

Dynamische Blockierung TTX-resistenter Natriumkanäle durch Lokalanästhetika

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Martin Pullmann

aus Frankfurt/Main

Gießen 2001

Aus dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Gf. Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Piper

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. E. Beck

Gutachter: PD Dr. M.E. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Tag der Disputation: 23.06.2003

1. Einleitung

1.1	Schmerz und Schmerztherapie	6
1.2	Physiologie der Nozizeption	7
1.3	Physiologie der Erregungsleitung	8
1.4	Natriumkanäle	10
1.5	Der TTX-resistente Natriumkanal	12
1.6	Lokalanästhetika	14
1.7	Aufgabenstellung	15

2. Material & Methoden

2.1	Präparation	16
2.2	Die „Patch-Clamp“-Technik	16
2.3	Elektrophysiologische Geräte	18
2.4	Datenerfassung und Auswertung	19
2.5	Lösungswechsel	20
2.6	Lösungen	20
	2.6.1 Nährmedium	20
	2.6.2 Kristalline Lösungen	20

3. Ergebnisse

3.1	TTX-resistente Natriumströme	22
3.2	Tonischer und „use-dependent“ Block	25
3.3	Dynamischer Block	27
3.4	Erholungszeiten vom dynamischen Block	29
3.5	Inaktivierungs-reduzierter Natriumkanal	30
3.6	Konzentrations-Wirkungskurven	32

4. Diskussion

4.1	Dynamischer Block	34
4.2	Tonischer Block	37
4.3	„use-dependent“ Block	37
4.4	Klinische Relevanz	39

<u>5. Zusammenfassung</u>	39
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	41
<u>7. Lebenslauf</u>	45
<u>8. Danksagung</u>	46

Abbildung 1:	Anatomie des nozizeptiven Systems.	8
Abbildung 2:	Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals.	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Stadien des TTX-resistenten Natriumkanals.	11
Abbildung 4:	Chemische Struktur von Lidocain.	14
Abbildung 5:	Chemische Struktur von Benzocain.	14
Abbildung 6:	Schematische Darstellung verschiedener „Patch“-Konfigurationen.	17
Abbildung 7:	Schematische Darstellung eines „patch-clamp“-Versuchsstandes in „whole-cell“-Konfiguration.	19
Abbildung 8:	Zellkapazitätsverteilung aller untersuchten Zellen.	22
Abbildung 9:	Aktivierungs- und Inaktivierungskurven für TTX-resistente Natriumströme.	23
Abbildung 10:	Strom-Spannungs-Kurve des TTX-resistenten Natriumstroms.	25
Abbildung 11:	Tonischer und „use-dependent“ Block des TTX-resistenten Natriumstromes.	26
Abbildung 12:	Inaktivierungskurve des TTX-resistenten Natriumstroms.	27
Abbildung 13:	Dynamische Blockierung unter Lidocain und Benzocain	29
Abbildung 14:	Erholung des TTX-resistenten Natriumstroms von einem depolarisationsinduzierten Block während der Repolarisation.	29
Abbildung 15:	Inaktivierungs-reduzierte Natriumströme.	31
Abbildung 16:	Dosiswirkungskurven von Lidocain und Benzocain.	33
Tabelle 1:	Halbmaximale Blockierungskonzentrationen von Lidocain und Benzocain.	32

1. Einleitung

1.1 Schmerz und Schmerztherapie

„Für ein bißchen weniger Schmerz in dieser Welt“; durch diesen Slogan aus der TV-Werbung (Aspirin-Kampagne der Bayer AG) wird deutlich, welche herausragende Rolle die Schmerztherapie in unserer heutigen Gesellschaft spielt. Und auch wenn uns eine fast unüberschaubare Menge an Schmerzmedikamenten zur Verfügung stehen, so gibt es doch noch weiße Flecken auf der großen Landkarte des Schmerzes. Die Bandbreite einer Schmerzempfindung reicht dabei von thermischem Schmerz, ausgelöst durch Hitze und Kälte, über Eingeweideschmerz bei Koliken oder Entzündungen, über sogenanntem scharfen Schmerz bei Verletzungen bis hin zum Phantomschmerz. Hieraus wird deutlich, daß Schmerz ein außerordentlich komplexes Phänomen ist. Abgesehen vom Schmerzereignis an sich, sind es vor allem die Folgen, die sich daraus ergeben, die langanhaltende Spuren hinterlassen. Zum einen sind dies die nach dem ersten Schmerzereignis sofort auftretenden Folgeschmerzen, die z.B. nach einer Verletzung eine Ruhigstellung der betroffenen Körperpartie erzwingen und somit zum schnelleren und erfolgreicherem Heilungsprozess beitragen. Zum anderen spielen die Auswirkungen eines unangenehmen Schmerzereignisses im Bereich des Zentralnervensystems eine außerordentlich wichtige Rolle. Nicht nur, daß uns die Erinnerung an solch ein negatives Ereignis vor einer erneuten schmerzhaften Erfahrung schützt - das Kind faßt die heiße Herdplatte kein zweites Mal an - , das Gehirn moduliert auch die Schmerzempfindlichkeit. So ist die Toleranz gegenüber einem bewußt in Kauf genommenen Schmerz (Durchpressen durch einen Spalt) wesentlich höher als beim Testen eines Reizes auf seine Schmerzhaftigkeit (vorsichtiges Probieren des heißen Kaffees). Hinzu kommen noch die un- oder unterbewußten Reaktionen insbesondere auf längere oder chronische Schmerzen. Effekte wie Ruhelosigkeit, Gereiztheit bis hin zu Angstzuständen oder Depressionen sind allgemein bekannt.

In der Medizin kann aber nun, insbesondere in den operativen Fachgebieten, oft nicht von Eingriffen abgesehen werden, die normalerweise extrem schmerzhaft wären. Hierbei, aber auch bei nicht-iatrogenen Schmerzen wie Neuropathien, Tumorschmerzen oder auch den Schmerzen unter der Geburt, hat die klinische Anästhesiologie eine ganze Reihe von Möglichkeiten, Schmerzen zu verhindern, zu beseitigen, zu vermindern oder zumindest nicht wahrnehmbar oder erträglich zu machen. Die beiden gebräuchlichsten Verfahren sind dabei

die Allgemeinanästhesie (Vollnarkose) und die Lokalanästhesie. Bei ersterem beruht der Effekt auf einer zentralnervösen Wirkung der inhalierten oder intravenös applizierten Anästhetika, die Wahrnehmung, Verarbeitung und Folgereaktionen im Zusammenhang mit dem Schmerzereignis verhindern. Die Lokalanästhesie hat ihren Wirkungsort dagegen weiter in der Peripherie des Nervensystems, indem sie die Weiterleitung der Empfindung „Schmerz“ auf verschiedenen Ebenen der Nozizeption reversibel unterbindet. Dies geschieht durch Applikation hoher Dosen von Lokalanästhetika z.B. spinal oder epidural, aber auch intravenös als Regionalanästhesie, als Oberflächenanästhesie oder als periphere Nervenblockade. Zur Langzeittherapie vor allem chronischer Schmerzen ist jedoch keines dieser Verfahren optimal geeignet. Bei Schmerzzuständen, die durch pathologische Veränderungen des Nerven selbst hervorgerufen werden (Neuropathien, Phantomschmerz), versagen konventionelle Analgetika häufig.

1.2 Physiologie der Nozizeption

Auslöser für einen Schmerzreiz entlang der nozizeptiven Bahnen ist immer ein Gewebeschaden. Dabei kann es sich um eine mechanische, thermische, chemische oder entzündliche Schädigung handeln. Die dadurch verletzten Zellen setzen dann ihrerseits diverse Faktoren frei, die selbst schmerzauslösend sein können (K^+ - und H^+ - Ionen, Serotonin, Histamin), oder aber als Katalysator für die Algogenität anderer Substanzen dienen (Prostaglandine). Der Begriff des Nozizeptors wird dabei nicht einheitlich definiert. In der Regel wird darunter das komplette erste Neuron der Schmerzleitung verstanden und zwar von seinen freien Nervenendigungen über das Spinalganglion in Rückenmarksnähe bis zum proximalen Ende an einer Synapse im Hinterhorn des Rückenmarks. Die Reizung dieses Neurons findet an den freien Nervenendigungen statt, weswegen diese auch zum Teil als Nozizeptor bezeichnet werden. Die der Weiterleitung dienenden Nervenfasern der Neurone sind langsamleitende myelinisierte $A\delta$ - oder unmyelinisierte C-Fasern (Gasser & Erlanger 1929), wobei die $A\delta$ -Fasern den hellen, gut lokalisierbaren sogenannten somatischen Schmerz übertragen, die C-Fasern dagegen den dumpfen, schlecht lokalisierbaren viszeralen Schmerz. Die Stärke des Schmerzreizes wird über die Frequenz der ausgelösten Aktionspotentiale übermittelt. Auf Rückenmarksebene erfolgt dann die erste Verschaltung, zum einen auf polysynaptische Reflexbögen für eine Sofortantwort (Zurückweichen von der Schmerzquelle), zum anderen auf die aufsteigenden Schmerzbahnen des Tractus spinothalamicus, Tractus spinoreticularis und Tractus spinocervicalis. Über die Formatio reticularis erfolgt dann die

Weiterverschaltung in höhere Zentren, wo das Erlebte bewußt gemacht, als negativ bewertet und gespeichert wird. Zusätzlich folgt auf die Schmerz-Information auch eine vegetative Antwort im Sinne einer Kampf-oder-Flucht-Reaktion mit Schweißausbruch, erhöhtem Muskeltonus, erhöhter Herzfrequenz etc. (s. Abb. 1).

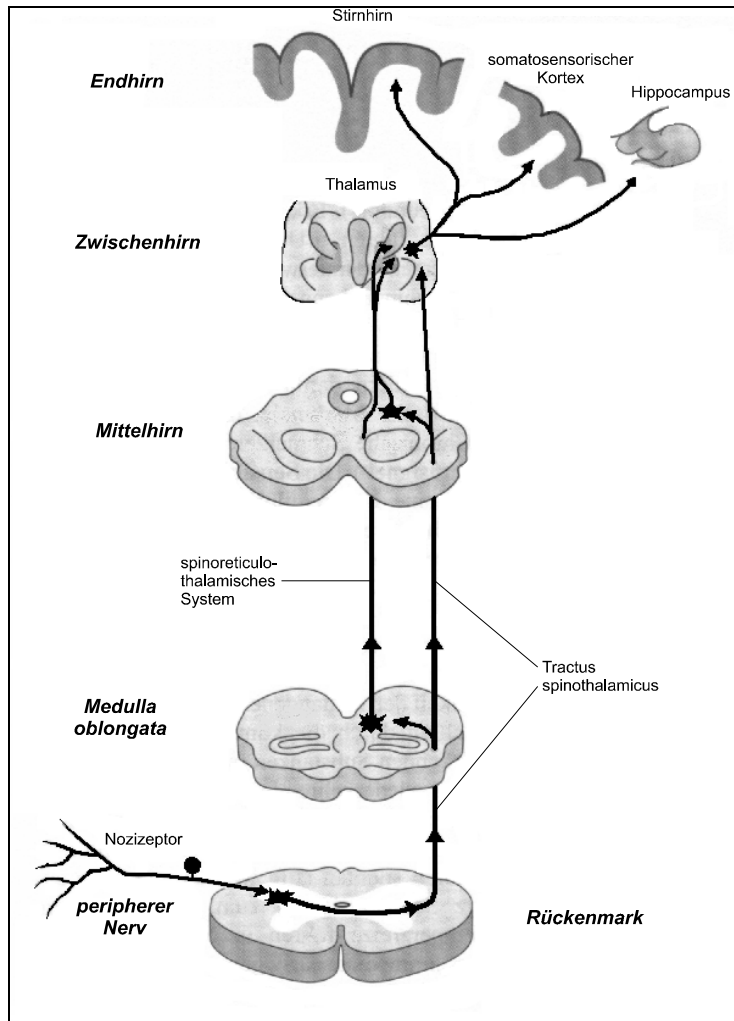


Abb. 1: Anatomie des nozizeptiven Systems. Die Reizung erfolgt durch eine Gewebeschädigung am Nozizeptor. Die Weiterverschaltung erfolgt in der Hinterhornregion des zugehörigen Rückenmarkssegments und auf den nachgeschalteten höheren Zentren in Medulla oblongata, Mittel-, Zwischen- und Endhirn.

Modifiziert nach Illes *et al.*, 1996.

1.3 Physiologie der Erregungsleitung

Die Grundlage all dieser Fortleitungs- und Verschaltungsprozesse liegt in den elektrischen Eigenschaften der Nervenzellmembran. An dieser semipermeablen Membran herrscht im Ruhezustand ein elektrisches Potential von ungefähr -70 mV. Aufrechterhalten wird es zum einen durch passive Diffusionsprozesse, insbesondere durch potentialunabhängige Kaliumkanäle, zum anderen durch den aktiven Transport der Na^+/K^+ -Pumpe, die Natrium-Ionen in den Extrazellulärraum (EZR) und Kalium-Ionen in den Intrazellulärraum (IZR) transportiert. Dadurch besteht über der Membran ein Konzentrationsgefälle (EZR/IZR) von

28/1 für Natrium und 1/35 für Kalium. Das sogenannte Ruhepotential entsteht also durch osmotische und elektrische Kräfte. Der angegebene Wert von -70 mV liegt ungefähr im Bereich des Kaliumgleichgewichtspotentials (E_K), das sich, bei Annahme reiner Kaliumleitfähigkeit, nach der Nernst-Gleichung

Gleichung 1:
$$E_K = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \cdot \ln \frac{[K^+]_{\text{außen}}}{[K^+]_{\text{innen}}}$$

R	= allgemeine Gaskonstante ($8,315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
F	= Faraday-Konstante ($9,64 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)
T	= absolute Temperatur (K)
z	= Wertigkeit des Ions ($K^+ = 1$)
$[K^+]$	= Kaliumionenkonzentration

berechnen läßt. Um diese Eigenschaften der neuronalen Zellmembran zur Erregungsweiterleitung zu nutzen, muß sich dieses Potential kurzzeitig umkehren. Die entscheidende Rolle dabei spielen potentialabhängige Natriumkanäle. Wird das Ruhemembranpotential durch einen elektrischen Reiz über einen Schwellenwert von etwa -50 mV depolarisiert, so erhöht sich schlagartig die Leitfähigkeit der Natriumkanäle – die Kanäle „öffnen“ sich -, was zu einem Einstrom von Natrium-Ionen von extrazellulär nach intrazellulär führt. Dies führt zu einer lokalen Umkehrung des Membranpotentials, dem Aktionspotential. Dieser Vorgang wird durch spontanes Schließen der Natriumkanäle, die sogenannte Inaktivierung beendet. Zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials tragen dann, neben den oben beschriebenen Prozessen, auch potentialabhängige Kaliumkanäle bei. Durch ihre verzögerte Öffnung nach der Potentialumkehr bewirken sie eine schnellere Repolarisation der Membran, indem sie einen Kaliumauswärtsstrom ermöglichen.

Allein dieser lokale Prozeß reicht aber immer noch nicht aus, um den entstandenen Impuls weiterzuleiten. Dies geschieht durch die Miterfassung der benachbarten Membrananteile, die ebenfalls depolarisiert werden und damit weitere Öffnungen von Natriumkanälen bewirken. Eine retrograde Ausbreitung wird durch die Refraktärzeit der Membran verhindert, einer Zeit vorübergehender Unerregbarkeit, die solange andauert, bis das Ruhemembranpotential wiederhergestellt ist. Um die hohen Leitungsgeschwindigkeiten einiger Nervenfasern (bis zu 100 m/s) zu erreichen, muß das Aktionspotential extrem kurz sein (1 ms). Hier spielt die saltatorische Erregungsleitung myelinisierter Axone eine geschwindigkeitserhöhende Rolle, indem hierbei die Erregung von einem Ranvierschen Schnürring zum nächsten „springt“ und die durch Myelin isolierten Anteile übergeht. An die Aktivierung und Inaktivierung langsamleitender Fasern, wie z.B. die der Schmerzfasern, müssen, aufgrund der bis zu 100 -

fach langsameren Nervenleitgeschwindigkeiten, nicht solch extreme Ansprüche gestellt werden.

1.4 Natriumkanäle

Wie bereits oben beschrieben spielen Natriumkanäle eine wichtige Rolle im gesamten neuronalen System. Daher ist dieser Kanaltyp auch Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit gewesen bzw. ist dies immer noch. Primär-, Sekundär- und zum größten Teil auch Tertiärstruktur, Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten sowie Reaktionen auf diverse Pharmaka sind bekannt. Der Natriumkanal besteht dabei aus vier in der Aminosäuresequenz ähnlichen Motiven, den sogenannten Domänen. Jede dieser vier Domänen enthält einen transmembranären Anteil, der aus sechs α -Helices besteht. Die Domänen sind intrazellulär miteinander verbunden und bilden so, als α -Untereinheit, die eigentliche funktionelle Kanalpore. Der Selektivitätsfilter dieses Kanals liegt wahrscheinlich auf einer zwischen den Segmenten fünf und sechs interponierten Schleife, die in das Innere der Kanalpore hineinragt. Dieser Selektivitätsfilter kann aufgrund der Größe und der Hydrathülle unterschiedlicher Ionen diese selektieren. Als zusätzlicher Spannungssensor fungieren positiv geladene Teile der S4-Segmente aller Domänen (s. Abb. 2).

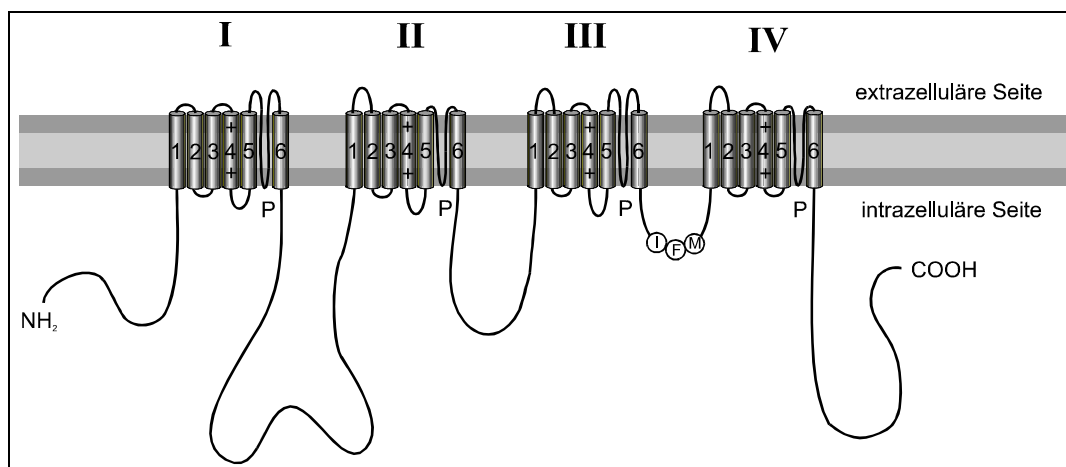


Abb. 2: Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals. Die transmembranären Segmente 4 enthalten den Spannungssensor, die Schleifen zwischen den Segmenten 5 und 6 (P) entsprechen wahrscheinlich dem Selektivitätsfilter. Das IFM-Peptid zwischen Domäne III und IV kann den Kanal durch Blockade der Pore inaktivieren. (Abb.modifiziert nach Catterall, 1988)

Zusätzlich verfügt der Kanal noch über zwei intrazelluläre β -Untereinheiten, die insbesondere für die Kinetik des Kanals zuständig sind. Die Inaktivierung des Natriumkanals erfolgt durch einen Teil der Aminosäuresequenz zwischen den Domänen III und IV, der aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (I, F, M) besteht. Dieser Tripeptid

verschließt nach erfolgter Aktivierung die Membranpore von intrazellulär und bewirkt so die Inaktivierung (Eaholtz et al. 1994). Natriumkanäle können also im wesentlichen drei verschiedene Zustände annehmen. Diese Stadien werden im allgemeinen als ruhend-aktivierbar, offen-aktiviert und geschlossen-inaktiviert bezeichnet (s. Abb. 3).

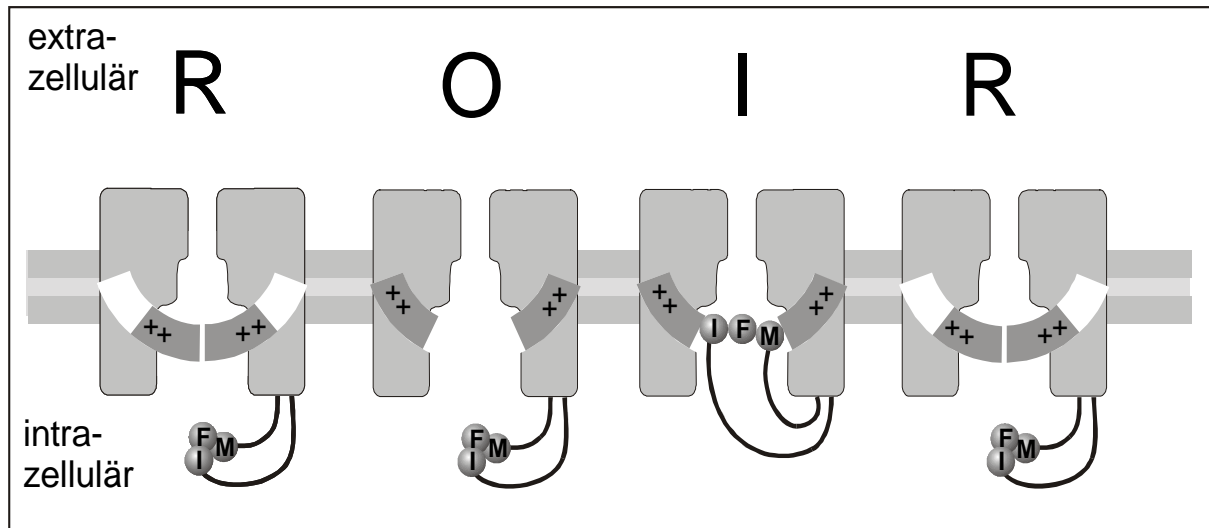


Abb. 3: Schematische Darstellung der Stadien des TTX-resistenten Natriumkanals. Die extrazelluläre Engstelle entspricht dem Selektivitätsfilter, die beiden dunkleren Balken dem Aktivierungstor. Intrazellulär ist das inaktivierende IFM-Peptid dargestellt. R entspricht dem ruhend-aktivierbaren, O dem offen-aktivierten, I dem geschlossen-inaktivierten Zustand.

Im Laufe eines Aktionspotential durchläuft der Kanal diese Zustände. Im Ruhezustand ist der Kanal zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials geschlossen, jedoch jederzeit erregbar. Wird der Kanal nun durch ein benachbartes Aktionspotential depolarisiert, wird er aktiviert und öffnet sich. Natriumionen können durch den Kanal fließen und somit die Umkehrung des Membranpotentials bewirken. Nach der Öffnung geht der Kanal spontan in den inaktivierten Zustand über, die Kanalpore ist wieder geschlossen, so daß die Repolarisationsvorgänge zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials anlaufen können. Diese Inaktivierung kann über zwei unterschiedlich schnelle Mechanismen ablaufen, die im wesentlichen von der Dauer, der Größe und der Geschwindigkeit des depolarisierenden Impulses abhängen. Ist das Ruhemembranpotential am Ende der Refraktärzeit des Kanals wiederhergestellt, gehen die Natriumkanäle erneut in den aktivierbaren Zustand über. Der normale Verlauf eines Aktionspotential am Natriumkanal durchläuft also die Stadien geschlossen-aktivierbar, offen-aktiviert, geschlossen-inaktiviert und wiederum geschlossen-aktivierbar in dieser Reihenfolge. Nichtsdestotrotz ist der Übergang eines Kanals von einem Zustand in jeden anderen möglich, ohne eventuelle Zwischenstadien durchlaufen zu müssen.

Von pharmakologischer Seite sind insbesondere die Interaktionen von Lokalanästhetika mit Natriumkanälen eingehend untersucht. Die Bindungsstelle für diese Substanzen liegt dabei in der Pore auf dem Segment S6 der Domäne IV (Ragsdale et al. 1994). Bindet eine lokalanästhetisch wirksame Substanz an diesem Ort, so wird der Ionenfluß durch diesen Kanal verhindert. Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen, reversiblen Blockade des Natriumstroms. Wird der Natriumstrom wiederholt ausgelöst, verstärkt sich die partielle Blockade, was als phasischer oder „use-dependent“ Block bezeichnet wird (Butterworth & Strichartz 1990). Als Erklärung für dieses Phänomen bestehen zur Zeit zwei Hypothesen. Die am häufigsten verwendete Theorie ist die „Modulated Receptor Hypothesis“ (Hille 1977, Hondeghem & Katzung 1977). In ihr wird davon ausgegangen, daß der Natriumkanal im aktivierten und vor allem im inaktivierten Zustand eine deutlich erhöhte Affinität zu dem Lokalanästhetikummolekül hat. Eine Bindung, die während der Auslösung eines Stromes stattgefunden hat, löst sich im nachfolgenden Ruhezustand nur langsam, so daß sich bei einem schnell folgenden neuen Impuls die Blockade verstärkt. Dies wiederholt sich bei jeder weiteren folgenden Kanalaktivierung, bis die Blockade als Maximum eine Art Gleichgewichtszustand erreicht. Als zweites Modell fungiert die „Guarded Receptor Hypothesis“ (Starmer et al. 1984). Hierbei wird davon ausgegangen, daß die Affinität des Kanals zum Lokalanästhetikum gleich bleibt, jedoch der Weg des Lokalanästhetikums an seine Bindungsstelle im Ruhezustand des Kanals erschwert ist. Erst durch eine Konformationsänderung während der Aktivierungs- und Inaktivierungsphase wird der Zugang zur Bindungsstelle freigegeben, wodurch die blockierende Wirkung eintreten kann.

1.5 Der TTX-resistente Natriumkanal

Tetrodotoxin, abgekürzt TTX, ist das Gift des japanischen Kugelfisches. Es ist ein Alkaloid, das aus der Leber und den Ovarien dieser Tiere gewonnen wird und schon 1964 erstmals als potenter und hochspezifischer Natriumkanalblocker beschrieben wurde (Narahashi et al. 1964). Bereits seit über zwanzig Jahren ist der TTX-resistente Natriumkanal mit seinen speziellen Eigenschaften bekannt. Nach seiner Entdeckung in sensorischen Ganglien der Maus (Yoshida & Matsuda 1979) wurde er von diversen Arbeitsgruppen mit den unterschiedlichsten Untersuchungsmethoden (Mikroelektrodenteknik, intrazelluläre Perfusionstechnik, „patch-clamp“-Technik) charakterisiert (Kostyuk et al. 1981, Schwartz et al. 1990, Caffrey et al. 1992, Roy & Narahashi 1992, Elliott & Elliott 1993, Ogata & Tatebayashi 1993, Yoshimura et al. 1996). Hierbei ist zu erwähnen, daß der TTX-resistente Natriumkanal nicht komplett unempfindlich gegen TTX ist, sondern erst durch eine mehr als 60.000-fach höhere TTX-Konzentration blockiert wird.

Elektrophysiologisch zeigt sich, daß TTX-resistente Natriumströme über eine um ca. 20 – 30 mV höhere Aktivierungs- und Inaktivierungsschwelle, eine langsamere Kinetik dieser Prozesse und eine deutlich schnellere Erholung von der Inaktivierung verfügen als TTX-sensitive Ströme (Elliott & Elliott 1993). Mit Untersuchungen auf Einzelkanalebene konnte außerdem festgestellt werden, daß die Einzelkanalleitfähigkeit unter der TTX-sensitiver Natriumkanäle liegt (Roy et al. 1994, Bräu et al. 1995, Motomura et al. 1995).

Auch von molekularbiologischer Seite ist der TTX-resistente Natriumkanal inzwischen gut erforscht. Die dabei klonierten Kanalproteine, die in beiden Fällen in kleinen Spinalganglienzellen der Ratte vorkommen und in Frosch-Oozyten exprimiert werden, werden als α -SNS (Arbeitsgruppe Wood, London, UK) bzw. PN3 (Arbeitsgruppe Hunter, Palo Alto, USA) bezeichnet (Akopian et al. 1996, Sangameswaran et al. 1996). Letztere Arbeitsgruppe konnte 1997 auch den humanen TTX-resistenten Natriumkanal klonieren und so dessen Existenz im menschlichen Nervensystem beweisen (Naylor et al. 1997). Dadurch gewinnt die Forschung an diesem Kanaltyp an klinischer Relevanz.

Von besonderem Interesse ist dabei die Bedeutung dieses Kanals für die Schmerztherapie. Verschiedene Anhaltspunkte sprechen dafür, daß gerade dieser Kanal bei der Entstehung und Weiterleitung von Impulsen im peripheren Schmerzsystem eine gewichtige Rolle spielt. Zum einen kommt der TTX-resistente Natriumkanal an kleinen Spinalganglienzellen vor. Diese Zellen sind mit den als Schmerzfasern bekannten, langsamleitenden A δ - und C-Fasern

verbunden (Harper & Lawson 1985) und können TTX-resistente Aktionspotentiale ausbilden (Yoshida & Matsuda 1979, Villiere & McLachlan 1996). Dies wurde auch durch Immunhistochemie und in situ-Hybridisierungen bestätigt (Akopian et al. 1996, Sangameswaran et al. 1996). Außerdem ist die bereits oben beschriebene langsamere Kinetik zu langsam für die hohen Weiterleitungsgeschwindigkeiten von dicken myelinisierten Nervenfasern, für die langsam leitenden nozizeptiven Fasern reicht sie jedoch aus. Des Weiteren konnte der TTX-resistente Strom kleiner Spinalganglienzellen durch verschiedene Nozizeptor-sensibilisierende Substanzen wie Prostaglandin E, Adenosin und Serotonin erhöht werden (England et al. 1996). Als letzter Anhaltspunkt läßt sich anführen, daß gerade im Milieu neuropathisch geschädigter Fasern, die über ein depolarisiertes Membranpotential verfügen, der TTX-resistente Natriumkanal durch seine Eigenschaften immer noch zur Impulststehung und –weiterleitung beitragen kann. Die Dauerschmerzhaftigkeit einer Neuropathie ist durch die schnellere Erholungszeit von der Inaktivierung erklärbar, die repetitive Erregungen erleichtert.

1.6 Lokalanästhetika

Die Lokalanästhesie ist eine in der klinischen Praxis alltägliche Methode, diverse diagnostische oder therapeutische Eingriffe zu ermöglichen. Eine ganze Reihe von Substanzen wird dazu verwendet. Das grundlegende Wirkprinzip all dieser Substanzen ist die Hemmung der Erregungsausbreitung entlang einer neuronalen Schmerzfasern. Dies erfolgt durch die Blockade von Natriumkanälen. In der vorliegenden Arbeit wurden Lidocain und Benzocain untersucht.

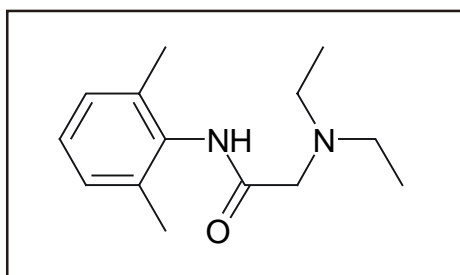


Abb. 4: Chemische Struktur von Lidocain

Lidocain ist ein Amid-Lokalanästhetikum, das aufgrund seiner Wirkung auf die Natriumkanäle des Herzens auch als Antiarrhythmikum verwendet wird. Seine anästhesiologischen Anwendungsgebiete liegen in der Infiltrations-, Leitungs-, Oberflächen-, Spinal-, und Epiduralanästhesie. Um einen zu schnellen Abtransport der Substanz von ihrem

Wirkort zu verhindern, wird es zur Wirkungsverlängerung oft mit Adrenalin versetzt. Chemisch gesehen handelt es sich um 2-Diethylamino-N-[2,6-Dimethylphenyl]-acetamid mit der Summenformel $C_{14}H_{22}N_2O$ und einem Molekulargewicht von 234,3 g/mol. Lidocain zeigt einen ausgeprägten „use-dependent“ Block.

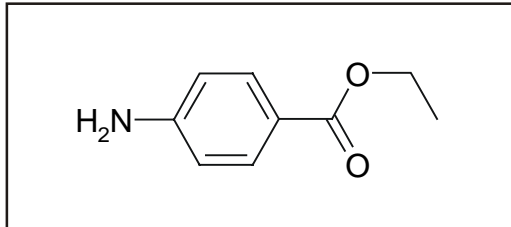


Abb. 5: Chemische Struktur von Benzocain

Benzocain ist ein Lokalanästhetikum vom Ester-Typ und liegt unter physiologischen Bedingungen ungeladen vor. Im klinischen Alltag wird es vor allem zur Oberflächenanästhesie von Schleimhäuten verwendet. Chemisch ist es Ethyl 4-Aminobenzoate mit der Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ und einem Molekulargewicht von 165,2 g/mol. Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde Benzocain in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Benzocain löst keinen „use-dependent“ Block aus.

1.7 Aufgabenstellung

Im Zuge der Entdeckung eines neuen Angriffspunktes der anästhesiologischen Schmerztherapie in Form eines bestimmten Ionenkanals, ist die weitere Charakterisierung und Untersuchung dieses Kanals hochinteressant. Basierend auf dem Vergleich der beiden Lokalanästhetika Lidocain und Benzocain, insbesondere in Bezug auf ihre unterschiedliche Beeinflussung des „use-dependent“ Blocks, wird in dieser Arbeit unter Anwendung der „patch-clamp“-Technik an Spinalganglienzellen erwachsener Ratten eine neue molekulare Vorstellungsweise für die Ursachen des „use-dependent“ Block des TTX-resistenten Natriumkanals entwickelt.

2. Material & Methoden

2.1 Präparation

Die Spinalganglien wurden 6-8 Wochen alten Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts nach Tötung durch Kompression und zervikale Dislokation entnommen. Hierbei wurde die Wirbelsäule durch einen ventralen Zugang und Entfernung der Thorax- und Abdominalorgane freigelegt und vom Zervikal- bis zum Lumbalbereich vollständig entnommen. Die Eröffnung des Rückenmarkkanals erfolgte durch seitliche Einschnitte mittels einer Schere auf Höhe der Wirbelbogenwurzel. Nach Entfernung der Wirbelkörper konnten die Spinalganglien durch Zug an der jeweiligen Hinterwurzel aus den Neuroforamina gelöst und von der Hinterwurzel und dem Spinalnerven abgetrennt werden. Nach der Entnahme wurden die ca. 20 – 30 gewonnenen Spinalganglien in Tyrodelösung (s. Kap. 2.6 Lösungen) aufbewahrt. Sowohl die Tötung der Ratten als auch die Organentnahme wurden dem zuständigen Regierungspräsidium gemeldet. Nach weiterer Freipräparation durch Entfernung von Bindegewebe und Nervenresten wurden die Ganglien in einer calcium- und magnesiumfreien 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 min bei 37°C unter konstanter Bewegung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Nährmedium (s. Kap. 2.6 Lösungen) folgte eine weitere Inkubation in Nährmedium mit Trypsin-Inhibitor Typ II-S, 100 µg/ml (Sigma, Deisenhofen) und DNase II, 80 µg/ml (Fluka, Buchs, Schweiz) für 5 Minuten. Mit drei feuerpolierten Glaspipetten mit kleiner werdenden Durchmessern wurden die Ganglien zu einer Zellsuspension aufgelöst. Nach Sedimentieren der Zellen wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in Plastikpetrischalen (Ø 35 mm) mit Nährmedium verteilt. Die Zellen wurden unter Carbogen-Begasung (95% O₂, 5% CO₂) maximal 72 Stunden aufbewahrt.

2.2 „Patch-Clamp“-Technik

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden mit der 1976 von Neher und Sakmann entwickelten „Patch-Clamp“-Technik (Neher & Sakmann 1976, Hamill et al. 1981) durchgeführt. Deren Prinzip ist es, mittels einer feinen Glaspipette elektrischen Kontakt zu einer Zelle herzustellen und so eine Darstellung der Ströme durch die Zellmembran bis hin zu

Einzelkanaldarstellungen zu ermöglichen. Dabei wird die Glaspipette, deren Spitze einen Durchmesser von ca. 1 μm hat, unter Sicht eines invertierenden Mikroskops an die Zelle herangefahren. Nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran kann durch Anlegen eines leichten Unterdrucks die Zelle so angesaugt werden, das ein Abdichtwiderstand von mehreren Gigaohm, der sogenannte „Gigaseal“, erzielt wird. Die dadurch erzielten Vorteile sind zum einen die Reduzierung des Verletzungsstroms auf ein vernachlässigbares Minimum, denn der gemessene Strom fließt so fast ausschließlich durch die Zellmembran. Zum anderen wird durch den extrem hohen Abdichtwiderstand das diesem umgekehrt proportionale elektrische Rauschen („Johnson noise“) so stark reduziert, daß auch sehr geringe Ströme, wie sie z.B. durch einen einzigen Ionenkanal fließen, meßbar sind.

Die Zellmembran kann so in verschiedenen Konfigurationen untersucht werden. Neben der für diese Arbeit verwendeten „whole-cell“ Konfiguration existieren noch die bereits oben beschriebene „cell-attached“ Konfiguration sowie die sogenannten „cell-free“ Patches. Bei letzteren wird ein Membranfleck (Patch) aus der Zellwand ausgerissen, so daß man je nach Technik einen „inside-out“- oder „outside-out“- Patch erhält. Nähere Erläuterungen siehe Abbildung 6.

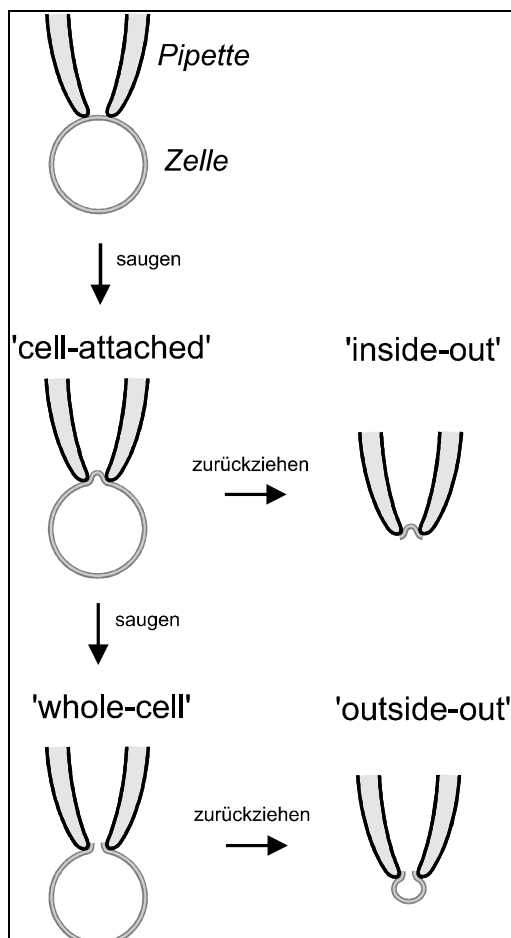


Abb. 6: Schematische Darstellung verschiedener „Patch“-Konfigurationen. Nach dem Heranfahren der Pipette an die Zelle wird durch vorsichtiges Ansaugen die „cell-attached“-Konfiguration mit einem „Gigaseal“ hergestellt. Wird nun die Pipette ruckartig zurückgezogen erhält man einen „inside-out“-Patch, bei dem die Innenseite der Zellmembran der Badlösung zugewandt ist. Durch weiteres kurzes und kräftiges Saugen in der „cell-attached“-Konfiguration erhält man die „whole-cell-Konfiguration“ mit Zugang zum Zellinneren durch die Pipette. Diese ist durch langsames Zurückziehen der Pipette und daraus folgender Abschnürung eines kleinen Membranbläschens in die „outside-out“-Konfiguration überführbar, bei der, wie im „whole-cell“-Zustand, die Membranaußenseite zur Badlösung weist.

Bei der „whole-cell“ Konfiguration besteht somit ein Zugang zum Zellinneren durch die Pipette. Der Austausch der Flüssigkeiten intrazellulär und in der Glaspipette war nach ca. 50 Sekunden in einem stabilen Zustand, so daß mit dem Experiment begonnen werden konnte. Der zur Messung der Ströme benötigte Verstärker arbeitet nach dem Prinzip der Spannungsklemme („voltage-clamp“). Hierbei wird ein dem Verstärker vorgegebenes Potential an der Zelle durch den Verstärker selbst aufrechterhalten. Die dazu vom Verstärker benötigten Ausgleichströme entsprechen den Ionenströmen, die durch die Zellmembran fließen und werden aufgezeichnet. Während des Experiments erfolgte eine Kompensation von Leck- und kapazitiven Strömen sowie der Serienwiderstände über den Verstärker. In dieser Arbeit angegebene Spannungen beziehen sich auf die Differenz der Innenseite zur Außenseite, Einwärtsströme sind als negativ und auf Abbildungen nach unten gerichtet dargestellt. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (22-24°C) durchgeführt.

2.3 Elektrophysiologische Geräte

Die für die beschriebenen Experimente verwendeten Glaspipetten wurden unmittelbar vor dem Experiment aus Borosilikat-Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm mittels eines Horizontal-Pipettenziehgerätes (Brown-Flaming Micropipette Puller Model P-97, Sutter Instrument Company, USA) hergestellt. Hierbei wurden die mit Methanol gereinigten Kapillaren in das Ziehgerät eingespannt und nach einem vorgegebenen Programm unter Erhitzung zu einer sich verjüngenden Spitze ausgezogen. Die dadurch entstehenden gleichmäßig großen Spitzen wurden dann feuerpoliert, d.h. an einem glühenden Platindraht weiter verkleinert, entgratet und gereinigt. Die Pipetten wurden von der Rückseite her mit der Innenlösung (s. Kap. 2.6 Lösungen) befüllt.

Die lösungsgefüllten Pipetten werden mittels einer Klemmschraube am Pipettenhalter befestigt, in dessen Mitte sich eine Silberelektrode befindet. Durch diese wird ein elektrischer Kontakt zur Pipettenlösung bzw. während des Experiments zum Zellinnern hergestellt. Der Pipettenhalter ist an einem Mikromanipulator (Mikromanipulator DC6, Märzhäuser, Wetzlar) befestigt, durch den sich die Pipette dreidimensional bewegen und so leicht an die zu untersuchende Zelle heranführen läßt. Die Petrischalen mit den Zellen werden über einem inversen Mikroskop (Modell IM, Zeiss, Oberkochen) angebracht und untersucht. Die zur Verfügung stehenden Vergrößerungen sind 63-, 160- und 400-fach. Mikroskop und Mikromanipulator sind auf unterschiedlichen Trägersystemen installiert, um Schwingungsprobleme zu vermeiden. Zur Ausschaltung von Umgebungsschwingungen ruht

die gesamte Anordnung auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Isostation Vibration Isolated Workstation, Newport, Irvine, CA, USA). Der verwendete Verstärker ist ein Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), der über einen Analog-Digital-Wandler (Labmaster TM-40 AD/DA board, Scientific Solutions, Solon, OH, USA) mit einem Personal Computer (386DX-40MHz, MS-DOS 7.0) zur Darstellung und Speicherung der Daten verbunden ist (s. Abb. 7).

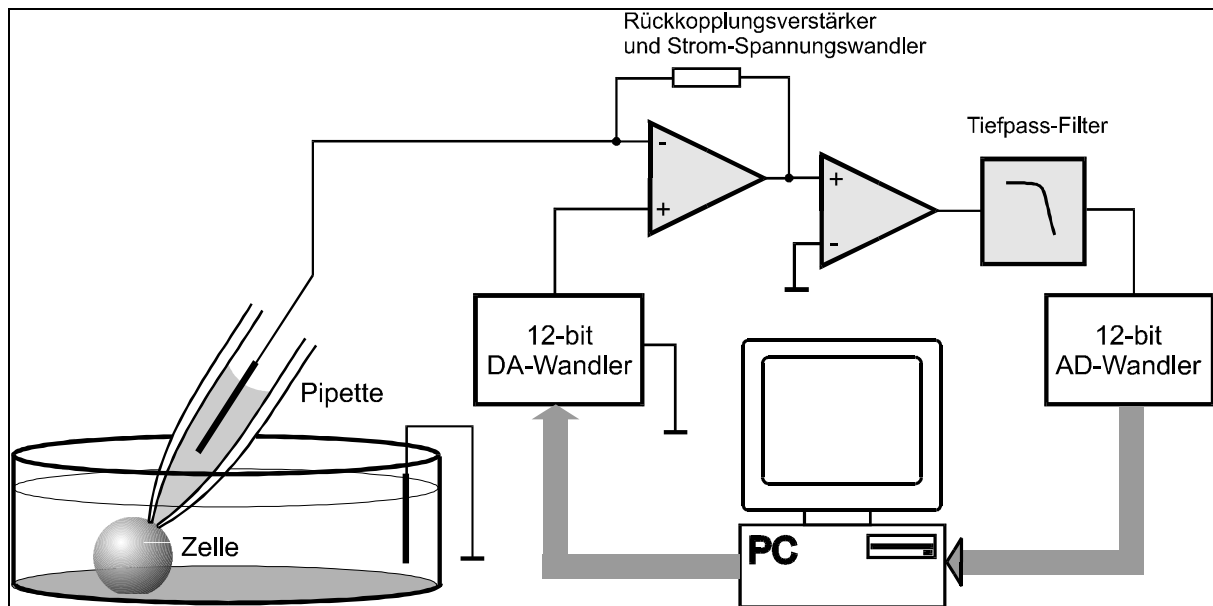


Abb. 7: Schematische Darstellung eines „patch-clamp“-Versuchsstandes in „whole-cell“-Konfiguration

2.4 Datenerfassung und Auswertung

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte per PC mittels verschiedener Programme. Die Erstellung der Impulsprotokolle und Registrierung der Stromkurven wurde mit Clampex pClamp 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Stromkurven geschah mit ClampFit (Axon Instruments, s.o.). Für graphische Darstellung, statistische Auswertung und Kurvenanpassung standen Fig P 5.0 (Biosoft, Cambridge, England) und Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA), zur Tabellenkalkulation Microsoft Excel 7.0 und zur erweiterten graphischen Präsentation CorelDraw 8.0 zur Verfügung.

Die in den Abbildungen dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

2.5 Lösungswechsel

Um die verschiedenen Lösungen extrazellulär applizieren zu können, wurde ein spezielles Perfusionssystem verwendet. Dies besteht aus sechs nebeneinander angeordneten Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 1 mm. Diese sind wiederum über ein Schlauchsystem durch einen gefrästen Plexiglasblock mit handelsüblichen 5 ml-Einmalspritzen verbunden, deren Kolben durch ein Hydrauliksystem betätigt werden. Ein gleichmäßiger Fluß durch alle Kapillaren wird durch ein angeschlossenes Dauerinfusionsgerät Perfusor 4 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) gewährleistet. Der Vorschub beträgt dabei ca. 1,5 ml/min, was einer Flußgeschwindigkeit von ca. 20 mm/min entspricht. Das Perfusionssystem wird mit einem Magnetfuß direkt am Objektisch des Mikroskops befestigt. Während eines Experiments wurden die Zellen nach Erreichen der „whole-cell“-Konfiguration am Boden der Petrischale mit dem Mikromanipulator von dort abgehoben und in die Glaskapillare verbracht. Die elektrischen Eigenschaften der Zelle blieben dabei unverändert. Nach erfolgter Messung konnte die Zelle problemlos mit dem Mikromanipulator in die angrenzenden Kapillaren bewegt werden. Ein vollständiger Wechsel der Extrazellulärlösung war so in wenigen Sekunden möglich.

2.6 Lösungen

2.6.1 Nährmedium

Das Nährmedium wurde vor jeder Präparation frisch hergestellt und diente zur Aufbewahrung der Ganglienzellen sowie zum Waschen während der Präparation (s. Kap. 2.1 Präparation). Folgende Zusammensetzung wurde verwendet (alle Substanzen von Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen): 13,05 ml MEM (Minimum Essential Medium Eagle), 0,3 ml einer 200 mmol/l L-Glutamin-Lösung, 0,15 ml einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (3000 IE Penicillin, 3 mg Streptomycin) und 1,5 ml fötalem Kälberserum (FCS).

2.6.2 Kristalline Lösungen

Die kristallinen Lösungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit Substanzen der Firma Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) und Aqua bidestillata hergestellt. Die Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und regelmäßig pH-kontrolliert. In maximal monatlichen Intervallen wurden neue Lösungen angefertigt. Die Applikation der Lösungen erfolgte durch Spritzenfilter mit Porengröße 0,2 µm (Renner, Darmstadt).

Zusammensetzung der Lösungen:

- externe Tyrode-Lösung:

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

- externe Ca²⁺- und Mg²⁺- freie Tyrode Lösung:

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

- externe Tyrode-Lösung mit TEA:

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

- externe Tyrode-Lösung mit TEA und TTX:

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

- intrazelluläre CsF-Lösung (CsF_i):

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

- intrazelluläre CsF-Lösung mit Chloramin T:

10 mmol/l NaCl, 140 mmol/l CsF, 3 mmol/l EGTA, 10 mmol/l HEPES, 1 g/l Chloramin T

EGTA: Ethylenglycol-Bis[β-Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat

HEPES: (4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazin-ethansulfonsäure)

Diese Lösungen sind modifiziert, um optimale Untersuchungsbedingungen zu ermöglichen. Die Senkung der Natriumionenkonzentration auf 35 mmol/l vermindert den Natriumstrom und verbessert damit die Eigenschaften des „voltage-clamp“-Modus. Die Osmolarität der Lösungen wurde durch Cholinchlorid ausgeglichen. Der Zusatz von 10 mmol/l Tetraethylammoniumchlorid (TEA) blockiert den spannungsabhängigen Kaliumstrom (Tasaki & Hagiwara 1957), der Zusatz von 100 nmol/l Tetrodotoxin (TTX) blockiert die TTX-sensitiven Natriumkanäle.

Durch Zugabe von Cäsiumfluorid (CsF) werden ebenfalls die Kaliumströme (durch Cäsiumionen) sowie die Calciumströme (durch Fluoridionen) blockiert. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit Tris-Puffer (Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris)-Base) auf 7,4 für die Extrazellulärlösungen, respektive 7,2 für die Intrazellulärlösung eingestellt.

3. Ergebnisse

3.1 TTX-resistente Natriumströme

Diese Ströme wurden in der „whole-cell“-Konfiguration der Spannungsklemme („voltage-clamp“) untersucht. Die dabei untersuchten Zellen waren kleine und mittelgroße Spinalganglienzellen erwachsener Ratten. Diese Zellgröße wurde gewählt, da in größeren Zellen praktisch ausschließlich TTX-sensitive Natriumkanäle vorliegen, wohingegen die hier verwendete Zellpopulation ein Gemisch aus TTX-sensitiven und –resistenten Natriumkanälen aufweist (Elliott & Elliott 1993). Bestimmt wurde die Zellgröße aus der Zellkapazität, die während jedes Experiments durch den Axopatch-Verstärker mittels geeichter kapazitiver Kompensation bestimmt wurde. Unter Annahme einer kugelförmigen Zellform und einer spezifischen Kapazität der Zellmembran von $1\mu\text{F} / \text{cm}^2$ kann so die Größe der Zellen berechnet werden (Hille 1992) (s. Abb. 8).

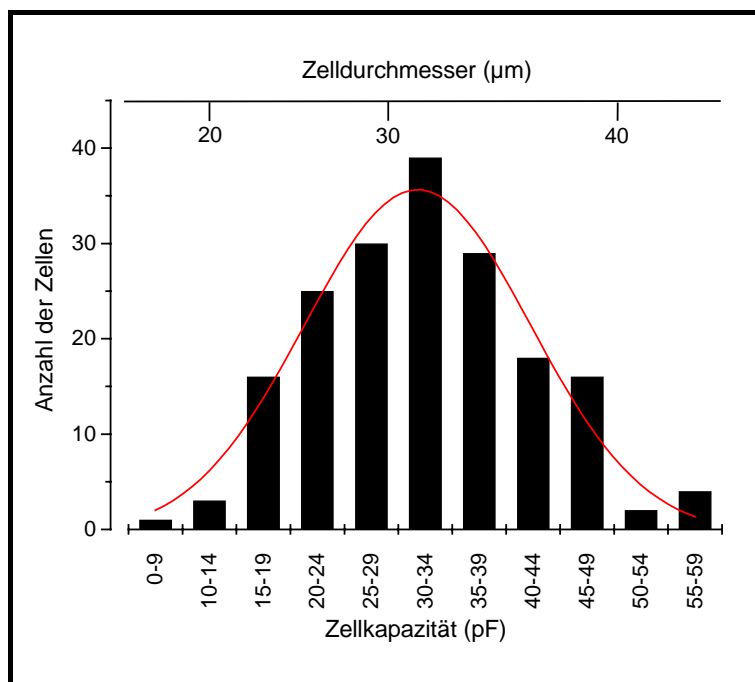


Abbildung 8: Zellkapazitätsverteilung aller untersuchten Zellen. Die Fußzeile bezeichnet die gemessenen Zellkapazitäten, die Kopfzeile die daraus berechneten Zelldurchmesser. Die mittlere Kapazität beträgt 32 ± 10 pF (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 183$). Die Linie stellt die Anpassung mit einer Gaußfunktion dar.

Die gemessenen Natriumströme hatten Maxima von 4 – 20 nA bei einer Natriumkonzentration die für bessere Untersuchungsbedingungen auf ein Viertel (35 mmol/l) reduziert worden war. Das gewählte Haltepotential lag bei -90 mV und alle Experimente wurden unter extrazellulärer Anwesenheit von 100 nmol/l TTX durchgeführt.

Zur weiteren Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften wurden routinemäßig zu Anfang jeder neuen Zelluntersuchung Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten registriert.

Um eine Aktivierungskurve (Strom-Spannungs-Kurve) zu erstellen, wurde die Zelle mit einem Impulsprotokoll gereizt, das von einem Haltepotential von -90 mV ausgehend einen um 20 mV hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV über 50 ms und darauffolgend 15 Impulse zu jeweils positiveren Potentialen von -80 mV bis 60 mV über 50 ms generierte. Zur Untersuchung der Inaktivierung wurde ein Impulsprotokoll verwendet, das, vom Haltepotential von -90 mV ausgehend, 15 Impulse zu Potentialen von -130 mV bis 10 mV, ebenfalls in 10 mV Schritten über 50 ms, und direkt anschließend zu einem Potential von -10 mV für 10 ms erzeugte (s. Abb. 9).

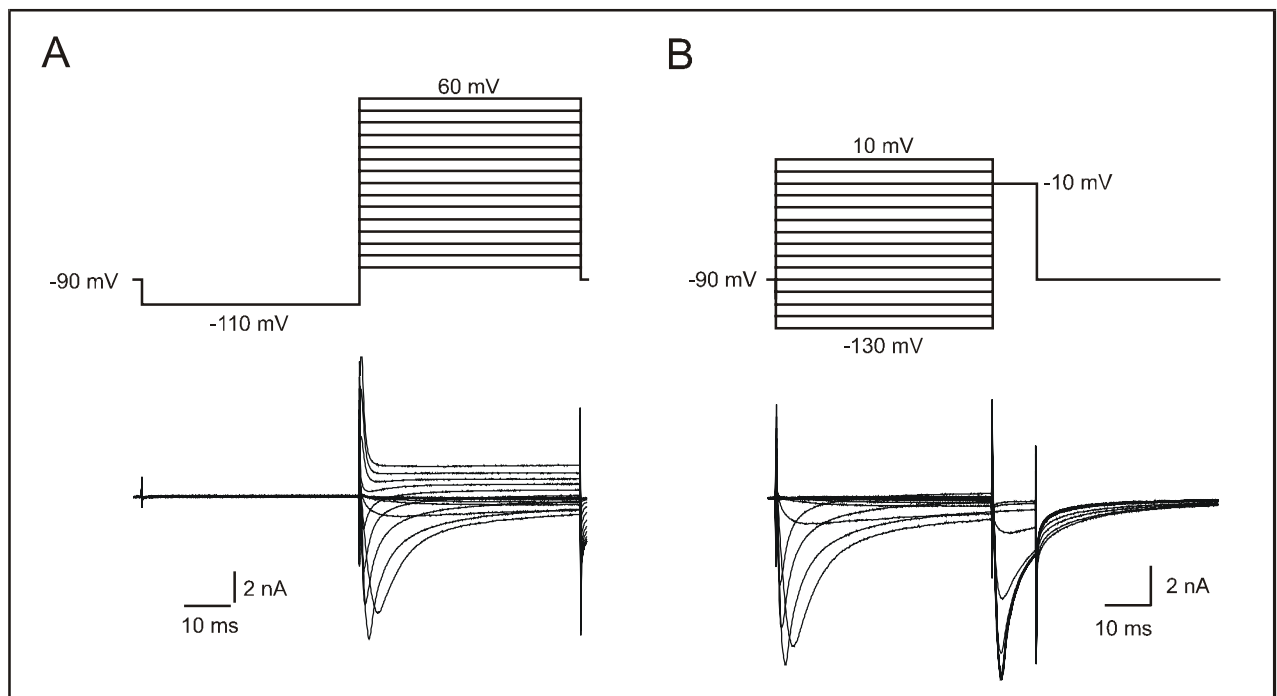


Abb. 9: Aktivierungs- (A) und Inaktivierungskurven (B) für TTX-resistente Natriumströme. Registrierungen in externer Tyrodelösung mit TEA und TTX, oberhalb die jeweiligen Impulsprotokolle.

Aus dem Maximum des Natriumstroms (I_{Na}) aufgetragen gegen das Testpotential (E) kann man dann anhand einer Grafik die Potentialabhängigkeit des Natriumstroms verdeutlichen (s. Abb. 10). Die Potentialabhängigkeit der Natriumleitfähigkeit (G_{Na}) der Zellmembran wird dabei von einer Boltzmann-Funktion beschrieben, die, abhängig vom Potential (E), zwischen null und einer maximalen Natriumleitfähigkeit ($G_{Na,max}$) liegt.

Gleichung 2:
$$G_{Na}(E) = \frac{G_{Na, \max}}{1 + e^{\frac{E_{h,a} - E}{k_a}}}$$

$G_{Na, \max}$	= maximale Natriumleitfähigkeit
k_a	= Steilheitsfaktor
E	= Membranpotential
$E_{h, a}$	= halbmaximales Aktivierungspotential

Das Testpotential wiederum induziert einen Natriumstrom, der sich gemäß des Ohmschen Gesetzes aus E und G_{Na} unter Einbeziehung des Natriumgleichgewichtspotentials (E_{Na}) berechnen läßt.

Gleichung 3:
$$I_{Na}(E) = G_{Na} \cdot (E - E_{Na})$$

I_{Na}	= Natriumspitzenstrom
E_{Na}	= Umkehrpotential
G_{Na}	= Natrium-Leitfähigkeit

Durch Einsetzen von Gleichung 3 in Gleichung 2 erhält man die mathematische Formel der Strom-Spannungskurve.

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

Bei genauerer Betrachtung der hieraus ermittelten Kurven erkennt man jedoch einen zweiten Anteil des Natriumstromes. Diese zweite Komponente in der Strom-Spannungskurve ist wahrscheinlich auf das Vorkommen von mindestens zwei TTX-resistenten Natriumkanal-Subpopulationen zurückzuführen (Tate et al. 1998, Scholz et al. 1998, Rush et al. 1994). Um dem in der Abbildung deutlich sichtbaren zweiten Stromanteil Rechnung zu tragen und beide Anteile isoliert auswerten zu können, wurden die Kurven mit zwei Boltzmann Funktionen nach Gleichung 5 angepaßt. Dabei wurde für die bei niedrigeren Potentialen aktivierende Komponente ein Umkehrpotential von 30 mV angenommen.

Gleichung 5
$$I_{Na}(E) = \frac{G_{Na1, \max}}{1 + e^{\frac{E_{h,a1} - E}{k_{a1}}}} \cdot (E - E_{Na}) + \frac{G_{Na2, \max}}{1 + e^{\frac{E_{h,a2} - E}{k_{a2}}}} \cdot (E - 30mV)$$

Durch nicht-lineare Kurvenanpassung erhält man die Werte der Parameter und die in Abb. 10 dargestellte Kurve.

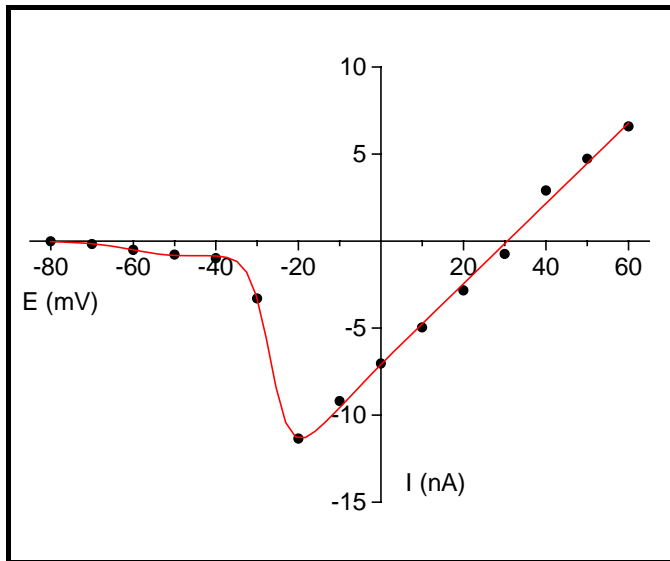


Abb. 10: Strom-Spannungs-Kurve des TTX-resistenten Natriumstroms. Aufgetragen sind der Natriumspitzenstrom I_{Na} gegen das Testpotential (E). Experiment in externer Tyrode-Lösung mit TEA und TTX, Innenlösung CsF, Haltepotential -90mV . Kurve angepasst nach Gleichung 5.

Zur Darstellung der Potentialabhängigkeit der schnellen Inaktivierung wurde nach dem oben erwähnten Impulsprotokoll eine Inaktivierungsregistrierung erstellt. Die dabei gemessenen Natriumspitzenströme wurden nun gegen das Potential des jeweiligen Vorimpulses aufgetragen (s. Abb. 12). Durch Anpassung von Gleichung 6 konnte hieraus das halbmaximale Inaktivierungspotential $E_{h,i}$ bestimmt werden, bei dem sich die Hälfte aller Ionenkanäle im inaktivierten Zustand befinden.

Gleichung 6:
$$I_{Na}(E) = \frac{I_{Na, \max}}{1 + e^{\frac{E - E_{h,i}}{k}}}$$

- | | |
|----------------|---|
| $I_{Na, \max}$ | = 1 (normalisiert) |
| k | = Steilheitsfaktor |
| E | = Membranpotential |
| $E_{h,i}$ | = halbmaximales Inaktivierungspotential) |

3.2 Tonischer und „use-dependent“ Block

Die bereits in Kapitel 1.4 beschriebenen unterschiedlichen Blockierungsarten (tonisch und „use-dependent“) des TTX-resistenten Natriumkanals wurden mittels eines Impulsprotokolls untersucht, das, vom Haltepotential von -90 mV ausgehend, nach einem 50 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV einen depolarisierenden Impuls nach -10 mV auslöste (s. Abb. 9). Zur Untersuchung des „use-dependent“ Blocks wurde dieses Protokoll zehnmal mit einer Frequenz von zwei Hertz durchlaufen. Durch das Einbringen der

Spinalganglienzellen in die Glaskapillaren des Lösungswechselsystems wurden die Zellen in der „whole-cell“-Konfiguration verschiedenen Konzentrationen der beiden zu untersuchenden Pharmaka ausgesetzt. Dabei wurden, neben den Kontrollen, für Lidocain Konzentrationen von 10, 30, 100, 300 und 1000 $\mu\text{mol/l}$, für Benzocain Konzentrationen von 100, 300, 1000 und 3000 $\mu\text{mol/l}$ gewählt. In jeder Konzentration wurden die Natriumströme nach dem beschriebenen Impulsprotokoll untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl Lidocain als auch Benzocain den TTX-resistenten Natriumstrom reversibel und konzentrationsabhängig blockieren. Allerdings wurde bei einer repetitiven Reizung mit einer Frequenz von zwei Hertz in Lidocain ein ausgeprägter „use-dependent“ Block induziert, wohingegen Benzocain keinen derartigen Block hervorrief (s. Abb. 11).

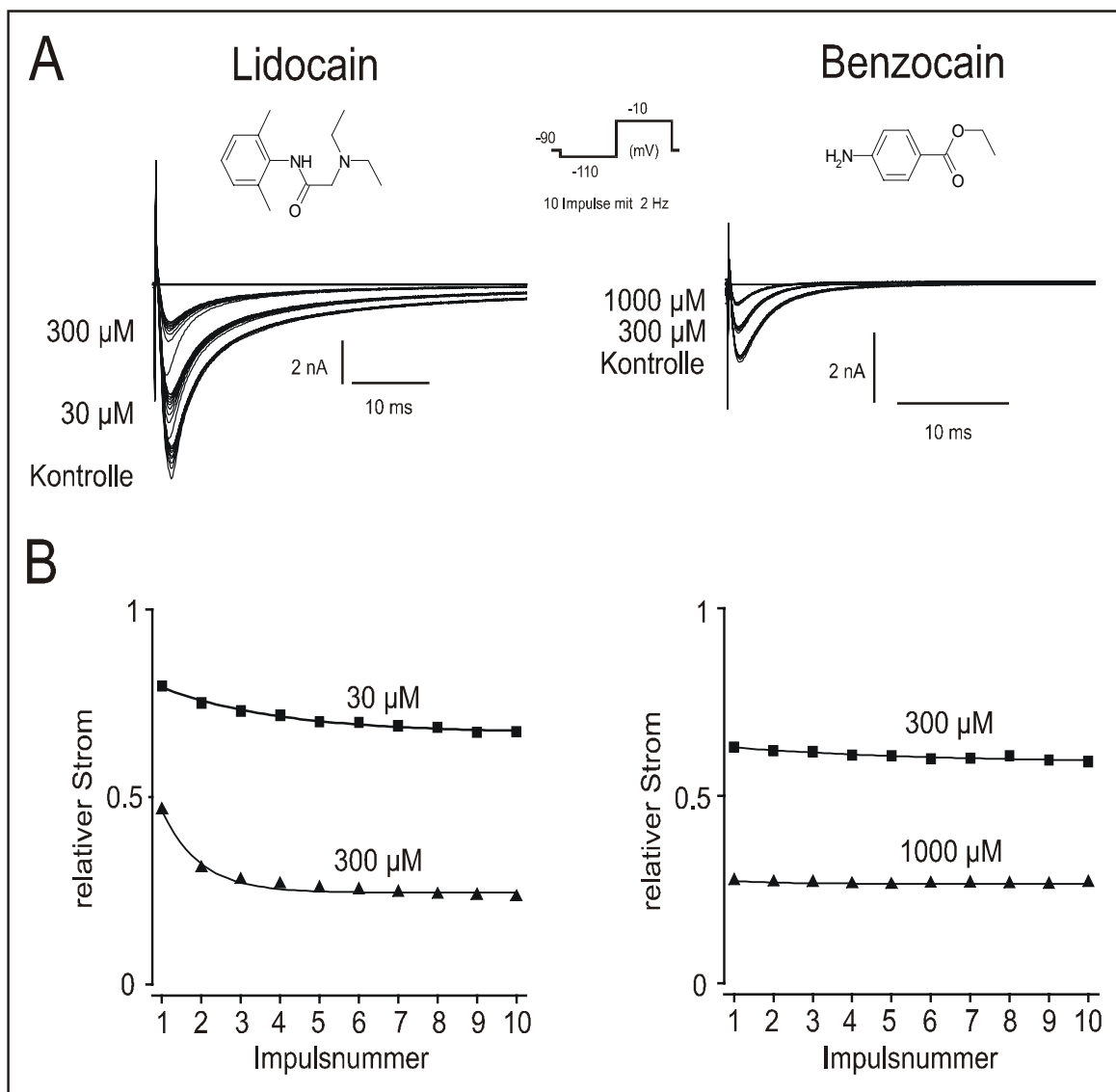


Abb. 11: Tonischer und „use-dependent“-Block des TTX-resistenten Natriumstromes. A: Originalregistrierungen der Ströme in verschiedenen Lokalanästhetika-Konzentrationen und in Kontrolle, B: relativer Spitzenstrom aufgetragen gegen die Impulsnummer

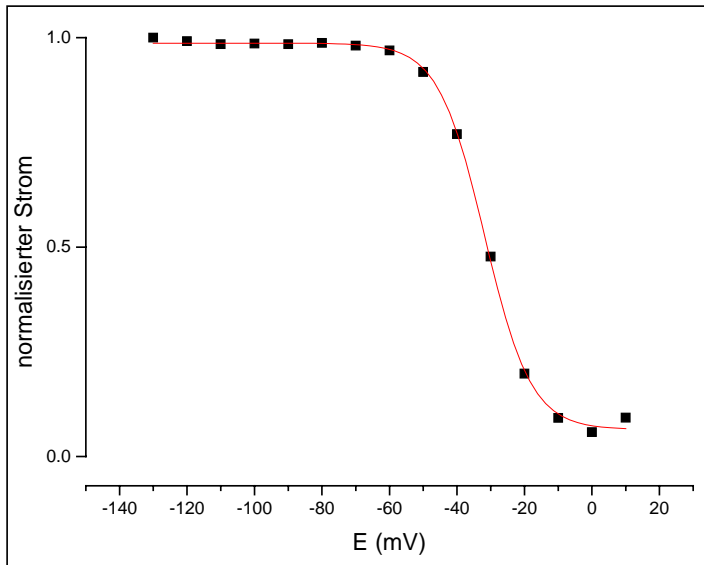


Abb. 12: Inaktivierungskurve des TTX-resistenten Natriumstromes. Registrierungen in externer Tyrodelösung mit TEA und TTX, Innenlösung CsF, Haltepotential -90 mV. Halbmaximales Inaktivierungspotential an diesem Beispiel $-31,8 \pm 0,2$ mV.

Vergleicht man die Entwicklung des Blockes beider Substanzen im Verlauf der Impulsserien (s. Abb. 11 B), so erkennt man, daß der Lidocain-Block während der ersten vier Impulse deutlich zunimmt und danach nahezu konstant bleibt. Bei Benzocain tritt der maximale Block sofort auf, es sind nur geringe Veränderungen während der Impulsserie erkennbar.

3.3 Dynamischer Block

Bei der Untersuchung der zeitlichen Verläufe der Stromkurven wird deutlich, daß sich unter dem Einfluß von Lidocain wesentliche Eigenschaften verändern. So beschleunigt sich während des ersten Impulses sowohl der Aufstrich bis zum Spitzenstrom, als auch der Zeitverlauf der Inaktivierung im Vergleich zur Kontrolle. Während des zehnten Impulses sind dagegen keine Unterschiede im Zeitverlauf zu erkennen. Dividiert man nun die Registrierungen der Experimente mit Lidocain durch die entsprechenden Registrierungen in Kontrolllösung, so kann man die Entwicklung des Blockes darstellen. Diese Verstärkung während der Depolarisationsphase nennen wir „Dynamischen Block“ (s. Abb. 13).

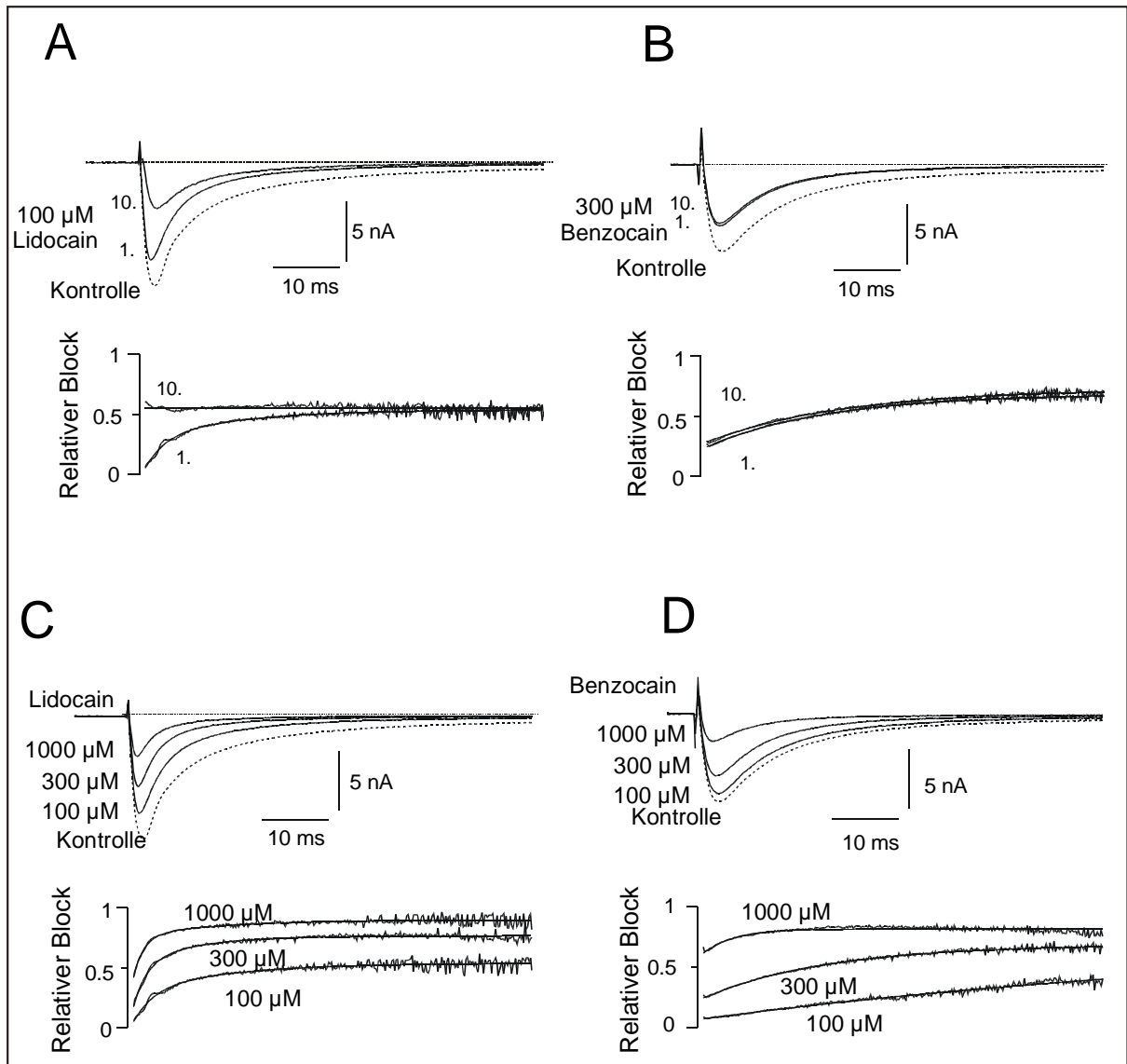


Abb. 13: Dynamischer Block unter Lidocain und Benzocain. Entwicklung der Blockade durch Lidocain (A, C) und Benzocain (B, D) zwischen dem ersten und zehnten Impuls des Impulsprogrammes, sowie unter zunehmenden Blockerkonzentrationen.

Für Lidocain bedeutet das, daß der TTX-resistente Natriumstrom durch 100 µM dieser Substanz vor der Depolarisation nicht blockiert wird. Der Block entwickelt sich erst während der Depolarisation innerhalb weniger Millisekunden. Dabei erreicht er einen stabilen Zustand von ca. 55% Blockade. Zum Zeitpunkt des Natriumspitzenstromes hat dieser dynamische Block bereits 20% erreicht, was normalerweise als tonischer Block bezüglich der Reduktion des Spitzenstroms bezeichnet wird. Benzocain weist dagegen die Eigenschaften des dynamischen Blocks sowohl während des ersten, als auch während des zehnten Impulses auf, was wahrscheinlich auf die unterschiedlichen molekularen Eigenschaften zurückzuführen ist.

3.4 Erholungszeiten vom dynamischen Block

Um die Dissoziation der Lokalanästhetika von ihrer Bindungsstelle am Kanal untersuchen zu können, wurden spezielle Impulsprotokolle mit einem Doppelimpuls verwendet. Nach einem depolarisierenden Impuls von 50 ms Länge nach 0 mV wurde nach einem Erholungszeitraum ein erneuter Impuls von 5 ms Länge ebenfalls nach 0 mV ausgelöst. Das Erholungsintervall beim Haltepotential von -90 mV wurde dabei von 50 ms bis 3000 ms stetig vergrößert. Aus der Größe der Ströme, die nach der Erholung wieder auslösbar waren, kann man auf die Menge der aktivierbaren Kanäle schließen (s. Abb. 14).

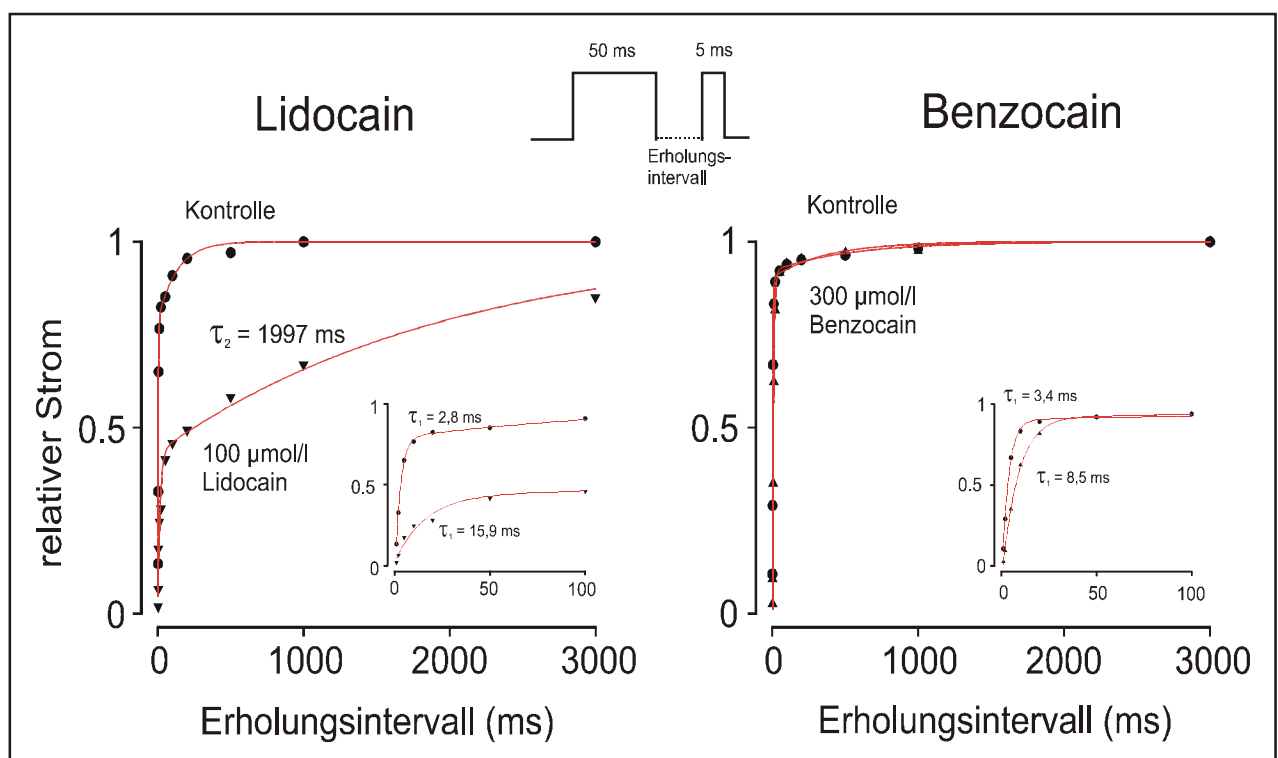


Abb. 14: Erholung des TTX-resistenten Natriumstroms von einem depolarisationsinduzierten Block während der Repolarisation. Die kleineren Abbildungen zeigen eine höhere Auflösung der ersten 100 ms der Erholungszeit. Die Graphen sind biexponentielle Anpassung zur Darstellung der Zeitkonstanten. τ entspricht der Zeitkonstanten der Erholung.

In Abwesenheit natriumkanalblockierender Substanzen erholten sich die Ströme schnell mit einer Zeitkonstante (τ) von 2,8 ms. Dies entspricht der Aufhebung der schnellen Inaktivierung. Vier Prozent des Stromes erholen sich mit einer zweiten Zeitkonstante von 2 Sekunden von der Inaktivierung, die wahrscheinlich der Aufhebung der langsamen Inaktivierung entspricht. Unter Zugabe von Lidocain veränderte sich die Aufhebung der Inaktivierung insofern, als sich 55% des Natriumstromes mit einer Zeitkonstante von 2,0 Sekunden erholten. Dies wird durch die Vorstellung erklärbar, daß sich das Lidocainmolekül während der Repolarisationsphase nur sehr langsam vom Kanal löst. Die restlichen 45%

Natriumstrom, die sich mit einer Zeitkonstante von 2,8 ms erholen, stellen die Kanäle dar, an die sich während der Depolarisation kein Lidocain gebunden hat. Im Gegensatz dazu zeigte Benzocain keine Verlangsamung der Erholungszeiten. Allerdings erhöhte es die Zeitkonstante der schnellen Erholungszeit auf 8,5 ms. Dies legt die Überlegung nahe, dass sich das Benzocainmolekül während der Repolarisation wesentlich schneller von der Kanalstruktur löst als Lidocain. Aufgrund dieser Experimente scheint sich der „use-dependent“ Block des Lidocains bei repetitiven Impulsen aus dem verstärkten Block während der Aktivierungsphase, der hier als dynamischer Block bezeichnet wird, und einer langsamen Dissoziation des Lidocainmoleküls vom Natriumkanal während der Repolarisation zusammensetzen.

3.5 Inaktivierungs-reduzierter Natriumkanal

Um zu erfahren, in welchem Maß die Inaktivierung an der erhöhten Lidocain-Affinität während der Depolarisationsphase beteiligt ist, wurden Experimente an Zellen durchgeführt, deren schnelle Inaktivierung teilweise entfernt wurde. Dies geschah durch Applikation von Chloramin T über die Patchpipette an die Zellinnenseite. Chloramin T ist ein mildes Oxidans, welches an der Zellmembran insbesondere schwefelhaltige Aminosäuren oxidiert. In diesem Fall von besonderem Interesse ist dabei die schwefelhaltige Aminosäure Methionin als Bestandteil des in Kapitel 1.4 beschriebenen IFM-Tripeptid. Chloramin T vermindert also die Inaktivierung, indem es diesen Aminosäurepartikel so modifiziert, daß dieser die Kanalpore nicht mehr von intrazellulär verschließen kann. Das Impulsprotokoll entspricht dem Protokoll zur Untersuchung des „use-dependent“ Blockes mit einem hyperpolarisierenden Vorimpuls auf -110 mV und folgenden Testimpulsen nach -10 mV jeweils für 50 ms. Das Haltepotential lag bei -90 mV und es wurden Impulsserien von zehn Impulsen mit einer Frequenz von zwei Hertz verwendet. Der relative Strom für die Konzentrations-Wirkungskurven wurde aus dem Mittelwert der letzten 10 ms einer jeden Registrierung ermittelt. Die Auswirkungen von Chloramin T sind in Abbildung 15 deutlich zu erkennen. In Kontrolle erkennt man die unvollständige Inaktivierung mit einem erhaltenen Reststrom nach dem Spitzenstrom bis zum Ende des Impulses.

Bei Zugabe von Lidocain sind zwei Effekte auf die nicht inaktivierende Komponente des Natriumstroms auffällig. Zum einen wird der Reststrom bereits durch niedrige Lidocainkonzentrationen blockiert, zum anderen ist nur noch ein sehr geringer „use-

dependent“ Block erkennbar. Auch in den Experimenten mit Benzocain ist eine deutlich erhöhte Affinität zu den nicht-inaktivierenden Kanälen zu beobachten.

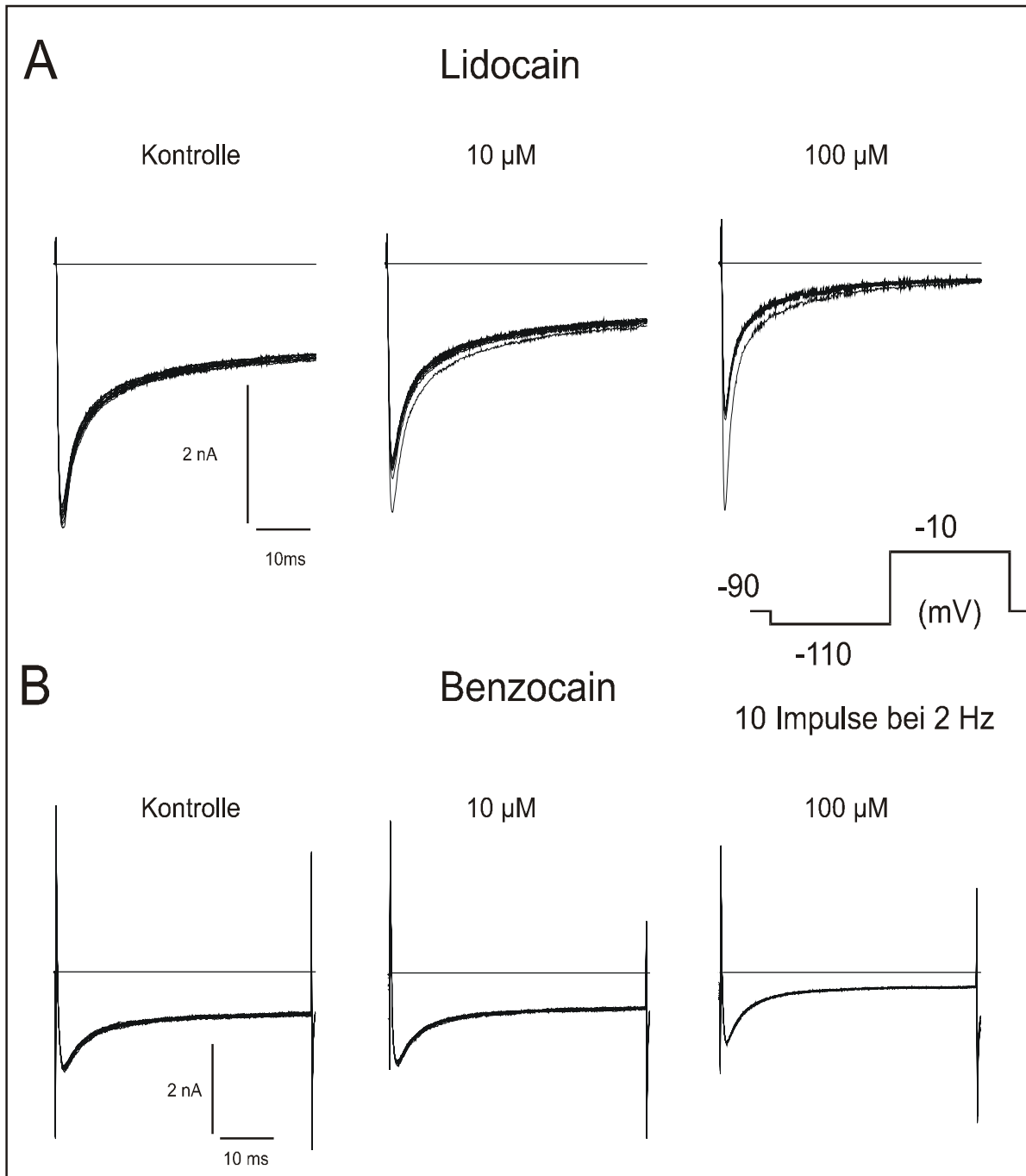


Abb. 15: Inaktivierungs-reduzierte Natriumströme. Originalregistrierungen in Kontrolle und Lidocain (A) bzw. Kontrolle und Benzocain (B). Die reduzierte Inaktivierung resultiert aus der Applikation von 1 mg/ml Chloramin T in der CsF-Innenlösung.

3.6 Konzentrations-Wirkungskurven

Zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven wurden die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50}) der beiden Substanzen ermittelt (s. Abb. 16). Berechnet wurden diese Konzentrationen nach der Hill-Gleichung.

Gleichung 7

$$f(c) = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{c}\right)^p}$$

IC_{50} = halbmaximale Blockierungskonzentration
 c = Konzentration
 p = Hill-Koeffizient

Dabei beschreibt der Hill-Koeffizient die Steilheit der Kurve und somit wieviel Moleküle einer Substanz mindestens mit einem Kanal interagieren. Würde ein Molekül ausreichen um einen Kanal zu blockieren, wäre der Hill-Koeffizient $p = 1$. Es wurden Konzentrations-Wirkungskurven für Lidocain und Benzocain für den tonischen und den „use-dependent“ Block des Spitzenstroms ermittelt. Ebenfalls wurden beide Blocktypen für den nicht-inaktivierenden Reststrom nach Applikation von Chloramin T dargestellt (s. Abb. 15). Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen sind in Tabelle 1 dargestellt.

	Spitzenstrom		Nicht-inaktivierender Strom	
	IC_{50} Tonisch	IC_{50} „use-dependent“	IC_{50} tonisch	IC_{50} „use-dependent“
Lidocain	252 ±21 (n=7)	70 ±8 (n=4)	23 ±1 (n=7)	21 ±1 (n=7)
Benzocain	387 ±78 (n=4)	362 ±68 (n=4)	36 ±5 (n=4)	40 ±6 (n=4)

Tabelle 1: Halbmaximale Blockierungskonzentrationen von Lidocain und Benzocain bezogen auf den Spitzenstrom und den nicht-inaktivierenden Reststrom. Zahlenangaben in $\mu\text{mol/l} \pm$ Standardabweichung; Zahlen in Klammern nennen die Anzahl der Experimente.

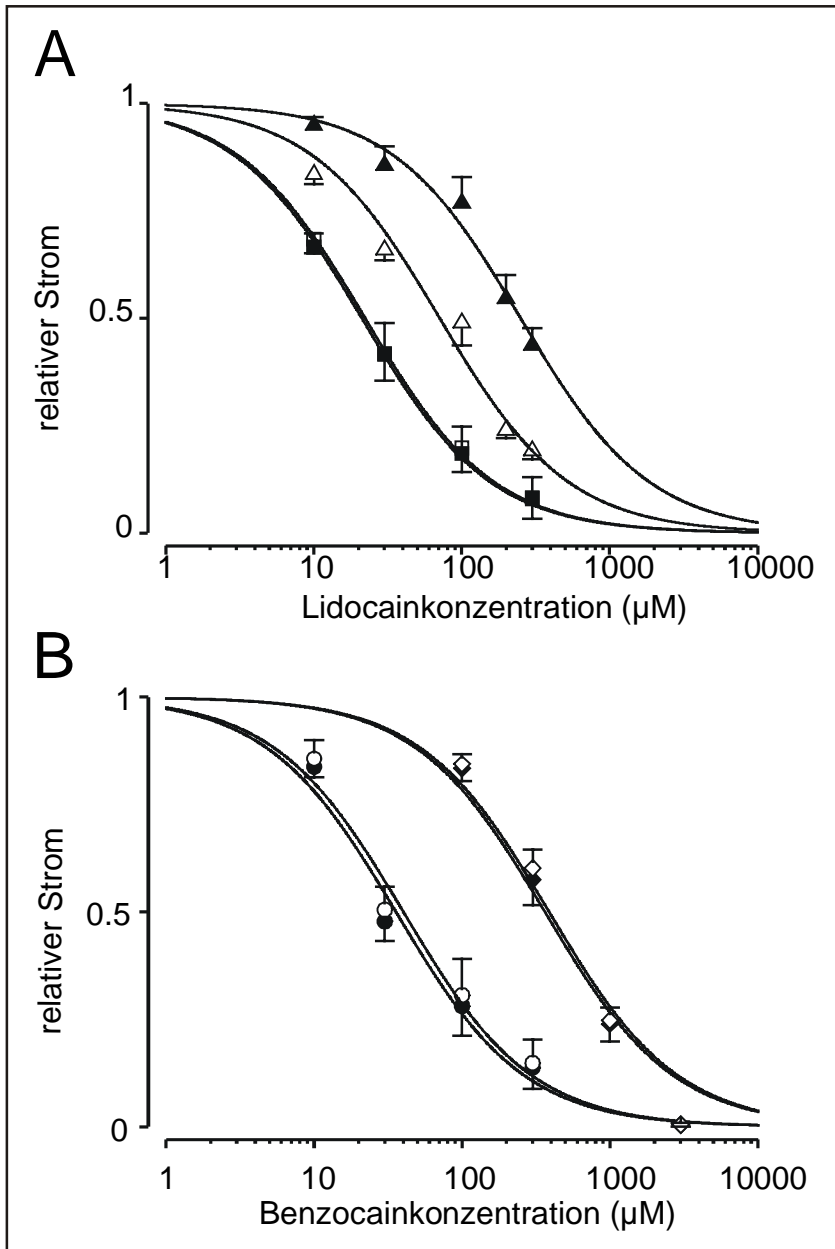


Abb. 16: Konzentrations-Wirkungskurven von Lidocain (A) und Benzocain (B).

Geschlossene Symbole stehen jeweils für den tonischen Block, offene für den „use-dependent“-Block.

A: Der Spitzenstrom (Dreiecke) in Lidocain zeigt eine deutliche Differenz zwischen den beiden Blocktypen, beim nicht-inaktivierenden Strom (Quadrate) gibt es keinen Unterschied.

B: In Benzocain zeigen sowohl der Spitzenstrom (Rauten) als auch der Reststrom (Kreise) nur geringe Unterschiede zwischen tonischem und „use-dependent“-Block.

Halbmaximale Blockierungskonzentrationen siehe Tabelle 1.

4. Diskussion

Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß TTX-resistente Natriumströme sowohl durch Lidocain als auch durch Benzocain blockiert werden. In beiden Fällen ist dies ein reversibler und konzentrationsabhängiger Effekt. Von beiden Pharmaka wird die Amplitude des Natriumstroms reduziert und der Zeitverlauf der Inaktivierung beschleunigt, was hier als “Dynamischer Block” bezeichnet wird. Zusätzlich ruft Lidocain bei einer repetitiven Stimulation einen “use-dependent” Block hervor.

4.1 Dynamischer Block

Der dynamische Block wird wesentlich von zwei Faktoren determiniert. Dies ist zum einen die Aktivierungskinetik, zum anderen die Konzentration des anwesenden Blockers. Aufgrund dieser Eigenschaften läßt sich der dynamische Block am besten als Offen-Kanal-Block erklären. Das heißt, daß das blockierende Lokalanästhetikum erst nach der Öffnung des Kanals in die Porenregion gelangen und dort an seine Bindungsstelle unterhalb des Selektivitätsfilters binden kann. Durch diese Bindung wird dann der Durchtritt von Natriumionen durch den Kanal blockiert. Wird der Natriumkanal nun durch schwache depolarisierende Potentiale aktiviert, ergibt sich eine lange Latenzzeit bis zur ersten Kanalöffnung. Daraus resultiert eine langsame Aktivierungskinetik. Da der dynamische Block ein Offen-Kanal-Block ist, bedeutet eine langsamere Öffnung des Kanalproteins eine Verlangsamung der Einstrommöglichkeit für das Lokalanästhetikum und zieht so wiederum einen langsamen dynamischen Block nach sich. Aus derselben Vorstellung heraus wird auch die Abhängigkeit der Zeitkonstante des dynamischen Blocks von der Lokalanästhetika-Konzentration deutlich. Je höher die Konzentration des Blockers, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Molekül an die Bindungsstelle des Kanals gelangen und dort seine Wirkung entfalten kann. Daraus resultiert eine Beschleunigung der Blockierungswirkung, sobald der Weg zur Bindungsstelle frei ist, beziehungsweise sich die Affinität des Rezeptors ändert.

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten kann man nicht sicher klären, worin der Grund für diese erhöhte Bindungsfähigkeit liegt. Nach den gängigen Theorien der “modulated receptor hypothesis” und der “guarded receptor hypothesis” (s. Kapitel 1.4) stehen jedoch zur Zeit zwei Erklärungsmöglichkeiten zur Auswahl. Zum einen ist dies eine erhöhte Affinität des

Lokalanästhetikums zur Bindungsstelle im Kanalprotein, zum anderen ein erleichterter Zugang in die Pore des Kanals. Davon scheint allerdings der erstere Ansatz der vielversprechendere zu sein. Die Gründe hierfür werden im folgenden erläutert.

Als Bindungsstelle für Lokalanästhetika wurden von Ragsdale und Mitarbeitern (Ragsdale et al. 1994) zwei Aminosäuren im Segment 6 der Domäne vier identifiziert. Diese Aminosäuren sind in allen bekannten Isoformen des Natriumkanals - und somit auch im TTX-resistenten - nachweisbar. Über die Positionierung dieser Sequenz in der Tertiärstruktur des Kanalproteins gibt es dagegen unterschiedliche Ansichten. Während Liu und Joho (1998) bei einem spannungsabhängigen Kaliumkanal von einer Konformationsänderung des Proteins während der Aktivierung und einer daraus folgenden Verlagerung der Bindungsstelle in das Innere der Pore ausgingen, wird in Untersuchungen der Region um den Selektivitätsfilter davon ausgegangen, daß das Segment 6 sehr fest im Protein verankert ist und sich nicht während der Aktivierung verschieben kann (Lipkind & Fozzard 2000). Die Lokalisation des Selektivitätsfilters ist sehr wahrscheinlich nahe der äußeren Öffnung des Kanals zu suchen (Lipkind & Fozzard 2000). Die Aktivierung und damit die Öffnung des Kanals zur Ermöglichung eines Durchstroms von Natriumionen wird dagegen von einem Tor gesteuert, das am dem Zellinneren zugewandten Ende des Kanals liegt. Hieraus wird deutlich, daß die Lokalisation der Lokalanästhetika-Bindungsstelle zwischen dem nach außen gewandten Selektivitätsfilter und dem nach innen gewandten Aktivierungstor liegt. Das Eindringen eines Lokalanästhetika-Moleküls ist also sowohl von außen als auch von innen behindert. Allerdings öffnet sich das Aktivierungstor nach Depolarisation und erlaubt so einen ungehinderten Zugang zur Bindungsstelle in der Pore von innen.

Im Gegensatz zur Aktivierung scheint die schnelle Inaktivierung keinen direkten Einfluß auf das Blockierungsverhalten des TTX-resistenten Natriumkanals zu haben. Im allgemeinen wird die schnelle Inaktivierung der Natriumkanäle dadurch erklärt, daß sich die intrazellulär gelegene Verbindungsschleife zwischen den Domänen III und IV des Kanalproteins mit einem Partikel, der aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM) besteht, in die Kanalpore verlagert und so den Ionenfluß verhindert (Eaholtz et al. 1994, s. Kapitel 1.5). In den Experimenten dieser Arbeit wurde die schwefelhaltige Aminosäure Methionin in diesem Tripeptid durch Chloramin T oxidiert und eine Bindung an den Kanal verhindert, da die Affinität des Partikels zum geöffneten Kanal verloren geht. Daraus resultierte eine inkomplette schnelle Inaktivierung. In den bisher klonierten TTX-resistenten Natriumkanälen der Gruppen um Wood (Akopian et al. 1996) und Hunter (Sangameswaran et al. 1996) war das IFM-Peptid ebenfalls auf der Verbindungssequenz zwischen den Domänen

III und IV vorhanden, so daß hier von einem gleichartigen Mechanismus ausgegangen werden kann. So zeigte sich auch in den Experimenten dieser Arbeit bei intrazellulärer Applikation von Chloramin T eine unvollständige schnelle Inaktivierung des TTX-resistenten Natriumstroms. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, ergibt sich eine gesteigerte Affinität des nicht-inaktivierenden Stromes für die blockierenden Substanzen. Gleichzeitig ist für diesen Teil des Stromes kein "use-dependent" Block mehr nachweisbar. Dies wird dadurch erklärbar, daß die Blockierung und somit die Affinität des Kanals schon beim ersten Impuls maximal ist und nicht durch repetitive Stimulation erhöht werden kann. Aus diesem Blickwinkel resultiert die Eigenschaft des "use-dependent" Blocks nicht daraus, daß ein inaktivierter, bezüglich blockierender Substanzen hoch-affiner Zustand entfernt wird. Vielmehr beruht dieser Effekt auf der verlängerten Verfügbarkeit eines hoch-affinen offenen Zustands.

Die Ursachen für diese unterschiedlichen Affinitäten sind dagegen noch nicht endgültig geklärt. Während der Depolarisation der Zellmembran unterliegt der Natriumkanal starken Konformationsänderungen. Diese sind als Ursache für eine erhöhte Affinität denkbar. Die schnelle Inaktivierung dagegen wird nur durch die Bindung des oben beschriebenen IFM-Tripeptids an den aktivierten Kanal geleistet. Dies bedeutet aber nur eine minimale Änderung in der Konformation und kann daher kaum die veränderten Bindungseigenschaften im Sinne einer erleichterten Bindung erklären. Diese Annahme wird auch durch molekulare Untersuchungen unterstützt. An klonierten Natriumkanälen konnte durch Lidocain keine stabilisierende Wirkung auf den inaktivierten Kanalzustand beobachtet werden. Genausowenig war ein Einfluß auf die Bindungsfähigkeit des IFM-Partikels im Sinne einer erschwerten Lösung aus der Kanalpore in Anwesenheit eines gebundenen Lidocainmoleküls sichtbar (Vedantham & Cannon 1999).

Des Weiteren kann auch die langsame Inaktivierung eine Rolle bei der erhöhten Affinität von Lokalanästhetika zum TTX-resistenten Natriumkanal eine Rolle spielen. Die langsame Inaktivierung tritt während eines lang anhaltenden depolarisierenden Impulses auf und entspricht am ehesten einer Änderung in der Struktur des Kanalproteins nach der Aktivierung als Folge der anhaltenden Depolarisation. Eine mögliche Erklärung wäre eine überschießende Aktivierung, die zu einem Verschuß der Pore an der Membranaußenseite führen könnte, wobei die durch die Aktivierung erhöhte Affinität erhalten bliebe.

4.2 Tonischer Block

Der TTX-resistente Natriumspitzenstrom wird auch bei niedrigen Stimulationsfrequenzen von hohen Lidocain- und Benzocainkonzentrationen blockiert. Dieser sogenannte tonische Block wird normalerweise auf die Blockade ruhender Natriumkanäle zurückgeführt, das heißt, daß das blockierende Lokalanästhetikamolekül ohne vorhergehende Depolarisation und somit auch ohne Aktivierung an seine Bindungsstelle in der Kanalpore gelangen kann. Da der TTX-resistente Natriumkanal jedoch über eine langsame Aktivierungskinetik verfügt, der tonische Block aber in Bezug auf den Spitzenstrom gemessen wird, kommt hier als zweite Komponente der Blockade auch noch der dynamische Block hinzu. Dies bedeutet, daß der tonische Block zum einen aus der Blockierung der Natriumkanäle in ihrem Ruhezustand, zum anderen aber auch durch die Blockierung der Kanäle durch den dynamischen Block während der Aktivierungsphase bis zum Erreichen des Spitzenstroms zustande kommt. Die echte Affinität der blockierenden Substanzen zum ruhenden TTX-resistenten Natriumkanal liegt also niedriger als die in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven angegebenen Werte, ist aber mit den für diese Arbeit verwendeten Methoden nicht messbar.

4.3 „use-dependent“ Block

Die Unterschiede im Blockierungsverhalten der beiden untersuchten Pharmaka Lidocain und Benzocain treten am deutlichsten beim „use-dependent“ Block zutage. Der Grund, warum Lidocain diesen Block, im Gegensatz zu Benzocain, hervorruft, liegt in der längeren Bindungszeit am Lokalanästhetikarezeptor des Natriumkanals. Während des ersten Impulses des hier verwendeten Protokolls wird ein bestimmter Teil der Kanäle durch den dynamischen Block blockiert. Da die Erholungszeitkonstante für den mit Lidocain blockierten Kanal bei zwei Sekunden liegt, der nächste Impuls jedoch schon nach 0,5 Sekunden folgt, sind zu diesem Zeitpunkt noch die meisten Kanäle blockiert und es werden noch nicht blockierte Kanäle mit Lidocain besetzt. Durch dieses Prinzip verstärkt sich der Block immer weiter, bis er nach wenigen Impulsen einen stabilen Zustand erreicht. Beim zehnten Impuls ist der „use-dependent“ Block dann voll ausgeprägt. Benzocain zeigt den gleichen dynamischen Block wie Lidocain. Da jedoch das Benzocainmolekül während der Repolarisationsphase sehr schnell wieder vom Kanalprotein dissoziiert, kann es nicht zur Ausbildung eines „use-dependent“ Blocks kommen.

Für die lange Bindung von Lidocain gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen wäre eine hohe Affinität der Bindungsstelle möglich. Zum anderen könnte das Lidocainmolekül in der Pore des Kanalproteins quasi gefangen werden. Die letztere Erklärung scheint dabei die vielversprechendere zu sein, da die erwartete Dissoziationszeitkonstante für Lidocain wesentlich unter den in dieser Arbeit gefundenen Werten liegt. Durch eine Überschlagsrechnung läßt sich dies verdeutlichen. Der Grad der Assoziation des Lokalanästhetikamoleküls kann mittels

Gleichung 8

$$\tau = 1 / \left(\frac{1}{\tau_{on}} - \frac{1}{\tau_{off}} \right)$$

τ	= Zeitkonstante des dynamischen Blocks
τ_{on}	= Assoziationszeitkonstante
τ_{off}	= Dissoziationszeitkonstante

aus der Zeitkonstante für den dynamischen Block berechnet werden. Vernachlässigt man die Dissoziation, so kann man als Wert für die Assoziationsrate von ungefähr 2.000.000 pro Mol pro Sekunde ausgehen. Dividiert man nun, nach dem Massenwirkungsgesetz, die Assoziationsrate durch die Dissoziationskonstante K_D , so erhält man die Dissoziationszeitkonstante. Geht man nun davon aus, daß die errechneten IC_{50} -Werte aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den nicht-inaktivierenden Teil des Natriumstroms die Dissoziationskonstante K_D des aktivierten Kanals zu den beiden Pharmaka darstellen, so errechnen sich die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation für Lidocain von 90 pro Sekunde und für Benzocain von 125 pro Sekunde. Der Reziprokwert dieser Dissoziationszeitkonstanten repräsentiert dann die Erholungszeitkonstanten und zwar 8 ms für Benzocain und 11 ms für Lidocain. Für Benzocain stimmt dieser überschlagene Wert mit den gemessenen überein, für Lidocain gibt es dagegen eine Diskrepanz, da die gemessenen Werte eine etwa 200-fach langsamere Zeitkonstante aufweisen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre ein Einfangen des Lidocainmoleküls innerhalb der Kanalpore in der Zeit zwischen den Impulsen. Der Grund, warum das Lidocainmolekül so gefangen werden kann, dies bei Benzocain jedoch nicht der Fall ist, ist wahrscheinlich im molekularen Aufbau der beiden Substanzen zu suchen. Lidocain trägt unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung an seinem terminalen Amin, Benzocain ist ungeladen. Das eigentliche Einfangen erfolgt dann durch das inaktivierende IFM-Tripeptid nach der Depolarisation des Kanals. Das neutrale Benzocain könnte den Kanal über hydrophobe Wege verlassen.

4.4 Klinische Relevanz

Die für die Therapie neuropathischer Schmerzen verwendeten Pharmaka aus der Gruppe der Natriumkanal-blockierenden Substanzen wie Lokalanästhetika, Antiarrhythmica und Anticonvulsiva wurden bisher hauptsächlich aufgrund empirischer Werte eingesetzt. Neuere Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß durch die Veränderungen des Milieus um eine geschädigte Nervenfasern im Sinne eines weniger negativen Membranpotentials und durch die repetitive Erregung, die als chronischer Schmerz wahrgenommen wird, die Empfindlichkeit der Natriumkanäle für die oben erwähnten Substanzen gesteigert wird. Auch durch systemische Applikation der oben erwähnten Substanzen können dann zur Blockade der Schmerzen ausreichende Konzentrationen erreicht werden (Bräu et al. 2001). Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen durch den Mechanismus des dynamischen Blockes einen möglichen Erklärungsansatz für dieses Phänomen dar.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Eigenschaften von Natriumkanälen untersucht. Hierbei galt das besondere Augenmerk dem TTX-resistenten Natriumkanal in peripheren sensiblen Neuronen. Insbesondere wurden die Auswirkungen zweier Lokalanästhetika (Lidocain und Benzocain) auf das Blockierungsverhalten im Sinne des tonischen und „use-dependent“ Blocks untersucht. Die Ergebnisse dienen als Grundlage für die klinische Schmerztherapie vor allem im Bereich neuropathischer Schmerzen. Für die Experimente wurden enzymatisch aufbereitete Spinalganglienzellen adulter Ratten mittels der „patch-clamp“-Technik in der „whole-cell“-Konfiguration untersucht.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß sowohl Lidocain als auch Benzocain den TTX-resistenten Natriumkanal tonisch, das heißt ohne vorhergehende Depolarisation, blockieren. Nur Lidocain zeigt zusätzlich einen „use-dependent“ Block, nämlich eine verstärkte Blockierung während repetitiver Erregungen. Die Eigenschaft des dynamischen Blockes - eine Verstärkung der Blockierungswirkung während des Erregungsablaufs - ist wiederum beiden Pharmaka zuzuordnen. Die Ursache für das unterschiedliche Blockierungsverhalten beider Substanzen liegt dabei in der längeren Bindung von Lidocain in der Kanalpore begründet.

Des Weiteren wird aus den Ergebnissen dieser Arbeit deutlich, daß der TTX-resistente Natriumkanal über zwei wesentliche Affinitätsstadien gegenüber Lokalanästhetika verfügt: einen niedrig-affinen Ruhezustand und einen hoch-affinen aktivierten Zustand. Offensichtlich modifiziert dabei der spannungsabhängige Aktivierungsprozess die Affinität des Kanals zu Natriumkanal-blockierenden Pharmaka und ist somit essentiell für einen stadienabhängigen Block. Die schnelle Inaktivierung spielt in diesem Zusammenhang und somit auch für den „use-dependent“ Block nur eine untergeordnete Rolle.

6. Literaturverzeichnis

- Akopian A.N., Sivilotti L. and Wood J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379, 257-262.
- Bräu M.E., Rush A.M. and Elliott J.R. (1995). Single channel analysis of two types of tetrodotoxin-resistant sodium channels in small cells isolated from adult rat (200-350 g) dorsal root ganglia (DRG). *J. Physiol.* 487, 184P.
- Bräu M.E., Dreimann M., Olschewski A., Vogel W. and Hempelmann G. (2001). Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons. *Anesthesiology* 94, 137-144.
- Butterworth J.F. and Strichartz G.R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* 72, 711-734.
- Caffrey J.M., Eng D.L., Black J.A., Waxman S.G., and Kocsis J.D. (1992). Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 592, 283-297.
- Catterall W.A. (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61
- Eaholtz G., Scheuer T. and Catterall W.A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12, 1041-1048.
- Elliott A.A. and Elliott J.R. (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.
- England S., Bevan S. and Docherty R.J. (1996). PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol. Lond.* 495, 429-440.
- Gasser H.S. and Erlanger J.(1929). The role of fiber size in the establishment of a nerve block by pressure or cocaine. *Am. J. Physiol.* 88, 581-591.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. and Sigworth F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* 391, 85-100.

- Harper A.A. and Lawson S.N. (1985). Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *J. Physiol.* 359, 47-63.
- Hille B. (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 69, 497-515.
- Hille B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer, S. 607
- Hondeghem L.M. and Katzung B.G. (1977). Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta* 472, 373-398.
- Illes P., Jurna I., Kaefer V., Resch K. (1996). Analgetika und Antiphlogistika. Seiten 201-225. in Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 7. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg
- Kostyuk P.G., Veselovsky N.S. and Tsyndrenko A.Y. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. *Neuroscience* 6, 2423-2430.
- Lipkind G.M. and Fozzard H.A. (2000). KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na⁺ channel pore. *Biochemistry* 39, 8161-8170.
- Liu Y. and Joho R.H. (1998). A side chain in S6 influences both open-state stability and ion permeation in a voltage-gated K⁺ channel. *Pflugers Arch.* 435, 654-661.
- Motomura H., Fujikawa S., Tashiro N., Ito Y. and Ogata, N. (1995). Single-channel analysis of two types of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglia. *Pflugers Arch.* 431, 221-229.
- Narahashi T., Moore J.W. and Scott W.R. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 47, 965-974.
- Naylor S.L., Hunter J.C., Sangameswaran L. (1997) A novel voltage-gated sodium channel in human dorsal root ganglia. *Abstracts Society for Neuroscience* 23: 908
- Neher E. and Sakmann B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Ogata N. and Tatebayashi H. (1993). Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.* 466, 9-37.

- Ragsdale D.S., McPhee J.C., Scheuer T. and Catterall W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724-1728.
- Roy M.L. and Narahashi T. (1992). Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 12, 2104-2111.
- Roy M.L., Reuveny E. and Narahashi T. (1994). Single-channel analysis of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 650, 341-346.
- Rush A.M., Elliott A.A. and Elliott J.R. (1994). Contribution of two channel populations to fast sodium currents (I_{Na}) recorded from small cells isolated from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.* 481, 44P.
- Sangameswaran L., Delgado S.G., Fish L.M., Koch B.D., Jakeman L.B., Stewart G.R., Sze P., Hunter J.C., Eglen R.M. and Herman R.C. (1996). Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 271, 5953-5956.
- Scholz A., Appel N. and Vogel W. (1998). Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2547-2556.
- Schwartz, A., Palti, Y. and 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.
- Starmer C.F., Grant A.O. and Strauss H.C. (1984). Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. *Biophys. J.* 46, 15-27.
- Tasaki I. and Hagiwara S. (1957). Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol.* 40, 859-885.
- Tate S., Benn S., Hick C., Trezise D., John V., Mannion R.J., Costigan M., Plumpton C., Grose D., Gladwell Z., Kendall G., Dale K., Bountra C. and Woolf C.J. (1998). Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nature Neurosci.* 1, 653-655.

Vedantham V. and Cannon S.C. (1999). The position of the fast-inactivation gate during lidocaine block of voltage-gated Na⁺ channels. *J. Gen. Physiol* 113, 7-16.

Villiere V. and McLachlan E.M. (1996). Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *J. Neurophysiol.* 76, 1924-1941.

Yoshida S. and Matsuda Y. (1979). Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques. *J. Neurophysiol.* 42, 1134-1145.

Yoshimura N., White G., Weight F.F. and de Groat W. (1996). Different types of Na⁺ and A-type K⁺ currents in dorsal root ganglion neurones innervating the rat urinary bladder. *J. Physiol. Lond.* 494, 1-16.

7. Lebenslauf

Name: Ludwig Martin Pullmann
Geburtsdatum: 3. Oktober 1974
Geburtsort: Frankfurt / Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schule: 1981-85 Grundschole Schlüchtern
1985-94 Ulrich-von-Hutten Gymnasium Schlüchtern
1994 Abitur

Studium: seit Oktober 1994 -: Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
August 1996: Physikum
August 1997: Erstes Staatsexamen
seit Oktober 1997: Mitarbeit im Labor Prof. Vogel im Physiologischen Institut der JLU, Gießen
September 1999: Zweites Staatsexamen
November 2000: Drittes Staatsexamen

Seit 1.5.2001 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde im Diakoniekrankenhaus Rotenburg / Wümme, seit 1.11.2002 Tätigkeit als Assistenzarzt ebendort.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. Michael E. Bräu

Für exzellente Betreuung und ein hervorragendes Arbeitsklima

Prof. Dr. Werner Vogel und allen Mitarbeitern im Labor

Für die Ermöglichung der wissenschaftlichen Tätigkeit und rat- und tatkräftige Hilfe

Marc

Für viel Spaß und eine gute Freundschaft

Meinen Eltern

Für Unterstützung meiner Ausbildung in jeglicher Hinsicht