im 20. Jahrhundert die Entwicklung zahlreicher halb- und vollsynthetischer Opiode, ohne die die moderne Anästhesie und Schmerztherapie nicht denkbar wäre.

Die Wurzeln der modernen Lokalanästhesie reichen nicht so weit zurück, weil es an Mitteln und Methoden fehlte.

Der Augenarzt Koller aus Wien, Freund von Sigmund Freud, demonstrierte 1884 in tierexperimentellen Versuchen die schon früher beobachteten lokalanästhetischen Effekte des Kokains und setzte die von ihm standardisierten Lösungen bei Operationen am Auge erfolgreich ein. Bei Experimenten von Corning 1885 wurde im Zusammenhang mit Injektionen im Rückenbereich vermutlich die erste Periduralanästhesie eher zufällig durch Eindringen von Kokain in den Periduralraum erreicht. 1892 wurde von Schleich erstmalig über die Infiltrationsanästhesie mit Kokain berichtet und in der damals weit verbreiteten Publikation „Schmerzlose Operationen“ niedergelegt. Mit der Synthese von Novocain 1904 durch Einhorn wurde der Durchbruch für die Lokalanästhesie erreicht.

Die Schweden Löfgren und Lundqvist führten in den 30er Jahren zahlreiche Experimente durch und hatten 1947 Lidocain, als erstes Amidlokokalanästetikum, hergestellt.

### ***1.3 Die Physiologie der Nozizeption***

Schmerz ist ein unangenehmer Sinneseindruck, der durch mechanische, thermische oder chemische Gewebstraumata ausgelöst werden kann. In allen Organen des menschlichen Körpers finden sich Nozizeptoren. Diese Sinnesrezeptoren haben eine so hohe Erregungsschwelle, dass sie nur durch gewebeschädigende oder gewebebedrohende Reize aktiviert werden. Ihr häufiges Auftreten unterstreicht die Wichtigkeit des Schmerzes für das Überleben. In der Haut des Menschen befinden sich Nozizeptoren, welche sowohl auf mechanische (z.B. Nadelstich) als auch auf chemische und thermische Reize reagieren. Diese Eigenschaft bezeichnet man als polymodal. Algetisch wirksame Substanzen wie Histamin, Kalium oder Bradikinin stimulieren die Nozizeptoren, Prostaglandine setzen die Reizschwelle an den Nozizeptoren herab. Dünne myelinisierte A $\delta$ - Fasern leiten den hellen, gut lokalisierbaren Schmerz. Sie besitzen eine Leitungsgeschwindigkeit von etwa 2,5 bis 20 m/s. Den langsamen, nichtmyelinisierten C- Fasern (Leitungsgeschwindigkeit: ca. 1 m/s) wird der dumpfe, unangenehme, schlecht lokalisierbare Schmerz zugeschrieben.

Die Umschaltung auf Interneurone, ipsilateral über den Tractus spinocervicalis und kontralateral über den Tractus spinothalamicus, erfolgt in der Substantia gelatinosa des Hinterhorns. Kollateralen in der Formatio reticularis beeinflussen die Aktivität von Neuronen, die die vegetativen Funktionen steuern. Zudem beeinflussen deszendierende Bahnen die nozizeptiven Afferenzen durch eine präsynaptische Hemmung der Erregungszufuhr und modulieren so den Schmerz auf Rückenmarksniveau. Gleichzeitig werden motorische und

vegetative Reflexe ausgelöst. Während der Verschaltung im Rückenmark kann das Schmerzempfinden durch körpereigene Stoffe (Endorphine) reduziert werden. Einige Schmerzmittel, z. B. Opiate setzen an dieser Stelle an. Vom Thalamus gehen die Schmerzinformationen zum Endhirn, zum Hypothalamus und zur Hypophyse. Das limbische System verleiht der Schmerzempfindung Qualität und Bedeutung. In der Großhirnrinde wird der Schmerz bewußt gemacht, lokalisiert und quantitativ bewertet. Hier werden nun auch zielgerichtete Handlungen zur Schmerzabwehr eingeleitet. Der wichtigste erregende Transmitter ist das Glutamat mit seinen unterschiedlichen postsynaptischen Rezeptoren. Verschiedene Peptide, welche als Neuromodulatoren wirken, sind mit dem Glutamat kolokalisiert. Die endogenen Opiode wirken hemmend auf das zentrale nozizeptive System. Sie bilden ein endogenes analgetisches System.

Diese Arbeit beschäftigte sich ausschließlich mit der Wirkung von Pethidin und Lidocain bezogen auf das periphere Nervensystem.

## ***1.4 Elektrophysiologie***

### ***1.4.1 Das Ruhepotential***

Erregbare Zellen besitzen ein Ruhepotential, dem eine unterschiedliche ionale Zusammensetzung des Extra- und Intrazellulärraumes zugrunde liegt. Kalium ist das häufigste intrazelluläre Ion, während Natrium im Extrazellulärraum überwiegt. Das Ruhepotential ist weitgehend ein Kalium-Diffusionspotential und wird in erster Linie von dem Konzentrationsgradienten für Kalium über die Membran bestimmt. Nervenzellen besitzen ein Ruhepotential von  $-70$  bis  $-90$  mV. Durch energieverbrauchende Transportmechanismen, die Ionen gegen ihren elektrochemischen Gradienten bewegen, werden Ionengradienten über der Zellmembran aufgebaut. Die ungleiche Ionenverteilung aufgrund der Natrium-Kalium-Pumpe, welche Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in die Zelle transportiert. Der so aufgebaute Gradient würde sich durch Diffusion ausgleichen. Da die Verschiebung geladener Teilchen ein elektrisches Feld aufbaut, das dem Diffusionsdruck entgegenwirkt, entsteht letztlich ein Gleichgewicht zwischen elektrischen und chemischen Gradienten. Negativ geladene, intrazelluläre Proteine können die Doppellipidmembran nicht überwinden, es verbleiben somit negative Ladungen im Zellinneren. Das Gleichgewichtspotential ( $E_G$ ) kann für einzelne Ionen mit der Nernstschen Gleichung bestimmt werden:



$$E_G = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \cdot \ln \left( \frac{[Ion]_{\text{au\ss en}}}{[Ion]_{\text{innen}}} \right)$$

$E_G$  = Gleichgewichtspotential des Ions (V)

R = allgemeine Gaskonstante 8,31451 (J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup>)

F = Faraday-Konstante 9,6485 (C·mol<sup>-1</sup>)

T = Temperatur (K)

z = Wertigkeit des Ions

Somit ergibt sich bei Raumtemperatur (T= 23°) für Natrium ein Gleichgewichtspotential von +67,5 mV und für Kalium von -84,7 mV, wenn man für die Spinalganglienzelle folgende Ionenkonzentrationen zugrunde legt: [NA<sup>+</sup><sub>i</sub>]: 10 mmol/l, [NA<sup>+</sup><sub>a</sub>]: 141 mmol/l,

$$[K^+{}_i] : 155 \text{ mmol/l}, [K^+{}_a] : 5,6 \text{ mmol/l}$$

(Kostyuk et al., 1981).

Auf diese Weise ergibt sich für Natriumionen eine einwärts-, für Kaliumionen eine auswärtsgerichtete Kraft. Die Ionenungleichverteilung liefert die potentielle Energie für die Impulsweiterleitung. Nervenimpulse sind fortgeleitete Aktionspotentiale.

### **1.4.2 Das Aktionspotential**

Unter einem Aktionspotential versteht man die rasche Depolarisation vom Ruhepotential zu positiven Potentialen, die selbsttätig mit für den Zelltyp typischem Zeitverlauf zum Ruhepotential repolarisieren. Beim Aktionspotential wird ein positiver Spitzenwert von etwa +60 mV erreicht, die Dauer hierfür liegt beim Nerv bei ca. 1 ms. In der Aufstrichphase beginnt die schnelle positive Potentialänderung durch eine erhöhte Natriumleitfähigkeit. Hierdurch erreicht das Membranpotential kurzfristig die Nähe des Natriumgleichgewichtspotentials. Verzögert steigt bei der Depolarisation auch die Kaliumleitfähigkeit, die mit dem Kaliumausstrom die Repolarisation einleitet. Nach einem Aktionspotential zeigt sich die Membran für etwa 2 ms nicht erregbar. In dieser absoluten Refraktärphase ist das Natriumkanalsystem noch inaktiviert. Während der nun folgenden Phase ist die Zelle relativ refraktär, nur durch starke Depolarisationen können Potentiale verminderter Amplitude ausgelöst werden.

### **1.4.3 Erregungsleitung**

Durch den Natriumeinstrom beim Aktionspotential wird eine direkte Membranentladung auch in benachbarten Axonregionen erzielt. Nach Erreichen der Schwelle können nun weitere Aktionspotentiale und somit eine Weiterleitung der Erregung evoziert werden. Faserdurchmesser, Membranwiderstand und Membrankapazität wirken auf die elektrotonische Ausbreitung und somit auf die Leitgeschwindigkeit. C-Fasern, marklose Hautefferenzen der Nozizeptoren, erreichen einen Faserdurchmesser von 1  $\mu\text{m}$  und erzielen eine Leitgeschwindigkeit von etwa 1 m/s. Deutlich schneller (ca. 100 m/s) leiten die myelinisierten A $\alpha$ - Fasern (ca. 15  $\mu\text{m}$  Durchmesser), die als primäre Muskelspindelafferenzen fungieren. An derartigen Fasern wirken die Markscheiden als Isolatoren. Die Myelinscheide wird im Abstand von 1-2 mm unterbrochen, an diesen „Ranvierschen Schnürringen“ liegt die Membran frei. Hier springt das Aktionspotential von Schnürring zu Schnürring, man spricht bei dieser Art der Erregungsleitung auch von „saltatorischer Leitung“. An den Schnürringen selbst laufen die gleichen Erregungsprozesse ab wie an den marklosen Nervenfasern. Durch die saltatorische Erregungsleitung wird die Nervenleitgeschwindigkeit hingegen beträchtlich erhöht.

### **1.5 Der Natriumkanal**

Ionenkanäle ermöglichen einen selektiven Übertritt bestimmter Ionen durch die sonst impermeable Lipiddoppelschicht. Aufgrund seiner entscheidenden Bedeutung für die Entstehung und Weiterleitung des Aktionspotentials wurde der Natriumkanal am eingehendsten untersucht. Der Natriumkanal ist ein membrandurchspannendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 300.000. Durch Tetrodotoxin, das am Natriumkanal bindet, kann die Zahl von Natriumkanälen bestimmt werden. Je nach Membran finden sich bis zu 50 Kanäle pro  $\mu\text{m}^2$  bei einem Kanalabstand von etwa 140 nm. Ein Kanalmolekül hat einen Durchmesser von ca. 8 nm groß und besitzt eine Kanalöffnung von etwa 0,5 nm (Schmidt & Thews & Lang, 2000). Der Natriumkanal ist selektiv, passieren können den Selektivitätsfilter nur Ionen gleicher Ladung und Größe. Der Kanal gewährleistet durch spezifische Bindungen während des Durchtritts einen raschen Natriumionenfluß bei gleichzeitiger Verminderung der Kaliumpassage. Kleine Kationen wie Lithium passieren den Natriumkanal gut.

Der molekulare Aufbau des Natriumkanals erklärt die Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnungen. Es wird spekuliert, dass die verschiedenen Kanalproteine alle vom Kalziumkanal abstammen. Vergleichbar den spannungsabhängigen Kalium- und Kalziumkanälen verfügt das Molekül des Natriumkanals über sogenannte Domänen, Untereinheiten des eigentlichen Kanalproteins. Eine Domäne weist sechs Segmente auf. Diese, die Membran querenden  $\alpha$ -Helices, sind durch extra- und intrazelluläre Aminosäureketten verbunden. Jeweils vier Domänen lagern sich bei Natrium- und Kalziumkanälen zusammen und bilden einen Kanal. In jeder Domäne enthält Segment 4 eine  $\alpha$ -Helix, in der sich wiederholt eine positiv geladene mit zwei hydrophilen Aminosäuren abwechseln. Änderungen der Membranspannung üben auf die geordnete, geladene Struktur Kräfte aus, die offenbar den räumlichen Aufbau des Moleküls so ändern, daß sich der Kanal öffnet oder schließt. Man kann beim Öffnen der Kanäle den sogenannten Torstrom messen, der der Ladungsverschiebung im Molekül entspricht. Werden die geladenen Aminosäuren in den  $\alpha$ -Helices in Segment 4 durch Mutagenese gegen ungeladene ausgetauscht, beeinflusst dies stark die Spannungsabhängigkeit des Kanals.

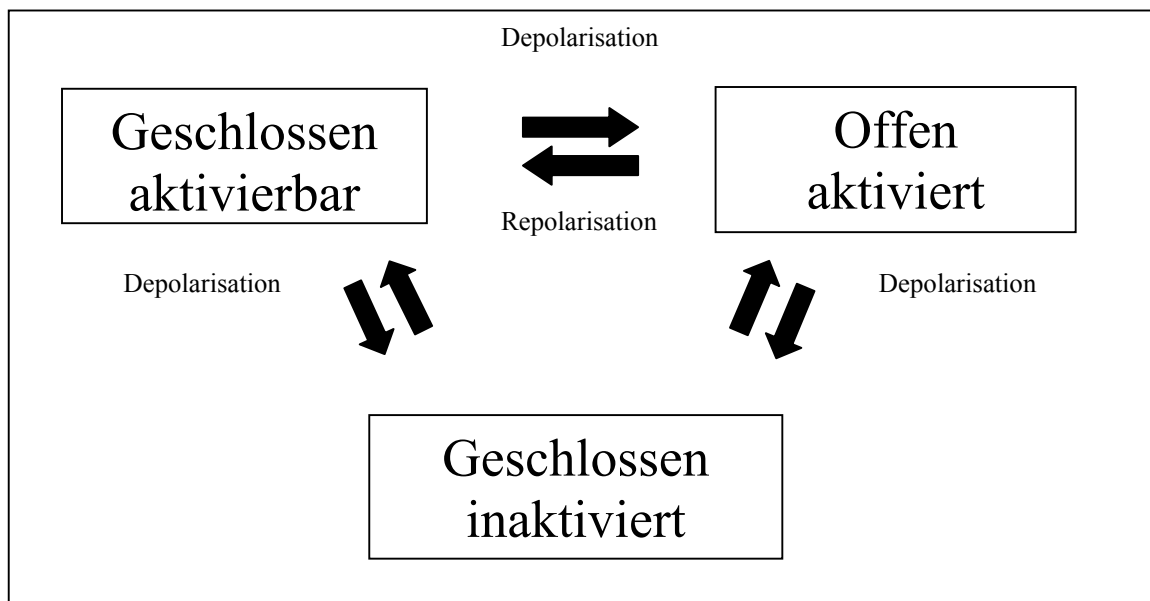
Die Inaktivierung des Natriumkanals geschieht durch eine intrazelluläre Kette von Aminosäuren zwischen Motiv III und IV. Diese Kette legt sich nach Aktivierung des Kanals in die geöffnete Pore und verschließt sie von innen (Eaholtz et al., 1994). Hierbei kommt der Aminosäuresequenz Isoleucin-Phenylalanin-Methionin (IFM) innerhalb dieser Kette entscheidende Bedeutung zu, da diese Sequenz die Bindung mit dem geöffneten Kanal eingeht. Die Inaktivierung kann durch intrazellulär applizierte proteolytische Enzyme aufgehoben werden, und ganz spezifisch kann sie durch Antikörper, die an das IFM-Motiv der Kette binden, blockiert werden.

Die Spannungsabhängigkeit des Natriumkanals sowie die dessen Inaktivierung können also genau definierten Molekülanteilen zugeordnet werden.

Es werden drei Zustandsformen des Natriumkanals unterschieden (Abbildung 1):

- ◆ ruhend und geschlossen
- ◆ aktiviert und offen
- ◆ inaktiviert und geschlossen

Die Öffnung der Natriumkanäle ist spannungsabhängig: Die Depolarisation der Membran führt zu Konformationsänderungen im Molekül, der zuvor ruhende Kanal öffnet sich, und die Natriumionen können ungehindert einströmen (Kanal aktiviert und offen). Bei anhaltender Depolarisation geht der Kanal in den inaktivierten und damit wieder geschlossenen Zustand über. Erst nach Repolarisation kann der Kanal wieder in den ruhenden, für die Passage von Natriumionen geschlossenen Zustand übergehen.



**Abb. 1:** Schema der Zustände der Natriumkanäle. Der Zustand „geschlossen aktivierbar“ kann bei Depolarisation in die Zustände „offen aktiviert“ oder „geschlossen inaktiviert“ übergehen. Auch aus dem „offen aktivierten“ Zustand fördert anhaltende Depolarisation den Übergang in den „geschlossen inaktivierten“ Zustand. Nur durch Repolarisation kann der Kanal schließlich in den „geschlossen aktivierbaren“ Zustand zurückkehren.

## 1.6 Lokalanästhetika

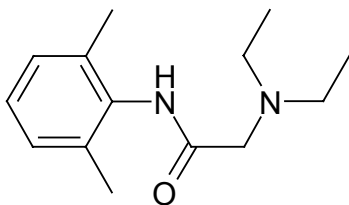
### 1.6.1 Wirkweise von Lokalanästhetika

Lokalanästhetika gelangen über die Innenseite der Membran zur axoplasmatischen (intrazellulären) Öffnung des Natriumkanals und führen dort zu elektrochemischen Veränderungen, durch die der Einwärtsstrom von Natriumionen durch den Kanal blockiert

wird. Nach derzeitiger Auffassung diffundiert das ungeladene, basische Lokalanästhetikum zunächst durch die Nervenmembran ins Axoplasma, dissoziiert dort in die geladene, kationische Form, die sich schließlich an die Bindungsstelle des Natriumkanals heftet und den Kanal in seiner inaktiviert- geschlossenen Form stabilisiert. Hierdurch wird die Umwandlung des Kanals in den ruhend- geschlossenen und den aktiviert-offenen Zustand als Reaktion auf den Nervenimpuls verhindert. Nur die kationische Form des Lokalanästhetikums kann diesen Block hervorrufen, nicht hingegen die ungeladene. Die einzelnen Lokalanästhetika weisen eine unterschiedliche Frequenzabhängigkeit der Blockade auf, je nach  $pK_a$ -Wert, Lipidlöslichkeit und Molekülgröße. Eine wichtige Rolle spielt auch die Geschwindigkeit der Dissoziation von der Bindungsstelle im Natriumkanal. Rasch dissoziierende Lokalanästhetika benötigen eine höhere Frequenzstimulation als langsamer dissoziierende. Die Frequenzabhängigkeit der Blockade spielt vor allem bei den Antiarrhythmika eine Rolle. Für Natriumkanäle ist die bekannteste spezifisch blockierende Substanz das Tetrodotoxin (TTX). TTX blockiert im Gegensatz zu Lokalanästhetika spannungsabhängige Natriumkanäle von der extrazellulären Seite und führt damit zur Abnahme der Stromamplitude.

### 1.6.2 Lidocain

Nach der Extraktion des Alkaloids Erythroxyton durch Gaedecke (1855) und der Isolierung des Cocains durch Niemann (1860) stand ab 1884 erstmalig das von Koller eingesetzte Lokalanästhetikum Cocain zur Verfügung. Nebenwirkungen wie Suchterscheinungen und Allergie forderten Neuentwicklungen des Benzoesäureesters Cocain. Lidocain (2-Diethylamino-2',6'-dimethylacetanilid) (Abbildung 2) wurde 1943 durch den Stockholmer Löfgren präsentiert. Das Amidderivat der Diethylaminoacetsäure zeigte eine deutlich reduzierte Allergierate.



**Abb. 2:** Strukturformel von Lidocain

Lidocain wird auch als membranstabilisierendes Antiarrhythmikum (Klasse Ib) zur Akutbehandlung ventrikulärer Extrasystolen und ventrikulärer Tachykardien eingesetzt. Als Nebenwirkungen sind Schwindel, Somnolenz, Krämpfe und Blutdruckabfälle bekannt.

## **1.7 Opiode**

### **1.7.1 Opioidrezeptoren**

Inzwischen sind drei Opioidrezeptoren bekannt ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ), die unterschiedliche, hauptsächlich zentrale Wirkungen auslösen.

Ihre Namen leiten sich von den Namen der Substanzen ab, die zur jeweiligen Identifizierung der Wirkungen führten (z.B.  $\mu$  für Morphin,  $\kappa$  für Ketocycloacocin,  $\delta$  für Dynorphin). Obwohl die Resultate biochemischer und pharmakologischer Untersuchungen zeigen, dass sich die drei Rezeptoren als eigenständige Moleküle voneinander unterscheiden, weisen alle drei Klassen doch gemeinsame Charakteristika auf.

Die Besetzung aller drei Rezeptoren bewirkt vorrangig eine inhibitorische Modulation der Übertragung von Neurotransmittern an den Synapsen im zentralen Nervensystem und im Plexus mesentericus. Die Opioidrezeptoren sind hauptsächlich in den einzelnen Hirnarealen und im Rückenmark in unterschiedlicher Verteilung lokalisiert, sie konnten aber auch an den peripheren Nervenendigungen nachgewiesen werden, wo ihre Aktionen zur Veränderung der Freisetzung von Neurotransmittern führen.

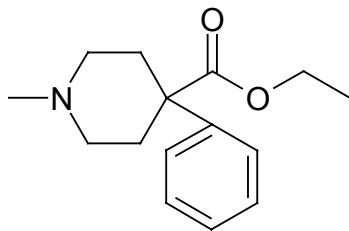
Entsprechend ihrer Wirkung am Rezeptor werden die Opiode in drei Gruppen eingeteilt:

- Agonisten vom Morphintyp, die hauptsächlich am  $\mu$ -Rezeptor agonistische Wirkungen ausüben
- Antagonisten wie Naloxon ohne jede agonistische Wirkung an allen Rezeptoren
- Opiode vom „Mischtyp“ mit (partieller) agonistischer und gleichzeitig antagonistischer Wirkung.

### 1.7.2 Pethidin (Meperidin)

Das synthetische Opioid Pethidin hat die agonistischen Eigenschaften des Morphins, es hemmt aber auch die Noradrenalinwiederaufnahme an den Nervenendigungen und weist parasymphatische Wirkungen auf. Pethidin (Abbildung 3) wurde 1939 von Eisleb und Schaanmann eingeführt. Das zur Reihe der Phenylpiperidine gehörende Pethidin wird chemisch als 1-Methyl-4-phenyl-4-piperidincarbonsäureethylester ( $C_{15}H_{21}NO_2$ ) bezeichnet. Pethidin hat ein Molekulargewicht von 247,34 g/mol, mit einem  $pK_a$ -Wert von 8,7 ist es eine leichte Base.

Die analgetische Wirkung von 100 mg i.m. entspricht in etwa der von 130 mg Kodein oder 10 bis 15 mg Morphin. In analogen therapeutischen Dosierungen erzeugt Pethidin in gleicher Weise Sedation, Atemdepression und Euphorie wie Morphin. Die Obstipation soll weniger ausgeprägt sein. Nach intramuskulären Applikationen wird ein schneller Wirkeintritt und eine Wirkdauer von nur 2 – 3 Stunden festgestellt. Pethidin eignet sich zur kurzfristigen Schmerzbehandlung bei Patienten mit postoperativen mittelstarken bis starken Schmerzen, vor allem nach Eingriffen im Viszeralbereich.



**Abb. 3:** Strukturformel von Pethidin

Pethidin wird gut enteral resorbiert, die orale Bioverfügbarkeit beträgt 50 – 80%. Plasmakonzentrationen von 100 – 800 ng/ml (0,4 – 6,4  $\mu\text{mol/l}$ ) gewährleisten Analgesie. Die Plasmaproteinbindung liegt bei etwa 60%, das Verteilungsvolumen beträgt 3,2 l/kg Körpergewicht. Pethidin wird nur zu einem geringen Anteil unverändert ausgeschieden. Der Abbau erfolgt durch N-Demethylierung zu Norpethidin, welches pharmakologisch noch aktiv ist und ebenfalls analgetisch wirkt. Nach Konjugation erfolgt die renale Ausscheidung. Vergleicht man die Strukturformeln von Pethidin und Lidocain, zeigen beide Substanzen einen lipophilen Ring sowie ein tertiäres Amin. Pethidin existiert im Handel in Form von Ampullen, Suppositorien und Tropfen.

### **1.7.3 Pethidin als Lokalanästhetikum**

Pethidin wird neben seiner hochspezifischen Bindung am Opiodrezeptor auch eine lokalanästhetische Wirkung an der peripheren Nervenmembran zugeschrieben.

Pethidin reduziert bei einer Konzentration von 0,4  $\mu\text{mol/l}$  die Fähigkeit des Froschnervs (*Nervus ischiadicus* von *Rana pipiens* und *Rana catesbeiana*) auf tetanische Stimulation zu reagieren (Krivoy, 1960). Ab einer Konzentration von 4  $\mu\text{mol/l}$  wird ein verlängertes aufsteigendes positives Nachpotential erzeugt. Hunter und Frank beschrieben eine verminderte Natriumleitfähigkeit als Resultat der Wirkung von 300  $\mu\text{M}$  Pethidin auf das Summenaktionspotential des Nervens. Sie dokumentierten die geringere Anstiegssteilheit und die Amplitudenabnahme des Summenaktionspotentials (Hunter & Frank 1979).

Eine Verminderung der Höhe des Aktionspotentials wurde bei einer Applikation von 100  $\mu\text{g/ml}$  (404  $\mu\text{mol/l}$ ) Pethidin am isolierten *Nervus vagus* des Kaninchens von Kosterlitz und Wallis (Kosterlitz & Wallis, 1964) nachgewiesen. Die Amplitude reduzierte sich bei A- und B-Fasern um 20 – 30%, bei C-Fasern um 20 – 40%. Ebenso wurde eine Minderung der Leitgeschwindigkeit von C-Fasern um 10 – 15% durch Pethidin beschrieben.

Jaffe und Rowe untersuchten die Wirkung von Pethidin am Hinterwurzelaxonen: 705  $\mu\text{mol/l}$  Pethidin führten in 61,5% zu einem Leitungsblock der Einzelfaseraktionspotentiale nach 0,4 bis 15 Minuten, an den übrigen Fasern kam es zur Abnahme der Leitgeschwindigkeit (Jaffe & Rowe 1996).

### **1.8 Fragestellung**

Lokalanästhetika zeigen eine komplexe Interaktion mit spannungsabhängigen Natriumkanälen. Pethidin entfaltet seine lokalanästhetische Wirkung ebenfalls über die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle und hat damit den gleichen Wirkmechanismus wie Lokalanästhetika. Unklar war bislang jedoch ob Pethidin auch TTX-resistente Natriumkanäle, die für die Impulsentstehung und -weiterleitung im peripheren nozizeptiven System verantwortlich sind, beeinflusst.

Ziel der Arbeit war daher die Untersuchung der Interaktion des Opioides Pethidin mit TTX-resistenten Natriumströmen an isolierten Spinalganglienzellen der Ratte im Vergleich mit dem klassischen Lokalanästhetikum Lidocain. Besonders die Interaktion des Blockers mit



verschiedenen Zustandsformen des Natriumkanals, sowie die Frage der Bindungsstelle am Kanalmolekül waren hier von Interesse.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Die Patch-Clamp-Technik

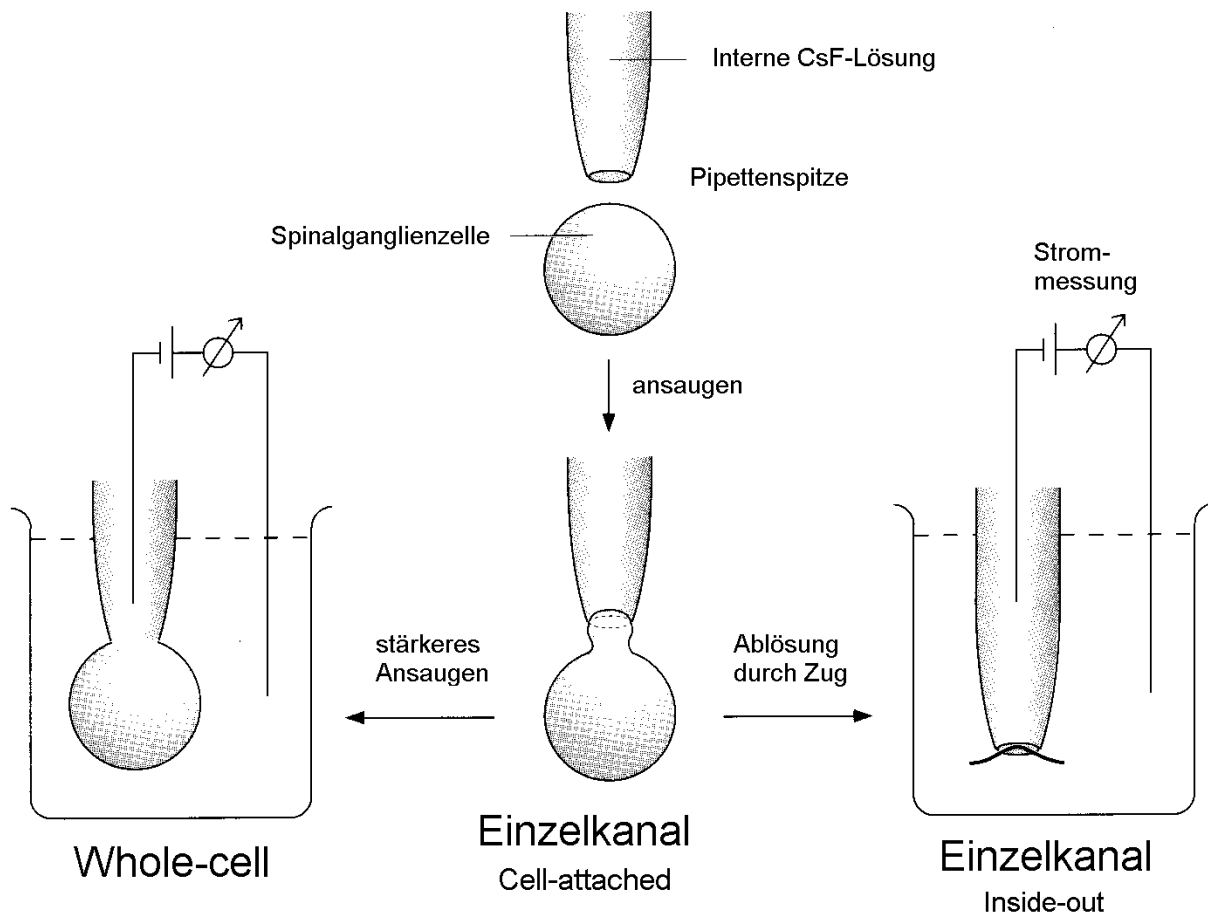
Mit dem Prinzip einer Membranflechklemme oder „patch-clamp“ kann man die molekularen Reaktionen der Einzelkanäle als Grundlage für die Potential- und Zeitabhängigkeit der Ionenströme erkennen.

Die Patch-clamp-Methode wurde 1976 erstmalig durch Neher und Sakmann beschrieben (Neher & Sakmann, 1976), 1981 entwickelte die Arbeitsgruppe um Neher und Sakmann eine hochauflösende Form (Hamill *et al.*, 1981).

Bei dieser Methode wird die Spitze einer Glaspipette auf eine Zellmembran gedrückt und somit eine Dichtung („Seal“) mit einem Widerstand im Gigaohmbereich („Gigaseal“) hergestellt. Hiermit gelingt die elektrische Isolierung eines Membranflecks, bzw. einzelner Ionenkanäle, von ihrer Umgebung.

Über einen Klemmverstärker wird mittels einer Regelschaltung eine elektrische Spannung („Sollspannung“) im Inneren der Pipette erzeugt. Der Klemmstrom entspricht den durch den Membranfleck fließenden Strömen und repräsentiert somit den Ionenstrom der Membran. Neben den zellgebundenen Patchformen „Whole-cell“ und „Cell-attached“ bestehen die zellfreien Techniken „Inside-out“ und „Outside-out“ (Abbildung 4). Durch Zurückziehen der Pipette nach Erlangen der „Cell-attached“-Konfiguration erhält man durch Lösung eines Membranflecks („Patch“) den „Inside-out-Patch“. Bei Erzeugen eines starken Unterdruckes wird ein Loch in die Zellmembran gerissen – man erhält so die „Whole-cell-Patch“-Konfiguration, die durch vorsichtiges Zurückziehen der Pipette in den „Outside-out-Patch“ übergeht.

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die „Whole-cell-Patch“-Methode. Gemessen werden hierbei Gesamtionenströme ohne die Möglichkeit des Zugriffes auf den einzelnen Ionenkanal. Durch den elektrischen Zugang zur Intrazellulärseite der Zelle können einerseits das Gesamtpotential der Zelle oder bei Vorgabe eines Festpotentials („voltage clamp“) die Gesamtionenströme durch die Zellmembran gemessen werden. Die „Whole-cell“-Technik bietet somit eine Möglichkeit, Veränderungen von Ionenströmen durch die Applikation verschiedener Pharmaka und Toxine zu messen.



**Abb. 4:** Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik

## 2.2 Elektrophysiologische Technik

In dieser Studie kam der „Patch-clamp“ – Verstärker Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) zum Einsatz. Mittels eines chlorierten Silberdrahtes wurde dessen Eingang mit der „Patch“-Pipette verbunden. Zur Unterdrückung hochfrequenten Rauschens wurden die erfassten Ströme nach Passage eines 2 bis 10 kHz – Tiefpassfilters digitalisiert (AD-Wandler, Labmaster TM-40 AD/DA board, Scientific Solutions, Solon, OH, USA) und zur weiteren softwaregestützten Verarbeitung auf die Festplatte eines Personal Computers (386 DX-40MHz, VGA, Win 95) gespeichert.

Unter Zuhilfenahme eines inversen Mikroskops (Modell IM, Zeiss, Oberkochen, Bundesrepublik Deutschland, 63 – 400x) gelang das Durchmusteren der Präparateschalen bis hin zum Aufsetzen der Pipetten auf die Zellmembran.

Als Steuerelement des Pipettenhalters fungierte der 3-achsige Mikromanipulator (HS6/2, Maerzhäuser, Wetzlar, Bundesrepublik Deutschland), der über eine Steuereinheit (MAC

4000, Firma Maerzhäuser) in zwei motorbetriebenen Achsen positioniert werden kann. Der Pipettenhalter wurde in einem Winkel von 45° zum Präparat justiert. Zur Suche der Spinalganglienzellen konnte der Objektivtisch in der Horizontalebene verschoben werden, druckgesteuerte Dämpfungselemente gewährleisteten einen schwingungsgedämpften Tisch (IsoStation Vibration Isolated Workstation, Newport, Irvine, CA, USA).

Die Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  durchgeführt. Bei allen Registrierungen wurde eine Serienwiderstands- und Kapazitätenkompensation vorgenommen.

### **2.3 Datenerhebung und –verarbeitung**

Verschiedene Computerprogramme wurden zur Datenverarbeitung eingesetzt. Die Datenerfassung erfolgte mittels pClamp Version 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Dieses ermöglichte den Einsatz festgelegter Impulsprotokolle.

Das Programm ClampFit 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) diente in der Datenverarbeitung der Ermittlung der Spitzenströme.

Zur Erstellung der Graphiken und statistischen Bearbeitung kam FigP 2.5 (Biosoft, Cambridge, England) zur Anwendung.

Aus den Meßergebnissen wurden Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the mean / Standardfehler des Mittelwertes) berechnet.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven und Strom-Spannungs-Kurven wurden nicht-linear durch die Funktion der Summe der kleinsten Abweichungsquadrate (nonlinear least squares fit) dargestellt.

### **2.4 Präparation**

Die in den Versuchen eingesetzten Spinalganglienzellen entstammten Wistar-Ratten aus eigener Zucht. Die 6 – 8 Wochen alten Tiere beiderlei Geschlechts wogen 200 – 300 g. Die Ratten wurden nach Commotio durch plötzliche zervikale Dislokation getötet. Nach Gewinnung der Spinalganglien wurden diese unmittelbar in die externe Calcium- und Magnesiumfreie Tyrode-Lösung (siehe Kapitel 2.5) eingelegt. Die von Nervenfasern und Bindegewebe weitgehend unter Mikroskop befreiten Ganglien wurden nun 30 Minuten lang bei konstant  $37 \pm 0,4^\circ \text{C}$  (durch Kühlsystem Colora WK3, Colora, Meßtechnik, Lorch,

Bundesrepublik Deutschland) in der Enzymlösung I, bestehend aus Kollagenase und Trypsin, inkubiert. Während Trypsin die Peptidbindungen spaltet, löst Kollagenase die Zellen aus dem Gewebeverband. Eine optimale Einwirkung der Enzymlösung wurde durch horizontale Schüttlung (~ 110 /min) gewährleistet.

Danach folgte das dreimalige Auswaschen der Enzyme durch die Calcium- und Magnesiumfreie externe Tyrode. Hiernach wurden die Ganglien mit der Enzymlösung II (DNAse und Trypsin-Inhibitor) versetzt, welche nach 5 Minuten Einwirkzeit durch Spülung mit Calcium- und Magnesiumhaltiger externer Tyrode gereinigt wurden.

Nach Überführung der enzymatisch behandelten Spinalganglien in das Nährmedium erhielt man nun die einzelnen Spinalganglienzellen durch wiederholtes Ansaugen und Ausstoßen mittels dreier Glaspipetten abnehmenden Durchmessers.

Für den weiteren Gebrauch erfolgte die Aufteilung und Aufbewahrung der Zellen in 4 – 6 mit Nährmedium gefüllten Kulturschalen (TC, 35,0/10mm, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Bundesrepublik Deutschland) bei 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von 24°C. Unter Carbogengasatmosphäre konnte der pH-Wert der Nährlösung im Inkubator bei  $7,4 \pm 0,1$  eingestellt werden. Die „Whole-cell-Patch-clamp“-Technik kann nach ~ 2 Stunden Sintern der Zellen zum Schalenboden erfolgen. Bis zum 3. Tag post praeparationem sind konstante Eigenschaften der Natriumströme nachweisbar.

Die zur Gewinnung und Weiterbearbeitung der Spinalganglienzellen benötigten Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

## **2.5 Toxine und Kanal-modifizierende Substanzen**

### **◆ Tetraethylammonium (TEA)**

Tetraethylammonium, ein quarternäres Ammoniumatom, gilt als der klassische Blocker potentialabhängiger Kaliumströme an Nervenmembranen. Er dient somit im wesentlichen zur Isolierung des Natriumstroms. Erstmals wurde dieser Effekt von Tasaki und Hagiwara (Tasaki & Hagiwara, 1957) am Tintenschneckenriesenaxon beschrieben. TEA zeigt in einem Konzentrationsbereich von wenigen mmol pro Liter diese spezifische Wirkung sowohl an der Außen- wie auch an der Innenseite der Zellmembran. Für die Experimente dieser Arbeit ist Tetraethylammoniumchlorid nur von der Außenseite appliziert worden.

#### ◆ **Tetrodotoxin (TTX)**

TTX ist ein hochtoxisches, paralytisch wirkendes Alkaloid, das aus der Leber und den Ovarien des Kugelfisches (Kao, 1966; Halstead, 1967) und anderer Spezies aus der Familie der Tetraodontidae gewonnen wird. Es ist ein sehr potentes Gift, denn schon die Dosis von 1 mg tötet mehr als 7000 Mäuse. So ist es 160.000 mal potenter als Cocain (Kao, 1966); es führt bereits bei 100 nmol/l zu einem selektiven und reversiblen Block von sensitiven Natriumkanälen (Kao & Fuhrman, 1963; Narahashi *et al.*, 1964). Der Gegenstand dieser Arbeit war jedoch die Untersuchung des TTX-resistenten Natriumkanals. Dieser Kanal ist bei einer entsprechend hohen Konzentration von 115  $\mu\text{mol/l}$  ebenfalls blockierbar. Deshalb mußte eine Toxin-Dosis gewählt werden, die zwar die TTX-sensitiven Natriumströme unterband, aber eine Darstellung der TTX-resistenten Natriumströme zuließ. Da eingehende Untersuchungen gezeigt haben, daß TTX lediglich von der Membranaußenseite wirksam ist (Koppenhöfer & Vogel, 1969), wurde es der externen Lösung beigefügt. Es wurde in einer 100 nanomolaren Lösung verwendet.

#### ◆ **Cäsium (Cs)**

Neben TEA stellt das monovalente Cäsiumion ebenfalls einen Blocker von Kaliumkanälen dar. Hierbei handelt es sich um einen spannungsabhängigen Block des Kaliumstroms (Quayle *et al.*, 1988; Koh *et al.*, 1992), wobei Cäsiumionen sowohl von der Außen- als auch Innenseite blockieren. Hierbei dringen die Ionen in die Kanalpore ein, um diese zu verschließen (Hille & Schwarz, 1978).

#### ◆ **Prüfsubstanzen**

Folgende Wirkstoffe wurden verwendet:

- Pethidin, das als Opiat auch eine starke lokalanästhetische Wirkung besitzt
- Lidocain.

Die Stammlösungen wurden mit Hilfe von Aqua bidestillata auf einer Konzentration von 100 mmol/l verdünnt.

## **2.6 Applikation der Lösungen**

In dieser Studie wurden die Lokalanästhetika Lidocain und Pethidin durch ein Röhren-Perfusionssystem (Yellen, 1982) appliziert. Bausteine dieses Lösungswechselsystems ist einerseits das Dauerinfusionsgerät Perfusor IV (B. Braun Melsungen AG, Bundesrepublik Deutschland), andererseits ein Spritzensystem, bestehend aus einer handelsüblichen Perfusorspritze mit einem Plastikdruckschlauch (Feinmechanische Werkstatt des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen, Bundesrepublik Deutschland). In einem Plexiglas-Block konnten bis zu sechs verschiedene Lösungen über einzelne Bohrkanäle mittels Einwegspritzen (2-5 ml) appliziert werden. Die Prüfsubstanzen erreichten nach Passage von rostfreien Stahlröhrchen (1,5 mm Innendurchmesser) die Zelle über zweifach gebogene filamentfreie Glaskapillaren (GB 150, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, England). Eine Abdichtung zwischen den Stahlröhrchen und den Glaskapillaren wurde über flexible Schlauchinterponate erreicht.

Nach magnetischer Fixierung des Applikationssystems auf dem Objektisch und vorsichtigem Eintauchen in die Badlösung erfolgte die genaue Positionierung der Patch-Pipette mit „Whole-cell“-Patch vor der jeweiligen Glaskapillare. Der vollständig im Lösungsstrom befindliche Patch tolerierte die Applikation der Prüfsubstanz bis zu einer Flußgeschwindigkeit von 5 ml/h. Das am Objektisch verankerte Applikationssystem gewährleistete einen sekundenschnellen Lösungswechsel an der Zelle. Nach einer Einwirkungszeit einer Substanz von mindestens 45 Sekunden Dauer konnte die Ionenstrommessung beginnen. Bei Messreihen unterschiedlicher Konzentrationen wurden die Substanzen in aufsteigender Konzentration verwendet.

## **2.7 Pipetten**

Patchpipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm (CEE BEE 101-PS, Chr. Bardram, Svendborg, Dänemark) hergestellt. Dazu diente ein Horizontal-Pipettenpuller (Brown-Flaming Micropipette Puller Model P-97, Sutter Instrument Company, ScienceProducts GmbH, Hofheim, Deutschland).

Eine mit Methanol gereinigte Glaskapillare wird in mindestens vier Schritten unter Zug im Lumen einer mit definierten elektrischen Strömen durchflossenen Wendel in zwei

Patchpipetten getrennt. Die Temperatur der Glühwendel, die Zuggeschwindigkeit sowie die Zeit zum Ziehen und Trennen der Kapillaren sind variabel und entscheiden über die Form und den Spitzendurchmesser der hergestellten Pipetten.

Bei den vorliegenden Experimenten wurden Pipetten mit Widerständen zwischen 0,5 -1,5 MΩ für Ganzzelleableitungen verwendet.

Unmittelbar vor dem Experiment wurden die Pipetten an der Spitze eines V-förmigen, glühenden, mit Borosilikatglas ummantelten Platindrahtes „feuerpoliert“, um den Rand ihrer Spitze zu glätten, Verschmutzungen wegzubrennen und bei Bedarf ihren Spitzendurchmesser weiter zu verjüngen.

Zum luftfreien Befüllen der Pipetten wurde eine kleine Menge Pipettenlösung (interne CsF-Lösung) durch die Spitze aufgezogen und anschließend vom offenen Ende her nachgefüllt.

## 2.8 Statistische Analysen

Sämtliche Anpassungsvorgänge wurden mit Hilfe nicht-linearer Anpassung gewonnen. Die Strom-Spannungs-Beziehung wurde mit einer modifizierten Boltzmann-Funktion angepasst, um das Umkehrpotential und das halbmaximale Aktivierungspotential ( $E_{h,a}$ ), bei dem die maximale Leitfähigkeit zur Hälfte aktiviert ist, zu bestimmen. Der Steilheitsfaktor  $k_a$  beschreibt, wie sehr sich die Leitfähigkeit in Abhängigkeit des Potentials um  $E_{h,a}$  ändert.  $I_{Na}$  gibt den Natriumstrom an,  $G_{Na,max}$  ist die maximale Natrium-Leitfähigkeit und  $E_{G,Na}$  ist das Gleichgewichtspotential für Natriumionen. Die Variable  $E$  entspricht dem Testpotential.

$$\text{Gleichung 1} \quad I_{Na}(E) = \frac{G_{Na,max}}{1 + e^{\frac{E_{h,a} - E}{k_a}}} \cdot (E - E_{G,Na})$$

Die Inaktivierungs- bzw. Wirksamkeitskurven wurden mittels der Boltzmann-Funktion angepasst. Der Parameter  $E_{h,i}$  beschreibt das halbmaximale Inaktivierungspotential,  $k_i$  nennt den Steilheitsfaktor und  $I_{Na,max}$  den Natriumspitzenstrom:

$$\text{Gleichung 2} \quad I_{Na}(E) = \frac{I_{Na,max}}{1 + e^{\frac{E - E_{h,i}}{k_i}}}$$



Die Hill-Formel wurde zum Anpassen der Kurven für das Verhältnis von der Konzentration zur Hemmung verwendet.  $h$  ist der Hill-Koeffizient,  $c$  die Konzentration,  $IC_{50}$  die halbmaximale Blockierungskonzentration und  $f_i$  der relative Block:

$$\text{Gleichung 3} \quad f_i(c) = \frac{1}{1 + \left( \frac{IC_{50}}{c} \right)^h}$$

Ziel der vergleichenden Experimente mit Lidocain und Pethidin ist zu klären, ob beide Wirkstoffe an einer oder an verschiedenen Bindungsstellen agieren. Zu diesem Zweck wurden bestimmte Konzentrationen von Lidocain der Zelle appliziert und die darauffolgende Amplitudenreduktion der Natriumspitzenströme gemessen. Im Anschluß wurde Pethidin in ansteigenden Konzentrationen hinzugefügt, um die Konzentrations-Inhibitionskurven, welche mittels der Gleichung 3 angepasst wurden, für die mit Lidocain vorblockierten Ströme zu ermitteln. Wenn beide Substanzen an derselben Bindungsstelle wirken, wird eine Konkurrenz zwischen Pethidin und Lidocain am Rezeptor durch eine sichtbare Verschiebung der Konzentrationsabhängigkeit vom Pethidin-Block erwartet. Das Ausmaß der Verschiebung hängt von der relativen Stromreduktion bei vorhergehender Pethidin-Anwendung ab und kann auf die folgende Weise berechnet werden:

$$\text{Gleichung 4} \quad IC_{50,app,pet} = \frac{IC_{50,pet}}{1 - fb_{lido}}$$

$IC_{50,app,pet}$  zeigt die erscheinende halbmaximale Blockierungs-Konzentration für Pethidin in Lidocain, während  $IC_{50,pet}$  die halbmaximale Blockierungs-Konzentration für Pethidin allein darstellt.  $fb_{lido}$  nennt den fraktionierten Block durch Lidocain vor der Applikation von Pethidin.

Wenn beide Substanzen an unterschiedlichen Rezeptoren wirken, wird keine Verschiebung der  $IC_{50}$ -Werte von Pethidin eintreten. Die abgebildeten Datenpunkte stellen Mittelwerte mit angegebenem Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean) dar.

### 3. Ergebnisse

Die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden an kleinen Spinalganglienzellen der Ratte durchgeführt. TTX-resistente Natriumströme wurden mit Hilfe der „Whole-Cell-Konfiguration“ der Patch-Clamp-Technik dargestellt und die Wirkungen von Pethidin und Lidocain auf diese Ströme untersucht. Um in diesen Zellen ebenfalls vorhandene TTX-sensitive Ströme zu blockieren, wurde der Badlösung 100 nmol/l TTX zugegeben. Das Haltepotential betrug in allen Untersuchungen -90 mV, um die Inaktivierung der Natriumströme komplett aufzuheben.

#### 3.1 Zellkapazität und Zellgröße

Vor allem kleine Spinalganglienzellen führen Nervenfasern mit langsamer Leitungsgeschwindigkeit wie A $\delta$ - oder C-Fasern (Harper & Lawson, 1985) und sind damit spezifisch für die Nozizeption. Die vorliegenden Untersuchungen wurden daher an kleinen oder mittelgroßen Zellen durchgeführt, welche im Gegensatz zu den großen Zellen TTX-resistente Natriumkanäle in ihrer Zellmembran aufweisen (Elliott & Elliott, 1993). Die Größe der Zelle kann neben der mikroskopischen Vermessung auch gut über ihre Zelloberfläche bestimmt werden. Die Zelloberfläche (A) kann relativ leicht aus der Membrankapazität bestimmt werden, wenn man eine spezifische Membrankapazität von 1  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Hille, 1992) zugrunde legt. Vor jedem Experiment wurde daher die jeweilige Membrankapazität über die Funktion der „Whole-cell“- Kapazitätskompensation des Patch-Clamp-Verstärkers ermittelt. Da Spinalganglienzellen annähernd eine kugelförmige Gestalt aufweisen, kann ihr Durchmesser (d) mittels der Gleichung  $d = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$  berechnet werden. Die durchschnittliche Zellkapazität von 36 Zellen lag bei  $31,6 \pm 7,9$  pF (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), was einem mittleren Durchmesser von etwa 30  $\mu\text{m}$  und damit kleinen bis mittelgroßen Zellen entspricht.

### 3.2 Aktivierung und Inaktivierung

Um das halbmaximale Aktivierungspotential der untersuchten Ströme zu messen wurden Strom-Spannungskurven erstellt: Nach einem 50 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls nach  $-110$  mV wurden die Natriumströme mit Testimpulsen von  $-80$  mV bis  $+60$  mV bei einem Haltepotential von  $-90$  mV ausgelöst, deren Spitzenwert bestimmt und gegen das Potential des Testimpulses aufgetragen. Durch Anpassen von Gleichung 1 an die so gewonnenen Datenpunkte wurden ein halbmaximales Aktivierungspotential ( $E_{h,a}$ ) von  $-27,1 \pm 1,9$  mV ( $n = 36$ ) sowie ein Umkehrpotential ( $E_{rev}$ ) von  $32,7 \pm 1,2$  mV ermittelt.

Um die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung zu bestimmen, wurden nach einem hyperpolarisierenden Vorimpuls von 50 ms Dauer in 10 mV Sprüngen zu verschiedenen Potentialen gegeben ( $-130$  mV bis  $10$  mV). Anschließend wurde mittels eines 5 ms dauernden Testimpulses nach  $-10$  mV der Natriumstrom ausgelöst, dessen Spitzenamplitude bestimmt und gegen das Potential des Vorimpulses aufgetragen. Durch Anpassung der von Gleichung 2 an die Datenpunkte ergibt sich ein halbmaximales Inaktivierungspotential ( $E_{h,i}$ ) von  $-36,2 \pm 1,1$  mV ( $n = 36$ ).

Weder Lidocain ( $n = 6$  für  $0,1$  mmol/l und  $n = 4$  für  $0,3$  mmol/l) noch Pethidin ( $n = 5$  für  $0,3$  mmol/l) zeigten Einfluss auf das Umkehrpotential ( $E_{rev}$ ). Beide Substanzen führten zu einer geringfügigen Anhebung von  $E_{h,a}$  zu positiveren Spannungen und einer Verschiebung von  $E_{h,i}$  in Richtung Hyperpolarisation. Lidocain zeigte eine stärkere Wirkung im Vergleich zu Pethidin. Die Werte repräsentieren Mittelwerte mit angegebenem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) nach Einsetzen der Daten in die Gleichungen 1 und 2. Alle Werte für  $E_{h,a}$  und  $E_{h,i}$  sind in der Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Verschiebungen der halbmaximalen Aktivierungs- und Inaktivierungspotentialen für Lidocain und Pethidin;  $n =$  Zellzahl

	<b>n</b>	Halbmaximales Aktivierungspotential $E_{h,a}$ (mV)	Halbmaximales Inaktivierungspotential $E_{h,i}$ (mV)
Kontrolle	36	$- 25.3 \pm 1.1$	$- 34.2 \pm 0.7$
Lidocain (0.1 mmol/l)	6	$- 17.3 \pm 4.8$	$- 43.0 \pm 0.9$
Lidocain (0.3 mmol/l)	4	$- 11.4 \pm 3.9$	$- 50.1 \pm 3.0$
Pethidin (0.3 mmol/l)	5	$- 14.7 \pm 2.2$	$- 41.1 \pm 1.1$

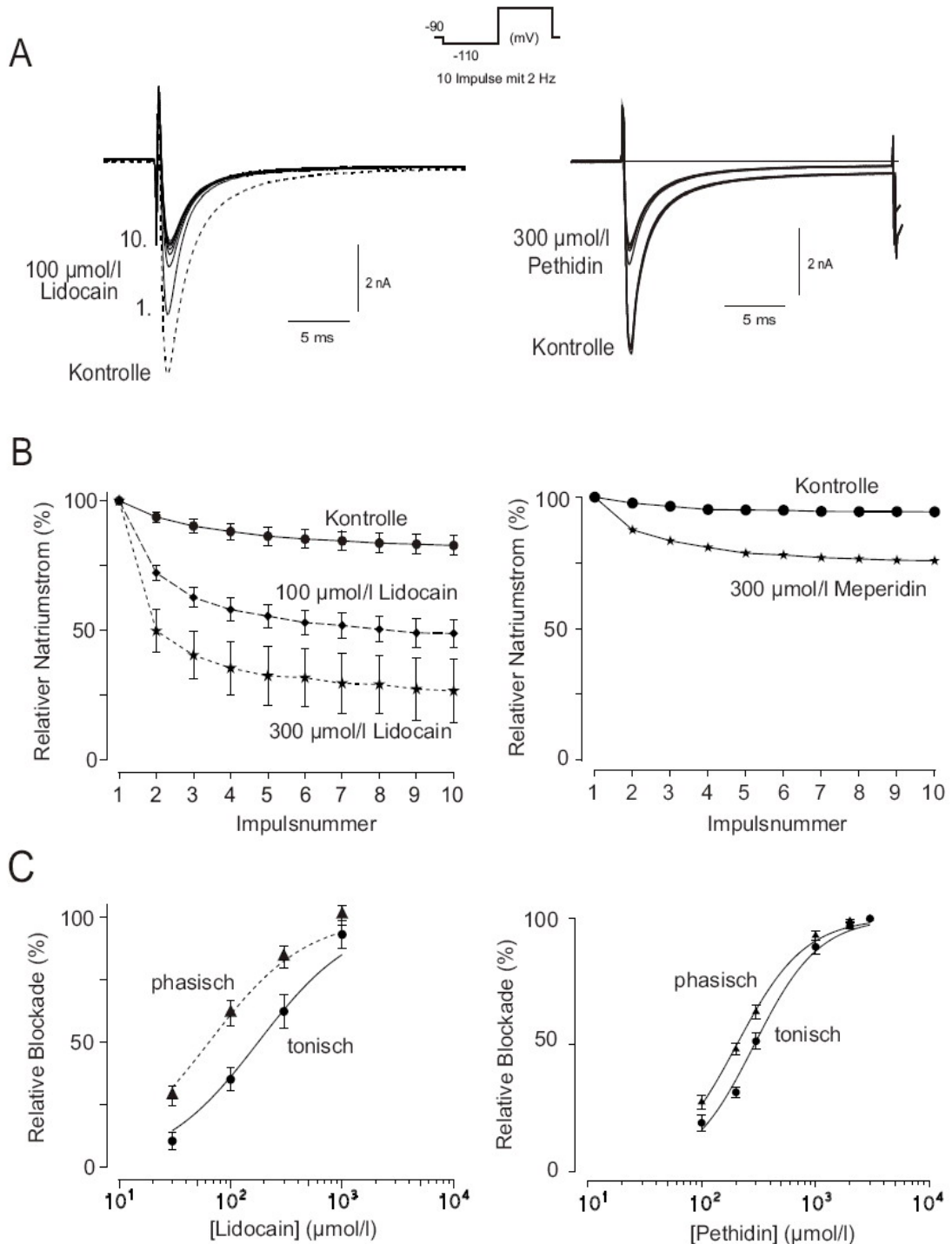
### 3.3 *Use-dependent Block und Konzentrationsabhängigkeit der Strom-Inhibition*

Um Konzentrations-Inhibitionskurven für Lidocain und Pethidin zu ermitteln, wurde zur Auslösung der TTX-resistenten Ströme ein Standardimpulsprotokoll verwendet: Nach einer 50 ms dauernden Hyperpolarisation nach -110 mV wurde der Strom durch eine 50 ms dauernde Depolarisation nach -10 mV ausgelöst. Dieses Impulsmuster wurde zehnmal mit einer Frequenz von 2 Hz bei einem Haltepotential von  $E = -90$  mV wiederholt, um einen „use-dependent“ Block auszulösen.

Die Applikation von Lidocain und Pethidin vermindert konzentrationsabhängig und reversibel die TTX-resistenten einwärts gerichteten Natriumströme. Beide Substanzen bewirken eine Abnahme der Stromamplituden (Abbildung 5A). Die während des ersten Impulses des Protokolls gemessene Verminderung des Natriumstromes wird als tonische Blockade bezeichnet. Das Phänomen der weiteren Reduktion des Stromes ausgelöst durch kurz aufeinander folgende Impulse kennzeichnet den „use-dependent“ (phasischen) Block. Im Gegensatz zu Lidocain führt Pethidin kaum zur Erzeugung eines solchen „use-dependent“ Block bei einer Frequenz von 2Hz (Abbildung 5B). In dieser Abbildung ist das Ausmaß der Blockade gegen die jeweilige Impulsnummer aufgezeichnet.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Strom-Inhibition zu bestimmen, wurde Lidocain in einer Konzentration von 30 – 1000  $\mu\text{mol/l}$  und Pethidin von 100 – 3000  $\mu\text{mol/l}$  appliziert und die jeweilige relative Stromabnahme gegen die Konzentration aufgetragen (Abbildung 5C). Die Datenpunkte sind Mittelwerte unter Angabe der mittleren Standardabweichung (SEM). Durch Anpassung der Hill-Funktion (Gleichung 3) an die Konzentrations-Inhibitionskurven ergibt sich die halbmaximale Blockierungskonzentration ( $IC_{50}$ ) jeweils für Lidocain und Pethidin. Die  $IC_{50}$ -Werte und der jeweilige Hill-Koeffizient sind in der Tabelle 2 dargestellt. Die Kurven für Lidocain wurden mit einem festen Hill-Koeffizienten von 1 ausreichend gut angepasst, was die Bedeutung von nur einem Blockermolekül für die Blockade eines Kanals widerspiegelt. Im Gegensatz zu Lidocain führt die Applikation von Pethidin zu keinem signifikanten „use-dependent“ Block; die Dosis Wirkungskurve verläuft steiler, so dass Hill-Koeffizienten größer eins zur optimalen Anpassung benötigt werden.

Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen und der Hill-Koeffizient für Lidocain und Pethidin sind in der Tabelle 2 dargestellt. Die Werte wurden mithilfe nicht-linearer Anpassung von Gleichung 3 an die Datenpunkte ermittelt, Fehlerwerte stellen den Standardfehler der Anpassung dar.



**Abb. 5:** **A:** Registrierung der Natriumströme an TTX-resistenten Natriumkanälen von Spinalganglienzellen der Ratte. Die gestrichelten Registrierungen zeigen den 1. Impuls in der Kontrolllösung. Die durchgezogenen Linien präsentieren die 10 folgenden Kurven jeweils für Lidocain bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  und für Pethidin von 300  $\mu\text{mol/l}$ .

**B:** Natriumspitzenströme in Abhängigkeit von der Impulsanzahl

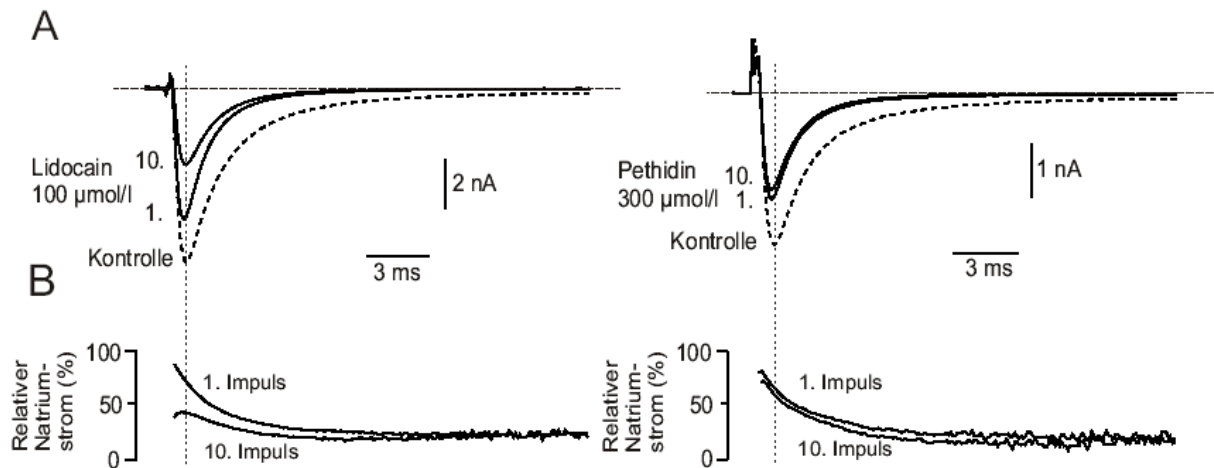
**C:** Verhältnis von Konzentration zu Inhibition von Lidocain und Pethidin. Der relative Block (Punkte) und der relative Use-dependent Block (10. Impuls bei 2 Hz, Dreiecke, gestrichelte Linie) ist gegen die Blockierungskonzentration aufgezeichnet. Die durchgezogene und die gestrichelte Linie repräsentieren die Datenpunkte nach Anpassung mit der Hill-Formel (Gleichung 3).

**Tabelle 2:** Halbmaximale Blockierungskonzentrationen ( $IC_{50}$ ) und Hill-Koeffizienten  $h$  für Lidocain und Pethidin,  $n$  = Zahl der Experimente

Substanz	Tonischer Block (1. Impuls)		Use-dependent Block (10. Impuls)	
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	Hill	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	Hill
Lidocain ( $n=11$ )	$197.8 \pm 22.7$	1	$74.3 \pm 6.9$	1
Pethidin ( $n=9$ )	$289.3 \pm 15.6$	$1.53 \pm 0.15$	$203.0 \pm 8.8$	$1.45 \pm 0.11$

### 3.4 *Dynamische Blockierung*

Durch vorangegangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe wurde ein weiteres Blockierungsphänomen beschrieben, der so genannte dynamische Block. Hierunter verstehen wir die Zunahme der Natriumstromblockade während der Aktivierung des Stromes, was im Prinzip einer Offenkanalblockade gleichkommt. In Abb. 5A wird die dynamische Blockierung als Beschleunigung der Inaktivierung erkennbar. Dividiert man nun den Stromverlauf in Lidocain durch den in der dazugehörigen Kontrolle, so erhält man zu jedem Zeitpunkt des Stromkurvenverlaufs die relative Blockierung des Stromes (Abb. 6). Zeitlich stellt sich dieser Verlauf als Exponentialfunktion dar und beschreibt die Assoziation des Pharmakons an den geöffneten Kanal. Pethidin führt ebenfalls zu einer dynamischen Blockade des Natriumstromes.



**Abb. 6:** Dynamische Blockierung TTX-resistenter Natriumströme durch Lidocain und Pethidin.

**A:** Originalregistrierungen in Kontrolle sowie die Stromverläufe ausgelöst durch den 1. und 10. Impuls einer 2 Hz Impulsserie in 100 µmol/l Lidocain und 300 µmol/l Pethidin. Impulsprotokoll wie in Abb. 6A.

**B:** Prozentualer Strom im zeitlichen Verlauf während der Depolarisation des 1. und 10. Impulses in der jeweiligen Substanz im Verhältnis zur Kontrolle. Die Zeitachsen sind in beiden Abbildungen gleich; die vertikale gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Natriumspitzenstroms.

### 3.5 *Kompetitionsexperimente*

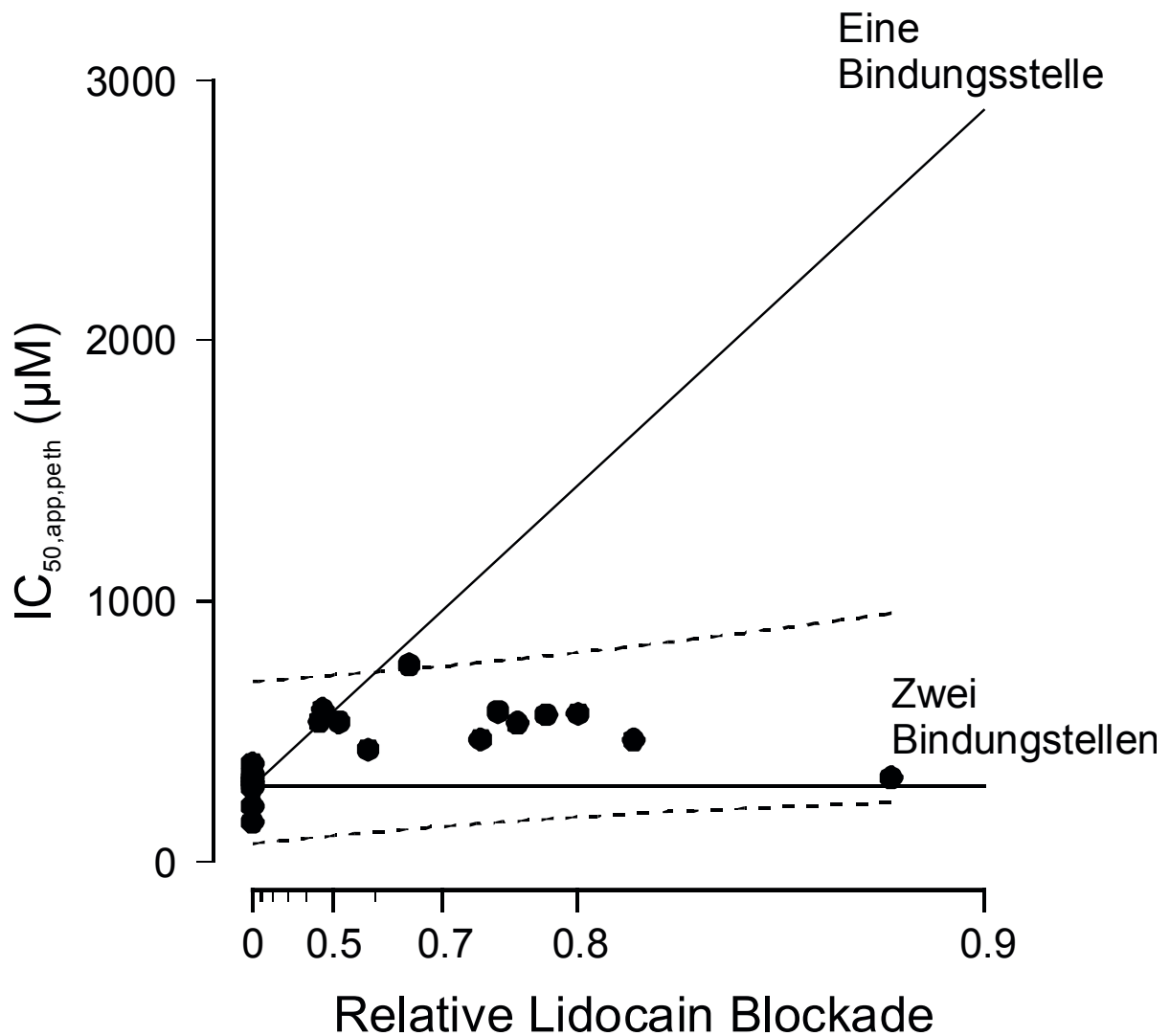
Ziel der Untersuchungen war es festzustellen, ob die Blockierungseigenschaften am TTX-resistenten Natriumkanal von Lidocain und Pethidin auf dieselbe Bindungsstelle oder zwei verschiedene Bindungsstellen zurückzuführen ist. Dazu wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt (Abbildung 7).

In 12 Experimenten wurden die Zellen mit Lidocain in einem Konzentrationsbereich von 100 – 1000 µmol/l vorbehandelt, was einen tonischen Block von 0,08 bis 0,78 beim ersten Impuls verursachte. Das Hinzufügen von Pethidin in Konzentrationen von 100 – 3000 µmol/l führte zu einer weiteren Reduktion der Spitzenströme in Abhängigkeit zur gewählten Konzentration (Pulsprotokoll wie in Abbildung 5). Der durch Pethidin induzierte Block an mit Lidocain vorklarierten Natriumkanälen wurde bestimmt, indem das Verhältnis der Spitzenströme bei Anwendung beider Substanzen zu den Spitzenströmen in Lidocain allein von 1 subtrahiert wurde. Die Kurven wurden mit der Hill-Formel (Gleichung 3) mit einem festen Hill-

Koeffizienten von 1 angepasst. Jeder so erhaltene  $IC_{50}$ -Wert wurde gegen den Lidocain-Block des korrespondierenden Experimentes aufgetragen (Abbildung 7). Die ansteigende Linie entspricht der theoretischen Veränderung der  $IC_{50}$ -Werte für Pethidin in Abhängigkeit der Vorblockierung durch Lidocain, wenn beide Moleküle an der gleichen Bindungsstelle angreifen, und wird durch Gleichung 4 beschrieben. Liegen zwei verschiedene Bindungsstellen vor, kommt es zu keiner Verschiebung der  $IC_{50}$ -Werte für Lidocain, was durch die horizontale Linie dargestellt ist.

Die Ansammlung der Datenpunkte um die horizontale  $IC_{50, \text{lidocain}}$ -Linie (Korrelationskoeffizient  $r = 0,373$ ) beweist, dass es keine Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle am Natriumkanal von Lidocain und Pethidin gibt. Die niedrige Korrelation zeigt, dass die  $IC_{50}$ -Werte sich nur gering mit der Vorblockierung verändern, was dem nicht-kompetitiven Modell entspricht. Die beiden Substanzen blockieren den Natriumkanal mittels verschiedener Bindungsstellen.





**Abb. 7:** Gleichzeitige Anwendung von Lidocain und Pethidin. Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen ( $IC_{50}$ ) von Pethidin wurden aus den Konzentrations-Inhibitionskurven nach Vorblockierung der Natriumkanäle durch Lidocain gewonnen. Diese  $IC_{50}$ -Werte wurden gegen den relativen, durch die Lidocain-Wirkung induzierten Block aufgetragen. Die durchgezogenen Linien zeigen die theoretische Verschiebung von den erscheinenden  $IC_{50}$ -Werten von Pethidin unter Annahme entweder einer gemeinsamen Bindungsstelle mit Lidocain oder zweier unterschiedlicher Bindungsstellen (siehe Text). Die gestrichelten Linien geben das 95%-Konfidenz- Intervall einer linearen Regression durch die Datenpunkte wieder. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Abbildung der Regressionsgeraden verzichtet.

## 4. Diskussion

Das Phänomen der Lokalanästhesie wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht (Butterworth & Strichartz, 1990). Der Wirkungsort der Lokalanästhetika ist der periphere Nerv. Eine Blockade der Nervenregbarkeit durch Lokalanästhetika resultiert aus der Blockade der Natriumkanäle. Neben den Untersuchungen an neuronalen TTX-sensitiven Natriumströmen an Kardiomyozyten konnten Bräu und Elliott eine ähnliche Empfindlichkeit klinisch verwendeter Lokalanästhetika auch am TTX-resistenten Natriumkanal aufzeigen (Bräu & Elliott, 1998).

Opioide wie Pethidin wirken bei systemischer Gabe durch ihre stereoselektive, hochspezifische Bindung an Opioidrezeptoren und erzeugen hier eine zentralnervöse Analgesie. Daneben wird eine lokalanästhetische Wirkung von Pethidin an der peripheren Nervenmembran beschrieben. In sehr frühen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, daß Pethidin die Fähigkeit des Froschnervs (*Nervus ischiadicus* von *Rana pipiens* und *Rana catesbeiana*), auf tetanische Stimulation zu antworten, angewandt in einer Konzentration von 0,4  $\mu\text{mol/l}$ , reduziert. Bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{mol/l}$  wurde ein verlängertes, aufsteigendes positives Nachpotential beschrieben. Hunter und Frank zeigten die Wirkung von 300  $\mu\text{M}$  Pethidin auf das Summenaktionspotential dieses Nervs (Hunter & Frank, 1979). Aufgrund der geringeren Anstiegssteilheit und Amplitudenabnahme des Summenaktionspotentials (auf  $\sim 80\%$  der Kontrolle nach einer halben Stunde und auf  $\sim 60\%$  am Ende des Experimentes nach drei Stunden) schlossen sie auf eine verminderte Natriumleitfähigkeit.

Ziel dieser Studie war es, die Wirkungen von Pethidin und dem Lokalanästhetikum Lidocain auf TTX-resistente Natriumströme zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Die Experimente wurden an kleinen bis mittelgroßen nozizeptiven Spinalganglienzellen erwachsener Wistar-Ratten durchgeführt. Es wurde untersucht, ob der lokalanästhetische Effekt von Pethidin über dieselbe Bindungsstelle wie Lidocain (dem postulierten Lokalanästhetikarezeptor) vermittelt wird oder ob getrennte Bindungsstellen für Pethidin und Lidocain vorliegen.

Zusammenfassend läßt sich bei beiden Substanzen eine reversible und konzentrationsabhängige Hemmung des TTX-resistenten Natriumstromes erkennen. Sie unterscheiden sich hingegen in der Modulation der Stromkinetik und agieren nicht kompetitiv am TTX-resistenten Natriumkanal. Diese Ergebnisse weisen auf getrennte Bindungsstellen für Pethidin und Lidocain am TTX-resistenten Natriumkanal hin.

#### **4.1 TTX-resistente Natriumströme**

Das anhand Strom-Spannungskurven ermittelte Umkehrpotential  $E_{rev}$  (32,7mV) liegt nahe dem berechneten Natriumgleichgewichtspotential von 31,8 mV, bezogen auf unsere Experimentbedingungen, und impliziert somit die Messung von Natriumströmen. Laut Elliot & Elliot werden TTX-sensitive Natriumströme durch 100 nM Tetrodotoxin in der Badlösung um 97% gehemmt (Elliott & Elliott, 1993). Tetrodotoxin wurde in einer Konzentration angewendet, die den SNS2-Kanal ( $Na_v$  1.9) nicht affektiert (Tate et al., 1998). Gemessen wurden so die Natriumströme durch den SNS- ( $Na_v$  1.8) und SNS2- ( $Na_v$  1.9) Kanaltyp. Die ermittelten halbmaximalen Aktivierungs- und Inaktivierungspotentiale entsprechen den Werten anderer Untersucher und bestätigen, daß sich die gemessenen Ströme auf den TTX-resistenten Natriumkanal beziehen.

TTX-sensitive Natriumkanäle sind in ihrer Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik schneller, und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung TTX-sensitiver Natriumströme erfolgt bei negativeren Potentialen (Roy & Narahashi, 1992; Rush et al., 1998).

#### **4.2 Blockierungseigenschaften von Lidocain und Pethidin**

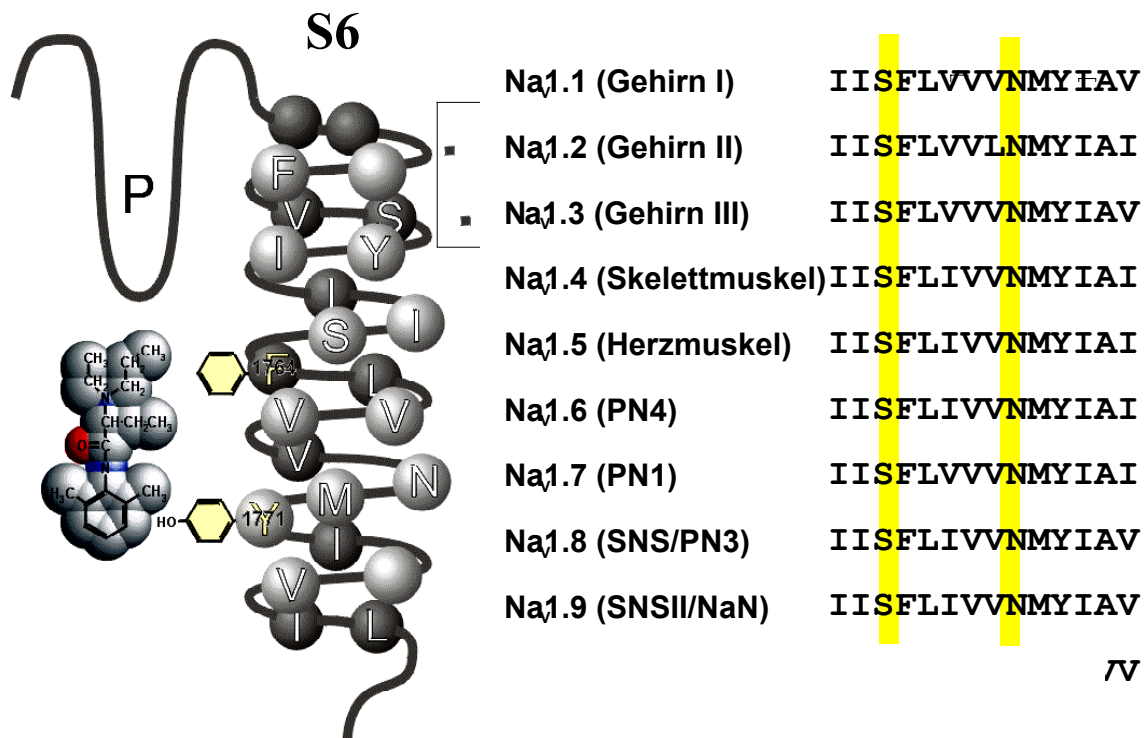
Sowohl Roy und Narahashi als auch Bräu und Elliott zeigten die Blockade aller Natriumkanal-Subtypen einschließlich des TTX-resistenten Kanals von Spinalganglienzellen durch Lidocain (Roy & Narahashi, 1992; Bräu & Elliott, 1998).

Die von uns ermittelten Werte bezüglich der charakteristischen Konzentrations-, use-dependent- und Spannungs- abhängigen Wirkungen am TTX-resistenten Natriumkanal stimmen annähernd mit den Angaben anderer Autoren überein. Die halbmaximale Blockierungskonzentration ( $IC_{50}$ ) für den tonischen Block von 197,8  $\mu$ M entspricht den Ergebnissen von Roy & Narahashi (Roy & Narahashi, 1992; 200  $\mu$ M) und Scholz et al. (Scholz et al., 1998; 210 $\mu$ M).

Ragsdale und Mitarbeiter (Ragsdale et al., 1994) identifizierten eine mögliche Bindungsstelle für Lokalanästhetika auf der  $\alpha$ -Untereinheit in Natriumkanälen des Rattengehirns (Abbildung 8). Es handelt sich hierbei um die zwei Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, die im Segment S6 der vierten Domäne lokalisiert sind. Die  $\alpha$ -Untereinheit des TTX-resistenten Natriumkanals der Spinalganglienzellen der Ratte zeigt dieselbe Aminosäuresequenz in

dieser Region (Akopian et al., 1996; Sangameswaran et al., 1996; Dib-Hajj et al., 1998), so dass eine korrespondierende Bindungsstelle am TTX-resistenten Natriumkanal angenommen werden kann.

## Na<sub>v</sub>1.2, Domäne IV



**Abb. 8:** Der molekulargenetische Aufbau der Lokalanästhetika Bindungsstelle des Natriumkanals. Links dargestellt ist die Aminosäuresequenz der transmembranäre  $\alpha$ -Helix des Segments 6 der vierten Domäne des Typ-II Rattenhirn-Natriumkanals (Na<sub>v</sub>1.2). Die beiden Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) stellen die Bindungsstelle für das Lokalanästhetikummolekül dar. Da die Bindungsstelle der Kanalpore (P) direkt benachbart ist kommt es zu einer Behinderung des Ionenflusses durch die Pore und somit zur Kanalblockade. Im rechten Teil der Abbildung sind Teile der Aminosäuresequenzen um die Bindungsstelle verschiedener spannungsabhängiger Natriumkanäle dargestellt. Man erkennt, dass die Bindungsstelle in allen Kanaltypen, vor allem auch bei den beiden TTX-resistenten Na<sub>v</sub>1.8 und Na<sub>v</sub>1.9 Kanälen vorhanden sind.

Unsere Experimente mit Lidocain stützen die These der Existenz von einer Bindungsstelle für eine lokalanästhetische Aktion, wobei der Hill-Koeffizient sich eins näherte und somit einer „Eins-zu-eins“- Bindung entsprach. Die Konzentrations-Hemmungs-Kurve von Pethidin verläuft deutlich steiler mit einem Hill-Koeffizienten von 1,53. Dieses zeigt, daß wahrscheinlich keine einfache „Eins-zu-eins“- Stöchiometrie ausgeübt wird, sondern vielmehr

eine zusätzliche oder vollständig andersartige Blockierung vorliegt. Hierbei könnten allosterische Effekte oder mehrere Bindungsstellen eine Rolle spielen.

Ein Hauptunterschied zwischen Lidocain und Pethidin in unseren Ergebnissen betrifft den use-dependent - Block. Selbst bei sehr hoher Reizfrequenz um 10 Hz zeigte Pethidin keinen use-dependent - Block. Dennoch kann dieser Unterschied alleine noch nicht als Beweis für eine von Lidocain differente Bindungsstelle angesehen werden. So findet man bei der Untersuchung anderer Lokalanästhetika wie dem Esterderivat Benzocain genauso wenig einen use-dependent - Block. Zwar konkurriert ähnlich wie Pethidin Benzocain mit Lidocain am Natriumkanal, dies wurde jedoch nur am TTX-sensitiven Natriumkanal nachgewiesen (Schmidtmayer & Ulbricht, 1980; Chapula 1985). Ferner nutzen auch Etidocain und Benzocain eine gemeinsame Bindungsstelle am Natriumkanal (Wang et al., 1998).

Ansteigende Lipophilie wird als wichtiges Kriterium für die Erhöhung der Natriumstromblockade für Wirkstoffe ähnlicher struktureller Eigenschaften wie zum Beispiel den n-Alkanolen (Elliott & Elliott, 1989; Elliott & Elliott, 1991) oder den Amid- oder Estergebundenen Lokalanästhetika (Bräu et al., 1998) angesehen. Bezogen auf den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten Octanol zu Wasser ( $\log P$ ) zeigt Lidocain ( $\log P$  2,26) eine geringere Lipidlöslichkeit als Pethidin ( $\log P$  2,72). Trotz der höheren Lipidlöslichkeit ist Pethidin schwächer wirksam und damit ein weniger potentes Lokalanästhetikum.

Lidocain und Pethidin interferieren am Kanal während der Aktivierungs- („time-to-peak“) und Inaktivierungsphase. Die Mechanismen, die zum dynamischen Block führen, erkennbar durch die exponentielle Abnahme des relativen Stromes, welcher bereits während der „time-to-peak“- Phase beginnt (Abbildung 6B, linker Anteil der gepunkteten Vertikallinie), sind nicht bekannt. Dieses basiert am ehesten auf einen „Offenen-Kanalblock“. Das bedeutet, dass das blockierende Lokalanästhetikamolekül erst nach der Öffnung des Kanals in die Porenregion gelangen und dort an seine Bindungsstelle unterhalb des Selektivitätsfilters binden kann. Durch diese Bindung wird dann der Durchtritt von Natriumionen durch den Kanal blockiert, und der Stromfluss nimmt im Verlauf stärker ab als unter der normalen Inaktivierung.

Alternativ zum Offen-Kanalblock ist auch denkbar, dass das Verhältnis Inaktivierung zu Aktivierung hinsichtlich einer erhöhten Inaktivierung verschoben ist, was schließlich zu dem Eintreten einer Inaktivierung innerhalb der Aktivierungsphase führt, so dass die Stromamplitude kleiner wird, die Stromkurve früher ihren Höhepunkt erreicht und die Inaktivierung beschleunigt erscheint.

Die Anwendung sowohl von Lidocain als auch Pethidin führen zum dynamischen Block, jedoch lässt sich der Use-Dependent-Block nur bei Lidocainanwendung finden. Der Grund, warum Lidocain den Use-dependent-Block im Gegensatz zu Pethidin hervorruft, liegt in der längeren Bindungszeit am Lokalanästhetikarezeptor des Natriumkanals. Während des ersten Impulses wird ein bestimmter Teil der Kanäle durch den dynamischen Block blockiert. Beim nächsten Impuls sind die meisten Kanäle blockiert, und es werden noch nicht blockierte Kanäle mit Lidocain besetzt. Aus diesem Grund verstärkt sich der Block immer weiter, bis ein Hauptteil der Kanäle durch Lidocain blockiert ist. Pethidin dagegen scheint sich sehr schnell von seinen Bindungsstellen zu lösen, so daß ein vollständiger Block des offenen Kanals auch bei hohen Frequenzen ausgelöst werden kann.

Zusammenfassend weisen Pethidin und Lidocain durch ihre Unterschiede in der Stromkinetik und den physikalisch-chemischen Eigenschaften auf verschiedene Wirkungsweisen am TTX-resistenten Natriumkanal hin. In den vergleichenden Experimenten wurde nachgewiesen, daß die Effekte nicht durch die gleiche Bindungsstelle am Kanal vermittelt werden. Pethidin könnte über hydrophobe Bahnen mit schneller Bindung und Dissoziation von seinem Rezeptor agieren. Möglicherweise handelt es sich dabei auch um mehrere Bindungsstellen innerhalb der Kanalpore, wodurch die größere Steilheit der Konzentrations-Inhibitionskurve mit einem Hill-Koeffizienten größer eins erklärbar wäre.

## 5. Zusammenfassung

### Pethidin und Lidocain

Das Opiat Pethidin weist neben seiner agonistischen Wirkung auf den  $\mu$ -Rezeptor zusätzlich eine starke lokalanästhetische Wirkung auf, die auf seine blockierende Wirkung am Natriumkanal zurückzuführen ist. In dünnen schmerzleitenden Nervenfasern sind Tetrodotoxin (TTX)-resistente Natriumkanäle für die Impulsentstehung und -weiterleitung verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Opiates Pethidin mit der des Lokalanästhetikums Lidocain am TTX-resistenten Natriumkanal verglichen. Dazu wurden mittels der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Methode TTX-resistente Natriumströme an enzymatisch dissoziierten Spinalganglienzellen erwachsener Ratten dargestellt und untersucht. Halbmaximale Blockierungskonzentrationen ( $IC_{50}$ ) wurden mit Hilfe nicht-linearer Anpassung der entsprechenden Gleichungen an die Datenpunkte einer Konzentrations-Inhibitionskurve gewonnen. Bei niedriger Reizfrequenz blockieren Pethidin und Lidocain den TTX-resistenten Natriumkanal konzentrationsabhängig und reversibel mit  $IC_{50}$ -Werten von  $289 \pm 16 \mu\text{mol/l}$  für Pethidin und  $198 \pm 23 \mu\text{mol/l}$  für Lidocain. Erhöht man die Reizfrequenz auf 2 Hz, so tritt bei Lidocain zusätzlich ein use-dependent Block auf, das heißt, die Blockierung des Kanals erhöht sich mit zunehmender Impulszahl. Während des zehnten Impulses liegt der  $IC_{50}$  Wert für Lidocain bei  $74 \pm 7 \mu\text{mol/l}$ . Pethidin dagegen weist keinen use-dependent Block mit einem  $IC_{50}$  Wert von  $203 \pm 9 \mu\text{mol/l}$  auf. Beide Substanzen verursachen eine starke dynamische Blockierung, das heißt, im Verlauf der Aktivierung und Inaktivierung einer einzelnen Stromregistrierung nimmt die Stromblockade exponentiell zu. Durch Anfertigen von Inhibitions-Wirkungsbeziehungen für Pethidin an mit Lidocain vorblockierten Natriumkanälen zeigt sich, daß beide Substanzen an unterschiedlichen Bindungsstellen am Natriumkanal angreifen. Lidocain und Pethidin zeigen gemeinsame, aber auch unterschiedliche Blockierungseigenschaften am TTX-resistenten Natriumkanal, wobei die Unterschiede auf verschiedene Bindungsstellen zurückzuführen sind.

## 6. Summary

### Meperidine and lidocaine

The opioid meperidine has besides its agonistic effect on the  $\mu$ -receptor also a local anaesthetic effect which is mediated by inhibiting voltage gated  $\text{Na}^+$  channels. Tetrodotoxin (TTX) resistant sodium channels in small nerve fibers are responsible for pulse initiation and in part for pulse propagation. The aim of the present study was to compare the effect of the opioid meperidine with the local anaesthetic lidocaine on TTX-resistant  $\text{Na}^+$  channel in rat dorsal root ganglion (DRG) cells. For this purpose TTX-resistant sodium currents were measured in enzymatically dissociated small DRG cells using the whole cell mode of the patch clamp technique. Half-maximal tonic inhibiting concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) were determined by fitting the appropriate equation to the data points of concentration inhibiting curves. Both, meperidine and lidocaine reversibly block TTX-resistant  $\text{Na}^+$  currents in a concentration-dependent manner at low stimulation frequencies.  $\text{IC}_{50}$ -values were for meperidine  $289 \pm 16 \mu\text{mol/l}$  ( $n=9$ ) and for lidocaine  $198 \pm 23 \mu\text{mol/l}$  ( $n=11$ ). In contrast to meperidine, lidocaine also exerted a strong use-dependent block, which is an increasing reduction of peak currents elicited by subsequent pulses applied at high frequency (2 Hz). Use-dependent block was determined by measuring the peak amplitude elicited by the tenth pulse of a 2 Hz train.  $\text{IC}_{50}$ -values for the use-dependent block were for meperidine  $203 \pm 9 \mu\text{mol/l}$  ( $n=9$ ) and for lidocaine  $74 \pm 7 \mu\text{mol/l}$  ( $n=11$ ). Both lidocaine and meperidine produced a strong dynamic block of the TTX-resistant  $\text{Na}^+$  current, i.e. block increases during the activation time course of the sodium current. This is essentially due to an open channel block by the drugs. Competition experiments with both substances revealed different binding sites for meperidine and lidocaine.

The present study demonstrates that lidocaine and meperidine have common as well as different blocking characteristics at the TTX-resistant sodium channel. The differences between the two drugs clearly arise from different binding sites on the sodium channel.



## 7. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 :	Schema der Zustände der Natriumkanäle	S. 7
Abbildung 2 :	Strukturformel von Lidocain	S. 8
Abbildung 3 :	Strukturformel von Pethidin	S. 10
Abbildung 4 :	Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik	S. 14
Abbildung 5A:	Registrierung der Natriumströme an TTX-resistenten Natriumkanälen von Spinalganglienzellen der Ratte	S. 24
Abbildung 5B:	Spitzenströme in Abhängigkeit von der Impulsanzahl	S. 24
Abbildung 5C:	Verhältnis von Konzentration und Inhibition von Lidocain und Pethidin	S. 24
Abbildung 6 :	Dynamische Blockierung TTX-resistenter Natriumströme durch Lidocain und Pethidin	S. 26
Abbildung 6A:	Originalregistrierungen in Kontrolle	S. 26
Abbildung 6B:	Prozentualer Strom im zeitlichen Verlauf	S. 26
Abbildung 7 :	Gleichzeitige Anwendung von Lidocain und Pethidin	S. 28
Abbildung 8 :	Der molekulargenetische Aufbau der Lokalanästhetika Bindungsstelle des Natriumkanals	S. 31

## 8. Anhang

### 8.1 *Verwendete Lösungen*

#### 8.1.1 *Außenlösungen*

##### ◆ **Externe Tyrode-Lösung mit TEA und TTX**

- 110 mmol/l CholinCl,
  - 35 mmol/l NaCl
  - 5 mmol/l KCl
  - 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>
  - 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>
  - 6 mmol/l Glucose
  - 10 mmol/l HEPES (4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazin-ethansulfonsäure)
  - 10 mmol/l TEA (Tetraethylammoniumchlorid)
  - 100 nmol/l TTX (Tetrodotoxin)
- mit Tris- (Trishydroxymethylaminomethan) Puffer auf pH 7,4 eingestellt

##### ◆ **Externe Tyrode-Lösung**

- 145 mmol/l NaCl
  - 5 mmol/l KCl
  - 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>
  - 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>
  - 6 mmol/l Glucose,
  - 10 mmol/l HEPES
- mit Tris-Puffer auf pH 7,4 eingestellt

##### ◆ **Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freie externe Tyrode-Lösung**

- 145 mmol/l NaCl
  - 5 mmol/l KCl
  - 6 mmol/l Glucose
  - 10 mmol/l HEPES
- mit Tris-Puffer auf pH 7,4 eingestellt

### 8.1.2 Innenlösung

#### ◆ Interne CsF-Lösung

10 mmol/l NaCl

140 mmol/l CsF

3 mmol/l EGTA (Ethylenglycol-Bis[Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat)

10 mmol/l HEPES

mit CsOH auf pH 7,2 eingestellt

### 8.1.3 Präparationslösungen

#### ◆ Nährmedium

Die Zusammensetzung entspricht 13,05 ml MEM (*minimum essential medium eagle with Earle's salts and NaHCO<sub>3</sub>*, M-7647, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 0,3 ml L-Glutamin (G-7513, Sigma), 0,15 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung (P-0781, Sigma) sowie 1,5 ml FCS (*fetal calf serum*, F-2442, Sigma).

Das Nährmedium dient sowohl zur Aufbewahrung der Spinalganglienzellen bis zum Experiment als auch zur Herstellung der Stammlösungen für die Enzymlösung II (DNAse und Trypsininhibitor).

#### ◆ Enzymlösung I

In 3 ml Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>- freier Tyrode-Lösung werden 9 mg Kollagenase (Worthington CLSII Typ 22, 231-322 Units/mg, Biochrom KG, Berlin, Bundesrepublik Deutschland) und 3 mg Trypsin (Typ I, T-8003, Sigma) gelöst.

#### ◆ Enzymlösung II

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 (Typ IV, D-4138, Sigma) werden in 16,25 ml Nährmedium gelöst.

Stammlösung Trypsin-Inhibitor: 25 mg Trypsin-Inhibitor (Typ IS, T-9003, Sigma) werden in 12,5 ml Nährmedium gelöst.

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	:	Verschiebungen der halbmaximalen Aktivierungs- und Inaktivierungspotentialen für Lidocain und Pethidin	S. 22
Tabelle 2	:	Halbmaximale Blockierungskonzentrationen und Hill-Koeffizienten für Lidocain und Pethidin	S. 25

## 10. Literaturverzeichnis

- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN: A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel Expressed by sensory neurons. *Nature* 1996; 379: 257-62.
- Bräu ME, Elliott JR: Local anesthetic effects on tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurones. *Eur J Anaesthesiol* 1998; 15: 80-88.
- Bräu ME, Vogel W, Hempelmann G: Fundamental properties of local anesthetics: Half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in peripheral nerve. *Anesth Analg* 1998; 87: 885-889.
- Butterworth JF, Strichartz GR: Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* 1990; 72: 711-734.
- Chapula JS: Interaction of lidocaine and benzocaine in depressing V<sub>max</sub> of ventricular action Potentials. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17: 495-503.
- Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG: Na<sub>v</sub>1, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 8963-8.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA: Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994; 12: 1041-1048.
- Elliott AA, Elliott JR: The role of inactivation in the effects of n-alkanols on the sodium current of cultured rat sensory neurones. *J Physiol.* 1989; 415: 19-33.
- Elliott JR, Elliott AA: Actions of alcohols on sodium channels in dorsal root ganglia. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 625: 344-54.
- Elliott AA, Elliott JR: Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol. (Lond)* 1993; 463: 39-56.

- Halstead: Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. In: U.S. Government Printing Office 1967; Washington, DC, Vol I, 83-87, Vol II, 679-844.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100.
- Harper AA, Lawson SN: Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol. (Lond)* 1985; 359: 31-46.
- Hille B: Ionic channels of excitable membranes. 2<sup>nd</sup> Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA 1992.
- Hille B, Schwarz W: Potassium channels as multi-ions single-file pores. *J Gen Physiol* 1978; 72: 409-442.
- Hunter EG, Frank GB: An opiate receptor on frog sciatic nerve axons. *Can J Physiol Pharmacol* 1979; 57: 1171-1174.
- International Association for the Study of Pain: The need of a taxonomy. *Pain* 1979; 6: 247-252, Editorial.
- Jaffe RA, Rowe MA: A comparison of the local anesthetic effects of meperidine, fentanyl, and sufentanyl on dorsal root axons. *Anesth Anlag*, 1996; 83: 776 – 781
- Kao CY: Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol Rev* 1966; 18: 997-1049.
- Kao CY, Fuhrmann FA: Pharmacological studies on tarichatoxin, a potent neurotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 1963; 140: 31-40.
- Koh DS, Jonas P, Bräu ME, Vogel W: A TEA-insensitive flickering potassium channel active around the resting potential in myelinated nerve. *J Membrane Biol* 1992; 130: 149-162.

- Koppenhöfer E, Vogel W: Wirkung von Tetrodotoxin und Tetraethylammoniumchlorid an der Innenseite der Schnürringsmembran von *Xenopus laevis*. Pflügers Arch 1969; 313: 361-380.
- Kosterlitz HW, Wallis DI: The action of morphine-like drugs on impulse transmission in mammalian nerve fibres. Br J Pharmacol 1964; 22: 499-510.
- Kostyuk PG, Veselovsky NS, Tsydrenko AY: Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons – I. Sodium currents. Neuroscience 1981; 6: 2423-2430.
- Krivoy WA: The action of analgetic agents on positive afterpotentials of frog sciatic nerve. Br J Pharmacol 1960; 129: 186-190.
- Narahashi T, Moore JW, Scott WR: Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. J Physiol 1964; 47: 965-974.
- Neher E, Sakmann B: Single channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. Nature 1976; 260: 799-802.
- Quayle JM, Standen NB, Stanfield PR: The voltage-dependent block of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle by caesium and barium ions. J Physiol (Lond) 1988; 405: 677-697.
- Ragsdale DS, Mc Phee JC, Scheuer T, Catterall WA: Molecular determinants of state-dependent block of the Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. Science 1994; 265: 1724-1728.
- Roy ML, Narahashi T: Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 1992; 12: 2104-11.
- Rush AM, Bräu ME, Elliott AA, Elliott JR: Characterization of multiple sodium current subtypes in small cell from adult rat dorsal root ganglia. J Physiol (Lond) 1998; 511: 771-789.



- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglén RM, Herman RC: Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem.* 1996; 271: 5953-6.
- Schmidtmayer J, Ulbricht W: Interaction of lidocaine and benzocaine in blocking sodium Channels. *Pflügers Arch* 1980; 387 (1): 47-54.
- Schmidt R, Thews G, Lang F: *Physiologie des Menschen*, 28. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2000
- Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W: Complex blockade of TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *J Physiol* 1998; 79: 1746-1754.
- Tasaki I, Hagiwara S: Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol* 1957, 40: 859-885.
- Tate S, Benn S, Hick C, Trezise D, John V, Mannin RJ, Costigan M, Plumpton C, Grose D, Gladwell Z, Kendall G, Dale K, Bountra C and Woolf CJ: Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nature neuroscience* 1998; 1: 653-655.
- Wang GK, Quan C, Wang S: A common local anesthetic receptor for benzocaine and etidocaine in voltage-gated  $\mu 1$  Na<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch.* 1998; 435: 293-302.
- Yellen G: Single Ca<sup>+</sup>-activated nonselective cation channels in neuroblastoma. *Nature* 1982; 42: 516-520.

## 11. Lebenslauf

- Persönliche Daten

Name: Eva Lili Schorer  
Geburtsdatum: 20.05.1976  
Geburtsort: Werther/Westf.  
Familienstand: ledig

- Schulbildung

1982 – 1986 Bültmannshof-Grundschule Bielefeld  
1986 – 1995 Ratsgymnasium Bielefeld  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

- Hochschulbildung

1995 – 1997 Vorklinisches Studium an der JLU Gießen  
1997 Physikum  
1997 – 2001 Klinisches Studium an der JLU Gießen  
1998 1. Staatsexamen  
2001 2. Staatsexamen  
2001 – 2002 Praktisches Jahr an der HHU Düsseldorf  
Evang. KH Düsseldorf, Wahlfach HNO  
2002 3. Staatsexamen

- Berufsausbildung

01.07.2002 – 31.10.2003 Ärztin im Praktikum in der HNO-Klinik des  
Malteser Krankenhauses St. Anna, Duisburg  
01.11.2003 – 31.12.2003 Ärztin im Praktikum in der HNO-Klinik des St.  
Franziskus Hospital, Köln  
Seit Januar 2004 Assistenzärztin in der HNO-Klinik des St.  
Franziskus Hospital, Köln

Köln im Juni 2004

## **12. Danksagung**

**PD. Dr. med. Michael E. Bräu** danke ich für die Überlassung des Themas und die verantwortliche Betreuung der Arbeit. Er unterstützte mich großzügig in wissenschaftlichen Belangen und verhalf mit seiner engagierten und konstruktiven Kritik bei der Erstellung des Manuskriptes. Mit viel Geduld schenkte er mir erste Einblicke in elektrophysiologische Techniken und Denkweisen. Er wusste mich jederzeit zu motivieren und vermittelte mir große Freude an der wissenschaftlichen Arbeit.

**Prof. Dr. med. Werner Vogel und seinen Mitarbeitern** danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Physiologie durchführen zu können, sowie für die alltägliche freundliche und tatkräftige Unterstützung.

**Meiner Familie** danke ich für ihre bedingungslose Liebe, die mir nicht nur im Studium und im Rahmen meiner Doktorarbeit Kraft gespendet hat. Meinen Eltern danke ich insbesondere für das Ermöglichen meines Medizinstudiums.

**Meinem Lars**