

**Die Wirkung trizyklischer Antidepressiva auf
Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle des peripheren
Nervensystems**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lots, Kirstin

aus Dresden

Gießen, 2010

Aus dem Physiologischen Institut
Leiter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. M. E. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Tag der Disputation: 01. September, 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Anästhesiologie und Schmerz | 1 |
| 1.2 | Physiologie der Nozizeption | 2 |
| 1.3 | Physiologie der Erregungsleitung | 5 |
| 1.4 | Die Struktur eines spannungsabhängigen Natriumkanals | 7 |
| 1.5 | Der TTX-resistente Natriumkanal | 11 |
| 1.6 | Natriumkanal blockierende Substanzen | 15 |
| 1.6.1 | Lokalanästhetika | 15 |
| 1.6.2 | Trizyklische Antidepressiva | 15 |
| 1.6.3 | Tetrazyklische Antidepressiva | 18 |
| 1.7 | Fragestellung | 19 |
| 2. | Elektrophysiologische Methoden | 20 |
| 2.1 | Präparation | 20 |
| 2.2 | Die „patch-clamp“-Technik | 21 |
| 2.3 | Perfusionssystem | 24 |
| 2.4 | Lösungen und Lösungswechsel | 25 |
| 2.4.1 | Nährmedium | 25 |
| 2.4.2 | Kristalline Lösungen | 25 |
| 2.5 | Datenverarbeitung und Statistik | 27 |
| 3. | Ergebnisse | 29 |
| 3.1 | Elektrophysiologische Grundlagen des TTX-resistenten Natriumkanals | 29 |
| 3.2.1 | Aktivierungskinetik | 30 |
| 3.2.2 | Inaktivierungskinetik | 33 |
| 3.3 | Reizfrequenzabhängigkeit der Natriumstrom-Blockade | 34 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4 | Konzentrationsabhängigkeit der Natriumstrom-Blockade | 38 |
| 3.5 | Lipophilieabhängigkeit der Natriumkanal-Blockade | 40 |
| 4. | Diskussion | 43 |
| 4.1 | Natriumkanal-Blocker als analgetische Substanzen | 43 |
| 4.2 | Die Rolle des Natriumkanals beim neuropathischen Schmerz | 44 |
| 4.3 | Natriumkanal-blockierende Mechanismen Trizyklischer Antidepressiva | 45 |
| 5. | Zusammenfassung | 47 |
| | Literaturverzeichnis | 49 |
| | Danksagung | 57 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1.1 | Nozizeptive afferente Leitungsbahnen | 4 |
| 1.2 | Zeitverlauf eines Aktionspotentials | 7 |
| 1.3 | Modell der Sekundärstruktur des spannungsabhängigen Natriumkanals | 9 |
| 1.4 | Modell der Tertiärstruktur des spannungsabhängigen Natriumkanals | 10 |
| 1.5 | Nomenklatur-Baum der spannungsabhängigen Natriumkanäle | 11 |
| 1.6.1 | Strukturformel: Tetrodotoxin | 12 |
| 1.6.2 | Strukturformel: Lidocain | 15 |
| 1.6.3 | Strukturformel: Amitriptylin | 15 |
| 1.6.4 | Strukturformel: Nortriptylin | 17 |
| 1.6.5 | Strukturformel: Doxepin | 17 |
| 1.6.6 | Strukturformel: Imipramin | 18 |
| 1.6.7 | Strukturformel: Maprotilin | 18 |
| 2.1 | Schematische Darstellung des „patch-clamp“-Versuchsstandes | 21 |
| 2.2 | Schematische Darstellung gebräuchlicher „patch-clamp“-Konfigurationen | 23 |
| 3.1 | Exemplarische Originalregistrierungen von Natriumströmen untersuchter Spinalganglienzellen mit zugehörigem Impulsprotokoll | 30 |
| 3.2 | Strom-Spannungskurve | 32 |
| 3.3 | Orginalregistrierungen TTX-resistenter Natriumströme | 35 |
| 3.4 | Inaktivierungskurven | 37 |
| 3.5 | Konzentrations-Inhibitionskurven | 39 |
| 3.6 | Darstellung der halbmaximalen Blockierungskonzentrationen aller untersuchten Antidepressiva sowie einiger Lokalanästhetika | 41 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Klassifikation peripherer Nervenfasern | 5 |
| 2.1 | Extrazellulärlösung | 26 |
| 2.2 | Intrazellulärlösung | 27 |
| 3.1 | Halbmaximale Inhibierungskonzentrationen und Hill Koeffizienten für Einzelreizung und für den jeweils zehnten Reiz nach Dauerreizung | 42 |

1. Einleitung

1.1 Anästhesiologie und Schmerz

"Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer echten oder potentiellen Gewebeschädigung einhergeht, oder als solches beschrieben wird. Schmerz ist immer subjektiv." (International Association for the Study of Pain, IASP, 1994).

Die Therapie von Schmerzen zählt wohl zu den ursprünglichsten und bis heute zu den wichtigsten Aufgaben in der Medizin. Man unterscheidet verschiedene Formen des Schmerzes.

Der akute Schmerz hat eine sinnvolle und lebenserhaltende Funktion. Akute Schmerzwahrnehmungen dienen dazu, Beschädigungen des Organismus zu melden und Schutzreaktionen auszulösen. Des Weiteren kommt zu den unbewussten Schutzreflexen noch eine bewusst empfundene und erinnerte Komponente hinzu, die dazu führt, dass schmerzauslösende, schädigende Handlungen in Zukunft unterlassen werden. Die im Anschluss an eine Traumatisierung gesteigerte Schmerzempfindlichkeit des geschädigten Gewebes erzwingt zudem eine schmerzbedingte Ruhigstellung und fördert damit den Heilungsprozess. Die Fähigkeit der Schmerzempfindung stellt somit eine sinnvolle Eigenschaft zum Schutz des Organismus dar.

Der chronische Schmerz, definitionsgemäß ein Schmerz, der länger als sechs Monate besteht, hingegen hat diese sinnvolle Melde-, Schutz- und Heilfunktion verloren. Es kommt zur physischen und psychischen Schädigung des Patienten. Man spricht hierbei von einem algogenen Psychosyndrom mit depressiver Verstimmung, Reizbarkeit, Schwäche und Abgeschlagenheit sowie verminderten sozialen Aktivitäten.

Die klinische Anästhesiologie hat die Aufgabe, Schmerzzustände zu unterdrücken oder zumindest für den Patienten erträglich zu machen, wobei die Unterscheidung zwischen akutem oder chronischem Schmerz eine entscheidende Bedeutung für die Therapie darstellt.

Zur Unterdrückung des akuten Schmerzes, welcher im klinischen Alltag z.B. bei chirurgischen Eingriffen entsteht, kommen anästhesiologische Verfahren, wie die Allgemeinanästhesie in Form der Vollnarkose und die Lokalanästhesie, als örtliche Betäubung, zum Einsatz. Während bei der Vollnarkose durch intravenös und/oder inhalativ verabreichte Anästhetika die Wahrnehmung sowie die Reaktion und die Erinnerung an den akuten Schmerz im Zentralnervensystem unterdrückt werden, wird bei der Lokalanästhesie die Weiterleitung der Schmerzinformation aus den peripheren Nerven reversibel unterbrochen. Beide Methoden der

Schmerzausschaltung haben zum Ziel, dass sich der Patient des akuten Schmerzes nicht bewusst wird.

Die Behandlung chronischer Schmerzzustände gestaltet sich jedoch deutlich schwieriger, da diese durch pathologische Veränderungen peripherer Nerven zustande kommen, die sich gegenüber konventionellen analgetischen Therapiemaßnahmen als resistent erweisen. Moderne Therapiekonzepte stützen sich hier unter anderem auf die erfolgreiche systemische Applikation von Natriumkanal blockierenden Substanzen in Form von Lokalanästhetika, Antiarrhythmika und Antikonvulsiva, wobei über die zugrunde liegenden Mechanismen, die zur schmerzlindernden Wirkung dieser Pharmaka führen, bis heute größtenteils noch spekuliert wird. Eine lokalanästhetische Wirkung gilt bisher als unwahrscheinlich, da die vermuteten erforderlichen Konzentrationen bei systemischer Anwendung nicht erreicht werden. Als wahrscheinlicher gelten Interaktionen mit den für die Schmerzentstehung verantwortlichen Mechanismen in den pathologisch veränderten Nozizeptoren peripherer Neurone.

Eine weitere Substanzgruppe zur adjuvanten Behandlung von neuropathischen Schmerzen stellen die Antidepressiva dar (Carter und Sullivan, 2002). Diese entfalten ihre antidepressive Wirkung über eine zentralnervöse Serotonin/Noradrenalin-Reuptake-Hemmung. Die analgetische Wirkung dieser Substanzgruppe lässt sich jedoch nicht auf ihre antidepressive Wirkung zurückführen, sondern wird sehr wahrscheinlich über andere, noch nicht genau verstandene Wirkmechanismen hervorgerufen.

Es sind jedoch nicht alle Antidepressiva zur Therapie des chronischen Schmerzes geeignet. Vor allem zeigen sich trizyklische Antidepressiva, wie z.B. Amitriptylin, anderen Antidepressiva deutlich überlegen (Bryson und Wilde, 1996), während neuere, nebenwirkungsärmere Substanzen, wie die selektiven Serotonin-Reuptake-Hemmer, keine schmerzhemmende Wirkung aufweisen (Max *et al.*, 1992).

1.2 Physiologie der Nozizeption

Schmerz ist mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebsschädigung assoziiert. Die Schmerzwahrnehmung erfolgt über Nozizeptoren. Diese Schmerzrezeptoren sind freie, nicht korpuskuläre Nervenendigungen im Gewebe, die das erste, noch zum peripheren Nervensystem gehörende Neuron der Schmerzleitung darstellen. Sie können mechanisch, thermisch oder chemisch gereizt werden (Beck *et al.*, 1974; Bessou und Perl, 1969).

Man unterscheidet des Weiteren polymodale Nozizeptoren, also Rezeptoren, die auf verschiedene Reizqualitäten reagieren, von solchen, die nur auf eine Reizart ansprechen. Während Druck und Temperatur direkte Noxen darstellen, die von außen auf den Körper einwirken, können auch Schmerzreize im Körper selbst durch dort vorhandene oder gebildete chemische Substanzen ausgelöst werden. Diese körpereigenen, algogenen Substanzen werden bei Entzündungsreaktionen und traumatischen Gewebeschädigungen freigesetzt. Hierzu gehören Transmitter wie Serotonin, Azetylcholin und Histamin, aber auch H^+ und K^+ -Ionen. Neben der einfachen Freisetzung von diesen sogenannten Entzündungsmediatoren kommt es aber auch noch zur Bildung von Prostaglandinen und Kininen, deren wichtigste Vertreter das Prostaglandin E_2 und Bradikinin darstellen. Diese sowie weitere Stoffe wie Leukotriene und Substanz P, aber auch das Absinken des pH-Wertes in einem Entzündungsgebiet, sensibilisieren die Schmerzrezeptoren und erhöhen damit deren Ansprechbarkeit auf schmerzauslösende Reize und Substanzen. Zusätzlich bewirken sie eine Kapillardilatation und führen zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität.

Wie in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt, werden die in den Schmerzfasern ausgelösten Aktionspotentiale, welche die elektrophysiologische Schmerzinformation darstellen, über dicke, markhaltige, schnell leitende $A\delta$ -Fasern (Gruppe III) oder über dünne, marklose, langsam leitende C-Fasern (Gruppe IV) weitergeleitet. Die Einteilung, Funktion sowie Faserdurchmesser und Leitungsgeschwindigkeit der verschiedenen peripheren Nervenfasern nach Erlanger und Gasser sind Tabelle 1.1 zu entnehmen (Erlanger und Gasser, 1932). Die Erregung der $A\delta$ -Fasern führt zu einem hellen, gut lokalisierbaren, epikritischen Sofortschmerz. Die Erregung der C-Fasern vermittelt einen dumpfen oder brennenden, protopathischen Schmerz, der erst später wahrgenommen wird und schlecht zu lokalisieren ist (Dudel, 2000; Zenker *et al.*, 1993). Die schmerzleitenden afferenten Fasern treten über die Hinterwurzeln in das Hinterhorn des Rückenmarks ein und werden in der Substantia gelatinosa des Hinterhorns auf weiterführende Neurone, die das zweite Neuron der Schmerzleitung darstellen, umgeschaltet. Diese kreuzen auf segmentaler Ebene und steigen im kontralateralen Vorderseitenstrang, dem Tractus spinothalamicus, zu den Thalamuskernen im Gehirn auf. Diese zweiten Neurone haben auf Höhe der entsprechenden Rückenmarkssegmente über so genannte Interneurone auch Verbindung zu den motorischen und sympathischen Efferenzen, über die motorische Fluchtreflexe und vegetative Reaktionen ausgelöst werden. Der Vorderseitenstrang gibt auf seinem Weg zu den Thalamuskernen Kollaterale zur Formatio reticularis des Hirnstammes und zum aufsteigenden retikulären aktivierenden System (ARAS) ab. Hierdurch werden bei Schmerzen das Atem- und Kreislaufzentrum beeinflusst und der Wachheitsgrad sowie die

Aufmerksamkeit gesteigert. Vom medialen Thalamus wird die nozizeptive Information vor allem zum frontalen Kortex, zum limbischen System (Wahrnehmung der affektiv-emotionalen Komponente des Schmerzes), zum Hypothalamus und zur Hypophyse (Anschluss an das endokrine System über Ausschüttung von ACTH und beta-Endorphin) und vom lateralen Thalamus zum somatosensorischen Kortex weitergeleitet. Im Thalamus erfolgt auch die Umschaltung auf das dritte und letzte Neuron der Schmerzleitung.

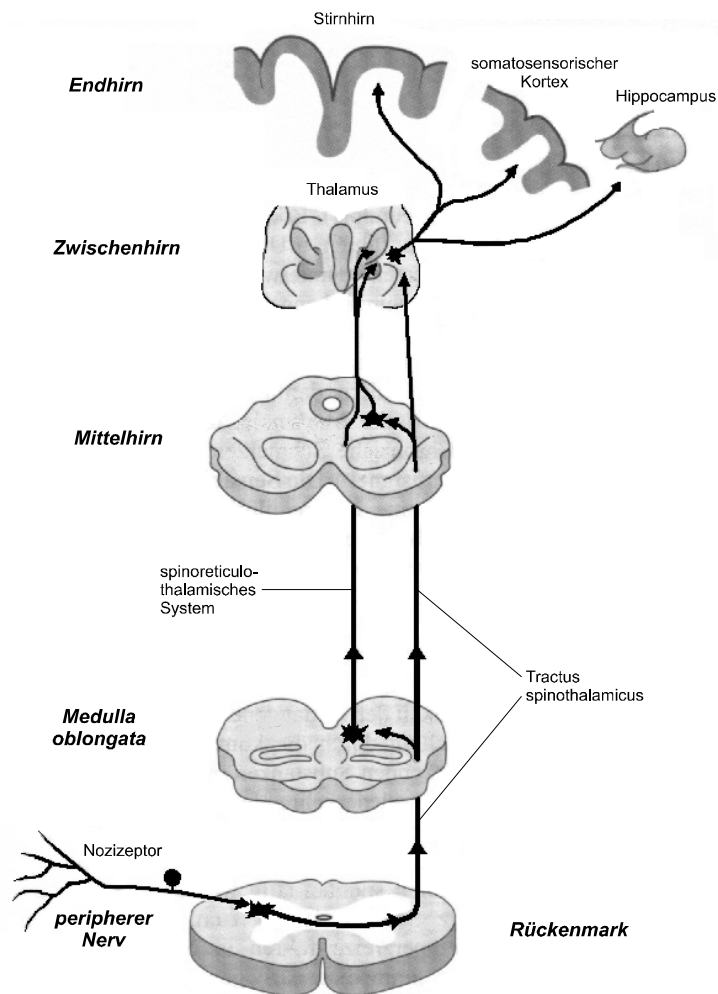


Abb. 1.1 Nozizeptive afferente Leitungsbahnen.

Periphere Schmerzimpulse gelangen über A δ -Fasern und C-Fasern ins Hinterhorn des Rückenmarks, werden dort umgeschaltet und im Tractus spinothalamicus bzw. im spinoreticulothalamischen System zum Thalamus weitergeleitet. Vom lateralen Thalamus ziehen Bahnen zum somatosensorischen Kortex, vom medialen Thalamus zum frontalen Kortex, limbischen System (Hippocampus), sowie zum Hypothalamus und zur Hypophyse. Modifizierte Darstellung nach Illes und Mitarbeiter (Illes *et al.*, 1996).

| Fasertyp | Funktion | ØFaserdurchmesser (µm) | ØLeitungsgeschwindigkeit (m/s) |
|----------|--|------------------------|--------------------------------|
| Aα | primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch zu Skelettmuskeln | 15 | 70-120 |
| Aβ | Hautafferenzen für Berührung und Druck | 8 | 30-70 |
| Aγ | motorisch zu Muskelspindeln | 5 | 15-30 |
| Aδ | Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption | 3 | 12-30 |
| B | sympathisch präganglionäre Efferenzen | 3 | 3-15 |
| C | Hautafferenzen für Nozizeption, sympathisch postganglionäre Efferenzen | 1 marklos | 0,3-2 |

Tabelle 1.1: Klassifikation der peripheren Nervenfasern nach Erlanger und Gasser (Erlanger und Gasser, 1932)

1.3 Physiologie der Erregungsleitung

Nervenzellen werden durch eine Lipid-Eiweißmembran begrenzt. Zwischen dem Inneren der Zelle und der extrazellulären Flüssigkeit besteht eine elektrische Potentialdifferenz, das Membranpotential. Eine Änderung dieses Membranpotentials stellt die Grundlage der Entstehung und Fortleitung von Erregungen dar. An der Axonmembran, die spannungsunabhängige Kalium- und Natriumkanäle aufweist, trifft man eine spezifische Verteilung der Ionen an. Im Innern befinden sich Kaliumionen und organische Anionen in hoher Konzentration und niedrige Konzentrationen von Natrium- und Chloridionen (Dudel, 1977). Dies führt im Ruhezustand zu

stand durch passive Diffusionsvorgänge und aktiven Ionentransport durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ zum Entstehen eines Kalium-Gleichgewichtspotentials, auch Ruhepotential genannt, von etwa -90 mV , welches sich unter Annahme ausschließlicher Kaliumleitfähigkeit mit der Nernst'schen-Gleichung berechnen lässt.

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

R = Allgemeine Gaskonstante ($8,315\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

F = Faraday-Konstante ($9,64 \cdot 10^4\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$)

T = Absolute Temperatur (K)

z_x = Wertigkeit des Ions X

[X] = Konzentration des Ions X

Wird die Nervenzelle erregt, so ändern sich ihr Membranpotential und damit die Struktur der enthaltenen, spannungsabhängigen Natriumkanäle, so dass diese sich öffnen (siehe Abb. 1.2). Folge ist eine kurzzeitige Umkehr des Potentials von zuvor -90 mV auf $+30\text{ mV}$, welche sich auf benachbarte Bezirke fortsetzt und damit weitergeleitet wird. Verantwortlich für die plötzliche Potentialumkehr sind die spannungsabhängigen Natriumkanäle, die sich bei elektrischer Membrandepolarisation öffnen und Natriumionen passiv hinein diffundieren lassen (Hille, 1971). Der Einwärtsstrom der Natriumionen überwiegt dabei dem ebenfalls passiven Ruhe-Kaliumauswärtsstrom und das sonst negative Membranpotential wird positiv. Durch Inaktivierung und spontanes Schließen der spannungsabhängigen Natriumkanäle wird dieser Vorgang unterbrochen und das Aktionspotential ist beendet. Durch das Schließen der Natriumkanäle und das verzögerte zusätzliche Öffnen spannungsabhängiger Kaliumkanäle, stellt sich das Ruhepotential wieder ein (Hodgkin und Keynes, 1955). Der aktive Ionentransport mittels der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dient dem Ausgleich der durch permanente Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten entstehenden Ionenströme.

Die hier beschriebene kurzzeitige Membranumpolung wird Aktionspotential genannt und stellt die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit einer Zelle oder eines Nerven dar. Die Dauer eines Aktionspotentials an einer Nervenzelle beträgt etwa 1 ms (Dudel, 1977).

Die Stärke eines Reizes wird über die Frequenz der entstehenden Aktionspotentiale kodiert. Um hohe Leitungsgeschwindigkeiten in den Nervenfasern erhalten zu können, müssen auch

die Natriumkanäle dieser Fasern eine entsprechend schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungs-kinetik aufweisen.

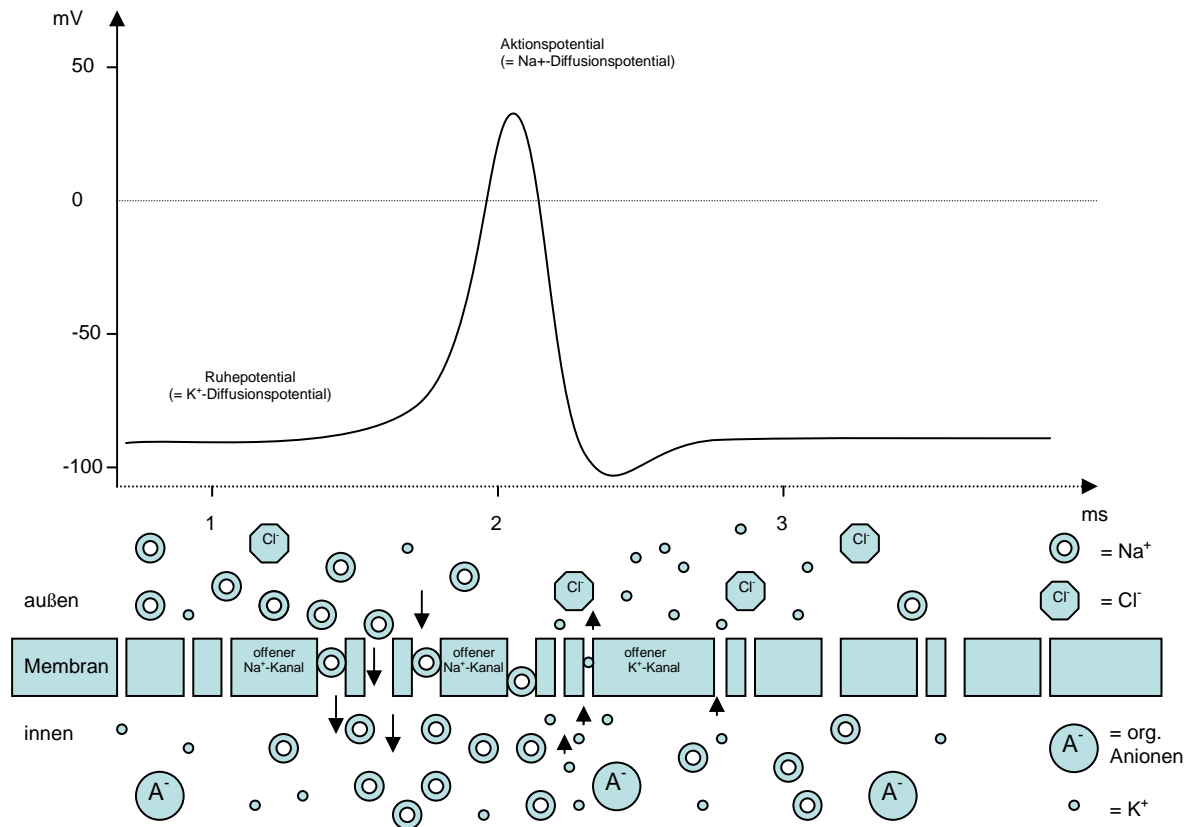


Abb. 1.2 Zeitverlauf eines Aktionspotentials

Das Aktionspotential beginnt, ausgehend vom Ruhepotential (-90 mV), mit einer sehr schnellen positiven Potentialänderung, der Depolarisationsphase durch einen Na^+ -Ionen-Einstrom (0,2 - 0,5 ms). Dies depolarisiert das Membranpotential und es erreicht positive Werte (+30 mV). Die Repolarisation erfolgt durch die Inaktivierung des Na^+ -Systems und das Öffnen der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle.

1.4 Die Struktur eines spannungsabhängigen Natriumkanals

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind Ionenkanäle und finden sich überall dort, wo Zellmembranen schnell erregbar sein müssen. Wegen ihrer Bedeutung für das Zustandekommen des Aktionspotentials sind der Aufbau und die Funktion spannungsgesteuerter Natriumkanäle physiologisch und pharmakologisch gut untersucht. Es existieren verschiedene Reaktionsmodelle für das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten der spannungsabhängigen Natriumkanäle und auch der molekulare Kanalaufbau ist bekannt (Marban *et al.*, 1998).

Alle Natriumkanäle bestehen aus einer alpha-Untereinheit (~260 kDa), die das funktionelle Kanalprotein bildet und einer oder mehrerer kleiner beta-Untereinheiten (~35 kDa), welche die funktionelle Eigenschaften, wie z.B. die Kanalkinetik beeinflussen (Catterall, 2000). Die Primärstruktur der alpha-Untereinheit des Natrium-Kanal-Proteins wird von 1820 Aminosäuren gebildet (Noda *et al.*, 1984). In Abbildung 1.3 ist die Sekundärstruktur der alpha-Untereinheit dargestellt. Die alpha-Untereinheit des Natrium-Kanals ist ein Glykoprotein, welches aus vier sich ähnelnden Domänen I-IV, so genannten Repeats besteht und einen intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus aufweist. Jede Domäne enthält sechs membran-durchspannende alpha-Helices S1-S6. Im Gegensatz zu den sonst hydrophoben Segmenten tragen die S4 Segmente aller Domänen positive Nettoladungen und bilden damit den Spannungssensor des Kanals (Stühmer *et al.*, 1989). Der Selektivitätsfilter für Natriumionen wird von den vier Schleifenregionen (P) zwischen den jeweiligen Segmenten S5 und S6 der vier Domänen gebildet und ist in Abbildung 1.4 zusammen mit den positiv geladenen S4 Segmenten schematisch dargestellt. Die intrazellulär gelegene Schleife zwischen Domäne III und IV enthält eine Aminosäuresequenz von Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM), welche sich nach Aktivierung des Kanals in die geöffnete Pore legt und diese von der intrazellulären Seite aus verschließt. Man spricht bei diesem Vorgang von der schnellen Inaktivierung des Natriumkanals (Eaholtz *et al.*, 1994; McPhee *et al.*, 1995).

Auf dem P-Segment der Domäne I wird der Rezeptor für Tetrodotoxin (TTX), einem Neurotoxin, vermutet (Noda *et al.*, 1989).

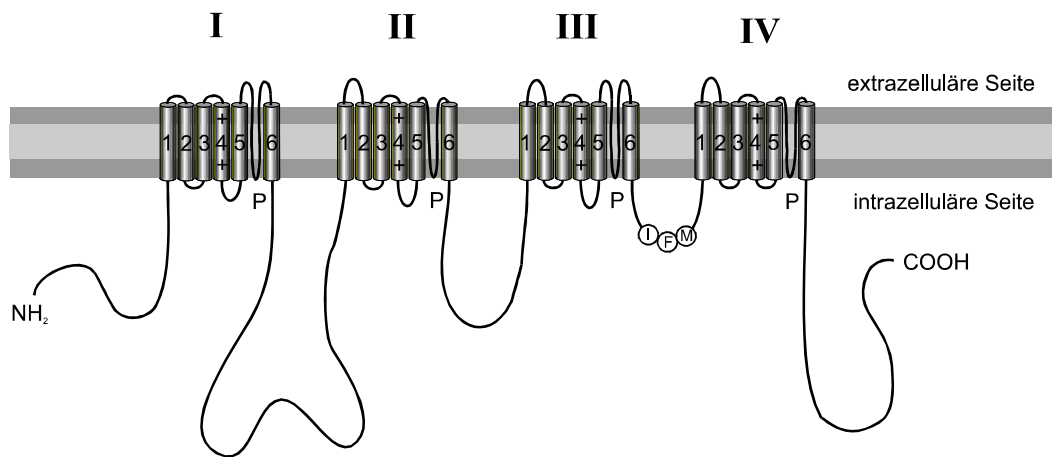


Abb. 1.3 Modell der Sekundärstruktur des spannungsabhängigen Natriumkanals nach Catterall (Catterall, 1988)
 Bei der Sekundärstruktur der alpha-Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals handelt es sich um ein Glykoprotein, welches aus vier sich ähnelnden Domänen, so genannten Repeats I-IV besteht. Jede dieser Domänen setzt sich aus sechs membrandurchspannenden, hydrophoben alpha-Helices, den Segmenten S1-6 zusammen. Die S4-Segmente tragen eine positive Ladung und stellen den Spannungssensor des Kanals dar. Die intrazellulär liegende Schleife zwischen Domäne III und IV enthält eine spezifische Aminosäurefrequenz bestehend aus Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM), welche sich nach der Aktivierung des Kanals in die geöffnete Pore legen kann, um diese zu verschließen, womit der Kanal funktionell deaktiviert wird (Eaholtz *et al.*, 1994). Des Weiteren findet man zwischen den Segmenten S5 und S6 jeder Domäne eine Schleife P, die von extrazellulär in die Membran hineinragt, welche die Porenwand und den Selektivitätsfilter für Natriumionen bildet. Auf dem P-Segment der Domäne I wird der Rezeptor für TTX vermutet. Der Rezeptor für Lokalanästhetika liegt auf dem S6-Segment der Domäne IV (Ragsdale *et al.*, 1994)

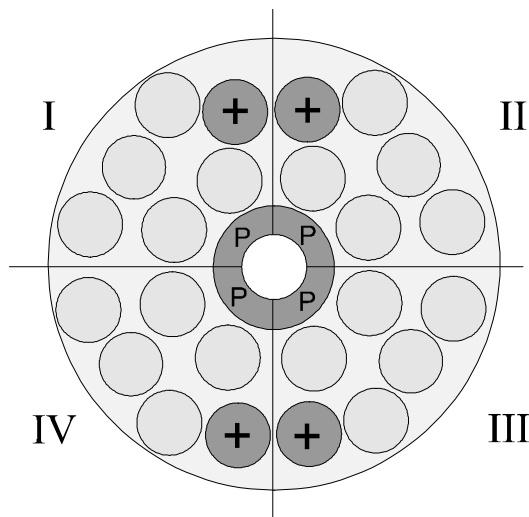


Abb. 1.4 Modell der Tertiärstruktur des spannungsabhängigen Natriumkanals (Alsobrook und Stevens, 1988; Stevens, 1991)

Anordnung der transmembranären alpha-Helices zu einem funktionellen Membranprotein, dem Natriumkanal. Die vier P-Schleifen, zwischen den Segmenten S5 und S6 aller Domänen, bilden die Porenwand und den Selektivitätsfilter für Natriumionen. Die mit positiven Nettoladungen besetzten S4 Segmente bilden den Potentialsensor des Na^+ -Kanals. Durch potentialabhängiges Verschieben dieser Segmente kann der Kanal geöffnet und der Selektivität entsprechend für Natriumionen durchlässig werden.

Lokalanästhetika, Antiepileptika, Klasse I Antiarrhythmika und andere Substanzen vermitteln ihre pharmakologischen Effekte durch Wirkung auf den spannungsabhängigen Natriumkanal. Der Blockademechanismus von Natriumkanälen durch Lokalanästhetika ist gut untersucht. Man geht heute davon aus, dass eine Bindung des Lokalanästhetikamoleküls in der Pore des spannungsabhängigen Natriumkanals zur Unterbrechung des Natriumstroms führt (Butterworth und Strichartz, 1990). Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte man sogar die Aminosäuren der alpha-Untereinheit, die die Bindungsstelle bilden, identifizieren, welche sich auf dem Segment S6 der Domäne IV befinden (Ragsdale *et al.*, 1994). Lokalanästhetika blockieren den Ioneneinstrom durch die Pore des Natriumkanals konzentrationsabhängig und reversibel. Man spricht hierbei vom tonischen Block. Durch wiederholte Reizung des Natriumstromes kann eine durch Lokalanästhetika hervorgerufene partielle Natriumstromblockade reversibel verstärkt werden. Diese Verstärkung ist abhängig von Reizfrequenz, Reizdauer, Membranpotential und Art des Lokalanästhetikums und wird als phasische Blockade (use-dependent Block) bezeichnet.

Die Familie der Natriumkanäle lässt sich in eine Reihe von Subtypen unterteilen, deren Unterschiede auf den spezialisierten Aufgaben in den unterschiedlichen Geweben beruhen.

Die Natriumkanal-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur und damit in ihren biophysikalischen Eigenschaften, ihrer chromosomalen Lokalisation und ihrer Sensitivität gegenüber Tetrodotoxin, einem Neurotoxin. Aufschluss über die Nomenklatur spannungsabhängiger Natrium-Kanäle soll Abbildung 1.5 geben.

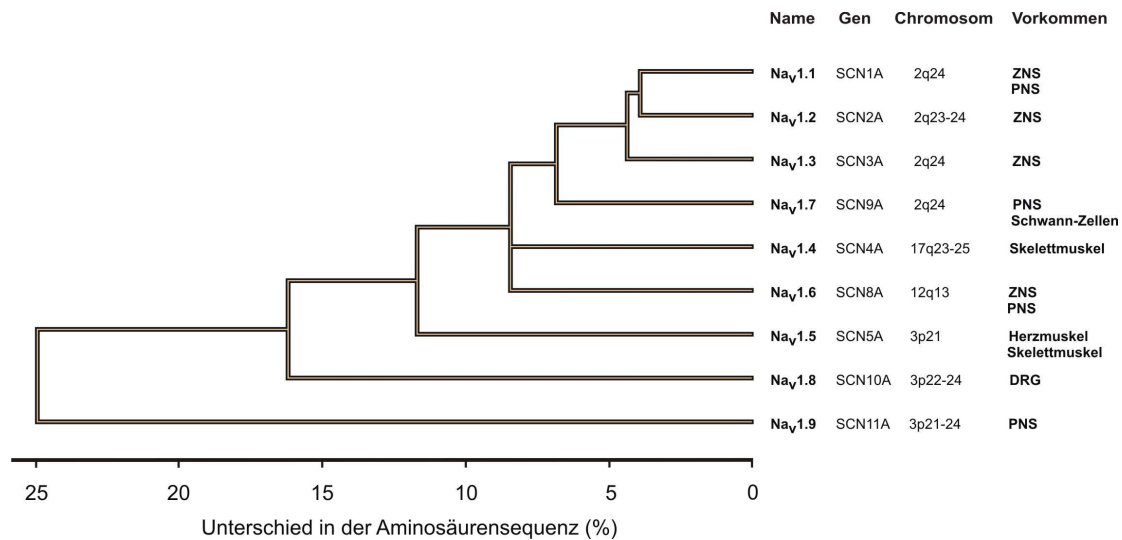


Abb. 1.5 Nomenklatur-Baum der spannungsabhängigen Natriumkanäle und deren relativer Unterschied in der Aminosäurefrequenz.

Verglichen werden die vier Domänen der alpha-Untereinheit spannungsabhängiger Natriumkanäle der Typen Na_v1.1 – Na_v1.9 (Goldin *et al.*, 2000). Phylogenetisch scheinen sich alle Subtypen aus einem ursprünglichen Kanal entwickelt zu haben. Kleine Mutationen erzeugen verschiedene gewebespezifische Kanaltypen, die ein individuelles Verhalten gegenüber Natriumkanal blockierenden Substanzen zeigen, mit einer charakteristischen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik bei erhaltener Grundfunktion und hoher Ionenselektivität.

1.5 Der TTX-resistente Natriumkanal

Spannungsabhängige Natriumkanäle des peripheren Nervensystems werden am rauen endoplasmatischen Retikulum des Zellkörpers synthetisiert und in die Zellmembran eingebaut. Auch in der Membran des Somas, das bei sensorischen Fasern in den Spinalganglien liegt, finden sich Natriumkanäle, welche einer Untersuchung relativ leicht zugänglich sind. Yoshida und Matsuda entdeckten 1979 bei Messungen von Aktionspotentialen an kleinen Spinalganglienzellen erwachsener Mäuse Ströme, die auf einen spannungsabhängigen Natriumkanal zurückzuführen waren, der gegenüber Tetrodotoxin resistent ist (Yoshida und

Matsuda, 1979). Bis heute wurden zwei Tetrodotoxin-resistente spannungsabhängige Natriumkanal-Subtypen identifiziert. Dies sind die Typen $\text{Na}_v1.8$ und $\text{Na}_v1.9$ (Tate *et al.*, 1998).

Tetrodotoxin

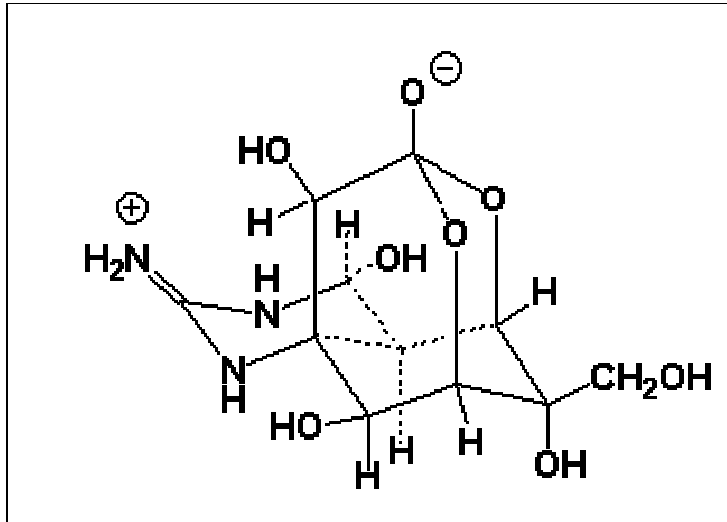


Abb. 1.6.1

Strukturformel: Tetrodotoxin

Alkaloid aus der Imidazolin- und Pyrimidingruppe

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{N}_3$

Molekulargewicht: 319,27 g/mol

Tetrodotoxin ist ein Neurotoxin, welches in der Leber, den Gonaden und den inneren Organen verschiedenster Meeres- und Brackwassertiere gefunden werden kann. Bekannt geworden ist es als das Gift des Kugelfisches. Das Tetrodotoxin wird dabei nicht von den Tieren selbst synthetisiert, sondern von Bakterien, welche über die Nahrung mit aufgenommen werden (Yasumoto *et al.*, 1989). Der strukturelle Aufbau des Tetrodotoxins konnte schon 1966 aufgeklärt werden (Tamura *et al.*, 1966, Abb. 1.6.1).

Tetrodotoxin (TTX) blockiert die Natriumkanäle an den Nervenfasern. TTX gehört zur Gruppe der Alkaloide. Seine Natriumkanal blockierende Wirkung beruht auf seiner positiv geladenen Guanidiniumgruppe. Diese geht mit der negativ geladenen, in der Porenregion gelegenen Glutaminsäure des TTX-sensitiven Natriumkanals eine starke polare Bindung ein. TTX-resistente spannungsabhängige Natriumkanäle weisen an dieser Stelle eine andere, nicht geladene Aminosäure auf. Sie werden erst bei deutlich höheren Konzentrationen von Tetrodotoxin blockiert.

Seit der oben beschriebenen ersten Untersuchung neuronaler TTX-resistenter Aktionspotentiale in sensorischen Ganglien der Maus, sind TTX-resistente Natriumströme von unterschiedlichen Arbeitsgruppen mit den unterschiedlichsten Techniken untersucht worden. Dabei kam nach der Mikroelektrodenteknik, wie sie von Yoshida und Matsuda 1979 benutzt wurde, auch die intrazelluläre Perfusionstechnik (Kostyuk *et al.*, 1981) und vor allem die „whole-cell“-Methode der „patch-clamp“-Technik zum Einsatz (Schwartz *et al.*, 1990; Caffrey *et al.*,

1992; Roy und Narahashi, 1992; Elliott und Elliott, 1993; Ogata und Tatebayashi, 1993; Yoshimura *et al.*, 1996).

Es zeigte sich, dass TTX-resistente und TTX-sensitive Natriumströme ein unterschiedliches Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten besitzen.

Das Schwellenpotential der potentialabhängigen Aktivierung und Inaktivierung liegt für die TTX-resistenten Natriumströme etwa 20-30 mV höher als bei TTX-sensitiven Natriumströmen. Die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung verläuft bei TTX-resistenten Natriumströmen um den Faktor drei langsamer. Die Erholung von der Inaktivierung erfolgt jedoch um ein zehnfaches schneller als bei der TTX-sensitiven Kanalform (Elliott und Elliott, 1993). Bei Experimenten auf Einzelkanalebene zeigten die TTX-resistenten Natriumkanäle stets eine kleinere Einzelkanalleitfähigkeit als die TTX-sensitiven Natriumkanäle (Roy *et al.*, 1994; Bräu *et al.*, 1995; Motomura *et al.*, 1995).

Inzwischen ist die gesamte Aminosäuresequenz der beiden spannungsabhängigen Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanal-Subtypen $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ durch molekularbiologische Untersuchungen bekannt. Der TTX-resistente Natriumkanal wurde unabhängig voneinander in zwei Arbeitsgruppen um Wood und Akopian sowie Hunter und Sangameswaran erstmals kloniert. Die Natriumkanäle, die dabei beide Gruppen sequenzierten, kommen an kleinen Spinalganglienzellen neugeborener sowie erwachsener Ratten vor (Akopian *et al.*, 1996; Sangameswaran *et al.*, 1996). Naylor und Mitarbeiter klonierten 1997 den humanen TTX-resistenten Natriumkanal und bewiesen hiermit dessen Vorkommen im menschlichen peripheren Nervensystem (Naylor *et al.*, 1997). Damit gewannen pharmakologische Untersuchungen am TTX-resistenten Natriumkanal auch für die klinische Forschung an Bedeutung, so dass diesem Kanal in den letzten Jahren ein gesteigertes wissenschaftliches Interesse zuteil wurde. Heute weiß man, dass dieser Kanal eine Rolle bei der Impulsentstehung und Weiterleitung im peripheren Schmerzsystem spielt. Die langsame Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik der TTX-resistenten Natriumströme ist für schnell fortgeleitete Aktionspotentiale (20-100 m/s) dicker myelinisierter Nerven zu langsam (Elliott und Elliott, 1993; Ogata und Tatebayashi, 1993). Für die langsam fortgeleiteten Aktionspotentiale (1 m/s) in nozizeptiven C-Fasern ist diese Kinetik jedoch ausreichend (siehe Tabelle 1).

Des Weiteren konnte Kobayashi eine TTX-resistente Komponente in C-Faser-Summenaktionspotentialen des Nervus ischiadicus des amerikanischen Ochsenfrosches aufzeigen (Kobayashi *et al.*, 1993). Bei Säugern kommen TTX-resistente Natriumkanäle in schmerzleitenden $A\delta$ - und C-Fasern neben TTX-sensitiven Natriumkanälen vor und tragen dort mit zur Aktionspotentialbildung bei. Jedoch scheint ihr Anteil in gesunden Nerven nicht

ausreichend zu sein, um eine genügende Transmitterfreisetzung für die Impulsweiterleitung in nachgeschaltete zentrale Neurone im Rückenmark zu bewerkstelligen (Pinto *et al.*, 2008).

Eine wichtigere Rolle scheint der TTX-resistente Natriumkanal aber bei der Entstehung chronischer Schmerzsyndrome zu spielen. TTX-resistente Natriumkanäle werden durch Nozizeptor sensibilisierende Substanzen aktiviert. England und Mitarbeiter zeigten, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂), ein Schmerzmediator, der die Empfindlichkeit von Nozizeptoren heraufsetzt, die Erregbarkeit kleiner Spinalganglienzellen steigern kann (England *et al.*, 1996). Von der Arbeitsgruppe um Gold wurden die Substanzen Adenosin und Serotonin untersucht, die ebenfalls sensibilisierend auf Nozizeptoren wirken (Gold *et al.*, 1996).

An pathologisch veränderten Nervenfasern, deren Ruhepotential durch dauerhafte Schädigung im positiveren Bereich liegt (-60 mV), als an gesunden Zellen (-90 mV), kann der spannungsabhängige TTX-resistente Natriumkanal eher zur Impulsenstehung beitragen, da sein Aktivierungs- bzw. Inaktivierungspotential deutlich höher liegt als das TTX-sensitiver Natriumkanäle. Dieser Effekt wird noch zusätzlich durch die schnelle Erholung nach Inaktivierung verstärkt (Elliott und Elliott, 1993). Mittels einer Computersimulation konnte gezeigt werden, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften des TTX-resistenten Natriumkanals unter diesen Bedingungen gut zur Ausbildung spontaner elektrischer Depolarisationen geeignet sind (Elliott, 1997) und somit eine neuropathische Schmerzentsstehung erklären können.

Neuere Arbeiten, wie die der Arbeitsgruppe um Takor, konnten zeigen, dass es in Bereichen geschädigter peripherer Nerven zu einer bis elffach höheren Expression speziell des spannungsabhängigen TTX-resistenten Na_v1.8-Kanals, im Vergleich zu unversehrten Nerven kommt (Takor *et al.*, 2009). So verstärkt diese gezeigte Akkumulation von Na_v1.8-mRNA in geschädigten Nervenanteilen die vermutete Rolle dieses Kanals im Zusammenhang mit dem erhöhten axonalen Erregungszustand in der Modellvorstellung des neuropathischen Schmerzes.

Auch scheint der Kanal eine Bedeutung in der Vermittlung des Kälteschmerzes zu besitzen (Zimmermann *et al.*, 2007). Arbeiten mit einem selektiven Blocker des Na_v1.8-Kanals, Substanz A-803467 [5-(4-chlorophenyl)-N-(3,5-dimethoxyphenyl)furan-2-carboxamid], konnten ebenfalls eine Besserung im Zusammenhang mit chronischen Schmerzen aufzeigen und den Na_v1.8-Kanal in einen zentralen Zusammenhang mit der Weiterleitung sowohl mechanisch evozierter Potentiale als auch spontan generierter neuronaler Aktivitäten an verletzten Spinalnerven setzen (McGaraughty *et al.*, 2008).

1.6 Natriumkanal blockierende Substanzen

1.6.1 Lokalanästhetika

Lidocain

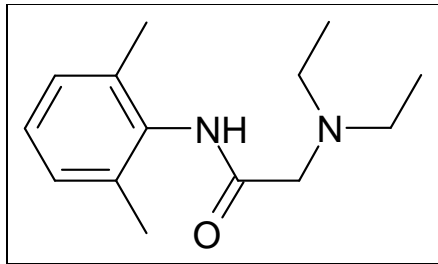


Abb. 1.6.2

Strukturformel: Lidocain

2-[Diethylamino]-N-[2,6 Dimethylphenyl]-Acetamid

Summenformel: $C_{14}H_{22}N_2O$

Molekulargewicht: 234,34 g/mol

Lidocain ist ein vom Kokain abgeleitetes Lokalanästhetikum vom Amid-Typ (siehe Abb. 1.6.2). Wie andere Lokalanästhetika blockiert es spannungsabhängige Natriumkanäle in den Zellmembranen der Nervenzellen und unterbindet damit die Weiterleitung von Aktionspotentialen. Des Weiteren gehört Lidocain nach der Vaughan Williams-Klassifikation (1984) auch zu den I B-Anti-arrhythmika. Lidocain hemmt am Herzen den schnellen Na^+ -Einstrom in die Schrittmacherzellen und wirkt so membranstabilisierend bei ventrikulären Extrasystolen und Tachykardie.

1.6.2 Trizyklische Antidepressiva

Amitriptylin

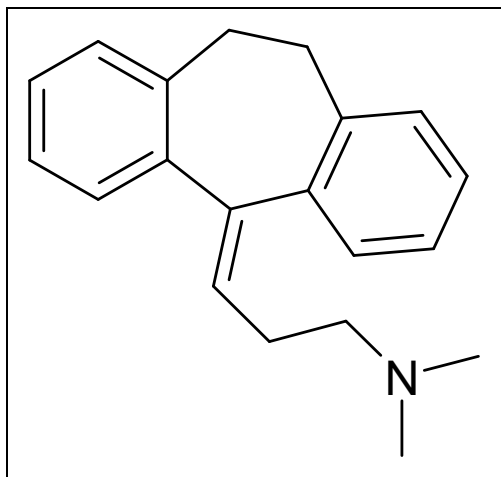


Abb. 1.6.3

Strukturformel: Amitriptylin

3-[10,11-Dihydro-5H-Dibenzo-(a,d)Cyclohepten
-5-Ylidene]-N,N-Dimethyl-1-Propanamin

Summenformel: $C_{20}H_{23}N$

Molekulargewicht: 277,41 g/mol

Amitriptylin ist ein trizyklisches Antidepressivum und zählt zu den Psychopharmaka. Von trizyklisch spricht man aufgrund der chemischen Struktur, die ein Dreiringsystem enthält (siehe Abb. 1.6.3).

Amitriptylin wurde 1960 erstmals synthetisiert und 1962 vom Arzneimittelhersteller Lundbeck auf dem Markt eingeführt und war bis zum Aufkommen der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer lange Zeit das meist verordnete Antidepressivum weltweit.

Man geht davon aus, dass eine gewisse Unterfunktion von Neurotransmittern im Gehirn am Zustandekommen der depressiven Symptomatik beteiligt ist. Wie alle trizyklischen Antidepressiva bewirkt Amitriptylin im zentralen Nervensystem die Hemmung der Wiederaufnahme der von Nervenimpulsen oder anders freigesetzten klassischen Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin und damit eine Hemmung ihrer Inaktivierung. Alle trizyklischen Antidepressiva haben eine starke anticholinerge Wirkung, welche vorherrschend für die Nebenwirkungen dieser Substanzgruppe verantwortlich sind, wie z.B. Mundtrockenheit, Sedierung sowie Magen-Darm und Blasenfunktionsstörungen.

Neben der antidepressiven Wirkung der trizyklischen Antidepressiva ist auch eine analgetische Potenz dieser Substanzen bekannt und sie werden häufig als adjuvante Medikamente zur Therapie neuropathischer, chronischer Schmerzzustände eingesetzt. Der bisher nicht genau verstandene analgetische Wirkmechanismus der trizyklischen Antidepressiva könnte entweder durch eine zentrale Wirkung dieser Substanzgruppe erklärt werden, oder aber, wie bei dem in dieser Arbeit untersuchten Modell, Folge einer peripheren Wirkung sein.

Nortriptylin

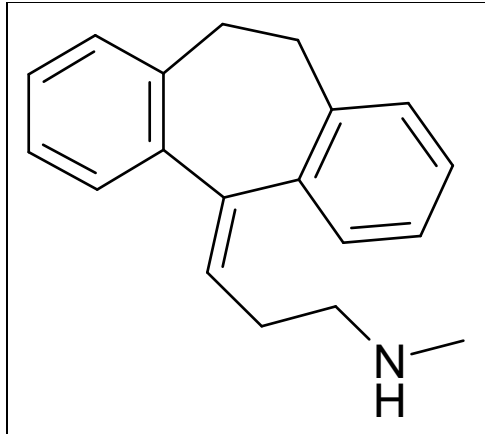


Abb. 1.6.4

Strukturformel: Nortriptylin

3-[10,11-Dihydro-5H-Dibenzo-(a,d)Cyclohepten
-5-Ylidene]-N-Methyl-1-Propanamin

Summenformel: C₁₉H₂₁N

Molekulargewicht: 263,39 g/mol

Nortriptylin gehört ebenfalls zur Substanzgruppe der trizyklischen Antidepressiva (siehe Abb. 1.6.4). Es handelt sich um einen aktiven Metaboliten des Amitriptylins und entsteht aus selbigem durch Demethylierung.

Doxepin

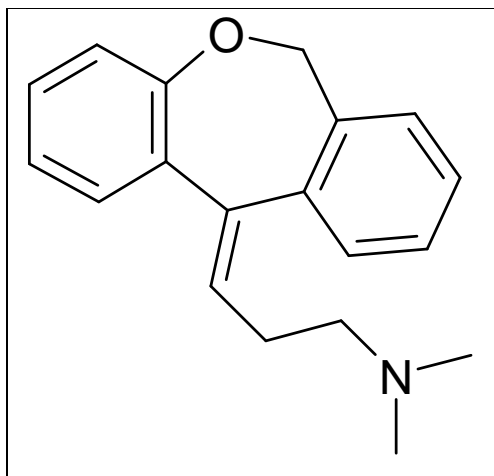


Abb. 1.6.5

Strukturformel: Doxepin

N,N-Dimethyl-3-Dibenz-(b,e)oxepin
-11(6H)-Ylidenpropylamin

Summenformel: C₁₉H₂₁N₂O

Molekulargewicht: 279,39 g/mol

Auch Doxepin wirkt als trizyklisches Antidepressivum durch die unselektive Wiederaufnahmemehemung von Serotonin und Noradrenalin und erhöht so deren Verfügbarkeit für die neuronale Übertragung, was zu einer Milderung depressiver Symptome führt (siehe Abb. 1.6.5).

Imipramin

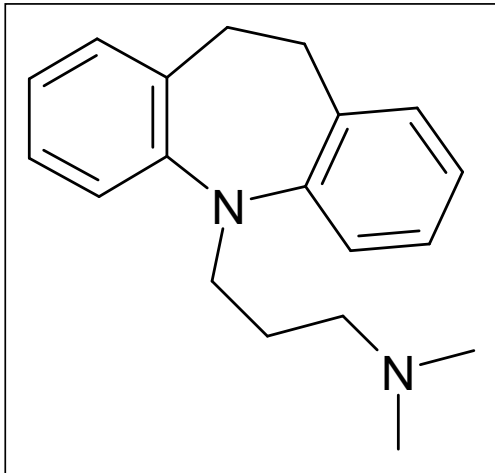


Abb. 1.6.6

Strukturformel: Imipramin

10,11-Dihydro-N,N-Dimethyl-5H-Dibenz-(b,f)azepine-5-Propanamin

Summenformel: C₁₉H₂₄N₂

Molekulargewicht: 280,42 g/mol

Imipramin war der erste moderne Wirkstoff zur Behandlung von Depressionen und wurde zum Prototypen einer ganzen Klasse von Psychopharmaka, den trizyklischen Antidepressiva (siehe Abb. 1.6.6). Entwickler und Hersteller war der Schweizer Konzern Geigy. Die Markteinführung erfolgte 1958.

1.6.3 Tetrazyklische Antidepressiva

Maprotilin

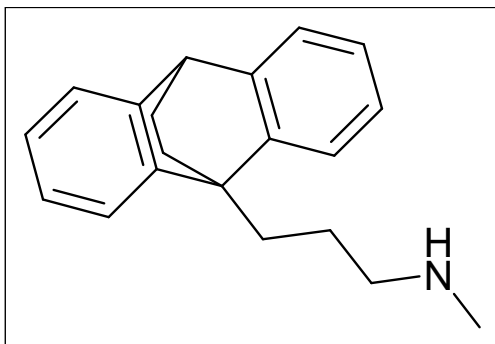


Abb. 1.6.7

Strukturformel: Maprotilin

N-Methyl-9,10-Ethanoanthracen-9(10H)-Propanamin

Summenformel: C₂₀H₂₃N

Molekulargewicht: 277,41 g/mol

Nachdem bei den trizyklischen Antidepressiva der Mechanismus ihres therapeutischen Effekts als Psychopharmaka geklärt war, wurde intensiver nach Substanzen gesucht, deren Wirkung die Gleiche ist, jedoch ohne starke anticholinerge Nebenwirkungen. Zu diesen gehört das tetrazyklische Maprotilin, welches sich durch eine deutlich bessere Verträglichkeit bei gleicher therapeutischer Stärke auszeichnet und daher auch von sehr hohem Interesse für die Schmerztherapie ist (siehe Abb.1.6.7).

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den bisher weitgehend unklaren Wirkmechanismus trizyklischer Antidepressiva bei der Behandlung chronischer Schmerzzustände zu klären. Dazu werden verschiedene Antidepressiva auf ihre direkte Wirkung auf die Natriumleitfähigkeit an peripheren nozizeptiven Neuronen untersucht. An diesen Neuronen wird der Fokus auf native spannungsabhängige TTX-resistente Natriumkanäle gelegt, um zu erarbeiten, ob trizyklische Antidepressiva über die Blockade dieser Kanäle und deren Ströme die Schmerzweiterleitung reduzieren.

2. Elektrophysiologische Methoden

Die Darstellung TTX-resistenter Natriumströme an kleinen, enzymatisch isolierten Spinalganglienzellen (Spinalneuronen) der Ratte erfolgte mit Hilfe der „whole-cell“-Konfiguration der „patch-clamp“-Methode. Pharmakologische Untersuchungen erfolgten durch die extrazelluläre Applikation von Lidocain, einem Lokalanästhetikum, und verschiedener trizyklischer und tetrazyklischer Antidepressiva.

2.1 Präparation

Die für die Versuchsreihen benötigten Spinalganglienzellen stammten von 6-8 Wochen alten männlichen und weiblichen Wistar-Ratten. Das Töten der Ratten und die Organentnahme wurden dem zuständigen Regierungspräsidenten gemeldet.

Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 150 und 250 g. Die Ratten wurden zunächst durch Comotio betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Darauf folgte das von ventral vorgenommene Freilegen der Wirbelsäule unter Entfernung aller Thorax- und Baucheingeweide. Die Wirbelsäule selbst wurde durch das rechts- und linksseitige Eröffnen des Rückenmarkkanals mittels einer Schere in einen ventralen und dorsalen Anteil gespalten. Durch leichten Zug an den auf diese Weise freigelegten und zugänglichen Hinterwurzeln konnten die thorakalen und lumbalen Spinalganglien herausgezogen und vom Spinalnerven und der Hinterwurzel mit einer Schere abgetrennt werden. Mit diesem Verfahren ließen sich durchschnittlich 20-30 Spinalganglien pro Versuchstier gewinnen, die zunächst in Tyrodelösung (siehe Kapitel 2.4; Lösungen und Lösungswechsel) eingelegt wurden. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Ganglien unter einer Stereolupe (Stemi DRC, Zeiss, Oberkochen) vom umgebenden Bindegewebe und restlichen Nervenanteilen gelöst und in einer Ca^{2+} und Mg^{2+} freien Tyrodelösung mit 3 mg/ml Kollagenase (Worthington Typ CLS-II, 280 U/l, Biochrom, Berlin) und 1 mg/ml Trypsin Typ-III-S (Sigma, Deisenhofen) für 40 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Ganglien von eventuell verbliebenen, nicht sichtbaren Kollagenstrukturen zu säubern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal gespült und zur Inaktivierung der Enzyme für 5 Minuten in ein Nährmedium (siehe Kapitel 2.4.1 Nährmedium) mit Trypsin-Inhibitor Typ II-S (100 µg/ml, Sigma) und Desoxyribonuclease II (80 µg/ml, Fluka, Buchs, Schweiz) inkubiert. Um die Ganglien zu vereinzeln, wurden nacheinander drei feine Glaspipetten mit kleiner werdendem Durchmesser verwendet, mit deren Hilfe die Zellen

durch Titrieren mechanisch voneinander getrennt wurden. Nach Absetzen der Ganglien in der Zellsuspension und Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen in Tyrodelösung überführt und auf Nährmedium enthaltende Plastikpetrischalen (\varnothing 35 mm) ausgesät und konnten so unter Carbogen-Begasung (95% O₂, 5% CO₂) bei 24°C bis zu 72 Stunden aufbewahrt werden.

2.2 Die „patch-clamp“-Technik

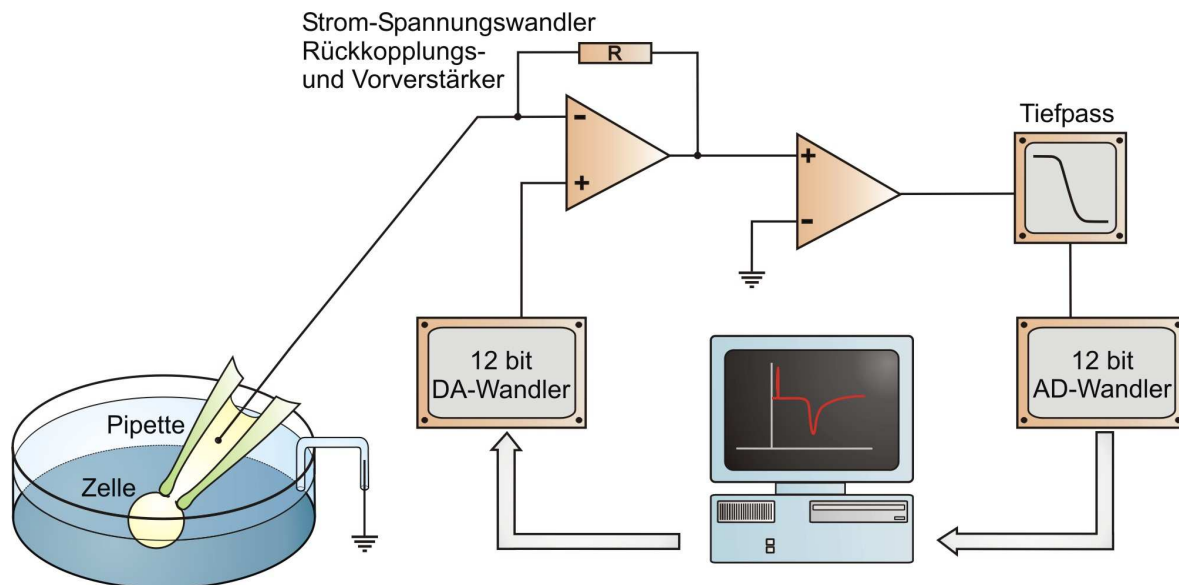


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des „patch-clamp“-Versuchsstandes

Von einem Computer wird das gewünschte Membranpotential über einen Digital-Analog-Wandler an einen Verstärker ausgegeben (Spannungsklemme oder „voltage-clamp“). Dieser misst über die Pipette die intrazelluläre Spannung und verstärkt gegebenenfalls eine vorhandene Differenz. In diesem Falle fließt über den Rückkopplungswiderstand ein Strom, bis das durch den Computer vorgegebene Potential erreicht ist. Dieser Strom verhält sich nach dem Ohmschen Gesetz proportional zur Spannung am Ausgang des Verstärkers. Dieses Signal wird dann weiterverstärkt und gefiltert, um schließlich nach Digitalisierung durch den Analog-Digital-Wandler auf dem Computer dargestellt zu werden. Einwärtsströme werden dabei stets nach unten ausgerichtet abgebildet und mit negativen Vorzeichen versehen. Mit dem Klemmenstrom einer „voltage-clamp“-Anordnung misst man so die Stärke des bei einem festgelegten Potential durch die Membran fließenden Stroms.

Alle Experimente wurden mit der „patch-clamp“-Methode (Hamill *et al.*, 1981) durchgeführt (Versuchsstandaufbau siehe Abbildung 2.1).

Bei diesem Untersuchungsprinzip wird eine feine Glaspipette, deren Spitzendurchmesser etwa $1\ \mu\text{m}$ beträgt, unter mikroskopischer Sicht an die Membran einer Zelle herangeführt und aufgesetzt. Durch die Erzeugung eines leichten Unterdrucks in der Pipette wird nun die Zellmembran an den Pipettenmund angesaugt, wobei ein elektrischer Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm, das sogenannte Gigaseal, aufgebaut wird. Dieser hohe Abdichtwiderstand zwischen Zellmembran und Pipette stellt den entscheidenden Unterschied der „patch-clamp“-Methode gegenüber der Mikroelektrodenteknik dar, bei der eine feine Pipette in die Zelle eingestochen wird. Bei diesen Experimenten wurden Messungen ab einem Abdichtwiderstand von $> 1\text{G}\Omega$ vorgenommen.

Das Gigaseal hat für die exakte Messung der Membranpotentiale zwei wichtige Vorteile. Erstens wird der Leckstrom, welcher durch die Verletzung der Zellmembran entsteht, so auf eine nicht nennenswerte Größe reduziert. Die elektrische Homöostase wird also nicht gestört. Zweitens wird das elektrische Rauschen, welches sich umgekehrt proportional zum Abdichtwiderstand entwickelt, bei den hohen Abdichtwiderständen, wie sie bei der „patch-clamp“-Methode erreicht werden, so klein, dass sogar Einzelkanalmessungen an den Ionenkanälen durchgeführt werden können.

Unbedingte Grundvoraussetzung für das Erzielen eines hohen Gigaseals stellen jedoch eine glatte Zelloberfläche, saubere und polierte Pipetten sowie die Verwendung gefilterter Lösungen dar.

Ein spezieller Verstärker, welcher für das Messen des Stroms durch die Zelle benötigt wird, zwingt der Zellmembran über die Pipette ein bestimmtes Potential auf, welches konstant gehalten wird. Das Prinzip des „voltage-clamp“-Verfahrens beruht auf dem Aufrechterhalten einer konstanten Spannung und dem Messen des dazu nötigen Kompensationsstromes. Als „patch-clamp“-Verstärker wurde der Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) benutzt. Leckströme und kapazitive Ströme an der Zellmembran wurden direkt während des Experimentes über den Verstärker ausgeglichen. Um den durch Serienwiderstände auftretenden Spannungsfehler möglichst klein zu halten, wurden ausschließlich große Pipetten mit niedrigem Widerstand ($1,5\text{-}2,5\ \text{M}\Omega$) verwendet. Des Weiteren konnten 80-90% des Serienwiderstandes durch die Benutzung der Serienwiderstandskompensationsfunktion des Verstärkers ausgeglichen werden.

Es gibt vier verschiedene Konfigurationen die bei der „patch-clamp“-Technik Verwendung finden (siehe Abbildung 2.2 „patch-clamp“-Konfigurationen). Sie können in die zellverbundenen „cell-attached“- und „whole-cell“- sowie die zellfreien „inside-out“- und „outside-out“-Konfiguration unterteilt werden.

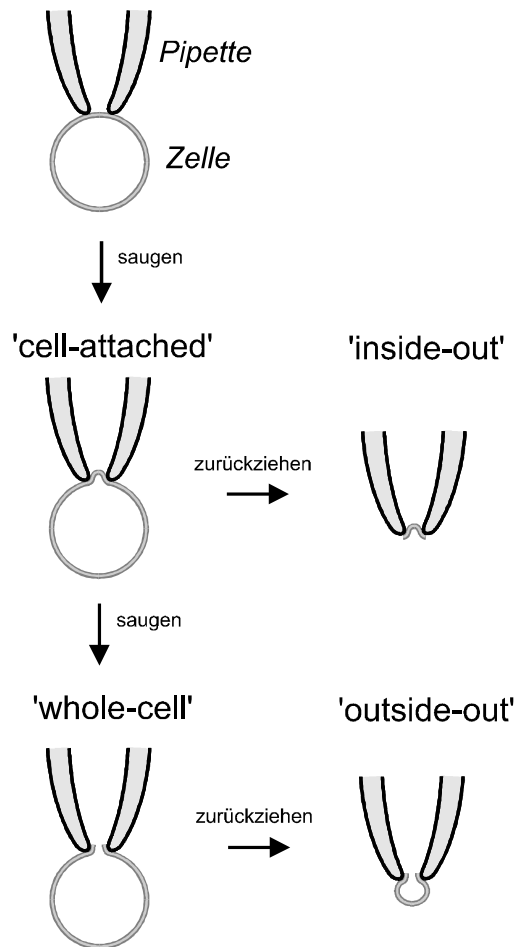


Abb. 2.2 Schematische Darstellung gebräuchlicher „patch-clamp“-Konfigurationen.

Bei der „patch-clamp“-Methode wird die Pipette zunächst vorsichtig, unter Sicht der Zelle angenähert, aufgesetzt und angesaugt → „cell attached“.

Zieht man nun die Pipette ruckartig zurück, wird das zuvor angesaugte Zellmembranstück, der „patch“, aus der Membran herausgerissen und bleibt an der Pipettenspitze haften. Dieser „inside-out-patch“ liegt nun mit der zuvor intrazellulären Membranseite der externen Lösung zugewandt.

Reißt man hingegen kein Membranteil aus der Zelle heraus, sondern saugt nur die Membranwand in die Pipette bis sich diese öffnet, so gelangt man in die „whole cell“-Konfiguration, bei der sich die extrazelluläre Membranseite weiterhin außen befindet. Durch weiteres Einsaugen der Zelle in die Pipette schnürt sich ein kleines Membranvesikel ab und bildet so den „outside-out-patch“, dessen Extrazellulärseite weiter der externen Lösung zugewandt ist.

Bei den Experimenten dieser Arbeit kam ausschließlich die „whole-cell“-Konfiguration zur Anwendung. Dabei liegt die Pipette zunächst der Zellmembran dicht an - „cell-attached“. Nun wird durch einen kurzen starken Sog, welcher über die Pipette erzeugt wird, ein Loch in die Zellmembran unter der Pipette gesaugt. Dabei liegt die Zellmembran dann der Innenwand der Pipette an und man erhält einen elektrischen Zugang zum Inneren der Zelle, über den der

Strom durch die in der Membran gelegenen und geöffneten Ionenkanäle der gesamten Zelle gemessen werden kann. Über den durch das Durchsaugen entstandenen Membrandefekt besteht nicht nur ein elektrischer Zugang zur Zelle, sondern es findet auch ein Auswaschen des Zellinhaltes statt.

Dieser Vorgang hat Vor- und Nachteile. Einerseits kann die chemische Zusammensetzung des intrazellulären Milieus kontrolliert werden. Andererseits gehen mit der Zeit Substanzen verloren, die für die normale Funktion der Ionenkanäle entscheidend sein können. Der Austausch des Zellinhaltes dauerte ca. 50 Sekunden. Danach wurden stabile Verhältnisse erreicht.

Pipetten:

Für die Herstellung der Pipetten wurden Borosilikatglas-Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm (CEE BEE 101-PS, Chr. Bardram, Svendborg, Dänemark) verwendet.

Die Pipetten wurden jeweils kurz vor dem Experiment mittels eines Horizontal-Pipettenziehgerätes (Brown-Flaming Micropipette Puller Model P-97, Stutter Instrument Company, USA) hergestellt. Die Pipettenspitze wurde zusätzlich vor jedem einzelnen Experiment unter mikroskopischer Sicht mit einer auf einem glühenden Platindraht erhitzten Glas-kugel feuerpoliert, um auf diese Weise eine glattere und engere Pipettenspitze zu erzeugen und eventuelle Verschmutzungen zu beseitigen. Dann wurden die so präparierten Pipetten mittels einer feinen Stahlkanüle von hinten mit der Intrazellulärlösung befüllt. Sie hatten beim Eintauchen in die Badlösung einen elektrischen Widerstand von 1,5-2,5 M Ω . Jede Pipette wurde nur für ein einziges Experiment benutzt. Das Heranführen der Pipette an die Zelle erfolgte unter Sicht durch ein invertierendes Mikroskop (Modell IM, Zeiss, Oberkochen) mit 400facher Vergrößerung und mittels eines Mikromanipulators (HS6/2, Fa. Maerzhäuser, Wetzlar), der über einen Joystick manuell gesteuert wurde.

2.3 Perfusionssystem

Um die Natriumkanal blockierende Wirkung der verwendeten Pharmaka zu untersuchen, wurde ein spezielles Perfusionssystem verwendet. Dieses bestand im Wesentlichen aus einem mit Bohrungen versehenen Plexiglasblock, der über kurze Schlauchverbindungen mit sechs gebogenen Glasröhren von jeweils 1 mm Durchmesser in Verbindung stand. Diese wurden wiederum in der Petrischale positioniert. In die Bohrungen konnten bis zu sechs 5 ml Spritzen

mit verschiedenen Testlösungen gesteckt werden, welche als Reservoir dienten und die über ein hydraulisches System langsam entleert werden konnten. Der Lösungsfluss betrug dabei 1,5 ml/h, was einer Flussgeschwindigkeit von ca. 20 mm/min in den Röhren entsprach. Der Plexiglasblock selbst wurde über einen Haftmagneten auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt, während die Glasröhren in die Petrischale mit den zu untersuchenden Zellen hineinragten.

Wurde eine Spinalganglienzelle erfolgreich in die „whole-cell“-Konfiguration gebracht, musste sie, an der Pipette haftend, vorsichtig vom Boden der Petrischale gelöst werden und konnte dann in die verschiedenen Röhren mit den jeweils unterschiedlichen Testlösungen eingebracht und umspült werden. Sealwiderstand und Stromstärke der Zelle blieben durch das Anheben unverändert. Mit dieser Methode konnte auf das mühsame Wechseln der gesamten Nähr- bzw. Testlösung verzichtet werden. Außerdem war der beschriebene Wechselvorgang zudem innerhalb von wenigen Sekunden möglich.

2.4 Lösungen und Lösungswechsel

2.4.1 Nährmedium

Das Nährmedium zur Zellaufbewahrung und Präparation wurde vor jeder Präparation frisch hergestellt. Es setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen. Zu 26,1 ml glutaminfreiem „Minimum Essential Medium Eagle“ wurden 0,6 ml einer 200 mmol/l L-Glutamin-Lösung, 3 ml fötales Kälberserum sowie 0,3 ml einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (3000 IE Penicillin; 3 mg Streptomycin) hinzugegeben. Alle Substanzen wurden von Sigma, Deisenhofen, bezogen.

2.4.2 Kristalline Lösungen

Sämtliche für die Präparation und die Experimente benötigten Lösungen wurden durch die Zugabe entsprechender Chemikalien zu Aqua bidestillata selbst hergestellt, bei +4 °C aufbewahrt und monatlich erneuert. Ihr pH-Wert von 7,4 bzw. 7,2 wurde jeweils vor den Experimenten überprüft und mittels Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) eingestellt. Eine Auflistung der Ionenkonzentrationen der zur isolierten Darstellung TTX-resistenter Natriumströ-

me benötigten und modifizierten Extra- bzw. Intrazellulärlösungen sind den Tabellen 2.1 und 2.2 zu entnehmen.

| Substanz (Konzentration in mmol/l) | Tyrode | Tyrode Ca²⁺,Mg²⁺-frei | 35-Tyrode | 35-Tyrode-TTX |
|--|---------------|--|------------------|----------------------|
| Na ⁺ | 145 | 145 | 35 | 35 |
| Cholin ⁺ | | | 110 | 110 |
| K ⁺ | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Ca ²⁺ | 1 | | 1 | 1 |
| Mg ²⁺ | 1 | | 1 | 1 |
| Cl ⁻ | 154 | 150 | 164 | 164 |
| Glucose | 6 | 6 | 6 | 6 |
| HEPES | 10 | 10 | 10 | 10 |
| TEA ⁺ | | | 10 | 10 |
| TTX | | | | 0,0001 |

Tabelle 2.1 Extrazellulärlösung

Um die TTX-sensitiven Natriumströme zu blockieren, wurde der Extrazellulärlösung Tetrodotoxin (TTX) in einer Konzentration von 100 nmol/l aus einer Stammlösung von 1 mg/ml (31,1 µmol/l) der Firma Sigma in Aqua bidestillata zugesetzt. Die spannungsabhängigen Kaliumströme wurden durch den Zusatz von 10 mmol/l Tetraethylammoniumchlorid (TEA) blockiert. Über eine Senkung der Natrium-Konzentration auf 35 mmol/l, die eine Verminderung des Natriumstroms zur Folge hat, wurden die „voltage-clamp“-Bedingungen im Experiment verbessert. Ein Ausgleich der Osmolarität erfolgte über die Zugabe von Cholinchlorid. Um die Stabilität des „Seals“ nicht zu stören, wurde die Calcium-Konzentration nicht unter 1 mmol/l gesenkt.

| Substanz | Konzentration (mmol/l) |
|-----------------|----------------------------------|
| Cs ⁺ | 140 |
| F ⁻ | 140 |
| Na ⁺ | 10 |
| Cl ⁻ | 10 |
| EGTA | 6 |
| HEPES | 10 |

Tabelle 2.2 Intrazellulärlösung (Pipetten-Lösung)

Zur Blockade der Kaliumströme wurden der Intrazellulärlösung Cs⁺-Ionen beigefügt. Calciumströme wurden durch den Zusatz von F⁻-Ionen blockiert. Über den Chelatbildner Ethylenglycol-Bis[β-Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA) wurde die effektive intrazelluläre Calcium-Konzentration auf Null gesenkt.

2.5 Datenverarbeitung und Statistik

Um die Messdaten erfassen und auswerten zu können, wurde ein handelsüblicher IBM-kompatibler PC verwendet. Die experimentell gemessenen Ströme wurden mittels eines 12-bit Analog-Digital Wandlers (TM-40 AD/DA board, Scientific Solutions, Solon, OH, USA) online digitalisiert und danach abgespeichert. Das Nyquistkriterium besagt, dass ein Signal, welches sich mit einer bestimmten Geschwindigkeit ändert, mit einer mehr als doppelt so hohen Maximalfrequenz digitalisiert werden muss, damit keine Information verloren geht und der Charakter des Signals unverändert bleibt. Um diesem Kriterium Rechnung zu tragen, betrug die Abtastfrequenz (Anzahl der digitalisierten Datenpunkte pro Sekunde) mindestens das Doppelte der Filterfrequenz. Zum Auslösen der Natriumströme wurden mit Hilfe des PCs und des 12-bit Digital-Analog Wandlers Spannungsimpulse erzeugt und auf die Zelle gegeben. Sämtliche zur Zellreizung, Messdatenakquisition sowie Vermessung der Natriumströme verwendeten Programme waren Teil des pClamp 6.0 Softwarepaketes von Axon Instruments. Mit Hilfe des Programms FigP 5.0 (Biosoft, Cambridge, UK) wurden die Abbildungen angefertigt und die Anpassung der nicht-linearen Datenpunkte an die Modellfunktion durchgeführt, wobei die Datenpunkte selbst Mittelwerte darstellen und die Fehlerbalken deren Stan-

Standardfehler beschreiben. Es wurde diese Form der Fehlerdarstellung gewählt, da es sich bei den angegebenen Werten um physikalische Messgrößen handelt und der Standardfehler des Mittelwertes ein Maß für die Güte einer Messung ist.

Alle Experimente wurden bei einer Raumtemperatur von 22-24 °C durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Grundlagen des TTX-resistenten Natriumkanals

Man unterscheidet aufgrund ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Unterschiede zwei Typen von Spinalganglienzellen (DRG-Zellen).

Große DRG-Zellen ($\varnothing > 50 \mu\text{m}$) enthalten TTX-sensitive Natriumkanäle in ihrer Zellmembran und weisen bezüglich ihrer Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik schnelle Ströme auf. Die in dieser Arbeit untersuchten kleinen bis mittelgroßen DRG-Zellen ($\varnothing < 50 \mu\text{m}$) hingegen besitzen ein Gemisch aus TTX-sensitiven und TTX-resistenten Natriumkanälen. Durch Zugabe von 100 nmol/l TTX in die externe Tyrode-Lösung werden die TTX-sensitiven Natriumkanäle geblockt, was die isolierte Darstellung der langsamen TTX-resistenten Natriumströme erlaubt.

Um die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der verwendeten Spinalganglienzellen zu untersuchen, wird nach erfolgtem „whole-cell“-patch einer Zelle im „voltage-clamp“-Modus des „patch-clamp“-Verstärkers ein Membranpotential von -90 mV angelegt. Um nun die Abhängigkeit des Natriumstroms von der Membranspannung zu ermitteln, wird mittels eines Impulsprotokolls die Zelle zunächst für 50 ms auf -110 mV hyperpolarisiert, um danach Natriumströme durch 50 ms dauernde Testimpulse in 10 mV Schritten von -80 mV bis +60 mV auszulösen. Der hyperpolarisierende Vorimpuls dient der Unterbindung der schnellen Inaktivierung des TTX-resistenten Natriumkanals sowie der Bestimmung des Leckstroms, über welchen die Qualität der folgenden „patch“-Messung geprüft wird.

Die durch diese Reize ausgelösten Ströme sind für kleine DRG-Zellen exemplarisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

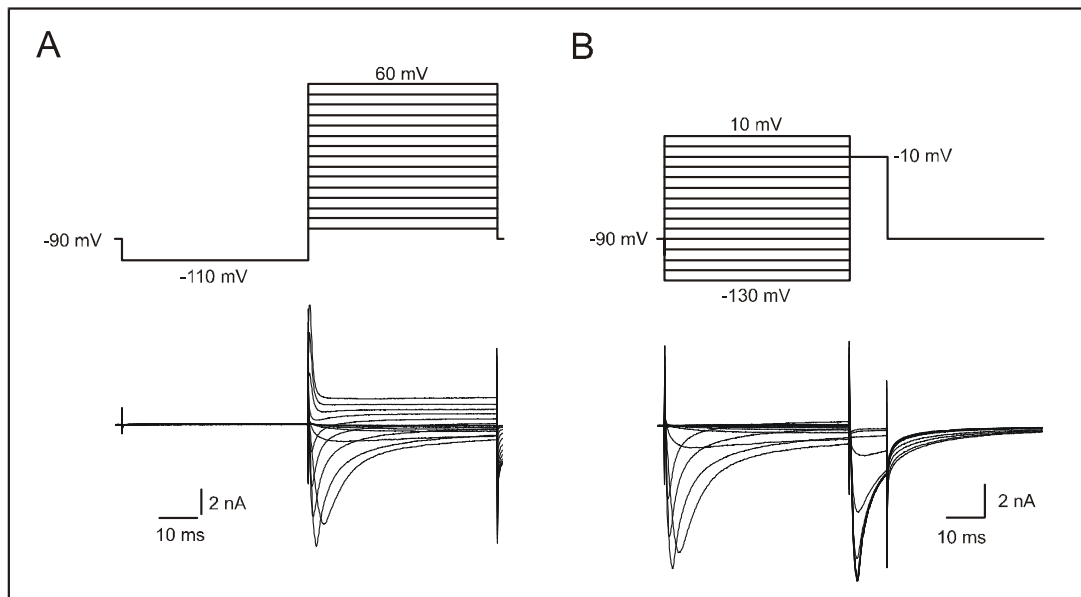


Abb. 3.1 Exemplarische Originalregistrierungen von Natriumströmen untersuchter Spinalganglienzellen mit zugehörigem Impulsprotokoll.

A: Zur Erzeugung einer Aktivierungskurve wird von einem Ruhemembranpotential von -90 mV ausgehend, für zunächst 50 ms, auf -110 mV hyperpolarisiert. Darauf folgen Testimpulse von einer Dauer von jeweils 50 ms in 10 mV Schritten ansteigend von -80 mV bis 60 mV.

B: Zur Messung der potentialabhängigen Inaktivierung wird die Zelle mit Vorimpulsen von -130 mV bis 10 mV gereizt. Gemessen wird dann der Maximalstrom auf den unmittelbar folgenden Testimpuls nach -10 mV und einer Dauer von 10 ms.

3.2.1 Aktivierungskinetik

Zur Erstellung der Strom-Spannungskurve wird die Amplitude des Natriumspitzenstroms (I_{Na}) des jeweiligen Reizes gegen die Spannung des Testimpulses (E) aufgetragen. Die Potentialabhängigkeit des Natriumstroms ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die Abhängigkeit des Natriumstroms vom Potential (E), bei maximaler Natriumleitfähigkeit, wird durch das Ohmsche Gesetz beschrieben.

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

$I_{\text{Na}}(E)$ = Funktion, die die Abhängigkeit des gemessenen Stromes (I_{Na}) vom Membranpotential (E) beschreibt

E_{Na} = Umkehrpotential (mV)

Die Strom-Spannungskurve (I-U-Kurve) resultiert aus der Natriumleitfähigkeit (G_{Na}) der Zellmembran. Der Natriumstrom ist zum einen von der Potentialdifferenz zum Umkehrpotential (Gleichung 2) und zum anderen von der Spannungsabhängigkeit der Natriumkanäle selbst (Gleichung 3) abhängig. Deren Potentialabhängigkeit kann wiederum durch die Boltzmann-Funktion beschrieben werden, die in Abhängigkeit des Potentials (E) zwischen Null und einer maximalen Leitfähigkeit ($G_{\text{Na, max}}$) liegt.

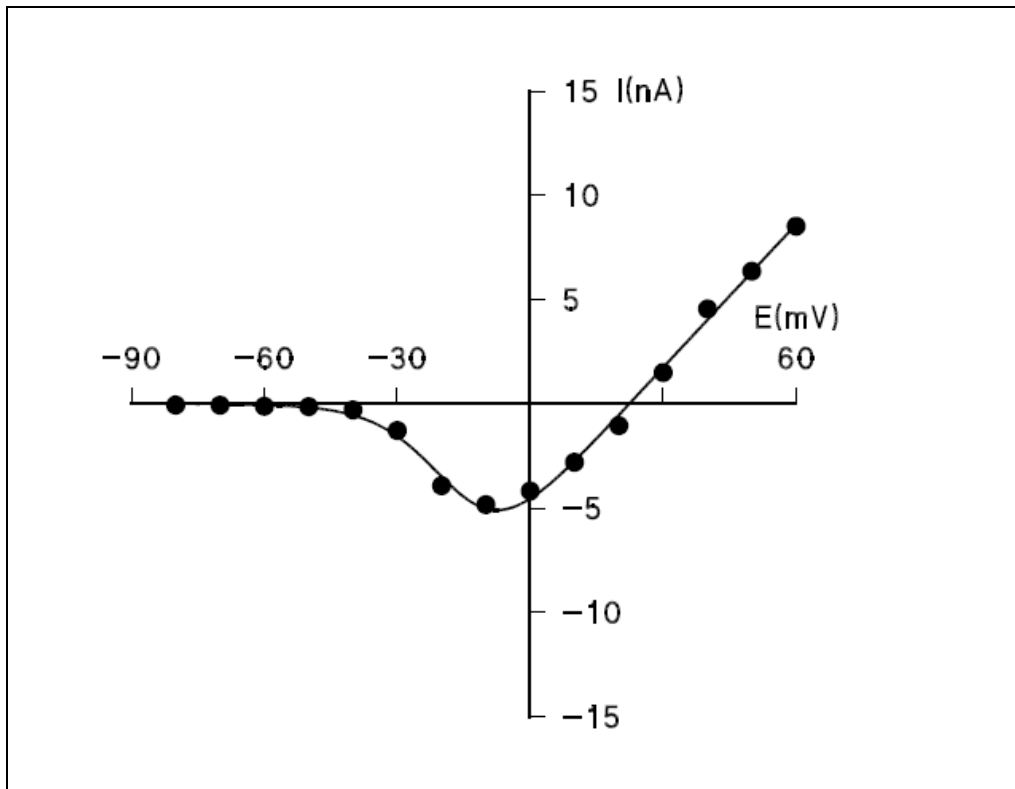


Abb. 3.2 Strom-Spannungskurve einer Spinalganglienzelle

Aufgetragen ist der Natriumspitzenstrom I gegen das Testpotential E . Nach einem hyperpolarisierenden Vorimpuls von -110 mV werden Natriumströme mit wiederholten Testimpulsen in 10 mV Schritten, ansteigend von -80 mV bis +60 mV bei einem Haltepotential von -90 mV, ausgelöst.

Gleichung 3:

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

- $G_{Na,max}$ = Maximale Natriumleitgeschwindigkeit (S)
 k_a = Steilheitsfaktor (mV)
 E = Membranpotential
 $E_{h,a}$ = Halbmaximales Aktivierungspotential (mV)

Setzt man nun Gleichung 2 in Gleichung 3 ein, so erhält man Gleichung 4, welche die mathematische Beschreibung der Strom-Spannungskurve darstellt.

Gleichung 4:

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

Führt man eine nicht-lineare Kurvenanpassung der Parameter der in Abbildung 3.2 dargestellten Strom-Spannungskurven durch, erhält man halbmaximale Aktivierungspotentiale ($E_{h,a}$) von $-22,9 \pm 1,7$ mV ($n=41$) für den TTX-resistenten Natriumstrom. Das Umkehrpotential (E_{Na}) liegt bei $31,2 \pm 1,4$ mV ($n=41$) und kommt dabei dem theoretischen, nach der Nernst'schen Gleichung berechneten Potential von 32 mV für eine Konzentration von 35 mmol/l Na^+ -Ionen extrazellulär sehr nahe.

Bei den angegebenen Zahlenwerten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2.2 Inaktivierungskinetik

Die Potentialabhängigkeit der schnellen Inaktivierung wird über Inaktivierungskurven ermittelt. Hierbei wird zunächst, ausgehend von einem voreingestellten Haltepotential von -90 mV, ein jeweils 50 ms andauernder Testimpuls in 10 mV-Schritten von -130 mV bis 10 mV gegeben, um anschließend mit einem 10 ms dauernden Impuls nach -10 mV den zu untersuchenden Natriumstrom auszulösen. Der dabei gemessene Spitzenstrom (I_{Na}) wird gegen das Potential des Vorimpulses aufgetragen und dann durch Anpassung an Gleichung 5, das halbmaxi-

male Inaktivierungspotential ($E_{h,i}$) bestimmt, welches für die in dieser Arbeit untersuchten Spinalneurone bei einem Wert von $-34,2 \pm 0,8$ mV ($n=41$) liegt.

Gleichung 5:

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

I_{Na} = Natriumspitzenstrom (nA)

$E_{h,i}$ = halbmaximales Inaktivierungspotential (mV)

k_i = Steilheitsfaktor (mV)

Das halbmaximale Inaktivierungspotential ist das Membranpotential, bei dem bereits vor Aktivierung des Natriumstromes die Hälfte aller Ionenkanäle der Zellmembran in einen Inaktivierungszustand übergegangen ist.

3.3 Reizfrequenzabhängigkeit der Natriumstrom-Blockade

Hierfür wurde den untersuchten Spinalneuronen in der „whole-cell“-Konfiguration ein Haltepotential von -90 mV im „voltage-clamp“-Modus des Verstärkers vorgegeben, was dem Ruhepotential der Zellen entspricht. Nach einem 20 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV wurden die Natriumströme durch einen 20 ms langen depolarisierenden Spannungssprung nach -10 mV ausgelöst. Diese Impulsmuster wurden mit einer Frequenz von 2 Hz zehnmal appliziert.

In Abbildung 3.3 sind Originalregistrierungen der TTX-resistenten Natriumströme in Kontroll-Lösung und in einer etwa halbmaximal blockierenden Konzentration der jeweiligen Substanz dargestellt.

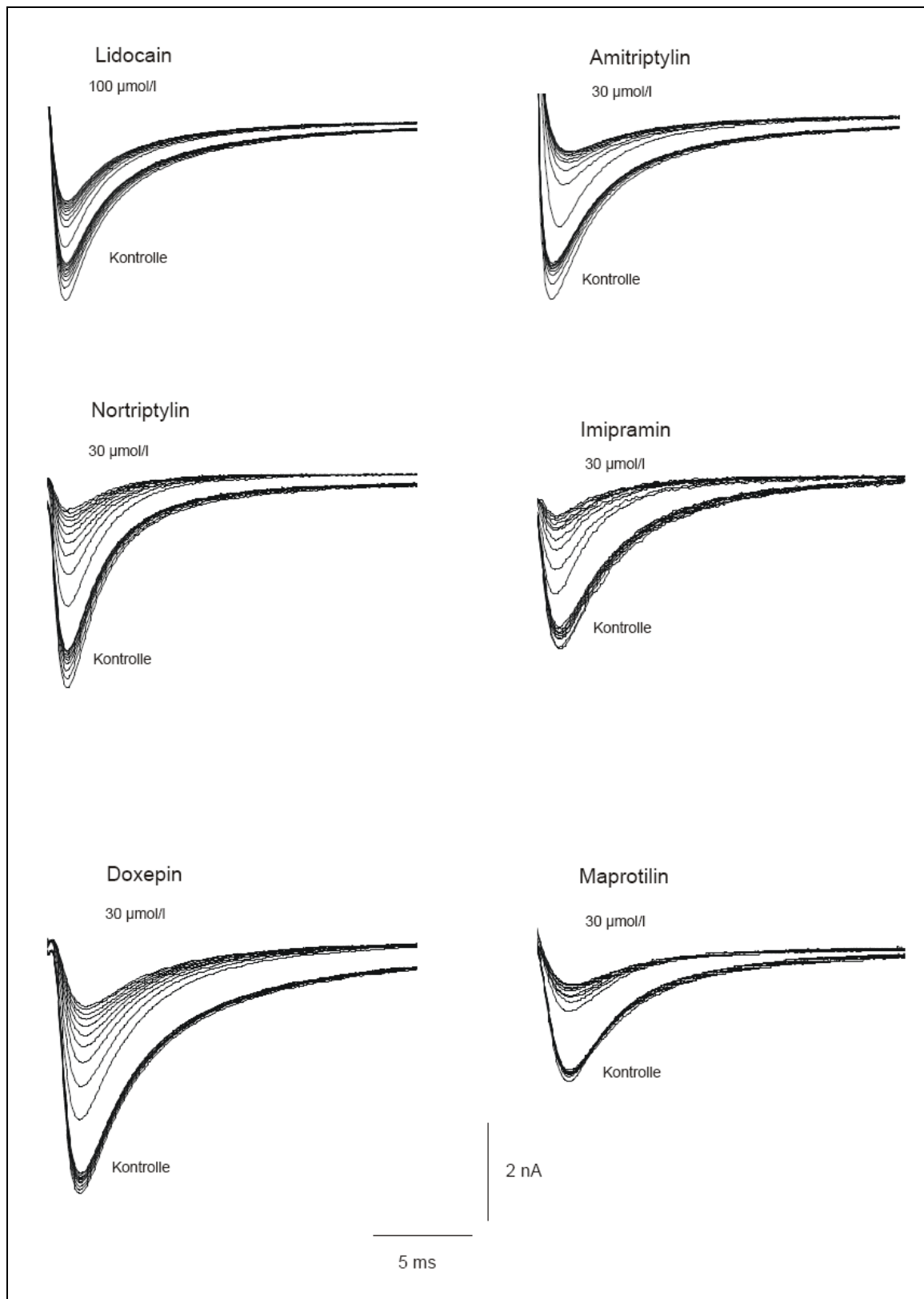


Abb. 3.3 Originalregistrierungen TTX-resistenter Natriumströme. Darstellung von zehn Registrierungen in Kontrolllösung sowie zehn Registrierungen in 100 µmol/l Lidocain sowie 30 µmol/l der Antidepressiva.

Alle untersuchten Pharmaka zeigten eine Zunahme der Blockade TTX-resistenter Natriumströme kleiner Spinalneurone während der repetitiven Reizung.

Die während des jeweils ersten Impulses der Impulsfolge gemessene Abnahme des Natriumstroms wird als tonische Blockade bezeichnet. Durch die im 0,5 s Abstand folgenden neun weiteren Impulsen wird der Stromfluss noch weiter reduziert, was als phasische oder use-dependent Blockade bezeichnet wird.

Die Abnahme des Natriumstromes in Abhängigkeit der zunehmenden Impulsanzahl der Reize ist in Abbildung 3.4 für das jeweilig zu testende Pharmakon dargestellt.

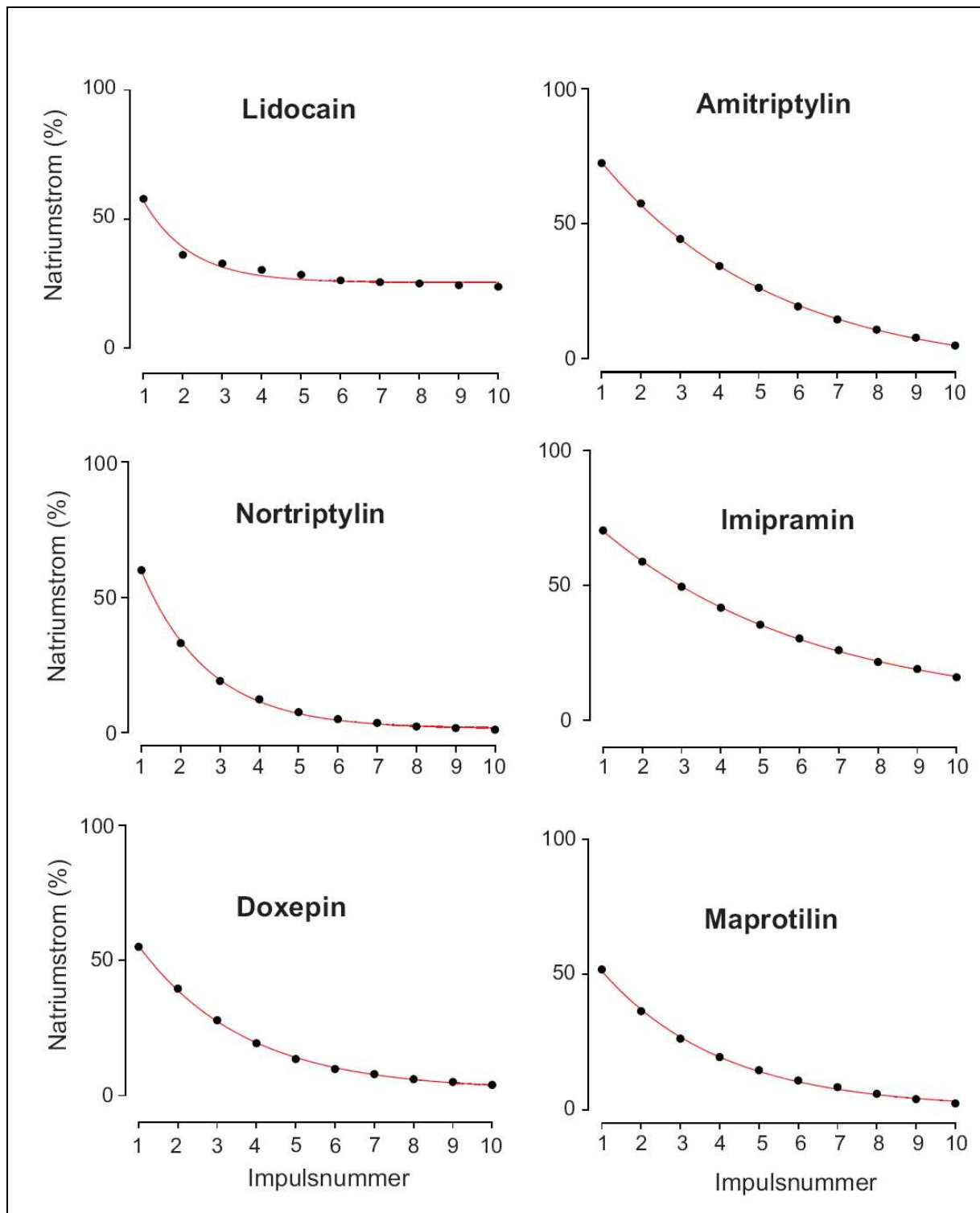


Abb. 3.4 Abnahme des Natriumstroms in Abhängigkeit mit der zunehmenden Reizanzahl (Impulse 1-10).

Dargestellt ist der prozentuale Natriumstrom nach Applikation des jeweiligen Pharmakons in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Lidocain und jeweils 30 $\mu\text{mol/l}$ der Antidepressiva, aufgetragen gegen die Impulsnummer der 2 Hz Reizung. Die Linien sind Anpassungen einer Monoexponentialfunktion an die Datenpunkte.

3.4 Konzentrationsabhängigkeit der Natriumstrom-Blockade

Um die Blockierungspotenz des jeweiligen Pharmakons am TTX-resistenten Natriumkanal zu bestimmen, wurden Konzentrations-Inhibitionskurven für die Substanzen Lidocain, als Referenzstoff für die Natriumkanalblockade, aus der diesbezüglich gut untersuchten Gruppe der Lokalanästhetika und der hier neu untersuchten Stoffe aus der Gruppe der Antidepressiva für den tonischen und phasischen Block erstellt (siehe Abb. 3.5).

Die Messungen erfolgten wieder nach dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Impulsmuster.

Dem ersten Impuls folgten ebenfalls neun weitere. Der durch dieses Impulsmuster ausgelöste Natriumstrom wurde sowohl in einer Kontroll-Lösung als auch in einer jeweils 3, 10, 30, 100 und 300 mikromolaren Testlösung der zu untersuchenden Substanzen gemessen. Zwischen den einzelnen Konzentrationsschritten wurde eine Äquilibrationszeit von mindestens einer Minute eingehalten.

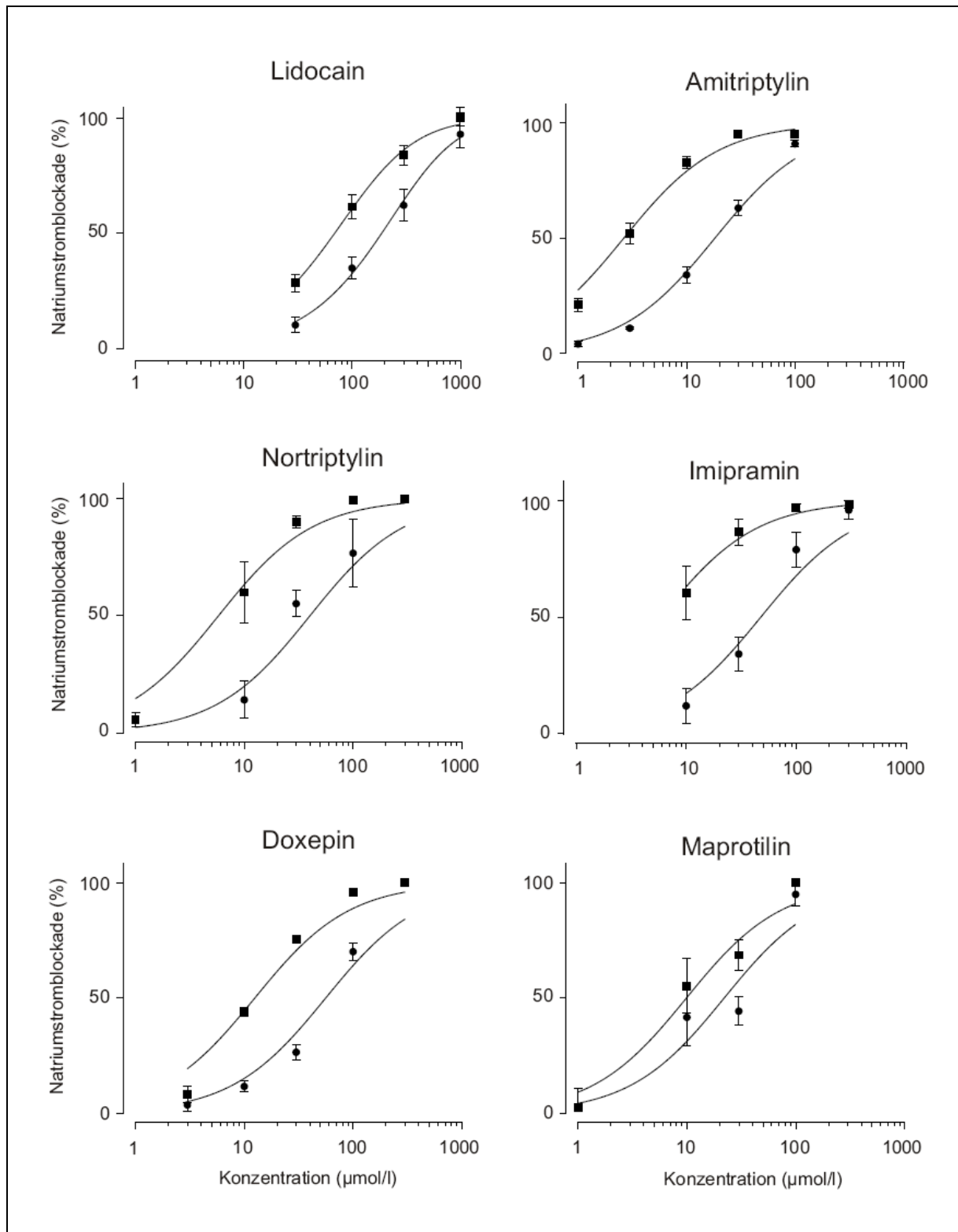


Abb. 3.5 Konzentrations-Inhibitionskurven für Einzelreize (•) und für Reizung mit 2 Hz (▪). Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten \pm Standardfehler des Mittelwertes. Mittels nichtlinearer Anpassung der Parameter an Gleichung 6 wurden halbmaximale Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) sowie der Hillkoeffizient (h) bestimmt (siehe Tabelle 3.1).

Die Konzentrationen für die halbmaximale Blockierungskonzentration (IC_{50}) wurden durch Anpassung der Gleichung 6 an die Daten bestimmt (siehe Tabelle 3.1).

Gleichung 6:

$$f(c) = 100\% \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{c}\right)^h}$$

c = Konzentration (mol/l)

IC_{50} = Halbmaximale Blockierungskonzentration (mmol/l)

h = Hill-Koeffizient

3.5 Lipophilie-Abhängigkeit der Natriumkanal-Blockade

Der strukturelle Aufbau Natriumkanal-blockierender Substanzen hat typische Merkmale. Sie besitzen ein lipophiles Ende, welches meist durch ein aromatisches Ringsystem gebildet wird. Zudem sind sie über eine Zwischenkette, bestehend aus einer Ether-, Ester- oder Carbamidbindung, mit einem endständigen Amid verbunden.

Die Lipidlöslichkeit einer Substanz wird mittels Partitionskoeffizienten (P) angegeben. Der Partitionskoeffizient wird üblicherweise als Oktanol-Wasser Koeffizient quantifiziert. Man ermittelt diesen Wert, indem man die zu untersuchende Substanz in einem Oktanol-Wasser Gemisch löst und nach der spontanen Trennung der beiden Phasen die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der jeweiligen Phase bestimmt und diese dann ins Verhältnis setzt. Zur einfacheren Darstellung wird der Partitionskoeffizient logarithmiert und als $\log(P)$ bezeichnet. Je höher der $\log(P)$ einer Substanz ist, desto größer ist ihre Lipidlöslichkeit.

Beispiel: Ist die Konzentration einer Substanz in der Oktanol-Phase 1000fach höher als in der Wasser-Phase, so wäre der Partitionskoeffizient für diese Substanz 1000 und der $\log(P) = 3$.

Um nun den Einfluss der Lipidlöslichkeit als bestimmende Determinante der Natriumkanal-blockierenden Potenz der Antidepressiva im Vergleich zur Referenzsubstanz Lidocain und anderen Lokalanästhetika zu zeigen, wurden die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50} -Werte) aller Substanzen für den tonischen und phasischen Block gegen den Logarithmus des Oktanol-Wasser Partitionskoeffizienten (P) aufgetragen.

In Abbildung 3.6 wird nun die Abhängigkeit der Natriumkanal-blockierenden Eigenschaften der untersuchten Pharmaka von ihrer Lipidlöslichkeit ersichtlich.

Je lipophiler die Substanz ist, desto niedriger ist auch ihr IC₅₀-Wert, die Konzentration, die nötig ist, um die Hälfte aller Natriumkanäle der untersuchten Test-Zelle mittels dieser Substanz zu blockieren.

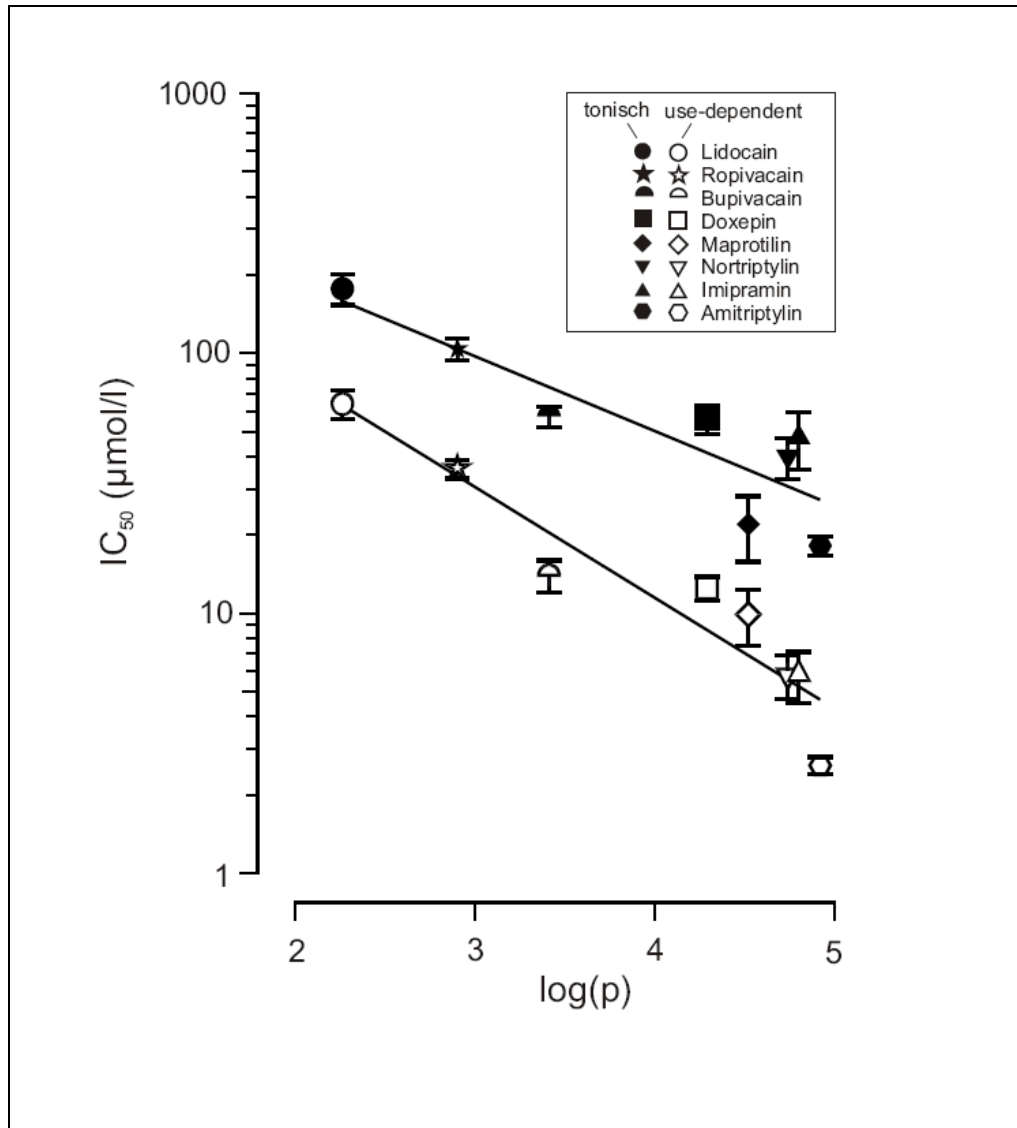


Abb. 3.6 Doppelt logarithmische Darstellung der IC₅₀-Werte aller untersuchten Antidepressiva sowie einiger Lokalanästhetika, aufgetragen gegen ihren Partitionskoeffizienten P .

Die Linien entsprechen einer linearen Regression an die gemessenen Datenpunkte mit der Gleichung $\log(\text{IC}_{50}) = -0,29 \log(P) + 2,8$ (Korrelationskoeffizient = -0,88) für Einzelreizung sowie $\log(\text{IC}_{50}) = -0,43 \log(P) + 2,8$ (Korrelationskoeffizient = 0,95) für 2Hz Reizung.

IC₅₀-Werte für Lokalanästhetika aus der Arbeit von Bräu und Mitarbeitern (Bräu und Elliott, 1998).

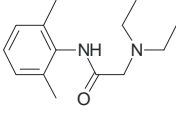
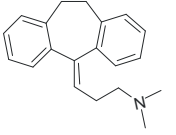
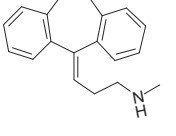
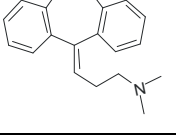
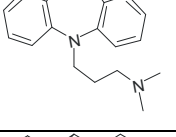
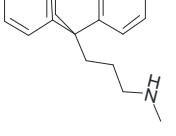
| Substanz | Struktur | Einzelreizung | | 2Hz Reizung | | n | log(P) | pK _a | Mol.-Gew. (g/mol) |
|--------------|---|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|----|--------|-----------------|-------------------|
| | | IC ₅₀ (μmol/l) | Hill Koeff. | IC ₅₀ (μmol/l) | Hill Koeff. | | | | |
| Lidocain |  | 277±17 | 1,0±0,1 | 79±6 | 1,1±0,1 | 21 | 2,26 | 8,2 | 234,34 |
| Amitriptylin |  | 17,7±1,2 | 1,2±0,1 | 2,8±0,2 | 1,3±0,1 | 14 | 4,92 | 9,4 | 277,41 |
| Nortriptylin |  | 33,1±2,6 | 1,3±0,1 | 7,5±1,3 | 1,6±0,3 | 6 | 4,74 | 9,7 | 263,39 |
| Doxepin |  | 55,9±4,1 | 1,4±0,1 | 12,6±0,6 | 1,5±0,1 | 6 | 4,29 | 9,0 | 279,39 |
| Imipramin |  | 44,0±6,0 | 1,6±0,3 | 7,3±1,9 | 1,3±0,4 | 6 | 4,80 | 9,4 | 280,42 |
| Maprotilin |  | 17,6±5,0 | 1,1±0,4 | 10,0±2,8 | 1,1±0,4 | 4 | 4,52 | 10,5 | 277,41 |

Tabelle 3.1 Halbmaximale Inhibierungskonzentrationen (IC₅₀-Werte) und Hill Koeffizienten für Einzelreizung und für den jeweils zehnten Reiz nach Dauerreizung mit 2 Hz.

(n ist die Anzahl der Experimente; log(P) ist der dekadische Logarithmus des Oktanol-Wasser Partitionskoeffizienten; pK_a ist die Protonendissoziationskonstante; das Molekulargewicht der jeweiligen Substanz in g/mol)

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass trizyklische Antidepressiva die gleichen Natriumkanal-blockierenden Eigenschaften aufweisen wie hoch potente Lokalanästhetika. Die Blockierung von Natriumkanälen im sensorischen Nervensystem durch trizyklische Antidepressiva kann über diesen Mechanismus zur Schmerzreduktion bei neuropathischen Schmerzsyndromen beitragen.

4.1 Natriumkanal-Blocker als analgetische Substanzen

Lokalanästhetika, wie z.B. Lidocain sind klassische Natriumkanal-blockierende Substanzen. Die lokale Applikation hoher Substanzkonzentrationen im Bereich eines peripheren Nervs induziert dort eine komplette Unterbrechung der Impulsweiterleitung und führt damit zu einer lokalen Analgesie. Neben der lokalen Applikation besteht auch die Möglichkeit, Natriumkanal blockierende Substanzen systemisch zu verabreichen, wie z.B. durch intravenöse Injektion oder orale Einnahme. Dazu gehören neben Lokalanästhetika auch andere Medikamente, die Natriumkanal blockierende Mechanismen als Wirkprinzip haben, wie Antiarrhythmika, Antidepressiva und Antikonvulsiva. All diese Medikamente können erfolgreich in der Therapie neuropathischer Schmerzsyndrome eingesetzt werden (Tanelian und Brose, 1991). Die systemische Applikation führt natürlich nicht zu einer vollständigen Nervenblockade. Vielmehr scheint der Hauptwirkmechanismus dieser Substanzen in einer Reduktion der ektopen Aktivität an den verletzten Nerven zu bestehen (Devor *et al.*, 1992), welche sich direkt auf die Impuls initiiierenden Prozesse am geschädigten Nerven selbst auswirken.

Natriumkanal-blockierende Substanzen zeigen primär keine große Selektivität für Natriumkanal-Isoformen im peripheren nozizeptiven System. Man vermutet jedoch, dass sich eine relative Selektivität aufgrund der elektrophysiologischen Veränderungen am geschädigten Nerven entwickelt (Bräu *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Depolarisation des Membranpotentials in Verbindung mit repetitiver Aktivität, wie sie bei geschädigten Nerven vorliegt, das Verhältnis von geschlossenen zu offenen und inaktivierten Natriumkanälen verschiebt. Des Weiteren bedingt die langsame Kinetik der TTX-resistenten Natriumkanäle, dass sie im Vergleich zu den TTX-Sensitiven, nach einem Reiz aufgrund ihrer langsamen Inaktivierungskinetik, längere Zeit im geöffneten Zustand verweilen (Elliott und Elliott, 1993). Geöffnete Natriumkanäle haben wiederum eine höhere Affinität zu use-dependent Blockern, was

die unter pathologischen Bedingungen entstehende relative Selektivität dieser Substanzen gegenüber Natriumkanälen in nicht ständig erregten, gesunden Nervenfasern erklären könnte (Bräu *et al.*, 2001). Diese relative Selektivität reduziert sich jedoch bei höheren Blockerkonzentrationen, da dann trotz intakten negativen Membranpotentials der Zellen des zentralen Nervensystems und des Herzens hemmende Effekte der Erregbarkeit selbiger auftreten.

4.2 Die Rolle des Natriumkanals beim neuropathischen Schmerz

In den vergangenen Jahren zeigte sich, dass der neuronale TTX-resistente Natriumkanal eine Schlüsselrolle bei der peripheren Nozizeption und damit auch bei der Entstehung chronischer Schmerzsyndrome einnimmt. In verschiedenen Studien wurden die Auswirkungen peripherer Nervenverletzungen in Form einer vermehrten Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle gezeigt. Natriumkanäle sind zum einen für die Impulsgenerierung an den peripheren nozizeptiven Nervenendigungen wichtig (Brock *et al.*, 1998), zum anderen sind sie aber auch in der Lage, bereits generierte Aktionspotentiale weiterzuleiten (Quasthoff *et al.*, 1995). Kommt es nun zu einer pathologischen Anhäufung der Natriumkanäle an der Verletzungsstelle des Axons (Novakovic *et al.*, 1998), was auch speziell für den TTX-resistenten $\text{Na}_v1.8$ -Kanal aufgezeigt werden konnte (Takor *et al.*, 2009), bildet dies die Grundlage für spontane Aktivitäten, wie sie an verletzten sensorischen Axonen bei Mäusen nachgewiesen werden konnten (Roza *et al.*, 2003).

In geschädigten Abschnitten peripherer Nerven liegt ein depolarisiertes Membranpotential vor, welches das Verhältnis TTX-resistenter zu TTX-sensitiven Natriumkanälen zugunsten der TTX-resistenten Natriumkanäle verschiebt (Schild und Kunze, 1997; Gold *et al.*, 2003). Knockout-Mäuse, denen der $\text{Na}_v1.8$ -Kanal fehlt, weisen gegenüber mechanischen bzw. thermischen Reizen eine Analgesie auf und entwickeln verspätet eine inflammatorische Hyperalgesie (Akopian *et al.*, 1999), was wiederum eine Beteiligung des TTX-resistenten Natriumkanals bei der Schmerzentstehung und Weiterleitung im peripheren Nervensystem demonstriert. Neuronale TTX-resistente Natriumkanäle in den primär sensorischen Nerven von Spinalganglienzellen unterscheiden sich grundlegend in den elektrophysiologischen Eigenschaften von TTX-sensitiven Natriumkanälen. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik ist langsamer und auch die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung liegt verglichen mit TTX-sensitiven Natriumkanälen im depolarisierteren Bereich (Elliott und Elliott, 1993). Diese Eigenschaften und ihre kurze Refraktärphase lassen den TTX-resistenten Natriumkanal

ideal erscheinen, Impulse unter pathophysiologischen Bedingungen zu generieren und stellt somit ein ausgezeichnetes Ziel für ein mögliches antinozizeptives Eingreifen dar.

4.3 Natriumkanal-blockierende Mechanismen trizyklischer Antidepressiva

Antidepressiva werden neben der Therapie von Depressionen häufig erfolgreich als adjuvante Medikamente in der Behandlung neuropathischer Schmerzzustände eingesetzt (Carter und Sullivan, 2002). Trizyklische bzw. tetrazyklische Antidepressiva haben sich in diesem Zusammenhang unter der enormen Vielfalt der verschiedenen Antidepressiva und im Gegensatz zu den selektiven Serotonin-Reuptake-Hemmern (SSRI) als überlegen gezeigt (Bryson und Wilde, 1996).

Trizyklische Antidepressiva sind hochpotente Natriumkanal-blockierende Substanzen (Sudoh *et al.*, 2003), welche einen ausgeprägten use-dependent Block verursachen. Bei lokaler Injektion können sie als örtliches Betäubungsmittel verwendet werden (Gerner *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004), was jedoch aufgrund ihrer Neurotoxizität bei hohen lokalen Dosen nicht empfohlen wird (Estebe und Meyers, 2004). Bei systemischer Verabreichung von trizyklischen Antidepressiva haben diese den gleichen Wirkmechanismus, wie andere Natriumkanal-blockierende Substanzen, also Lokalanästhetika, Antiarrhythmika und Antikonvulsiva. So reduziert Amitriptylin genauso wie Lidocain periphere Schmerzen in einem Model für chronische Schmerzen bei der Ratte (Abdi *et al.*, 1998).

Der Offenkanal-Block scheint eine entscheidende Rolle in der Effektivität eines Natriumkanal-Blockers in der Schmerztherapie darzustellen. Geöffnete muskuläre (Wang *et al.*, 2004) und neuronale Natriumkanäle, wie in dieser Arbeit gezeigt, haben die höchste Affinität zu Amitriptylin. Dies liegt vor allem daran, dass das Wirkstoffmolekül einen erleichterten Zutritt zu seiner Bindungsstelle am Natriumkanal hat, wenn dieser geöffnet ist (Hille, 1977). Geht der Natriumkanal nach der Aktivierung in den inaktivierten Zustand und anschließend in den Ruhezustand über, wird die Dissoziation des Blockermoleküls von der Bindungsstelle behindert. Hierdurch ist ein höherer Anteil von Natriumkanälen bei der nächsten Kanalöffnung bereits blockiert. Die Blockierung akkumuliert somit bei wiederholten Kanalöffnungen, wie sie bei schneller repetitiver Aktivität auftreten. In den hier dargestellten Ergebnissen äußert sich dieser Effekt als use-dependent Block. Besonders Amitriptylin und sein Metabolit Nortriptylin zeigen einen sehr ausgeprägten use-dependent Effekt.

Therapeutische Plasmakonzentrationen von Amitriptylin liegen im Bereich von 0,3 bis 0,9 μ M (Baldessarini, 2001) und sind damit noch einmal um den Faktor zehn niedriger als die IC₅₀-Werte für den use-dependent Block in dieser Arbeit. Allerdings kommt es durch die starke Lipophilie der Substanzen zu einer Akkumulation im Nervengewebe, die zu einer deutlich höheren Konzentration als im Plasma führen kann. Durch den use-dependent Block kommt es zu einer Verringerung der Entladungsfrequenz in ektopen Zentren, die somit zu einer Verringerung der Schmerzintensität führt.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Trizyklische Antidepressiva spielen bei der Behandlung des neuropathischen Schmerzes eine wichtige Rolle. Ein denkbarer Wirkmechanismus könnte die Blockade neuronaler spannungsabhängiger Natriumkanäle sein. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin, Nortriptylin, Doxepin, Imipramin und des tetrazyklischen Antidepressivums Maprotilin auf TTX-resistente Natriumkanäle in Spinalganglienzellen von Ratten untersucht.

Methoden: Die Darstellung TTX-resistenter Natriumströme enzymatisch isolierter Spinalganglienzellen der Ratte erfolgte mit Hilfe der „whole-cell“-Konfiguration der „patch-clamp“-Methode. In den „voltage-clamp“-Experimenten wurde den Zellen zur Erzeugung einer Aktivierungskurve zunächst ein Ruhemembranpotential von -90 mV angelegt, was dem Ruhepotential der Zellen entspricht. Nach einem 20 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV wurden die Natriumströme durch einen 20 ms langen depolarisierenden Spannungssprung nach -10 mV ausgelöst. Es folgten jeweils neun weitere Depolarisierungsimpulse mit einer Frequenz von 2 Hz. Halbmaximale Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) wurden mittels Konzentrations-Inhibitionskurven bestimmt.

Ergebnisse: In allen durchgeführten Experimenten inhibierten alle untersuchten Pharmaka TTX-resistente Natriumströme konzentrationsabhängig und auch während der phasischen Blockade reversibel. Halbmaximale-Blockierungskonzentrationen für den tonischen sowie den phasischen Block wurden von den Stoffen Amitriptylin $17,7 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$, $2,8 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$, Nortriptylin $33,1 \pm 2,6 \mu\text{mol/l}$, $7,5 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$, Doxepin $55,9 \pm 4,1 \mu\text{mol/l}$, $12,6 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$, Imipramin $44,0 \pm 6,0 \mu\text{mol/l}$, $7,3 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$, Maprotilin $17,6 \pm 5,0 \mu\text{mol/l}$, $10,0 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$ und des Lokalanästhetikums Lidocain $277 \pm 17 \mu\text{mol/l}$, $79 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ erstellt.

Folgerungen: Alle in dieser Arbeit untersuchten Antidepressiva blockierten TTX-resistente Natriumströme um ungefähr den Faktor zehn stärker als das Lokalanästhetikum Lidocain.

Abgesehen von Maprotilin ist vor allem der use-dependent Block dieser Substanzgruppe, im Vergleich zu dem der Lokalanästhetika, deutlich stärker ausgeprägt. Therapeutische Plasmakonzentrationen von Amitriptylin und Lidocain sind also in der Lage, repetitive TTX-resistente Aktionspotentiale kleiner sensorischer Spinalganglienzellen zu unterdrücken beziehungsweise abzuschwächen. Abschließend ist zu sagen, dass die schmerzlindernde Wirkung der Antidepressiva wahrscheinlich, beruhend auf ihrer Fähigkeit zur Verringerung der Entladungsfrequenzen in ektopen Zentren, auf ihre Natriumkanal-blockierenden Eigenschaften zurückzuführen ist.

Abstract

Background: Tricyclic antidepressants produce alleviation in various chronic pain syndromes. One possible therapeutic mechanism may be the blockade of neuronal voltage gated sodium channels. In this study we investigated the effects of the tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline, doxepine, imipramine and the tetracyclic antidepressant maprotiline on TTX-resistant Na⁺-channels in rat dorsal root ganglia neurons.

Methods: TTX-resistant Na⁺-currents were recorded in the whole cell configuration of the patch clamp method in enzymatically dissociated dorsal root ganglion neurons of adult rats. In voltage clamp experiments cells were held at -90 mV. After a 20 ms hyperpolarizing prepulse to -110 mV, TTX-resistant Na⁺-currents were elicited by 20 ms depolarizing pulses to -10 mV, applied in trains of ten with a 2 Hz frequency. Half-maximal blocking concentrations (IC₅₀) were derived from concentration-inhibition curves.

Results: In voltage clamp experiments, all drugs reversibly blocked TTX-resistant Na⁺-currents in a concentration and use-dependent manner. IC₅₀s as derived from concentration-inhibition experiments were for tonic block and use-dependent block, respectively: amitriptyline 17,7±1,2 μmol/l, 2,8±0,2 μmol/l, nortriptyline 33,1±2,6 μmol/l, 7,5±1,3 μmol/l, doxepine 55,9±4,1 μmol/l, 12,6±0,6 μmol/l, imipramine 44,0±6,0 μmol/l, 7,3±1,9 μmol/l, maprotiline 17,6±5,0 μmol/l, 10,0±2,8 μmol/l and the local anesthetic lidocaine 277±17 μmol/l, 79±6 μmol/l.

Conclusions: All antidepressants studied in this work block TTX-resistant Na⁺-channels with potencies being one order of magnitude higher than the local anaesthetic lidocaine. Use-dependent block is, except for maprotiline, more intense than with lidocaine. Therapeutic plasma levels of amitriptyline and lidocaine are able to suppress repetitive TTX-resistant action potentials in small sensory neurons. It is concluded that tricyclic antidepressants may alleviate pain by reducing firing frequency in ectopic sites through Na⁺-channel blockade.

6. Literaturverzeichnis

Abdi S, Lee DH, Chung JM (1998) The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 87: 1360-1366

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379: 257-262

Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN (1999) The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 2: 541-548

Alsobrook JP 2nd, Stevens CF (1988) Cloning the calcium channel. *Trends Neurosci* 11: 1-2

Baldessarini RJ (2001) Drugs and the treatment of psychiatric disorder. *The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill* 84-447

Beck PW, Handwerker HO, Zimmermann M (1974) Nervous outflow from the cats foot during noxious radiant heat stimulation. *Brain Res* 67: 373-386

Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibres to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32: 1025-1043

Bräu ME, Rush AM, Elliott JR (1995) Single channel analysis of two types of Tetrodotoxin-resistant sodium channels in small cells isolate from adult rat (200-350 g) dorsal root ganglia (DRG). *J Physiol (Lond)* 487: 184P (Abstract)

Bräu ME, Dreimann M, Olschewski A, Vogel W, Hempelmann G (2001) Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in ratsensory neurons. *Anesthesiology* 94: 134-144

Bräu ME, Elliott JR. (1998) Local anaesthetic effects on TTX-resistant Na⁺-currents in rat dorsal root ganglion neurons. *J Anaesthesiol* 15: 80-88

Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C (1998) Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol (Lond)* 512: 211-217

Bryson HM, Wilde MI (1996) Amitriptyline. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. *Drugs Aging* 8: 459-476

Butterworth JF, Strichartz GR (1990) Molecular mechanisms of local anesthesia: A review. *Anesthesiology* 72: 711-734

Caffrey JM, Eng DL, Black JA, Waxman SG, Kocsis JD (1992) Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 592: 283-297

Carter GT, Sullivan MD (2002) Antidepressants in pain management. *Curr Opin Investig Drugs* 3: 454-458

Catterall WA (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61

Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25

Chen Q, King T, Vanderah TW, Ossipov MH, Malan TP Jr, Lai J (2004) Differential blockade of nerve injury-induced thermal and tactile hypersensitivity by systemically administered brain-penetrating and peripherally restricted local anesthetics. *J Pain* 5: 281-289

Devor M, Wall PD, Catalan N (1992) Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48: 261-268

Dudel J, Schmidt RF (Hrsg.), Thews G (Hrsg.), Lang F (Hrsg.) (2000) Informationsvermittlung durch elektrische Erregung. In: *Physiologie des Menschen*, S. 20-42. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 28. Auflage

Dudel J, Schmidt RF (Hrsg.), Thews G (Hrsg.) (1977) Erregung von Nerven und Muskeln. In: *Physiologie des Menschen*, S. 7-32. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 19. Auflage

Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA (1994) Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12: 1041-1048

Elliott AA, Elliott JR (1993) Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol (Lond)* 463: 39-56

Elliott JR (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 RJ (1996) PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol (Lond)* 495: 422-440

Erlanger J, Gasser HS (1932) The compound nature of the action current of nerve as disclosed by the cathode ray oscillograph. *Am J Physiol* 70: 624-666

Estebe JP, Myers RR (2004) Amitriptyline neurotoxicity: dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve. *Anesthesiology* 100: 1519-1525

Gerner P, Mujtaba M, Sinnott CJ, Wang GK (2001) Amitriptylin versus bupivacaine in rat sciatic nerve blockade. *Anesthesiology* 94: 661-667

Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD (1996) Hyperalgesic agents increase tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1108-1112

Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F (2003) Redistribution of Na_v1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci* 23: 158-166

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365-368

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100

Hille B (1971) The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J Gen Physiol* 58: 599-619

Hille B (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol* 69: 497-515

Hodgkin AL, Keynes RD (1955) Active transport of cations in giant axon from Sepia and Loligo. *J Physiol (Lond.)* 128: 28-60

Illes P, Jurna I, Kaefer V, Resch K (1996) Analgetika und Antiphlogistika. Seite 201-225. in Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 7. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg

Kobayashi J, Ohta M, Terada Y (1993) C fiber generates a slow Na⁺ spike in the frog sciatic nerve. *Neurosci Lett* 162: 93-96

Kostyuk PG, Veselowsky NS, Tsyndrenko AY (1981) Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons – I. Sodium currents. *Neuroscience* 6: 2423-2430

Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol (Lond)* 508: 647-657

Max MB, Lynch SA, Muir J, Shoaf SE, Smoller B, Dubner R (1992) Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *N Engl J Med.* 326: 1250-1256

McGaraughty S, Chu KL, Scanio MJ, Kort ME, Faltynek CR, Jarvis MF (2008) A selective Nav 1.8 sodium channel blocker, A-803467 [5-(4-chlorophenyl-N-(3,5-dimethoxyphenyl)furan-2-carboxamid], attenuates spinal neuronal activity in neuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 324: 1204-1211

McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1995) A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem* 270: 12025-12034

Motomura H, Fujikawa S, Tashiro N, Ito Y, Ogata N (1995) Single-channel analysis of two type of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglia. *Pflügers Arch* 431: 221-229

Naylor SL, Hunter JC, Sangameswaran L (1997) A novel voltage-gated sodium channel in human dorsal root ganglia. *Abstracts Society for Neuroscience* 23: 908

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312: 121-127

Noda M, Suzuki H, Numa S, Stuhmer W (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 259: 213-216

Novakovic SD, Tzoumaka E, McGivern JG, Haraguchi M, Sangameswaran L, Gogas KR, Eglen RM, Hunter JC (1998) Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. *J Neurosci* 18: 2174-2187

Ogata N, Tatebayashi H (1993) Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. *J Physiol (Lond)* 466: 9-37

Pinto V, Derkach VA, Safronov BV (2008) Role of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium channels in Delta- and C-fiber conduction and synaptic transmission. *Neurophysiol* 99: 617-628

Quasthoff S, Großkreutz J, Schröder JM, 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

Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA (1994) Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265: 1724-1728

Roy ML, 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 ML, 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

Roza C, Laird JM, Souslova V, Wood JN, Cervero F (2003) The tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel Na_v1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. *J Physiol* 550: 921-926

Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglen RM, Herman RC (1996) Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 271: 5953-5956

Schild JH, Kunze DL (1997) Experimental and modeling study of Na⁺ current heterogeneity in rat nodose neurons and its impact on neuronal discharge. *J Neurophysiol* 78: 3198-3209

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

Stevens CF (1991) Ion channels. Making a submicroscopic hole in one. *Nature* 349: 657-658

Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339: 597-603

Sudoh Y, Cahoon EE, Gerner P, Wang GK (2003) Tricyclic antidepressants as longacting local anesthetics. *Pain* 103: 49-55.

Takor DK, Lin A, Matsuka Y, Meyer EM, Ruangsri S, Nishimura I, Spigelman I (2009) Increased peripheral nerve excitability and local Nav1.8 mRNA up-regulation in painful neuropathy. *Mol Pain* 25: 5-14

Tamura C, Amakasu O, Sasada Y, Tsuda K (1966) The crystal structure of derivatives of tetrodotoxin. I. Tetrodonic acid hydrobomid. *Acta Cryst* 21: 219-225

Tanelian DL, Brose WG (1991) Neuropathic pain can be relieved by drugs that are use-dependent sodium channel blockers: lidocaine, carbamazepine, and mexiletine. *Anesthesiology* 74: 949-951

Tate S, Benn S, Hick C, Trezise D, John V, Mannoin RJ, Costigan M, Plumpton D, Grose D, Gladwell Z, Kendall G, Dale K, Bountra C, Woolf CJ (1998) Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nat Neurosci* 1: 653-655

Vaughan Williams EM (1984) A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. *J Clin Pharmacol* 24: 129-147

Wang GK, Russell C, Wang SY (2004) State-dependent block of voltage-gated Na⁺ channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. *Pain* 110: 166-174

Yasumoto T, Yotsu M, Endo A, Murata M, Naoki H (1989) Interspecies distribution and biogenetic origin of tetrodotoxin and its derivatives. *Pure Appl Chem* 61: 505-508

Yellen G (1982) Single Ca²⁺-activated nonselective cation channels in neuroblastoma. *Nature* 296: 357-359

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 FF, de Groat WC (1996) Different types of Na⁺ and A-type K⁺ currents in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder. *J Physiol (Lond)* 494: 1-16

Zenker W, Mayr R, Gruber H, Kubik S, Rager G, Neuhuber W, Akert K, Künzle H, Braak H, Petsche H, Van Der Zypen E, Firbas W, Fritsch P, Halata Z, Böck P, Drenckhahn D (Hrsg.), Zenker W (Hrsg.) (1993) Nervensystem, Haut, Paraganglien. In: *Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, Bd. 2, S. 219-828. Urban & Fischer, München, Wien, Baltimore, 15. Auflage

Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi J, Nau C, Wood JN, Reeh PW (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447: 855-858

Danksagung

Mein Dank gilt den vielen Menschen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael E. Bräu,

für die hervorragende wissenschaftliche Ausbildung und die unermüdliche und stets geduldige Anleitung in allen theoretischen und praktischen Belangen dieser Dissertation.

Herrn Dr. med. Jan Frese,

für die unzähligen gemeinsamen Stunden am Patch-Clamp-Versuchsstand im Labor, fruchtbare Diskussionen und die hilfreiche Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Scholz und allen Mitarbeitern des Labors

für die Bereitstellung des Versuchsstandes, eine allzeit konstruktive Arbeitsatmosphäre und die stets freundliche Unterstützung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Henrich, D. Phil.,

für die freundliche und hilfreiche Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dipl.-Ing. Steffen Lots, meinem Vater,

für die geduldige und unermüdliche „computer-technische“ Unterstützung zur Erstellung dieser Arbeit.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form eines Posterbeitrags auf dem Deutschen Schmerzkongress am 19.10.2005 in Bremen vorgestellt.

Am 21.10.2005 wurde diesem Posterbeitrag der Posterpreis 2005 des Deutschen Schmerzkongress verliehen.

Lots K, Hempelmann G, Bräu M (2005) Antidepressiva blockieren TTX-resistente Natriumkanäle des peripheren nozizeptiven Systems. *Der Schmerz* 19 [Suppl 1]: 75-76

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen, habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**