

**Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und
Amitriptylin auf die Erregbarkeit spinaler
Hinterhornneurone der Ratte**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus–Liebig–Universität Gießen

vorgelegt von **Czorlich, Patrick**
aus Speyer

Gießen 2011

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. R. Schulz

Gutachter: Frau Prof. Dr. A. Olschewski

Gutachter: Prof. Dr. M. Kaps

Tag der Disputation: 05.03.2012

Meiner Oma Lilly

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER NOZIZEPTION, DIE ROLLE DES RÜCKENMARKS .	1
1.2 KLASSIFIZIERUNG DER SPINALEN HINTERHORNNEURONE	4
1.3 PHYSIOLOGIE DER NEURONALEN ERREGBARKEIT	6
1.4 DIE PATCH-CLAMP-TECHNIK.....	7
1.5 DIE ISOLIERUNG DES ZELLKÖRPERS (SOMA-ISOLIERUNG)	9
1.6 FRAGESTELLUNG.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 DIE PRÄPARATION DES RÜCKENMARKS	11
2.2 PIPETTEN.....	12
2.3 DER VERSUCHSSTAND	13
2.4 LÖSUNGEN	14
2.5 DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK	16
3. WIRKSTOFFE	18
3.1 CARBAMAZEPIN	18
3.2 GABAPENTIN	20
3.3 AMITRIPTYLIN.....	22
4. ERGEBNISSE.....	26
4.1 EFFEKTE VON CARBAMAZEPIN, GABAPENTIN UND AMITRIPTYLIN AUF SPANNUNGS- ABHÄNGIGE NATRIUM- UND KALIUMKANÄLE.....	26
4.1.1 WIRKUNG IM GEWEBESCHNITT	26
4.1.1.1 EFFEKTE VON CARBAMAZEPIN AUF NATRIUM- UND KALIUMKANÄLE	26
4.1.1.2 EFFEKTE VON GABAPENTIN AUF NATRIUM- UND KALIUMKANÄLE	29
4.1.1.3 EFFEKTE VON AMITRIPTYLIN AUF NATRIUM- UND KALIUMKANÄLE	30
4.1.2 UNTERSUCHUNGEN AM ISOLIERTEN SOMA.....	32
4.1.2.1 UNTERSUCHUNG DER NATRIUMSTRÖME AM ISOLIERTEN SOMA.....	33
4.1.2.2 UNTERSUCHUNG DER KALIUMSTRÖME AM ISOLIERTEN SOMA	34

4.2 WIRKUNG VON CARBAMAZEPIN, GABAPENTIN UND AMITRIPTYLIN AUF DIE ERREGBARKEIT	37
4.2.1 EFFEKTE VON CARBAMAZEPIN AUF EINZELNE AKTIONSPOTENZIALE.....	38
4.2.2 EFFEKTE VON GABAPENTIN AUF EINZELNE AKTIONSPOTENZIALE.....	40
4.2.3 EFFEKTE VON AMITRIPTYLIN AUF EINZELNE AKTIONSPOTENZIALE	41
4.3 EFFEKTE VON CARBAMAZEPIN, GABAPENTIN UND AMITRIPTYLIN AUF SERIEN VON AKTIONSPOTENZIALEN	44
5. DISKUSSION.....	47
5.1 CHRONISCHE NEUROPATHISCHE SCHMERZEN	47
5.2 WIRKUNG VON CARBAMAZEPIN, GABAPENTIN UND AMITRIPTYLIN IN DER THERAPIE CHRONISCHER SCHMERZEN	50
5.3 DIE ROLLE VON NATRIUM- UND K_{DR} -KANÄLEN AUF DIE ERREGBARKEIT VON SPINALEN HINTERHORNNEURONEN.....	52
5.4 EFFEKTE VON CARBAMAZEPIN, GABAPENTIN UND AMITRIPTYLIN AN NATRIUM- UND KALIUMKANÄLEN VON SPINALEN HINTERHORNNEURONEN	55
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	60
7. ANHANG.....	63
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	63
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	65
7.3 TABELLENVERZEICHNIS	66
7.4 GLEICHUNGSVERZEICHNIS	67
8. LITERATURVERZEICHNIS	68
PUBLIKATIONEN/ABSTRACTS	
EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	
DANKSAGUNG	

1. Einleitung und Fragestellung

Schmerzen und die damit verbundene Einschränkung der Lebensqualität stellen eine zunehmende Herausforderung in der Medizin dar. Dabei ist zu beobachten, dass die Zahl der Patienten mit neuropathischen Schmerzen stark zunimmt. In den letzten Jahren werden in der Behandlung dieser Patienten mit klassischen Analgetika, z.B. Opioiden oder nichtsteroidalen Antirheumatika, zunehmend Probleme festgestellt, wie dem fehlenden Ansprechen auf die Therapie. Dies hat dazu geführt, dass verstärkt auch Pharmaka anderer Wirkstoffgruppen zum Einsatz kommen. Solche Pharmaka werden unter anderem seit langer Zeit in der Therapie epileptischer Anfälle eingesetzt, wobei ein zusätzlicher, analgesierender Effekt beobachtet werden konnte. Mit Hilfe der Slice- und der Patch-Clamp-Technik ist die Möglichkeit gegeben, die Wirkungen verschiedenster Medikamente an Ionenkanälen spinaler Hinterhornneurone zu untersuchen und zu interpretieren, um dadurch Hinweise auf die Wirkmechanismen einzelner Wirkstoffe zu erhalten.

1.1 Anatomie und Physiologie der Nozizeption, die Rolle des Rückenmarks

Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird (International Association for the Study of Pain).

Um dieses komplexe Geschehen zu erfassen, weiterzuleiten und zu verarbeiten, werden sowohl das periphere als auch das zentrale Nervensystem beansprucht. Dieser Prozess wird als Nozizeption bezeichnet. Bei der Verarbeitung und Weiterleitung der sensorischen Informationen von der Peripherie in das Gehirn spielen spinale Hinterhornneurone des Rückenmarks eine entscheidende Rolle. Diese erhalten ihre primär afferenten Zuflüsse aus verschiedenen Organen durch unterschiedliche Typen von Rezeptoren, z.B. Thermorezeptoren, Nozizeptoren und Mechanozeptoren.

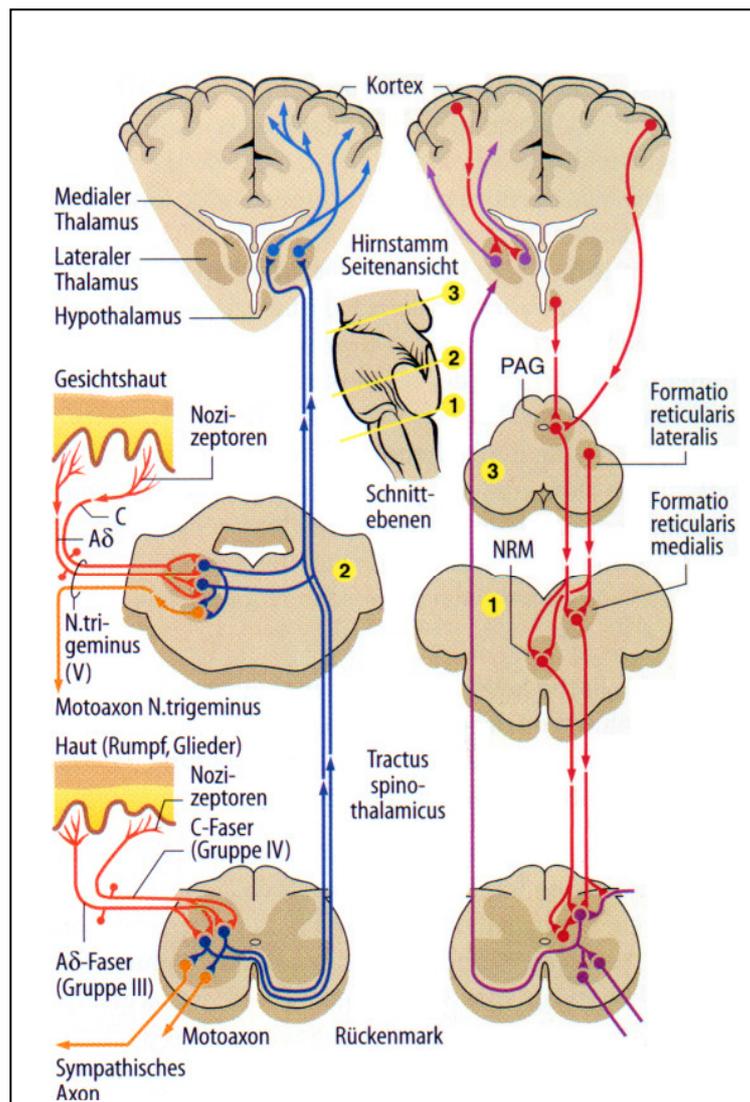


Abb. 1: Verlauf der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen und der deszendierenden modulierenden Bahnsysteme

Links: Verschiedene Typen der primär afferenten Fasern sind synaptisch mit den Hinterhornneuronen verschaltet. Diese leiten die sensorischen Informationen durch die aufsteigenden Bahnen (z. B. *Tractus spinothalamicus*) zu den höher gelegenen Hirngebieten oder durch propriospinale Verbindungen zu Inter- und Motoneuronen der Nachbarsegmente weiter. Auf dem Weg zum Thalamus vereinigen sich die Vorderseitenstrangbahnen mit weiteren nozizeptiven, weitgehend aus dem N. trigeminus stammenden Afferenzen. Vom lateralen Thalamus ausgehend führen spezifische thalamocorticale Bahnen in den somatosensorischen Kortex. Rechts sind die deszendierenden Systeme dargestellt. PAG: periaquäduktales Grau; NRM: Nucleus raphe magnus

(Aus Schmidt, Thews, Lang: Physiologie des Menschen; 28. Auflage, 2000; Olschewski, 2001)

Die Informationen der Nozizeptoren werden im Hinterhorn über Synapsen auf zentrale Neurone umgeschaltet und zu motorischen und sympathischen Reflexen verarbeitet. Hierbei sind die Hinterhornneurone zugleich die erste Schaltstelle des zentralen Nervensystems.

Die graue Substanz des Rückenmarks besteht nach Rexed (1952; 1954) aus zehn Zellschichten oder Laminae, die von I bis X nummeriert sind.

Die Laminae unterscheiden sich sowohl aufgrund der Form, Größe und Dichte der neuronalen Somata als auch der Typen von endenden primär afferenten Fasern. Dabei werden dem Hinterhorn des Rückenmarks die Laminae I-VI zugeordnet.

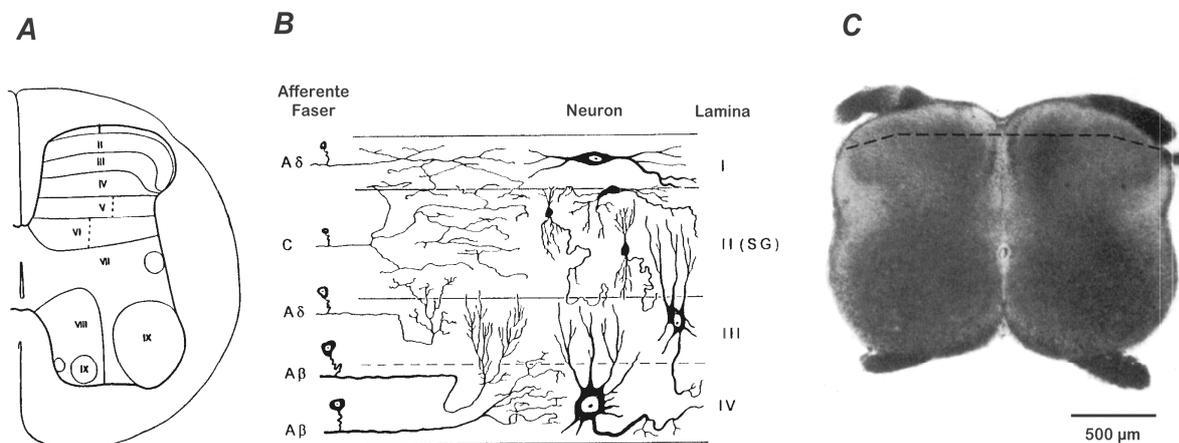


Abb. 2: Anatomie des Hinterhorns im Rückenmark

(A) Laminäre Organisation der grauen Substanz des Rückenmarks. Gezeigt ist das fünfte lumbale Segment der neugeborenen Katze (Aus Rexed, 1952). (B) Schematische Darstellung der neuronalen Organisation und des afferenten Zuflusses des oberflächlichen Hinterhorns. Lamina II entspricht der *Substantia gelatinosa* (modifiziert nach Cervero und Iggo, 1980). (C) Querschnitt aus der lumbalen Verdickung (Segmente L3-6) des Rückenmarks einer fünf Tage alten Ratte, wie er für die Patch-Clamp-Messungen an Hinterhornneuronen verwendet wurde. Die in dieser Arbeit untersuchten Neurone stammten aus den durch die gestrichelte Linie dorsal abgegrenzten Hinterhornregionen (aus Safronov *et al.*, 1999 und Olschewski, 2001).

In den Laminae I und II enden die meisten marklosen C- und dünnen markhaltigen A δ -Fasern, welche die Nozizeptoren und Thermorezeptoren innervieren. Lamina II erhält ihre Zuflüsse überwiegend durch die C-Fasern, hingegen die A δ -Fasern in die Lamina I und in die Außenbereiche von Lamina II projizieren. (Rethelyi, 1977; LaMotte, 1977;

Light und Perl, 1977; Kumazawa und Perl, 1978; Light und Perl, 1979a, b; Ralston und Ralston, 1979; Light *et al.*, 1979; Suguira *et al.*, 1986).

Die Erregung der A δ -Fasern führt zu einem hellen, gut lokalisierbaren und schnell auftretenden Schmerz, Erregung der C-Fasern zu einem dumpfen, schlecht lokalisierbaren und später einsetzenden Schmerz. Die Hinterhornneurone der tieferen Laminae III-VI erhalten ihre primär afferenten Zuflüsse überwiegend von den dickeren markhaltigen A α -, A β -, und A γ - Fasern (LaMotte, 1977; Light und Perl, 1977; Light und Perl 1979a; Grant *et al.*, 1979; Ralston und Ralston, 1982). Die Weiterleitung zum Gehirn erfolgt kontralateral über den Tractus spinothalamicus, Tractus spinoreticularis und ipsilateral über den Tractus spinocervicalis.

Insgesamt nehmen die spinalen Hinterhornneurone eine wichtige Rolle in der Verarbeitung und Weiterleitung von sensorischen Informationen ein. Dabei kann eine modulierende Hemmung und Aktivierung auf allen Rückenmarksebenen stattfinden.

1.2 Klassifizierung der spinalen Hinterhornneurone

Die spinalen Hinterhornneurone des Rückenmarks sind die erste Schaltstelle des zentralen Nervensystems. Über die im vorigen Kapitel beschriebenen Nervenfasern erhalten die Neurone Informationen aus der Peripherie, welche bereits auf dieser Ebene als Reflex beantwortet oder aber umgeschaltet dem Gehirn zugeführt werden. Die Hinterhornneurone unterscheiden sich nicht alleine durch die Zugehörigkeit zu bestimmten Laminae, ihrer Form oder ihrer Größe, sondern auch durch ihre Erregbarkeit. Durch Lopez-Garcia und King (1994) konnten vier Zellgruppen definiert werden, welche sich durch ihre Antworten auf die direkte Reizung mit einer intrazellulären Elektrode unterschieden. Die Neurone der drei Gruppen A, A-B und B ähneln sehr der Einteilung nach Thomson *et al.* (1989) in die Kategorien-1, 2 und 3. Durch Membranhypolarisation mittels Injektion eines negativen Stromimpulses zeigten Neurone der vierten Gruppe C eine ausgeprägte anormale Gleichrichtung, welche sich nach Ausschalten des Impulses als sogenanntes Rebound-Aktionspotenzial darstellte. Auf eine Dauerdepolarisation antworteten die Gruppe-C-Neurone mit

Aktionspotenzialen, wiesen dafür aber eine stärkere Frequenzadaptation auf als Gruppe-A-Neurone.

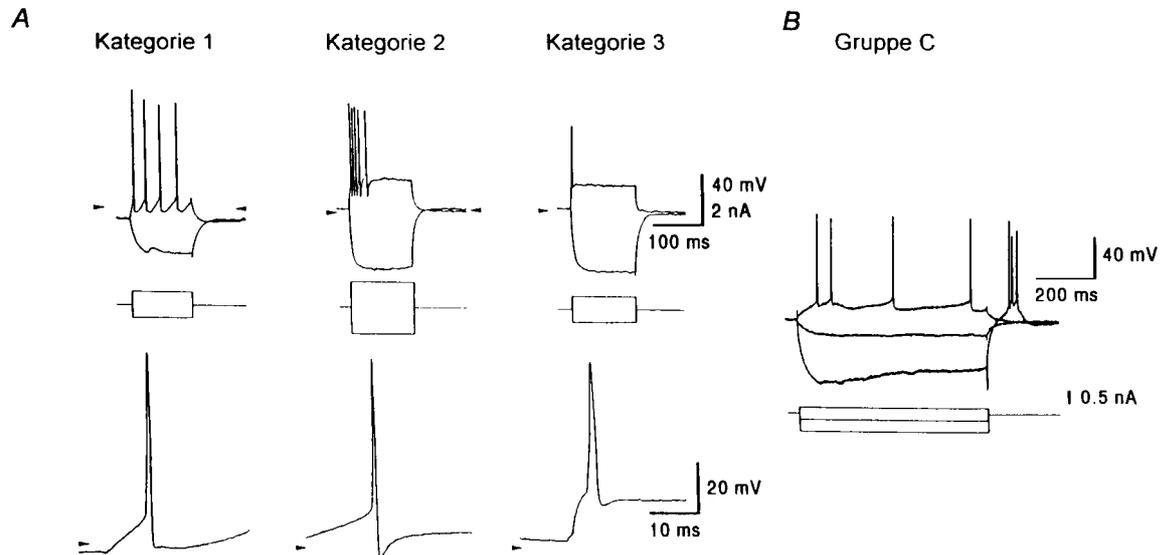


Abb. 3: Charakterisierung von vier Typen der Hinterhornneurone aufgrund der Muster ihrer Auslösung von Aktionspotenzialserien. Oben: Antworten der Kategorie-1-, 2- und 3-Neurone auf die dauernde De- und Hyperpolarisation. In allen Registrierungen markieren die kleinen Pfeile das Membranpotenzial von -75 mV. (aus Thomson *et al.*, 1989). (B) Antworten eines Gruppe-C-Neurons auf die dauernde De- und Hyperpolarisation. Während des Experiments wurde das Membranpotenzial bei -76 mV gehalten (Aus Lopez-Garcia und King, 1994 und Olschewski, 2001).

In Untersuchungen von Thomson *et al.* (1989) an den oberflächlichen Laminae I und II konnten keine Neurone der Gruppe-C identifiziert werden. Daraus könnte geschlossen werden, dass Gruppe-C-Neurone in den tieferen Laminae zu finden sind. Denn bei Experimenten von Lopez-Garcia und King (1994), die sowohl an oberflächlichen als auch an tieferen Hinterhornneuronen durchgeführt wurden, konnten Gruppe-C-Neurone gefunden werden. Allerdings muss beachtet werden, dass Thomson *et al.* (1989) die Gruppe-C-Neurone fälschlicherweise den Kategorie-1-Neuronen zuordnete.

Lopez-Garcia und King (1994) konnten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Erregbarkeit eines Hinterhornneurons und dessen afferenten Zufluss aufzeigen. Bei der Reizung, sowohl mit niederschwelligen (schmerzlosen) als auch mit hochschwelligen (schmerzhaften) Reizen, antworteten die Neurone mit der Generierung von Aktionspotenzialen. Neurone, bei denen die Anzahl der Aktionspotenziale mit der

Reizstärke zunahm, sogenannte Wide-Dynamic-Range-Neurone, gehörten überwiegend zur Gruppe A (Kategorie-1). Die Neurone, welche auf schmerzlose und schmerzhafte Reize die gleiche Anzahl von Aktionspotenzialen ausgelöst haben (Low-Threshold-Neurone), wurden entweder der Gruppe-A oder -A-B (Kategorien-1 und -2) zugeordnet. Nociceptive-Specific-Neurone, die nur auf schmerzhafte Reizung Aktionspotenziale generierten, gehörten überwiegend zu der Gruppe-A-B (Kategorie-2). Eine Stimulation der kutanen Rezeptoren führte hingegen an den meisten Gruppe-C-Neuronen zur synaptischen Hemmung und zur Verminderung ihrer spontanen Aktionspotenzialfrequenz.

1.3 Physiologie der neuronalen Erregbarkeit

Die neuronale Erregbarkeit stellt die eigentliche Grundlage für die Übermittlung von Informationen durch Nervenzellen dar. Entlang der Zellmembran von Axonen wird die Erregung schnell fortgeleitet. Basis für diesen Mechanismus ist die zeitliche und örtliche Spannungsänderung der Zellmembran. Das Ruhemembranpotenzial einer Nervenzelle liegt zwischen -70 mV und -90 mV. Es setzt sich zusammen aus dem Natrium- ($+61$ mV) und dem Kalium- ($-86,8$ mV) Gleichgewichtspotenzial. Obwohl es sich um ein Mischpotenzial handelt, wird es doch weitgehend als Kalium-Gleichgewichtspotenzial beschrieben. Durch die 1888 von Nernst (Pschyrembel, 1998) aufgestellte Gleichung lässt sich das Gleichgewichtspotenzial wie folgt errechnen:

Gleichung 1:

$$E_K = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} * \ln \frac{[K]_{\text{außen}}}{[K]_{\text{innen}}}$$

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

T = Temperatur in Kelvin (hier: 296 K)

z = Wertigkeit des Ions (für Kalium und Natrium gleich 1)

F = Faraday-Konstante ($9,648 * 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

[K] = Konzentration von K^+ an der Innen bzw. Außenseite der Membran

Wird ein Neuron durch einen äußeren Einfluss, z.B. einen Reiz, stimuliert, führt dies zu einer Depolarisation, das Potenzial wird in positiver Richtung ausgelenkt. Sobald ein bestimmtes Membranpotenzial (Schwelle) überschritten wird, kommt es zur Aktivierung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen. Bei diesem Vorgang kann die Natriumleitfähigkeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtspotenzials für Natriumionen zunehmen. Durch zunehmende Aktivität der potenzialabhängigen Kaliumkanäle sowie durch ein spontanes Schließen der Natriumkanäle, auch als Inaktivierung bezeichnet, nimmt das Membranpotenzial rasch wieder ab. Das Ruhemembranpotenzial stellt sich auf seinen ursprünglichen Wert ein. Diese Potentialumkehr wird als Aktionspotenzial bezeichnet. Über die Impulskodierung, d.h. die Frequenz, mit der Aktionspotenziale ausgelöst werden, erhält man Informationen über die Stärke des Reizes. Ein einzelnes Aktionspotenzial ist bereits in der Lage Membranen in der Nachbarschaft, entlang der Ausläufer von Nervenzellen, besonders der Axone, zu depolarisieren, ohne dabei Form und Amplitude wesentlich zu verändern. Trifft ein Aktionspotenzial auf eine Nervenendigung werden Transmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, die über Rezeptoren an der subsynaptischen Membran Änderungen im Membranpotenzial auslösen. Somit kann die elektrische Erregung (Information) an das nächste Neuron weitergegeben werden.

1.4 Die Patch-Clamp-Technik

Alle Experimente und Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beruhen auf der Methode der Patch-Clamp-Technik oder auch Membranflechklemme genannt. Diese Methode wurde 1976 erstmals von Neher und Sakmann beschrieben und von Hamill *et al.* (1981) weiter modifiziert. Seit dieser Zeit ist das „Patchen“ eine etablierte Methode in der Elektrophysiologie.

Das Prinzip beruht darauf, dass man eine Membran als elektrischen Schaltkreis ansehen kann und an diese Membran eine Spannungsklemme (Voltage-Clamp) anlegt. Bildlich gesehen ist hierbei das Membranpotenzial die Spannungsklemme, die Lipidschicht der Kondensator und die Poren bilden den Widerstand. Als äußere Technik benötigt man

einen in Reihe gekoppelten Strom-Spannungs-Wandler (I-V-Wandler) und einen Differenzverstärker, welcher Registrierungen von Ionenströmen bis hin zu Einzelkanalströmen ableitet. Kapazitive Ströme, welche durch Reize entstehen, können durch eine elektronische kapazitive Kompensation mit zwei verschiedenen Zeitkonstanten kompensiert werden.

Um eine Patch-Clamp-Messung durchzuführen, wird eine polierte Messpipette, welche auch die Ableitelektrode darstellt und einen chlorierten Silberdraht mit Elektrolytlösung beinhaltet, unter mikroskopischer Sicht, auf die Zellmembran aufgesetzt. Beim ersten Kontakt entsteht in der Regel ein niedriger Abdichtwiderstand von 10 bis 50 Megaohm. Damit ein Gigaseal entsteht (Abdichtwiderstand 50-100 GΩ), wird auf die Messpipette ein leichter Unterdruck gegeben. Beim Erreichen des Gigaseals erfolgt dann die elektrische Isolation der unter der Pipettenspitze liegenden Membranfläche von der gesamten Zelle. Gleichzeitig wird durch einen hohen Abdichtwiderstand das Hintergrundrauschen stark verringert, wodurch eine genauere Ableitung möglich wird (Hamill *et al.*, 1981).

Das elektrische Rauschen (Johnson-Noise) wird durch nachstehende Gleichung beschrieben.

Gleichung 2:

$$\sigma^2 = 4kTf / R$$

σ^2	=	Varianz des Stromrauschens
k	=	Boltzmann-Konstante
T	=	absolute Temperatur
f	=	Bandbreite der Messung
R	=	Abdichtwiderstand

Insgesamt kann man bei der Patch-Clamp-Technik vier verschiedene Konfigurationen voneinander abgrenzen. Die erste Konfiguration wird Cell-Attached genannt und entsteht, wenn der Gigaseal erreicht wird. Sie stellt nur eine elektrische Isolation des

Membranfleckens dar, trennt diesen aber noch nicht räumlich von der gesamten Zelle. Durchbricht man nun das unter der Pipettenspitze liegende Membranstück, z.B. durch einen Unterdruckimpuls, erhält man einen elektrischen Zugang zum Zellinneren. Dadurch können Ströme der gesamten Zelle abgeleitet werden. Dieser Zustand wird allgemein als Whole-Cell-Konfiguration definiert. Zieht man nun die Pipette vorsichtig von der Zelle weg, so schließt sich das Membranstück über der Pipettenspitze zu einer kleinen Halbkugel und die äußere Membranseite zeigt nach außen (Outside-Out-Patch). Geht man wiederum vom Cell-Attached-Modus aus und zieht die Pipette weg, ohne das darunterliegende Membranstück zu durchbrechen, entsteht zum einen ein Inside-Out-Patch. Die eigentlich zytoplasmatische Seite der Membran wird jetzt von Badlösung umgeben. Zum anderen ist auch die Entstehung eines Vesikels möglich. Es handelt sich um eine Struktur eines Outside-Out-Patches mit einer kugelähnlichen Form unter der Pipettenspitze. Die Membranschicht wird entweder durch Berührung eines Gegenstandes in der Experimentierkammer oder durch eine kurze Luftexposition entfernt. In diesen vier verschiedenen Konfigurationen ist es nun möglich, das Membranpotenzial und die Lösungen auf beiden Seiten der Membran zu kontrollieren. Auch können nun sowohl makroskopische Ströme als auch Einzelkanalströme gemessen werden. In dieser Arbeit kam ausschließlich die Whole-Cell-Konfiguration zur Anwendung.

1.5 Die Isolierung des Zellkörpers (Soma-Isolierung)

Die Methode der Soma-Isolierung wurde 1997 von Safronov *et al.* erstmalig beschrieben. Vorteile der Soma-Isolierung ergeben sich daraus, dass zum einen eine freie Diffusion der Moleküle zur neuronalen Membran nicht mehr durch das umliegende Gewebe behindert wird. Somit dient die Methode als Modell für pharmakologische Untersuchungen, nach anatomischer und elektrophysiologischer Identifizierung eines intakten Neurons, an einzelnen Zellkörpern (Soma). Zum anderen dient die Soma-Isolierung als Modell für die Beschreibung der Kinetik spannungsgesteuerter Ionenkanäle dadurch, dass die räumliche Spannungsklemme

gegenüber der Registrierung im Gewebeverband verbessert wird und der Spannungsfehler infolge des Serienwiderstands vermindert wird.

Nachdem im Gewebeschnitt ein intaktes Neuron aufgrund seines Natriumstromes identifiziert wurde, erfolgte die Isolierung durch vorsichtiges Wegziehen der Messpipette. Hierdurch konnte ein unbeschädigter Zellkörper aus dem Gewebeschnitt gelöst werden und alle bzw. fast alle Ausläufer der Nervenzelle verblieben im Gewebeschnitt. Als Soma wurde eine isolierte Struktur beschrieben, welche keine sichtbaren Ausläufer behalten hatte. Besaß das Soma eine einzelne, isolierte Struktur im Sinne eines 10 bis 100 μm langen Ausläufers, so wurde es als Soma+Axon-Komplex beschrieben, wenn nicht mehr als 15 % des ursprünglichen spannungsabhängigen Natriumstroms verloren gingen, welcher am intakten Neuron unmittelbar vor der Isolierung aus dem Gewebeschnitt gemessen wurde. Als Folge einer erfolgreichen Isolierung zeigte sich eine deutliche Verminderung des Leckstroms. Die gemessenen, stabilen Ruhepotentiale konnten den weiterhin guten physiologischen Zustand des isolierten Neurons bestätigen.

1.6 Fragestellung

Bei der Therapie chronischer neuropathischer Schmerzen kommen neben Analgetika oder Opioiden mittlerweile auch routinemäßig andere Wirkstoffe wie Amitriptylin, Carbamazepin und Gabapentin zum Einsatz. Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik, die Empfindlichkeit wichtiger Ionenkanäle, spannungsabhängiger Natriumkanäle (Na^+), schnell inaktivierender Kaliumkanäle (K_A) und verzögert aktivierender Kaliumkanäle (K_{DR}) gegenüber den Testsubstanzen und ihre Auswirkungen auf die Erregbarkeit spinaler Hinterhornneurone des Rückenmarks zu bestimmen.

2. Material und Methoden

2.1 Die Präparation des Rückenmarks

Die in den Experimenten untersuchten Hinterhornneurone stammen ausschließlich von jungen, 2-8 Tage alten, Ratten beiderlei Geschlechts (Stamm: Wistar, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland). Die Präparation ist angelehnt an die beschriebenen Präparationen von Edwards (Edwards *et al.*, 1989), Takahashi (Takahashi, 1990), Safronov (Safronov und Vogel, 1995) und Olschewski (Olschewski *et al.*, 1998). Nach schneller Dekapitierung wurde das Rückenmark in einer mit eiskalter Präparationslösung (vgl. Seite 15) gefüllten Schale herauspräpariert. Der pH-Wert konnte durch permanente Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) konstant bei 7,40 gehalten werden. Unter mikroskopischer Sicht (Wild, Typ 355110, Heerbrugg, Schweiz) wurden anschließend am Rückenmark die Radix posterior und die Radix anterior, die Dura Mater und Arachnoidea Mater sowie die ventralen und dorsalen Blutgefäße mit einer Irisschere (Klein, Heidelberg, Deutschland) entfernt. Das präparierte Rückenmark wurde zur Abkühlung auf 38° Celsius (C) in eine 2%ige Agarlösung eingebettet, welche wiederum in eine tiefgekühlte 23%ige NaCl-Lösung bis zur vollständigen Aushärtung gestellt wurde. Aus dem entstandenen Agarblock wurden die Rückenmarkssegment L3-L6 herausgeschnitten, in Pyramidenform auf eine Plastikplatte mit Acrylcyanat (UHU, Brühl, Deutschland) geklebt und mit einem Mikro-Vibrator (VT 1000S, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 200 µm dicke Scheiben geschnitten. Die angefertigten Rückenmarksschnitte wurden in der Präparationslösung unter weiterer Carbogenbegasung bei 32° C für 30 min inkubiert. Danach wurden sie bei fortdauernder Begasung bei Zimmertemperatur (21-24° C) aufbewahrt.

Die Experimente wurden von Januar 2002 – Februar 2004 im Physiologischen Institut in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Werner Vogel / später Herrn PD Dr. med. Andres Scholz unter der Leitung von PD Dr. med. Andrea Olschewski durchgeführt. Es handelte sich dabei um Untersuchungen an einem überlebenden Organ, das nach der Tötung der Tiere entnommen wurde. Die Durchführung dieser Experimente wurde dem Regierungspräsidium Gießen als staatlicher Aufsichtsbehörde angezeigt und die Anzahl der verbrauchten Tiere jährlich gemeldet.

Die Abgrenzung zwischen Neuronen und Gliazellen erfolgte unter dem Mikroskop durch die Fähigkeit der Neurone, Aktionspotenziale zu generieren. Auch wurde unter Voltage-Clamp-Bedingungen zur Unterscheidung von Neuronen und Gliazellen die große Amplitude des spannungsabhängigen Natriumstroms gemessen. Der Grenzwert wurde hier bei 0,8 nA festgelegt (Safronov *et al.*, 1997).

2.2 Pipetten

Die in allen Experimenten verwendeten Pipetten wurden aus 75 mm langen Kapillaren aus Borosilikatglas (GC150F-7,5, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, England) mit einem inneren Filament hergestellt. Mit Hilfe eines Horizontalziehgerätes, (Sutter Instruments, Novato, USA), genannt Puller, wurden aus einer Kapillare jeweils zwei getrennte Messpipetten (Widerstand: 1,5-6 M Ω) erzeugt. Die Kapillaren wurden zuvor mit Methanol entfettet und die Enden mit der Flamme eines Bunsenbrenners poliert.

Ein stromdurchflossener Platindraht (0,127 mm Durchmesser, Ventron, Karlsruhe, Deutschland), an dem vor jedem Experiment die Pipettenspitze angenähert wurde, hat diese angeschmolzen. Mögliche Verunreinigungen und scharfe Kanten an der Pipettenspitze können durch dieses Polieren beseitigt werden (Aldrich *et al.*, 1983). Dies führt zu einer Erhöhung des Abdichtwiderstands. Die polierten Pipetten wurden soweit mit Innenlösung (vgl. Seite 15 und 16) gefüllt, bis der Elektrodendraht im Pipettenhalter gerade in die Flüssigkeit eintauchte. Als Pipettenelektrode diente ein chlorierter, dünner Silberdraht (0,5 mm Dicke, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Ein Überfüllen der Pipette kann zur Ausbildung leitender Brücken führen, welche sich negativ auf die Rauscheigenschaften auswirkt (Numberger und Draguhn, 1996).

2.3 Der Versuchsstand

Der Versuchsstand befand sich auf einem schwingungsgedämpften Messtisch, welcher von einem Faraday'schen Käfig umgeben war. Auf dem Messtisch befanden sich unter anderem das Mikroskop, die Experimentierkammer, sowie der Mikromanipulator.

Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein Axioskop FS (Zeiss, Frankfurt am Main, Deutschland). Dieses aufrechte Mikroskop besitzt zur Betrachtung ungefärbter Schnitte eine Differenzkontrast-Einrichtung (Nomanski-Optik), und ein Wasserimmersionsobjektiv (40x).

Nach Fixierung und Fokussierung des Präparates bestand zwischen dem Präparat und dem Objektiv noch genügend Arbeitsabstand um eine Pipette unter dem Objektiv bewegen zu können.

Grundlage der Experimentierkammer bildete ein aus Delrin bestehender Ring (Durchmesser: 30 mm, Dicke: 4 mm). Voraussetzung für diesen Ring ist eine hohe mechanische Stabilität bei gleichzeitiger relativ hoher Hydrophobizität, welche durch einen leichten Überzug mit Vaseline noch verstärkt werden konnte. In der Mitte des Ringes befand sich vertieft eine dünne, runde Glasscheibe. Durch diesen Aufbau der Kammer konnte ein vollständiger Austausch der Perfusionslösung, bei einem Durchlauf von 3 Milliliter pro Minute (ml/min), sichergestellt werden. Das Gesamtvolumen der Kammer betrug ca. 0,4 Milliliter (ml). Die Fixierung der Präparatschnitte in der Experimentierkammer erfolgte mit Hilfe eines Gitters (Grid). Dieser Grid bestand aus einem Platinrahmen mit quergespannten Nylonfilamenten.

Der dreiachsige Mikromanipulator HS6/2 wurde von Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland geliefert. An diesem befand sich auch der Pipettenhalter. Die Steuereinheit, Multicontrol 2000C (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland), welche die Achsen antrieb, wurde, wie das gesamte System, über einen Joystick gesteuert.

Sowohl die Mess- als auch die Badelektrode bestanden beide aus Silber. Um eine Minimierung des Offsets zu erreichen, wurden die Elektroden regelmäßig mit 1 Mol (M) Kaliumchlorid- (KCL) Lösung chloriert. Unter Offset-Potenzialen versteht man

Spannungen, die innerhalb der Messkette Silberdraht-Pipettenlösung-Badlösung-Erdung entstehen. Diese können zu Abweichungen zwischen dem angezeigten und tatsächlichen Potenzial von Zellmembran und Patch führen (Numberger und Draguhn, 1996). Um diese Problematik zu beherrschen, wurden die Elektroden vor jedem Seal abgeglichen.

Als Verstärker wurde ein Axopatch 200 B (Axon Instruments, USA) ausgewählt. Mit diesem wurden alle Strom- und Spannungsmessungen durchgeführt. Der Verstärkungsbereich lag bei 0,5-1000 mV/pA. Bei einem Brückenwiderstand von 500 M Ω und einer Frequenzbandbreite von bis zu 100 kHz, die in einem Bereich von 0,5-20 mV/pA vorgeschaltet wurden, waren Aufnahmen von Strömen bis zu 20 pA möglich.

In höheren Bereichen von 50-1000 mV/pA wurde stattdessen ein Widerstand von 50 G Ω vorgeschaltet, welcher eine Frequenzbandbreite von bis zu 50 kHz besaß. Das Anlegen von Spannungen in Form von Reizimpulsen an der Pipette war im Bereich von -200 mV bis +200 mV möglich. Die Festlegung des Pipettenwiderstandes erfolgte nach Einteilung einer Skala von 0,001 bis 0,01. Sobald ein Gigaseal erreicht wurde, wählte man höhere Skalenteile von 0,1.

2.4 Lösungen

Alle für die Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Steinheim, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Gelöst wurden alle Chemikalien in Aqua bidestilata (Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland).

Der pH-Wert der Außenlösungen wurde durch Carbogenbegasung (95% O₂, 5% CO₂) auf einen Wert von 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch der Lösungen wurden diese mit einem Papier-Porenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) gereinigt. Dies erhöhte die Sauberkeit.

Die Innenlösung wurde immer über ein vorgeseztes Filtersystem, 0,2 µm Filter (Renner, Darmstadt, Deutschland), appliziert. Durch die Zugabe von HEPES und 10,6 ml 1 N KOH wurde die Innenlösung auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt.

Lösungen für die Untersuchungen am Gewebeschnitt

Innenlösung-1 (in mM): NaCl 5; KCl 144,4; MgCl₂ 1; EGTA 3; HEPES 10
EGTA: Ethylenglycol-bis[β-Aminoethylether]
N,N,N',N'-Tetraacetat; HEPES: N-[2-Hydroxyethyl]
Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]

Außenlösungen:

Präparationslösung (in mM): NaCl 115; KCl 5,6; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; Glucose 11;
NaH₂PO₄ 1; NaHCO₃ 25

Durch die Zugabe einer niedrigen Ca²⁺- (100 µM) und einer parallel erhöhten Mg²⁺-Konzentration von insgesamt 5 mM konnte die synaptische Aktivität der Neurone unterdrückt werden. Diese modifizierte Lösung wurde Badlösung genannt:

Badlösung-1 (in mM): NaCl 115; KCl 5,6; CaCl₂ 0,1; MgCl₂ 5; Glucose 11;
NaH₂PO₄ 1 ; NaHCO₃ 25

Lösungen für die Untersuchungen an isolierten Soma

Außenlösungen

Für die selektive Registrierung des Natrium-Stroms wurde eine Tetraethylammonium-Chlorid-(TEA-Cl)-Lösung oder TEA-Lösung am isolierten Soma verwendet. TEA ist ein klassischer Blocker potenzialabhängiger Kalium-Kanäle (Tasaki und Hagiwara, 1957). TEA wirkt bereits in millimolaren Konzentrationen.

Badlösung-2 (in mM): NaCl 95; KCl 5,6; CaCl₂ 0,1; MgCl₂ 5; Glucose 11,
NaH₂PO₄ 25 und TEA 20.

Zur Registrierung der Kaliumkanäle erfolgte die Verwendung einer cholinhaltigen-Außenlösung. Aufgrund ihrer Molekulargröße gelangen Cholinionen, im Gegensatz zu Natrium-Ionen, durch Natriumkanäle in die Zelle. Zusätzlich wurden dieser Lösung 200 nM Tetrodotoxin (TTX) zur Verstärkung der Blockade der Natriumkanäle hinzugefügt.

Badlösung-3 (in mM): Cholin-Chlorid 141; KCL 0,6; CaCl₂ 0,6,; MgCl₂ 5;
 Glucose 11; HEPES 10; TTX 0,0002

Innenlösung für Registrierungen am Soma

Für die Registrierungen der Kaliumkanäle am isolierten Soma wurde die Innenlösung-2 verwendet. Der pH-Wert wurde mit 9,2 ml 1 N NaOH bei 7,3 gehalten.

Innenlösung-2 (in mM): NaCl 5; KCl 144,4; MgCl₂ 1; EGTA 3; HEPES 10

Die Natriumkanäle am isolierten Soma wurden unter Verwendung einer Cäsiumhaltigen-Innenlösung (Innenlösung 3) registriert. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,3 wurden 9,2 ml 1 N NaOH verwendet.

Innenlösung 3 (in mM): NaCl 5,8; CsCl 134; MgCl₂ 1; EGTA 3; HEPES 10

2.5 Datenverarbeitung und Statistik

Als Basiselement der Datenverarbeitung diente ein Personal Computer, welcher auch gleichzeitig als Impulsgenerator fungierte. Die Programme pClamp (Vers.:9.0) und Clampfit (Vers.:9.0.1.10) von Axon Instruments (Foster City, USA) wurden für alle Aufzeichnungen und Auswertungen verwendet. Digitalisiert wurden die Daten online mit einem 12 Bit AD/DA-Wandler (Digidata 1320A, Axon Instruments, USA). Für Natrium- und Kaliumstrommessungen betrug die Filterfrequenz 3 kHz (digitalisiert mit 10 kHz).

Die graphischen Darstellungen und die deskriptive Statistik wurden mit Origin (Vers.: 7.0273, OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA) erstellt.

In der gesamten Dissertation werden numerische Werte als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean / Standardfehler des Mittelwertes) aufgeführt. Übertraf der Standardfehler des Mittelwertes die Symbolgröße der Datenpunkte, so erfolgte die Darstellung durch symmetrische Fehlerbalken.

Die statistischen Auswertungen der durchgeführten Patch-Clamp-Untersuchungen erfolgten durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) (StatView für Windows, Version 5.0.1. SAS Institute Inc., USA). Im Anschluss wurden die linearen Kontraste mit einem Scheffé-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3. Wirkstoffe

3.1 Carbamazepin

Carbamazepin (u. a. Tegretal[®]) wurde erstmals 1959 unter dem Namen Geigy 32883 (5H-dibenz[b,f]azepin-5-carboxamid) als neuartiges Antikonvulsivum vorgestellt. Drei Jahre später konnte in einer klinischen Studie die Wirksamkeit von Geigy 32883 in der Behandlung der Trigeminalneuralgie gezeigt werden (Blom, 1962). Mittlerweile ist Carbamazepin das Mittel der Wahl in der Behandlung der Trigeminalneuralgie und wird darüber hinaus auch in der Dauertherapie bei fokalen epileptischen Anfällen und nicht einzuordnenden Grand-mal-Anfällen (z.B. Schlaf-Grand-mal) eingesetzt. Weiterhin dient es als Alternative bei Lithiumunverträglichkeit in der Therapie bipolarer affektiver Psychosen. Auch in der Schmerztherapie erweitern sich die Indikationen für Carbamazepin ständig. So wurde z.B. die Wirksamkeit bei diabetischer Neuropathie (Rull *et al.*, 1969) und Schmerzen nach Schlaganfällen (Leijon und Boivie, 1989) nachgewiesen.

Die Plasmakonzentrationen im therapeutischen Bereich liegen zwischen vier und 12 µg/ml, jedoch konnte bislang keine Korrelation zwischen dem klinischen Bild des Patienten und der Plasmakonzentration gefunden werden (Evans und Gualtieri, 1985; Petit *et al.*, 1991). Bei oraler Gabe von Carbamazepin werden die höchsten Plasmakonzentrationen ca. vier Stunden nach Einnahme gemessen (Ghose *et al.*, 1983; Riva *et al.*, 1984; 1985). Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei etwa 80-90 % für Carbamazepin in Sirup (Morselli, 1989; Gérardin *et al.*, 1990) und bei etwa 56-87 % nach Tablettengabe (Levy *et al.*, 1975). Im Plasma wird Carbamazepin hauptsächlich an Albumin und α_1 -Glycoproteine gebunden (Hooper *et al.*, 1975; Contin *et al.*, 1985). Etwa 33 % der jeweiligen Plasmakonzentration wird im Liquor erreicht. Die Ausscheidung erfolgt primär durch einen Abbau in der Leber unter Hilfe der Cytochrom P-450 Familie und ein geringer Teil wird auch unverändert über die Nieren ausgeschieden (Faigle und Feldmann, 1989).

Carbamazepin zeigt als typische Nebenwirkungen einen sedierenden Effekt, Nystagmen, Doppelbilder, Ataxien, Diarrhoe, Obstipation, Schwindel, Übelkeit und Erbrechen (Schmidt und Seldon, 1982; Gayford und Redpath, 1969; Askmark und

Wiholm, 1990). Weiter wirkt es negativ chronotrop und dromotrop und kann diverse Bradyarrhythmien bis zum kompletten atrioventrikulären Block verursachen (Kennebäck *et al.*, 1991; Kasarskis *et al.*, 1992). Bei massiver Überdosierung können auch Tachykardien beobachtet werden (Kasarskis *et al.*, 1992). Äußerst selten kann Carbamazepin auch ein Lungenödem, eine Leukopenie, sowie Leber- und Nierenschäden bzw. -funktionsstörungen verursachen. In Einzelfällen wurde auch eine Knochenmarkschädigung beobachtet (Bhattacharya *et al.*, 2009.) Eine relevante Nebenwirkung, mit einer deutlichen Ausprägung in asiatischen Populationen gegenüber Europäern, ist die Wechselwirkung zwischen HLA-B*1502 und einem Stevens-Johnson-Syndrom (Chung *et al.*, 2010).

1985 konnte durch Willow *et al.* gezeigt werden, dass Carbamazepin neben Diphenylhydantoin das einzige Antikonvulsivum ist, welches eine signifikante Blockade von Natriumkanälen im Bereich der therapeutischen Konzentrationen besitzt. Dabei zeigte sich, dass die Wirkung von Carbamazepin in einem hohen Maße spannungsabhängig ist. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde die Vermutung aufgestellt, dass einer der Hauptwirkmechanismen von Carbamazepin über die Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen stattfindet. Durch Messungen an Neuroblastomzellen konnte bei einem Haltepotenzial von -75 mV unter Anwesenheit von 20 μ M Carbamazepin eine Blockade des Natriumstroms von 35-40 % beobachtet werden. Eine Carbamazepinkonzentration von 30 μ M führte beim gleichen Haltepotenzial zu einer Blockade von 50 % (Willow *et al.*, 1985).

Weitere Untersuchungen an coronaren Schnitten von Mäusen zeigten bei einem Haltepotenzial von -100 mV und einer Carbamazepinkonzentration von 10 μ M keine signifikanten Effekte und auch eine Konzentration von 100 μ M bewirkte lediglich eine Abnahme des Natriumstroms von ca. 10 % (Kuo *et al.*, 1997). Hingegen zeigte sich schon wie bei den Experimenten von Willow *et al.* bei einem Haltepotenzial von -70 mV bei Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M eine signifikante Natriumkanalblockade. Jedoch konnten Konzentrationen von 300 μ M oder mehr keine Blockade von mehr als 30 % bewirken (Kuo *et al.*, 1997). Daraus kann man schließen, dass je negativer das Haltepotenzial und die Feuerrate des Neurons ist, desto niedriger fällt die

Natriumkanalblockade aus und im Gegensatz dazu die Natriumkanalblockade ansteigt, je höher das Haltepotenzial und die Feuerrate liegt (Kuo, 1998).

Die Bindungsstelle von Carbamazepin an neuronalen Natriumkanälen liegt sehr wahrscheinlich an der extrazellulären Seite des Kanals. Jene biomolekulare Bindung (1-zu-1-Bindungsprozess) findet bevorzugt an den schnell-inaktivierten Natriumkanälen statt (Kuo, 1998).

Diese Untersuchungen zeigen deutlich auf, dass auch eine Wirkung von Carbamazepin an neuronalen Hinterhornneuronen zu erwarten ist, was die Motivation für die Experimente an diesen Zellen darstellte.

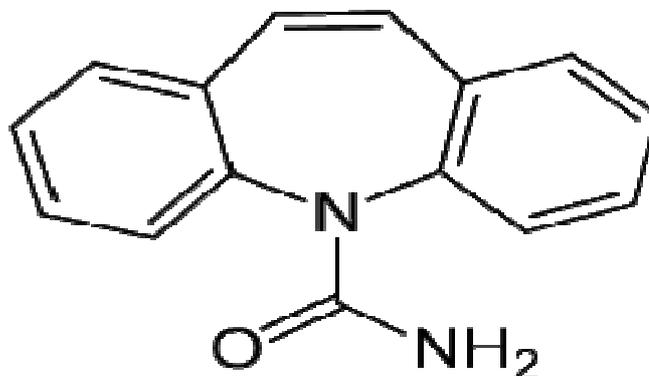


Abb. 4: Strukturformel von Carbamazepin (aus <http://de.wikipedia.org>)

3.2 Gabapentin

Gabapentin (1-(aminomethyl)-cyclohexanessigsäure), ein Strukturanaloga der γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde als Antiepileptikum der zweiten Generation 1993 durch die FDA (Food & Drug Administration) in den USA zugelassen. Seitdem wird es u. a. unter dem Handelsnamen Neurontin[®] von der Firma Pfizer vertrieben.

Im Gegensatz zu anderen Antiepileptika wird Gabapentin nur in geringem Maße an Plasmaproteine gebunden oder in der Leber verstoffwechselt. Die Eliminierung erfolgt hauptsächlich unverändert über die Nieren (Fischer *et al.*, 1994). Die Plasmahalbwertszeit schwankt zwischen 4,8 bis 8,7 Stunden (Rose und Kam, 2002). Die Plasmakonzentration wurde in verschiedenen klinischen Studien mit 2 - 15 $\mu\text{g/ml}$ angegeben (Browne, 1993; Schmidt, 1989). Im physiologischen pH-Bereich liegt

Gabapentin als Zwitterion vor und penetriert leicht durch die Blut-Hirn-Schranke (Taylor *et al.*, 1998). Als Referenzwert für die Liquoranalytik gilt in der Regel die Obergrenze von $< 20 \mu\text{g/ml}$. Grundsätzlich beträgt die Liquorkonzentration etwa 20 % der Plasmakonzentration und wird mit $0,09 - 0,14 \mu\text{g/ml}$ angegeben (Ben-Menachem *et al.*, 1992). Obwohl es als Strukturanaloga für GABA entwickelt wurde, bindet es jedoch nicht an GABA-Rezeptoren oder andere bekannte Neurotransmitterrezeptoren (Shimoyama *et al.*, 1997). Als primäre Bindungsstelle wurde die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals identifiziert, welcher nach Nervenverletzungen in sensorischen Neuronen überexprimiert wird. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte aber noch nicht eindeutig geklärt werden, ob Gabapentin an die α_2 - oder die δ -Komponente bzw. intra- oder extrazellulär bindet (Gee *et al.*, 1996, Rogawski und Löscher, 2004).

Gabapentin wird heute eingesetzt unter anderem als Zusatztherapie bei partiellen epileptischen Anfällen ohne ausreichende Kontrolle durch andere Antiepileptika und in der Schmerztherapie. Dort zeigt es sich wirksam bei postherpetischen Neuralgien (Segal und Rordorf, 1996; Rowbotham *et al.*, 1998), bei diabetischer Neuropathie (Backonja *et al.*, 1998) und bewirkt darüber hinaus eine Reduktion von Migräneattacken (Mathew, 2001).

Als häufigste Nebenwirkungen traten Somnolenz, Schwindel, eine Ataxie und eine allgemeine Abgeschlagenheit auf (Ramsay, 1995; Bourgeois, 1998; McLean *et al.*, 1999). Aber auch anxiolytische Wirkungen wurden beobachtet (Rogawski und Löscher, 2004) sowie in weniger als 1 % der Fälle Krämpfe (McLean *et al.*, 1999).

Gabapentin unterscheidet sich von anderen Antiepileptika in erster Linie dadurch, dass es keine signifikante Wirkung an Natriumkanälen hat und auch nicht zu einer Abnahme der Feuerrate von Aktionspotenzialen gekommen ist (Taylor, 1998; Rock *et al.*, 1993). Dies wurde durch Untersuchungen an dorsalen Wurzelganglienneuronen von Ratten bestätigt, denn auch dort zeigte sich keine Blockade von TTX-sensitiven Natriumkanälen in Konzentrationen bis zu 3 mM. Auch trat keine tonische oder phasische Blockade bei gleichen Konzentrationen auf (Bräu *et al.*, 2001). Weitere Experimente an Ovarialzellen von chinesischen Hamstern mit exprimierten α -Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanal wiesen auch daraufhin hin, dass Gabapentin keine direkten Einflüsse auf Natriumkanäle besitzt (Rock *et al.*, 1993). Effekte am Ruhemembranpotenzial spinaler Neurone von Mäusen konnten ebenfalls

nicht beobachtet werden (Rock *et al.*, 1993). Bei Verlängerung der Gabapentininkubation auf bis zu 48 Stunden an kultivierten spinalen Neuronen von Mäusen konnte *in vitro* eine Abnahme der Frequenz von natriumabhängigen Aktionspotenzialen erreicht werden (Wamill und McLean, 1994). Interaktionen mit GABA oder GABA-Rezeptoren, Benzodiazepinen, Glycinen oder N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA) wurden nicht gefunden (Taylor *et al.*, 1998). Weiterhin inhibiert es die monoamine Neurotransmitterfreisetzung, wahrscheinlich über Interaktion mit Calciumkanälen (Taylor *et al.*, 1998). Eine Aktivierung von Kalium-Auswärtsströmen beim Ruhemembranpotenzial an Neuronen des Hippocampus wurde beschrieben.

Durch die Tatsache das Gabapentin nicht wie andere Antiepileptika direkt an Natriumkanälen wirkt, werden von verschiedenen Autoren die Möglichkeiten diskutiert, ob es nicht auf eine andere Art und Weise bzw. über indirekte Prozesse am Natriumkanal seine Wirkung entfalte (Wamill und McLean, 1994; Shimoyama *et al.*, 1997).

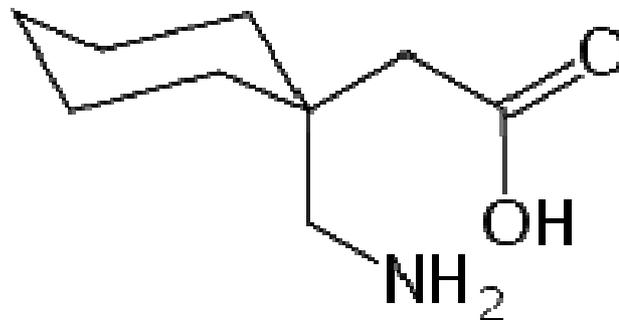


Abb. 5: Strukturformel von Gabapentin (aus <http://de.wikipedia.org>)

3.3 Amitriptylin

Amitriptylin wurde erstmals 1961 in einer klinischen Studie eingesetzt und zeigte zugleich eine signifikante Wirksamkeit als Antidepressivum (Barsa und Saunders, 1961). Seitdem wird das, pharmakologisch als auch chemisch, mit Imipramin verwandte trizyklische Antidepressivum Amitriptylin (u. a. Saroten[®]) als Standardtherapeutikum bei endogenen Depressionen eingesetzt. Besonders die lange Halbwertszeit von 9-36

Stunden führt zu einer guten Patientencompliance, da in der Regel nur eine einmalige tägliche Einnahme nötig ist (Barsa und Sauters, 1961). Die Wirksamkeit von Amitriptylin konnte in klinischen Studien u. a. bei postherpetischen Neuralgien (Watson *et al.*, 1982), diabetischer Neuropathie (Max *et al.*, 1987) und bei Polyneuropathie (Vrethem *et al.*, 1997) gezeigt werden.

Zu den Wirkmechanismen gehört eine zentrale Blockade der Wiederaufnahme von Noradrenalin, von Serotonin sowie eine Natriumkanalblockade. Als typische Nebenwirkungen wurden ein allgemeines Schwächegefühl und Schwindel beschrieben, weiterhin anticholinerge Symptome wie z.B. Mundtrockenheit, Miktionsstörungen, Obstipation, Akkomodationsstörungen, eine Steigerung des Augeninnendruckes und eine Erhöhung der Herzfrequenz. Ein feinschlägiger Tremor kann auch als Nebenwirkung beobachtet werden (Barsa und Sauters, 1961).

Eine der Bindungsstellen für Amitriptylin wurde am Skelettmuskel von Mäusen als α -Untereinheit des Natriumkanals, bestehend aus den Segmenten D1S6, D3S6 und D4S6, identifiziert. Dieser Rezeptor stimmt in großen Teilen mit dem Rezeptor für Lokalanästhetika an spannungsabhängigen Natriumkanälen überein (Nau *et al.*, 2000; Catterall und Mackie, 2001; Yarov-Yarovoy *et al.*, 2001; Yang und Kuo, 2002). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die wichtigste Bindungsstelle für Amitriptylin L1280 auf dem Segment D3S6 liegt, hingegen von Lokalanästhetika die Bindungsstelle F1579 auf dem Segment D4S6 bevorzugt wird (Wang *et al.*, 2004).

Weitere Parallelen zwischen Amitriptylin und Lokalanästhetika konnten in diversen Schmerzmodellen bei Tieren beobachtet werden. Dabei zeigte sich Amitriptylin ähnlich potent wie Lokalanästhetika und sogar potenter als Bupivacain (Gerner *et al.*, 2001, 2003). Die Wirkungen, die mit Amitriptylin erzielt wurden, sind auch vergleichbar mit den Wirkungen von lokal injizierten langwirksamen Lokalanästhetika (Gerner *et al.*, 2001, 2003; Sudoh *et al.*, 2003).

Bei intrathekaler Gabe von 90 μ l Amitriptylin in Konzentrationen von 5 und 10 μ M wurde bei 5 μ M lediglich eine kurze und schwache Blockade der Antinozizeption festgestellt. Eine intrathekale Injektion von 10 μ M Amitriptylin bewirkte eine ausgeprägtere Schmerzblockade, welche aber auch von relativ kurzer Dauer war (Gerner *et al.*, 2003). Wahrscheinlich blockiert Amitriptylin die Feuerrate von Aktionspotenzialen in Schmerzfasern stärker als die Weiterleitung von anderen

Aktionspotenzialen (Gerner *et al.*, 2003). Auch wurde bei intrathekaler Gabe von Amitriptylin die Wirkung von Morphin verstärkt (Eisenach und Gebhart, 1995).

Die therapeutische Dosis für Amitriptylin in der Behandlung von endogenen Depressionen liegt in der Regel zwischen 0,36 und 0,90 μM (orale Einnahmemenge: 25-300 mg/Tag; Baldessarini, 2001) und in der Behandlung von neuropathischen Schmerzen bei 10-300 mg/Tag (Monks und Merskey, 1984). Diese Plasmakonzentrationen sind vergleichbar mit den halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC_{50} -Werten) für die Blockade von inaktivierten und offenen Natriumkanälen (0,51 und 0,26 μM). Bei diesen Konzentrationen sollte Amitriptylin eine signifikante Blockade dieser Kanäle bewirken (Wang *et al.*, 2004). Ebenfalls sollten diese Konzentrationen für eine signifikante Blockade der offenen und inaktivierten Natriumkanäle in sensorischen Neuronen ausreichen (Lai *et al.*, 2003).

Die Potenz von Amitriptylin hängt stark vom Zustand des Kanals ab. Die Wirkung an inaktivierten Kanälen ist größer als an Kanälen im ruhenden Zustand (Bräu *et al.*, 2001). Amitriptylin zeigt an offenen und inaktivierten Kanälen eine ähnliche Affinität (Wang *et al.*, 2004).

Elektrophysiologische Experimente an Wurzelganglienneuronen konnte bei einem Haltepotenzial von -90 mV eine reversible Blockade von TTX-resistenten Natriumströmen aufzeigen. Diese Blockade ist konzentrationsabhängig und wird bei hohen Konzentrationen als nahezu vollständige Blockade angesehen (Bräu *et al.*, 2001). Bei einer Stimulation mit 2 Hz zeigte Amitriptylin eine use-dependent-Blockade. Weiterhin zeigte sich, dass die Wirkung von Amitriptylin verstärkt wurde, je positiver das Membranpotenzial war (Bräu *et al.*, 2001). Andere *in vitro* Untersuchungen zeigten bei infrequenter Stimulation ebenfalls eine Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Barber *et al.*, 1991; Nau *et al.*, 2000).

Die Wirkungen von trizyklischen Antidepressiva, wie z.B. Amitriptylin, bei chronischen und neuropathischen Schmerzen kann zum Teil also über die Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen erklärt werden (Pancrazio *et al.*, 1998; Bräu *et al.*, 2001; Sudoh *et al.*, 2003).

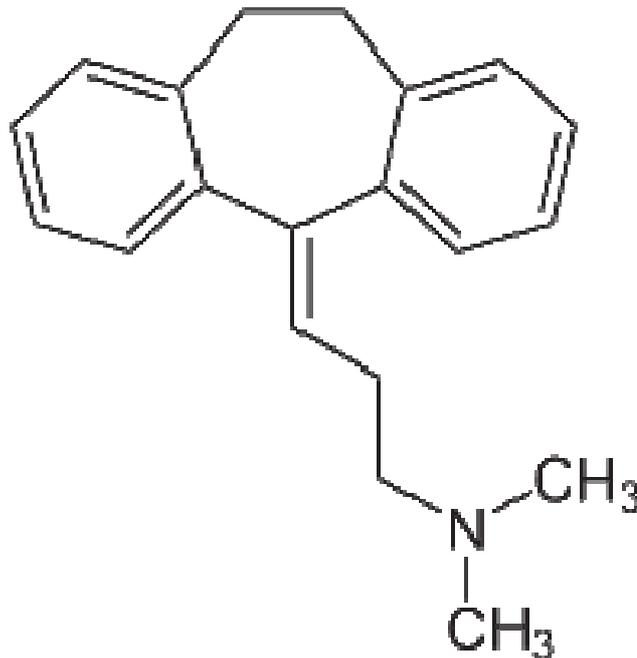


Abb. 6: Strukturformel von Amitriptylin (aus <http://de.wikipedia.org>)

Substanzname	Carbamazepin	Gabapentin	Amitriptylin
Chemische Bezeichnung	5H-dibenz[b,f]azepin-5-carboxamid	1-(aminomethyl)-cyclohexanessigsäure	3-(10,11-dihydro-5Hdibenzo[a,d]cyclohepten-5yliden-N,N-dimethylpropylamin
Beschreibung	Farbloses, weiß bis schwach gelblichweißes, kristallines Pulver	Farbloses, weißes Pulver	Weißes bis farbloses Pulver
Relatives Molekulargewicht	236, 27	171, 34	313,86
Löslichkeit	Alkohol und propyleres Glycol	Wasser	Wasser und Alkohol

Tabelle 1: Physiochemische Eigenschaften der untersuchten Substanzen

4. Ergebnisse

Die in der folgenden Arbeit dargestellten Ergebnisse nehmen Bezug auf physiologische und pharmakologische Effekte, welche Bedeutung im Rahmen der Schmerzweiterleitung und – chifferung im Bereich der Hinterhornneurone haben. Detailliert eingegangen wird auf die Wirkungen der häufig klinisch eingesetzten Wirkstoffe Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin. Bei allen drei Wirkstoffen zeigt sich eine Erregungsblockade, welche die klinische Relevanz dieser Medikamente im Bereich der chronischen Schmerztherapie zum Teil erklären könnte. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt.

In Anlehnung an die Charakterisierung der Hinterhornneurone nach Thomson et al., 1989 sowie Lopez-Garcia und King, 1994 wurden die untersuchten Neurone in drei Gruppen aufgeteilt. Die Neurone der Kategorie I nach Thompson werden nachfolgend als „tonically-firing-neuron“ (TFN), die Kategorie-II-Neurone als „adapting-firing-neuron“ (AFN) und die Neurone der Kategorie III als „single-spike-neuron“ (SSN) bezeichnet.

4.1 Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle

4.1.1 Wirkung im Gewebeschnitt

4.1.1.1 Effekte von Carbamazepin auf Natrium- und Kaliumkanäle

Die Effekte von Carbamazepin auf Natrium- und Kaliumkanäle wurden zuerst im Gewebeschnitt an Neuronen der Laminae I-III des Rückenmarks junger Ratten durchgeführt. Hierzu wurde die Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik verwendet.

Zu Beginn der Experimente wurde jeweils die Untersuchungskammer mit der Badlösung-1 perfundiert. Innenlösung-1 wurde für alle Experimente in der Whole-Cell-Konfiguration gewählt. Um eine Untersuchung sowohl von Natriumkanälen als auch

von Kaliumkanälen, hier der spannungsaktiven, schnell inaktivierenden sowie der verzögert aktivierenden Kaliumkanäle, durchzuführen, wurde eine HEPES-gepufferte Bad-Lösung verwendet. Der Nachweis von Natriumkanälen stellt einen wichtigen Schritt zur sicheren Identifizierung von Neuronen und zum Ausschluss von glialem Gewebe dar. Durch die Zugabe einer niedrigen Ca^{2+} - (100 μM) und einer parallel erhöhten Mg^{2+} -Konzentration von insgesamt 5 mM konnte die synaptische Aktivität der Neurone unterdrückt werden. Da die Calciumkanäle nicht ausschließlich calciumselektiv sind, bewirkt eine Verminderung der Calciumkonzentration eine Erhöhung des Kationenstroms durch Calciumkanäle, der wiederum eine Veränderung der Natriumstromamplitude verursachen kann. Mit Zugabe des Kalziumkanalblockers Magnesium lässt sich der spezifische und unspezifische Kationenstrom durch Kalziumkanäle einschränken und somit die Messgenauigkeit erhöhen.

Blockade der Natriumkanäle

Nach Registrierung der Ionenströme von Natriumkanälen sowie der spannungsaktiven, schnell inaktivierenden und der verzögert aktivierenden Kaliumkanäle erfolgte ein dreiminütiges Einwaschen der Carbamazepinlösung mit einer Konzentration von 50 μM . Im Anschluss hieran wurde eine neuerliche Registrierung der zuvor genannten Kanäle durchgeführt. Nach weiteren fünf Minuten erfolgte die Einwaschung der Carbamazepinlösung mit einer Konzentration von 300 μM für drei Minuten mit nachfolgender Registrierung der Ionenströme von Na^+ - sowie von K_A - und K_{DR} -Kanälen. Um die Wirkung von Carbamazepin auf Natriumkanäle zu quantifizieren, wurde der jeweilige Natriumspitzenstrom (Na^+ peak) unter Applikation von Carbamazepin in Relation gesetzt zu dem Natriumspitzenstrom in der Kontrolllösung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 (vgl. Seite 28) zusammengefasst.

Effekte von Carbamazepin auf spannungsaktive, schnell inaktivierende und verzögert aktivierende Kaliumkanäle

Parallel zu den Ableitungen der Ionenströme über den Natriumkanälen erfolgt die Ableitung der spannungsaktiven, schnell inaktivierenden sowie der verzögert aktivierenden Kaliumkanäle an nativen Schnitten des Rückenmarks in der Whole-Cell-Konfiguration. Ein Spannungssprung nach +20 mV war nach einem Vorimpuls von -120 mV (150 ms) in der Lage, sowohl K_A - als auch K_{DR} -Ströme zu aktivieren. Die Wirkung von Carbamazepin in den verschiedenen Konzentrationen (50 μM und 300 μM) auf die Kaliumkanäle wurde registriert und die Blockade in den jeweiligen Konzentrationen bestimmt. Dazu wurde für die K_A -Ströme die Reduktion des Spitzenstroms (K_A *peak*), für die K_{DR} -Ströme die Reduktion des *steady-state* Stroms am Ende des Impulses (200 ms) berechnet.

		Na^+ (%)	K_A (%)	K_{DR} (%)	n
SSN	50 μM	34,8 \pm 4,5	17,3 \pm 4,5	15,9 \pm 4,5	11
	300 μM	44,4 \pm 7,1	23,1 \pm 5,9	28,0 \pm 7,2	8
AFN	50 μM	22,9 \pm 6,5	11,7 \pm 2,2	10,0 \pm 2,1	7
	300 μM	36,6 \pm 5,6	21,5 \pm 4,6	25,8 \pm 3,3	9
TFN	50 μM	28,6 \pm 7,4	18,3 \pm 7,9	16,1 \pm 8,6	5
	300 μM	24,0 \pm 6,7	6,2 \pm 4,4	7,2 \pm 5,1	4

Tabelle 2: Relative Blockade von Ionenströmen durch Carbamazepin im Gewebe
Die Blockade der Ionenströme an Natriumkanälen, an spannungsabhängigen, schnell inaktivierenden Kaliumkanälen und verzögert aktivierenden Kaliumkanälen durch Carbamazepin wird als relative Reduzierung in Prozent (%) angegeben.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass für Carbamazepin eine Blockade der spannungsaktiven, schnell inaktivierenden Kaliumkanäle und für die verzögert aktivierenden Kaliumkanäle bei SSN besteht, dieser Effekt jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war als für die Natriumkanäle. Die Ergebnisse sind in der obigen Tabelle 2 zusammengefasst (vgl. Seite 28).

4.1.1.2 Effekte von Gabapentin auf Natrium- und Kaliumkanäle

Die Wirkungen von Gabapentin auf die Hinterhornneurone der Laminae I-III wurden analog zur Vorgehensweise der Untersuchungen mit Carbamazepin, wie zuvor in Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben, durchgeführt.

Blockade der Natrium- und Kaliumkanäle

In gleicher Vorgehensweise, wie zu den Untersuchungen der Wirkung von Carbamazepin auf die Natrium- und Kaliumkanäle von Hinterhornneuronen der Laminae I-III unter Absatz 4.1.1.1 beschrieben, erfolgten nun die Experimente mit Gabapentin. Hier konnte eine ausgeprägte Blockade der Ionenströme für Natriumkanäle bei SSN unter 1 mM Gabapentin festgestellt werden. Wiederum war die Blockade der Natriumkanäle stärker als die der Kaliumkanäle. Die nachfolgende Tabelle 3 (vgl. Seite 30) zeigt die Effekte von 100 μ M und 1 mM Gabapentin auf die entsprechenden Natrium- und Kaliumströme.

		Na ⁺ (%)	K _A (%)	K _{DR} (%)	N
SSN	100 µM	26,5 ± 4,8	13,3 ± 3,1	12,6 ± 3,7	11
	1 mM	48,2 ± 4,5	16,3 ± 4,5	17,7 ± 5,5	10
AFN	100 µM	18,5 ± 6,2	18,0 ± 3,6	15,3 ± 4,3	7
	1 mM	30,7 ± 7,9	32,8 ± 7,0	31,1 ± 7,4	5
TFN	100 µM	16,5 ± 6,5	10,3 ± 7,2	7,8 ± 3,7	5
	1 mM	29,2 ± 8,3	19,4 ± 10,4	19,1 ± 10,5	5

Tabelle 3: Relative Blockade von Ionenströmen durch Gabapentin im Gewebe

Die Blockade der Ionenströme an Natriumkanälen, an spannungsabhängigen, schnell inaktivierenden Kaliumkanälen und verzögert aktivierenden Kaliumkanälen durch Gabapentin wird als relative Reduzierung in Prozent (%) angegeben.

4.1.1.3 Effekte von Amitriptylin auf Natrium- und Kaliumkanäle

Die Wirkungen von Amitriptylin auf die Hinterhornneurone der Laminae I-III wurden ebenfalls analog zur Vorgehensweise der Untersuchungen mit Carbamazepin, wie zuvor in Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Konzentrationen, welche für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurden betragen, 1 µM sowie 5 µM.

Blockade der Natrium- und Kaliumkanäle

Die nachfolgende Tabelle 4 (vgl. Seite 31) fasst die Ergebnisse der Untersuchungen der Effekte von Amitriptylin auf die Natrium- und Kaliumkanäle dorsaler Hinterhornneurone der Laminae I-III der Ratte zusammen. Die Experimente wurden, wie bereits zuvor in Absatz 4.1.1.1 beschrieben, durchgeführt.

		Na ⁺ (%)	K _A (%)	K _{DR} (%)	N
SSN	1 μM	44,2 ± 6,1	14,5 ± 3,5	11,7 ± 4,1	7
	5 μM	50,5 ± 5,6	29,6 ± 5,4	34,6 ± 5,4	8
AFN	1 μM	22,7 ± 15,1	16,3 ± 9,0	16,0 ± 6,2	3
	5 μM	54,1 ± 7,7	45,6 ± 3,4	47,2 ± 5,4	6
TFN	1 μM	19,8 ± 5,4	3,0 ± 1,4	2,3 ± 1,1	4
	5 μM	39,0 ± 7,8	18,8 ± 2,9	25,0 ± 3,0	4

Tabelle 4: Relative Blockade von Ionenströmen durch Amitriptylin im Gewebe

Die Blockade der Ionenströme an Natriumkanälen, an spannungsabhängigen, schnell inaktivierenden Kaliumkanälen und verzögert aktivierenden Kaliumkanälen durch Amitriptylin wird als relative Reduzierung in Prozent (%) angegeben.

Amitriptylin bewirkte eine ausgeprägte Blockade sowohl der Ionenströme für Natriumkanäle als auch der spannungsaktiven, schnell inaktivierenden Kaliumkanäle für SSN und AFN. In den TFN verursachte Amitriptylin eine starke Blockade der Natriumkanäle mit einem Trend zur Blockade der Kaliumkanäle unter 5 μM.

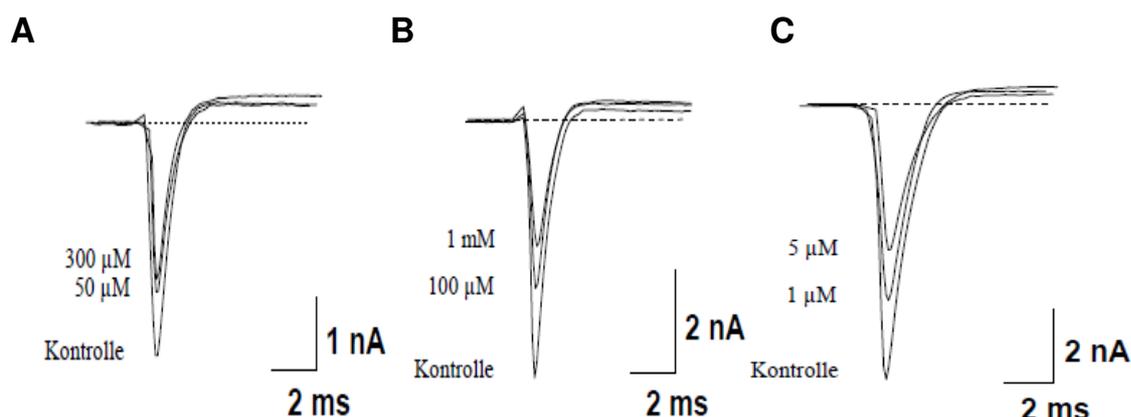


Abbildung 7: Blockade von Natriumströmen im Gewebeschnitt

Obige Abbildung zeigt die Originalregistrierung makroskopischer Natriumströme in der Whole-Cell-Konfiguration an SSN durch die Wirkstoffe Carbamazepin (A) in Konzentrationen von 50 μM und 300 μM, Gabapentin (B) in Konzentrationen von 100 μM und 1 mM sowie Amitriptylin in Konzentrationen von 1 μM und 5 μM. Das Nullniveau wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Das Impulsprotokoll sprang ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV auf -120 mV und dann auf -20 mV.

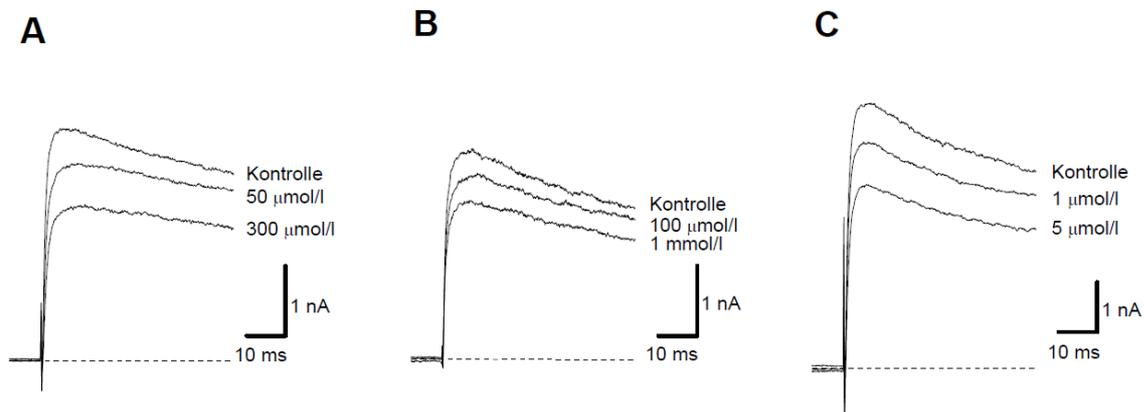


Abbildung 8: Blockade des verzögert aktivierenden Kalium-Kanals durch Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin im Gewebeschnitt

Die obige Abbildung zeigt die Originalregistrierungen makroskopischer K_{DR} -Ströme in der Whole-Cell-Konfiguration an SSN. Zur Durchführung wurden die Wirkstoffe Carbamazepin (A) in 50 μM und 100 μM , Gabapentin (B) in 100 μM und 1 mM sowie Amitriptylin (C) in 1 μM und 5 μM jeweils in steigender Dosierung appliziert. Zu jedem der Wirkstoffe ist die jeweilige Kontrolle dargestellt. Das Impulsprotokoll zeigte einen Sprung von -80 mV (Haltepotenzial) zunächst auf -60 mV und dann auf +40 mV. Die gestrichelte Linie gibt das jeweilige Nullniveau an.

4.1.2 Untersuchungen am isolierten Soma

Die Methode der Soma-Isolierung bietet den Vorteil, dass der Spannungsfehler aufgrund des Serienwiderstandes deutlich reduziert und damit die Beschreibung der Kinetik spannungsgesteuerter Ionenkanäle erheblich verbessert wird. Darüber hinaus wird die Diffusion der einzelnen Wirkstoffe in die neuronalen Strukturen optimiert.

In den weiterführenden Untersuchungen am isolierten Soma wurden die genauen IC_{50} -Werte für die Blockade von Natriumkanälen durch die Wirkstoffe Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin ermittelt. Zur Berechnung der IC_{50} -Werte wurden die einzelnen Blockierungswerte der Wirkstoffe Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin unter Annahme einer Hill-Koeffizienten von $h = 1$ (eine Interaktion zwischen einem Molekül und einem Rezeptor) angepasst.

Gleichung 3: $I/I_0 = 1 / 1 + (C / IC_{50})^h$

I = Natrium-Spitzenstrom unter Wirkstoffapplikation

I₀ = Natrium-Spitzenstrom in der Kontrolllösung

C = Konzentration des Wirkstoffes [M]

h = Hill-Koeffizient (h = 1)

IC₅₀ = halbmaximale Blockierungskonzentration [M]

Allerdings erlaubt uns die Soma-Isolierung nicht mehr zwischen single-spike-, adapting-firing- und tonically-firing-Neuronen zu unterscheiden, da mit den spezifischen Innenlösungen (vgl. Seite 16) es nicht mehr möglich ist, Aktionspotentiale abzuleiten.

4.1.2.1 Untersuchung der Natriumströme am isolierten Soma

Zunächst erfolgten die Untersuchungen zur Feststellung der IC₅₀-Werte für den Natriumstrom. Für Carbamazepin betrug der IC₅₀-Wert $156,4 \pm 16,3 \mu\text{M}$ (n=4) und für Amitriptylin $4,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (n=5). Bei den Untersuchungen mit Gabapentin (n=5) konnte mit einer maximalen Konzentration von 3 mM lediglich eine Blockade bis auf $68 \pm 6 \%$ des Ausgangswertes registriert werden. Eine Ermittlung des IC₅₀-Wertes war somit nicht möglich. Die IC₅₀-Werte für die Blockade der Natriumströme sind graphisch in der Tabelle 9 (vgl. Seite 34) dargestellt.

	IC ₅₀ -Werte
Carbamazepin	$156,4 \pm 16,3 \mu\text{M}$
Gabapentin	nicht messbar
Amitriptylin	$4,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$

Tabelle 5: IC₅₀ Werte zur Blockade der Natriumströme am isolierten Soma

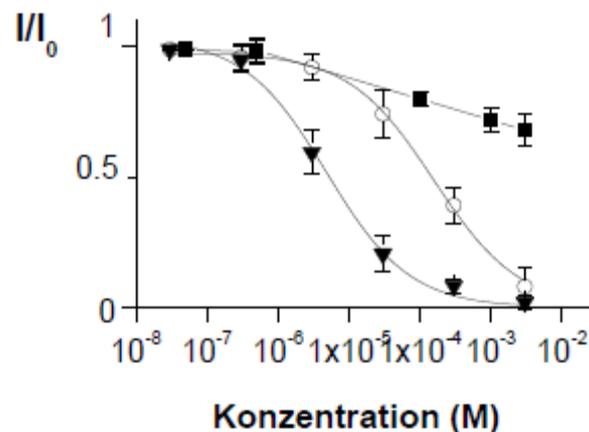


Abbildung 9: IC_{50} Werte für die Blockade der Natriumströme am isolierten Soma

Die obige Abbildung zeigt die IC_{50} -Werte zur Blockade der Natriumströme der Wirkstoffe Carbamazepin (\circ), Gabapentin (\blacksquare) und Amitriptylin (\blacktriangledown). Die Berechnung der Kurve erfolgte mittels Gleichung 3 (vgl. Seite 33). Die genauen IC_{50} -Werte sind der Tabelle 5 (vgl. Seite 33) zu entnehmen. Für Gabapentin konnte bis zu einer Dosierung von 3 mM kein IC_{50} Wert errechnet werden. Es erfolgt somit eine Darstellung der relativen Blockade.

4.1.2.2 Untersuchung der Kaliumströme am isolierten Soma

Zur Untersuchung der Kaliumströme erfolgte zunächst eine Trennung selbiger von den Natriumströmen durch die Verwendung einer natriumfreien Cholinchloridlösung (Badlösung 3, vgl. Absatz Seite 15 und 16). Als nächster Schritt wurde eine Trennung der Kaliumströme, wie von Wolff *et al.* 1998 beschrieben, durchgeführt. Zur Trennung wurde das unterschiedliche Aktivierungsverhalten der Kaliumströme ausgenutzt. Eine Darstellung der Trennung zeigt die Abbildung 10 auf der folgenden Seite 35.

Die Berechnung des schnell inaktivierenden Kaliumkanals erfolgte dann nach der Gleichung: $K_A = K^+ - K_{DR}$, wie bereits zuvor durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben (Olschewski *et al.*, 2002). Eine Beurteilung der Blockade des K_{DR} -Stroms wurde über die Abnahme des Steady-State-Stroms am Ende des Impulses berechnet. Zusätzlich erfolgte bei jeder Registrierung der Ströme die jeweilige Aufzeichnung der Korrekturimpulse. Zur Kompensation der Leck- und kapazitiven Ströme wurden diese von der Testregistrierung subtrahiert.

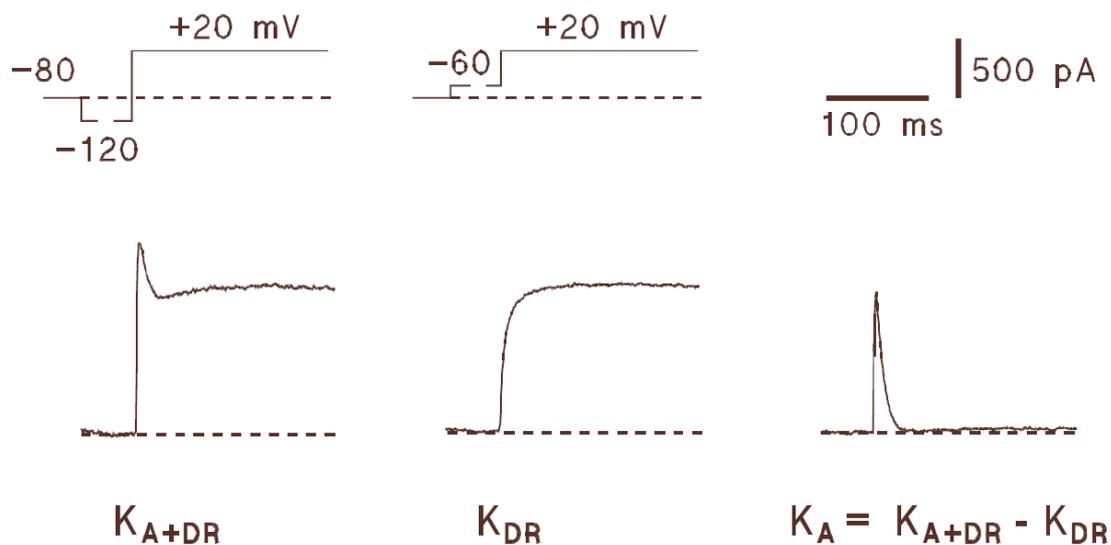


Abbildung 10: Darstellung der Trennung spannungsabhängiger Kaliumströme

Links: Darstellung des Kaliumgesamtstroms ($K_A + K_{DR}$)

Mitte: Abbildung des verzögert aktivierenden Kaliumströme (K_{DR})

Rechts: Präsentation des schnell inaktivierenden Kaliumstroms (K_A) als Differenz der beiden Ströme. Die jeweiligen Impulsprotokolle befinden sich über den entsprechenden Abbildungen (nach Olschewski *et al.*, 1998 und Schnoebel *et al.*, 2005).

Für die in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe ergaben sich folgende IC_{50} -Werte zur Blockade des verzögert aktivierenden Kaliumstroms für Carbamazepin von $607 \pm 49,3 \mu\text{M}$ ($n=4$) und für Amitriptylin von $8,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ($n=5$). Wiederum konnte für Gabapentin bei einer maximalen Dosis von 3 mM lediglich eine Blockade auf $82 \pm 4 \%$ des Ausgangswertes ermittelt werden. Eine Übersicht hierzu zeigt Tabelle 6 sowie die nachfolgende Abbildung 11 (vgl. Seite 36).

	IC_{50}-Werte
Carbamazepin	$607 \pm 49,3 \mu\text{M}$
Gabapentin	nicht messbar
Amitriptylin	$8,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$

Tabelle 6: IC_{50} Werte zur Blockade der verzögert aktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma

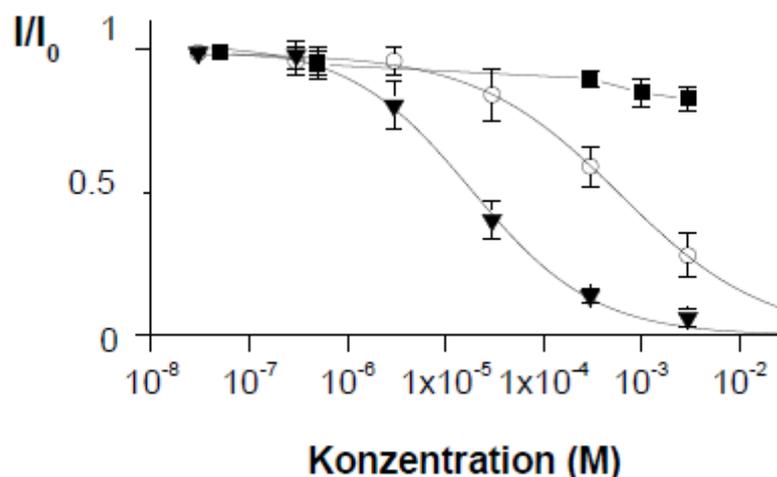


Abbildung 11: IC₅₀ Werte für die Blockade der verzögert aktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma

Die obige Abbildung zeigt die IC₅₀-Werte zur Blockade der verzögert aktivierenden Kaliumströme (K_{DR}) der Wirkstoffe Carbamazepin (○), Gabapentin (■) und Amitriptylin (▼). Die Berechnung der Kurve erfolgte mittels Gleichung 3 (vgl. Seite 33). Die genauen IC₅₀-Werte sind Tabelle 6 (vgl. Seite 35) zu entnehmen. Für Gabapentin konnte bis zu einer Dosierung von 3 mM kein IC₅₀-Wert errechnet werden. Es erfolgt somit eine Darstellung der relativen Blockade.

Darüber hinaus erfolgte die Berechnung der relativen Blockade der schnell inaktivierenden Kaliumströme am Soma. Aufgrund der nur sehr schwach ausgeprägten Blockade konnte keine Berechnung der IC₅₀-Werte in den von uns getesteten Konzentrationen errechnet werden. In der nachfolgenden Tabelle 7 sowie Abbildung 12 (vgl. Seite 37) sind die entsprechenden relativen Blockaden dargestellt.

	Amitriptylin	Carbamazepin	Gabapentin
3×10^{-7}	$0,99 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,02$
3×10^{-6}	$0,98 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,04$
3×10^{-5}	$0,94 \pm 0,06$	$0,92 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,05$
3×10^{-4}	$0,87 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,05$

Tabelle 7: Relative Blockade der schnell inaktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma

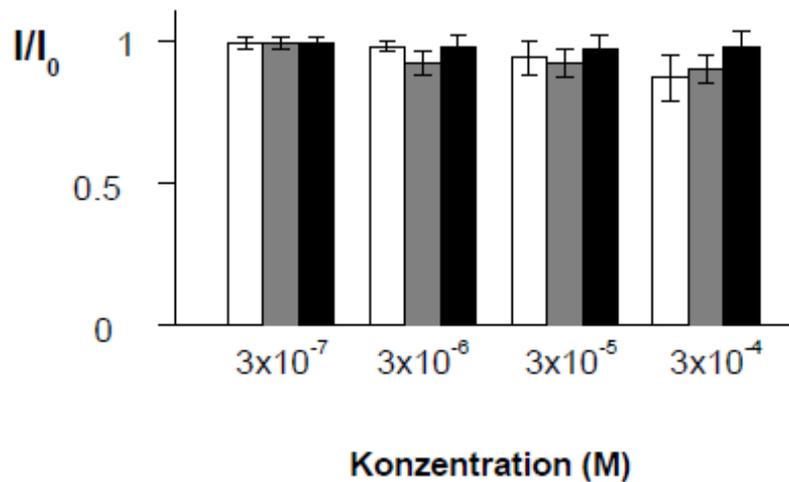


Abbildung 12: Blockade der spannungsabhängigen schnell inaktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma

Die Abbildung zeigt die relative Blockade der schnell inaktivierenden Kaliumströme durch die Wirkstoffe Carbamazepin (grauer Balken), Gabapentin (schwarzer Balken) und Amitriptylin (weißer Balken) mit dem entsprechenden SEM. Die genauen Werte sind Tabelle 7 (vgl. Seite 36) zu entnehmen.

4.2 Wirkung von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf die Erregbarkeit

Die Informationsweiterleitung und Verarbeitung sowie die Steuerung und Regulierung aller motorischen und vegetativen Funktionen des Organismus wird durch das Nervensystem ausgeführt. Dabei werden die afferenten Informationen von Hinterhornneuronen in Form von Aktionspotenzialen an die höher gelegenen Hirnregionen weitergeleitet. Von entscheidender Bedeutung sind hier die Impulskodierung und die Frequenz, mit der die Aktionspotenziale generiert werden. Diese enthält die Informationen über die Stärke des Reizes (vgl. Abbildung 1, Seite 2).

4.2.1 Effekte von Carbamazepin auf einzelne Aktionspotenziale

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde die Wirkung von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf die spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle der Hinterhornneurone untersucht. Die Änderungen der Leitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen beeinflussen wesentlich die Entstehung und Form der Aktionspotenziale. Es stellt sich aber letztlich die Frage, welche Effekte die Blockade dieser Ionenkanäle auf die Erregungsmuster der Hinterhornneurone hat. Mit den im Folgenden beschriebenen Experimenten soll der Zusammenhang zwischen der durch die Wirkstoffe Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin induzierten Kanalblockade und dem Impulsgenerierungsverhalten der Hinterhornneurone geklärt werden.

Zur Durchführung der Experimente wurden die Gewebeschnitte mit der Badlösung 1 (vgl. Seite 15) perfundiert und Carbamazepin in steigender Dosierung (50 und 300 μM) nach zuvor beschriebenem Schema (vgl. Absatz 4.1.1.1) appliziert. Alle Messungen erfolgten an intakten Neuronen der Laminae I-III in der Current-Clamp-Methode. Carbamazepin in einer Dosierung von 50 μM führte zu einer Reduktion der Amplitude des Aktionspotenzials mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ bei single-spike-Neuronen. In der höheren Dosierung von 300 μM war der Effekt deutlich ausgeprägter und es konnte eine statistische Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) $< 0,01$ demonstriert werden, ebenfalls für SSN. Parallel hierzu zeigte sich unter Applikation von 300 μM Carbamazepin eine signifikante Verbreiterung des Aktionspotenzials ($p < 0,01$) als auch eine hoch signifikante Abflachung des maximalen Anstiegs des Aktionspotenzials ($p < 0,001$) sowie eine signifikante Abnahme des Aktionspotenzials für SSN. Für adapting-firing-Neurone zeigten sich vergleichbare Effekte, jedoch mit einem niedrigeren Signifikanzniveau beim maximalen Anstieg des Aktionspotenzials ($p < 0,01$). Die statistische Analyse der Effekte von Carbamazepin auf die Amplitude bzw. Repolarisation des Aktionspotenzials ist in Tabelle 8 (vgl. Seite 39) zusammengefasst.

		AP-Höhe (mV)	AP-Breite HH (ms)	Max. positiver Anstieg (Vs^{-1})	Max. negativer Abfall (Vs^{-1})	N
SSN	Kontrolle	18,55 ± 2,18	2,61 ± 0,29	74,9 ± 10,9	- 40,8 ± 5,33	10
	50 µM	12,65 ± 1,81 *	2,97 ± 0,26	47,1 ± 7,42 *	-31,4 ± 3,72	
	Kontrolle	24,0 ± 2,49	2,83 ± 0,17	81,5 ± 8,48	-40,63 ± 3,94	8
	300 µM	12,0 ± 3,16**	4,26 ± 0,36**	39,13 ± 6,72***	-24,0 ± 3,25**	
AFN	Kontrolle	33,43 ± 2,35	2,23 ± 0,2	126,71 ± 13,07	- 55 ± 5,77	7
	50 µM	29,57 ± 2,97	2,33 ± 0,16	104,29 ± 12,17	- 49,71 ± 4,82	
	Kontrolle	33,11 ± 1,93	2,30 ± 0,14	119,22 ± 8,72	-52,33 ± 4,15	9
	300 µM	21,9 ± 3,12**	3,02 ± 0,24**	73,44 ± 11,55**	-37,67 ± 4,77*	
TFN	Kontrolle	33,2 ± 2,06	2,6 ± 0,34	107,6 ± 15,77	-47,8 ± 6,82	5
	50 µM	27,4 ± 2,98	2,94 ± 0,54	97,0 ± 19,53	-42,6 ± 7,63	
	Kontrolle	34,5 ± 2,06	2,4 ± 0,36	118,25 ± 15,01	-51,25 ± 7,60	4
	300 µM	24,5 ± 4,11**	2,63 ± 0,36	91,25 ± 16,54	-41,25 ± 4,78	

Tabelle 8: Effekte von Carbamazepin auf Einzel-Aktionspotenziale

Die Dauer der Aktionspotenziale wurde auf der Hälfte der maximalen Höhe des Aktionspotenziales gemessen. Der positive und negative Anstieg bzw. Abfall sind die Maximalwerte gemessen während des Anstiegs bzw. Abfalls des Aktionspotenzials. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird angegeben mit $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***).

4.2.2 Effekte von Gabapentin auf einzelne Aktionspotenziale

Nach dem gleichen Schema wie für Carbamazepin (vgl. Absatz 4.2.1, Seite 38) erfolgte die Untersuchung der Effekte von Gabapentin auf einzelne Aktionspotenziale. Hierfür wurden Konzentrationen von 100 μM und 1 mM verwendet. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Untersuchungen mit Carbamazepin zeigte sich bei Gabapentin lediglich eine Wirkung unter einer Konzentration von 1mM auf single-spike-Neurone.

		AP-Höhe (mV)	AP-Breite HH (ms)	Max. positiver Anstieg (Vs^{-1})	Max. negativer Abfall (Vs^{-1})	N
SSN	Kontrolle	26,64 \pm 2,96	3,32 \pm 0,32	79,73 \pm 9,53	-36,18 \pm 3,98	11
	100 μM	23,45 \pm 2,98	3,53 \pm 0,36	65,18 \pm 8,49	-33,55 \pm 4,05	
	Kontrolle	21,1 \pm 1,49	3,51 \pm 0,31	61,2 \pm 4,87	-31,8 \pm 2,41	10
	1 mM	14,1 \pm 1,89**	4,2 \pm 0,3	39,5 \pm 4,34*	-23,0 \pm 2,17**	
AFN	Kontrolle	35,71 \pm 2,47	2,83 \pm 0,36	101,29 \pm 7,33	-47,29 \pm 6,61	7
	100 μM	34,71 \pm 3,94	2,9 \pm 0,3	93,57 \pm 7,67	-46,86 \pm 6,47	
	Kontrolle	34,25 \pm 2,81	2,45 \pm 0,19	105,5 \pm 6,46	-47,5 \pm 3,4	4
	1mM	27,0 \pm 5,55	2,7 \pm 0,1	77,25 \pm 12,02*	-40,75 \pm 2,93	
TFN	Kontrolle	40,4 \pm 3,22	2,22 \pm 0,18	125,2 \pm 11,49	-60,0 \pm 5,06	5
	100 μM	36,0 \pm 4,53	2,34 \pm 0,26	111,2 \pm 14,36	-56,6 \pm 6,81	
	Kontrolle	40,4 \pm 3,22	2,22 \pm 0,18	125,2 \pm 11,49	-60,0 \pm 5,06	5
	1 mM	31,8 \pm 5,94	2,62 \pm 0,50	96,0 \pm 18,08	-53,4 \pm 9,44	

Tabelle 9: Effekte von Gabapentin auf Einzel-Aktionspotenziale

Die Dauer der Aktionspotenziale wurde auf der Hälfte der maximalen Höhe des Aktionspotenzials gemessen. Der positive und negative Anstieg bzw. Abfall sind die Maximalwerte gemessen während des Anstiegs bzw. Abfalls des Aktionspotenzials. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird angegeben mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**).

4.2.3 Effekte von Amitriptylin auf einzelne Aktionspotenziale

Im Gegensatz zu Carbamazepin und Gabapentin zeigte sich bei Amitriptylin bereits in der klinisch relevanten Dosierung von 5 μM ein deutlicher Effekt auf die Generierung von Aktionspotenzialen bei allen drei Gruppen von Neuronen, single-spike-Neurone, adapting-firing-Neurone und tonically-firing-Neurone. Die Ergebnisse hierzu finden sich in der nachfolgenden Tabelle 10.

		AP-Höhe (mV)	AP-Breite HH (ms)	Max. positiver Anstieg (Vs^{-1})	Max. negativer Abfall (Vs^{-1})	N
SSN	Kontrolle	25,0 \pm 4,27	4,04 \pm 0,51	66,71 \pm 11,45	-31,43 \pm 4,82	7
	1 μM	17,0 \pm 4,14	4,76 \pm 0,5	43,57 \pm 8,80	-23,29 \pm 3,75	
	Kontrolle	27,2 \pm 2,51	3,77 \pm 0,34	68,33 \pm 6,87	-31,83 \pm 3,45	6
	5 μM	17,0 \pm 3,34*	5,57 \pm 0,53**	36,83 \pm 7,16**	-18,7 \pm 3,64*	
AFN	Kontrolle	31,0 \pm 3,41	2,3 \pm 0,39	106,0 \pm 8,2	-48,0 \pm 4,07	5
	1 μM	28,0 \pm 3,73	2,54 \pm 0,46	97, 0 \pm 4,36	-41,2 \pm 2,94	
	Kontrolle	33,3 \pm 3,63	2,15 \pm 0,35	115,17 \pm 11,35	-56,0 \pm 8,66	6
	5 μM	17,2 \pm 4,54**	3,63 \pm 0,81	53,67 \pm 10,54**	-28,83 \pm 5,48*	
TFN	Kontrolle	44,0 \pm 1,87	2,35 \pm 0,15	144,5 \pm 7,35	-55,0 \pm 2,2	4
	1 μM	42,0 \pm 2,27	2,8 \pm 0,19	123,5 \pm 5,19	-50,25 \pm 4,33	
	Kontrolle	44,0 \pm 1,87	2,35 \pm 0,15	144,5 \pm 7,35	-55,0 \pm 2,2	4
	5 μM	35,8 \pm 3,07*	3,1 \pm 0,21*	92,5 \pm 7,96**	-39,0 \pm 4,32**	

Tabelle 10: Effekte von Amitriptylin auf Einzel-Aktionspotenziale

Die Dauer der Aktionspotenziale wurde auf der Hälfte der maximalen Höhe des Aktionspotenzials gemessen. Der positive und negative Anstieg bzw. Abfall sind die Maximalwerte gemessen während des Anstiegs bzw. Abfalls des Aktionspotenzials. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird angegeben mit $p < 0.05$ (*) und $p < 0.01$ (**).

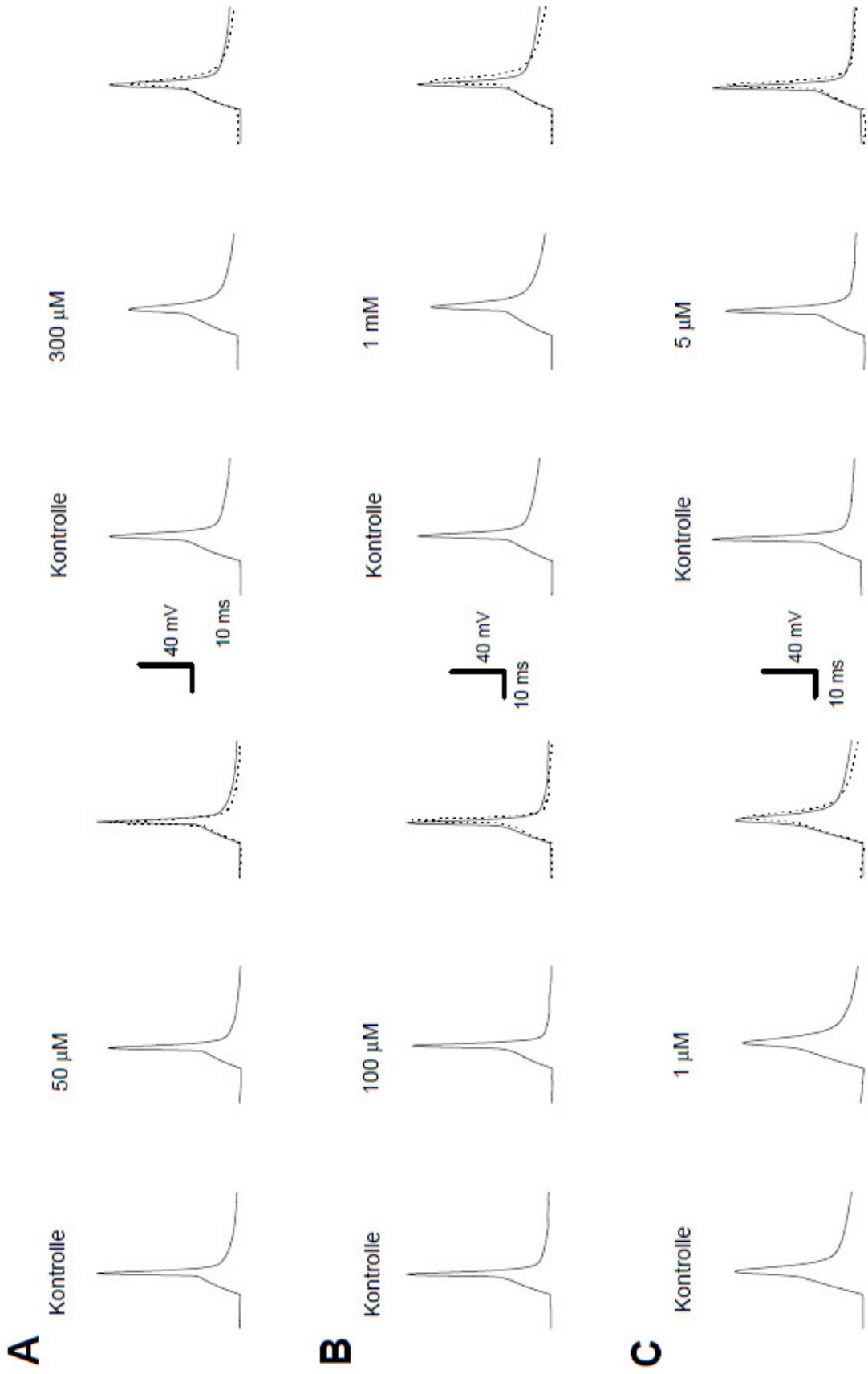


Abbildung 13 (vgl. Seite 42): Wirkung von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf einzelne Aktionspotenziale

Die Abbildung zeigt für die Wirkung von Carbamazepin (A), Gabapentin (B) und Amitriptylin (C) auf einzelne Aktionspotenziale an SSN in den jeweils genannten Konzentrationen jeweils einzelnen und übereinander gelagert. Die Current-Clamp-Ableitung erfolgte in der Whole-Cell-Konfiguration. Während der Experimente für das Membranpotenzial um das Ruhemembranpotenzial bei -70 mV gehalten.

4.3 Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf Serien von Aktionspotenzialen

Wie bereits zuvor beschrieben (vgl. Absatz 1.2, Seite 4 ff.), erfolgte im Jahr 1989 durch Thomson *et al.* eine Einteilung der Hinterhornneurone der Laminae I und II des dorsalen Myelons der erwachsenen Ratte aufgrund des spezifischen Erregungsmusters in drei Gruppen. Gruppe-I-Neurone lösten kurze Aktionspotenziale aus und reagierten auf Dauerdepolarisation mit Serien von Aktionspotenzialen. Neurone der Gruppe-II reagierten zu Beginn einer Dauerdepolarisation mit Serien von Aktionspotenzialen, adaptierten sich jedoch sehr rasch. Hingegen konnten durch Neurone der Gruppe-III auf eine Dauerdepolarisation lediglich ein bis zwei Aktionspotenziale ausgelöst werden. Als weiteres Charakteristikum unterschieden sich die Hinterhornneurone dieser drei Gruppen durch unterschiedliche Formen der hyperpolarisierenden Nachpotenziale. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine Korrelation der Muster zwischen den durch die direkte intrazelluläre Stimulation ausgelösten Aktionspotenzialserien und den infolge einer peripheren Reizung entstehenden Aktivitätsformen besteht. Die Intensität der afferenten Impulse bestimmte die Frequenz der Aktionspotenzialserien *in vivo*.

Die nachfolgenden Untersuchungen zeigen den Einfluss von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf die Generierung von Aktionspotenzialserien. Der Versuchsaufbau, die Durchführung der Experimente und die dabei verwendeten Konzentrationen wurden bereits bei den Ergebnissen zur Messung der Einzelaktionspotenziale (vgl. Seite 38) beschrieben. Um Kategorie-1-Neurone sicher zu klassifizieren, mussten diese auf einen 500 ms langen depolarisierenden Impuls mit einer Serie von Aktionspotenzialen reagieren, ohne eine Adaptation in dieser Zeit zu zeigen.

Alle Untersuchungen erfolgten in der Current-Clamp-Methode mit einem Dauerimpuls über 500 ms, welcher zu einer dauerhaften Depolarisation der Zellmembran führte. Das Ruhepotential wurde bei -80 mV gehalten.

Nach Identifizierung der Kategorie-I-Neurone erfolgte der jeweilige Einwasch der Wirkstoffe Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin in der jeweils niedrigeren Konzentration in die Badlösung 1 (vgl. Seite 15) für drei Minuten.

Hierbei konnte für Amitriptylin in einer Dosierung von 5 μM die stärkste Blockade ($58,1 \pm 22,5 \%$) der Aktionspotenzialserien gezeigt werden. Die Dosierung von 5 μM entspricht hier bereits einer klinisch relevanten Konzentration. Der Effekt der Blockade von Amitriptylin korreliert hier mit der zuvor gezeigten Blockade der Ionenströme für Natriumkanäle und Kaliumkanäle (K_A und K_{DR}). Für Carbamazepin zeigte sich in den Konzentration von 50 μM und 300 μM ein ähnlicher Effekt ($46,6 \pm 21,3 \%$ für 50 μM und $43,9 \pm 35,4 \%$ für 300 μM). Gabapentin rief bei diesen Untersuchungen den geringsten Effekt hervor ($10,5 \pm 8,4 \%$ für 100 μM und $35,4 \pm 29,3 \%$ für 1 mM).

Art der Zelle	Wirkstoff	Konzentration	Reduktion der maximalen Feuerrate (%)	N
AFN	Carbamazepin	50 μM	$45,5 \pm 4,8$	7
		300 μM	$63,6 \pm 9,1$	4
	Gabapentin	100 μM	$19,4 \pm 16,7$	7
		1 mM	$26,8 \pm 24,2$	4
	Amitriptylin	1 μM	$36,2 \pm 12,4$	5
		5 μM	$70,5 \pm 6,9$	6
TFN	Carbamazepin	50 μM	$46,6 \pm 21,3$	5
		300 μM	$43,9 \pm 35,4$	4
	Gabapentin	100 μM	$10,5 \pm 8,4$	5
		1 mM	$35,4 \pm 29,3$	5
	Amitriptylin	1 μM	$4,2 \pm 36,3$	4
		5 μM	$58,1 \pm 22,5$	5

Tabelle 11: Relative Reduktion der maximalen Feuerrate dorsaler Hinterhornneurone

Die maximale Feuerrate ist die Anzahl von Aktionspotentialen, welche sich auf einen dauerhaften Reiz in einer definierten Zeitspanne (500 ms) zeigt (vgl. Seite 44 und 45).

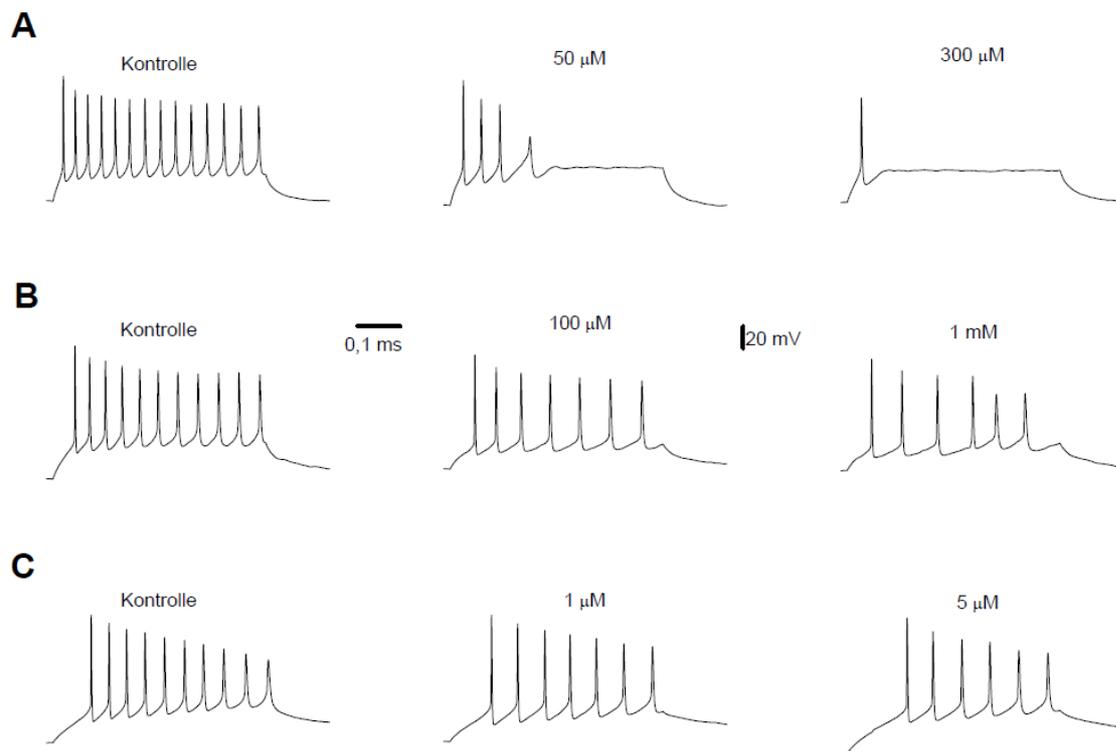


Abbildung 14: Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf Serien von Aktionspotenzialen

Die obige Abbildung zeigt, in Originalregistrierungen, die Effekte von 50 µM bzw. 300 µM Carbamazepin (A), von 100 µM und 1 mM Gabapentin (B) und von 1 µM sowie 5 µM Amitriptylin (C) auf Serien von Aktionspotenzialen. Die Ableitung der Current-Clamp-Registrierungen erfolgte in der Whole-Cell-Konfiguration. Während der Experimente wurde das Membranpotenzial bei -70 mV gehalten.

Die dargestellten Originalregistrierungen zeigen beispielhaft die Blockade von Serien von Aktionspotenzialen.

5. Diskussion

5.1 Chronische neuropathische Schmerzen

Chronische neuropathische Schmerzen sind ein weit verbreitetes Krankheitsbild, welches bei den betroffenen Patienten zu einem deutlichen Verlust der Lebensqualität führen kann. McDermott *et al.* schätzten bereits im Jahr 2006 die Punktprävalenz von chronischen neuropathischen Schmerzen in der Bevölkerung auf bis zu 5 % (McDermott *et al.*, 2006). Bereits hieraus ist ersichtlich, dass chronische neuropathische Schmerzen eine bedeutende sozioökonomische Relevanz besitzen.

Die Definition des Begriffes „Neuropathischer Schmerz“ wurde zuletzt im Jahr 2008 durch Treede *et al.* festgelegt, als „ein Schmerz, welcher als direkte Konsequenz aus einer Läsion oder Krankheit, welche das somatosensorische System affiziert, hervorgeht“ (Treede *et al.*, 2008). Diese Definition verdeutlicht, dass es sich bei chronischen neuropathischen Schmerzen um ein komplexes, weit verzweigtes Krankheitsbild handelt. Die Komplexität dieses Krankheitsbildes resultiert aus den vielen verschiedenen Ursachen, welche chronischen neuropathischen Schmerzen zu Grunde liegen. Hierzu zählen unter anderem metabolische, entzündliche, toxische und mechanische Noxen, welche das zentrale und/oder periphere somatosensorische Nervensystem schädigen können (Sommer, 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass chronische neuropathische Schmerzen durch die Kombination verschiedener Mechanismen hervorgerufen werden können. Bei jedem einzelnen Patienten ist dabei eine komplexe Mischung dieser Mechanismen die Grundlage für dessen Schmerzsymptomatik und Ausprägung (Baron *et al.*, 2010).

Eine Einteilung der verschiedenen Arten von chronischen neuropathischen Schmerzen findet sich bei Baron (2006). Dieser unterteilt chronische neuropathische Schmerzen in vier verschiedene Kategorien, 1. periphere, fokale oder multifokale schmerzhaftes Neuropathien (z.B. Trigeminus-Neuralgie, diabetische Mononeuropathie, postzosterische Neuralgie), 2. periphere, generalisierte, schmerzhaftes Neuropathien (Polyneuropathien, z.B. bedingt durch Diabetes Mellitus, Alkohol, Chemotherapeutika und chronische, inflammatorische Polyradikulopathien), 3. zentrale, schmerzhaftes

Neuropathien (z.B. Apoplex, Rückenmarksverletzungen, Encephalitis disseminata und Syringomyelien) und 4. sogenannte „mixed-pain“-Syndrome (z.B. chronische Rückenschmerzen, Tumorschmerzen, M. Sudeck).

Gegenüber den chronisch neuropathischen Schmerzen muss zur Optimierung der Therapie eine Abgrenzung gegenüber nozizeptiven Schmerzen (z.B. Schmerzen bei Arthrose) erreicht werden. Es ist bekannt, dass dies im klinischen Alltag nicht immer gelingen kann (Freynhagen *et al.*, 2006). Ein typisches Beispiel sind hier Rückenschmerzsyndrome bei z.B. einem Bandscheibenvorfall und daraus resultierender neuropathischer Schmerzkomponente auf der einen Seite und auf der anderen Seite der nozizeptiven Komponente, durch z.B. in Gelenken auftretende chronische Aktivierung afferenter Nerven (Baron, 2006).

Relevanz der Ionenkanäle beim chronischen neuropathischen Schmerz

Ausgehend von einer Vielfalt der Ursachen und Wirkmechanismen sind bei chronischen neuropathischen Schmerzen auch eine Allodynie und eine Hyperalgesie möglich (Jarvis und Boyce-Rustay, 2009). Wie bereits in der Einleitung beschrieben erfolgt die Schmerzweiterleitung über langsam-leitende C-Fasern sowie schnell leitende, dünne A δ -Fasern. Nach einer peripheren Schädigung eines Nervens kommt es nachweislich zu einer spontanen Aktivität in den verletzten-afferenten sowie den nicht verletzten-afferenten, nachfolgenden Fasern. Ebenfalls zeigt sich ein Anstieg von mRNA, welche für spannungsabhängige Natriumkanäle expremiert. Dieser Anstieg scheint mit der spontanen Aktivität der afferenten Fasern zu korrelieren. Das vermehrte Auftreten von spannungsabhängigen Natriumkanälen sowohl in den verletzten als auch in den intakten afferenten Fasern führt zu einer Herabsetzung der Erregungsschwelle und damit zur spontanen Auslösung von Aktionspotentialen (Baron *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass es nach einer Verletzung des Rückenmarks zu einer Erhöhung der Expression des TTX-sensitiven Natriumkanal-Subtypen Na_v1.3 in dorsalen Hinterhornneuronen der Ratte kommt (Hains *et al.*, 2003; Hains und Waxman, 2007). Diese Expression zeigte sich sowohl in Neuronen der Laminae I und II als auch in Neuronen der Laminae III und IV (Hains *et al.*, 2003). Die gleiche Arbeitsgruppe

konnte zeigen, dass der Natriumkanal $\text{Na}_v1.3$, an der Übererregbarkeit von Hinterhornneuronen beteiligt ist (Hains *et al.*, 2003). Ein weiteres Indiz für eine zentrale Rolle der Natriumkanäle in der Schmerzverarbeitung und Schmerzweiterleitung zeigte sich in den Untersuchungen von Dib-Hajj *et al.* aus dem Jahr 2009, in welcher eine Mutation der Funktionssteigerung im Gen *SCN9A*, welches für den Natrium-Kanal $\text{Na}_v1.7$ codiert, zu einer Schmerzzunahme bei den Patienten führte, hingegen Mutationen welche die Funktion des Gens *SCN9A* herabsetzten, bei den Patienten eine vollkommene Gefühllosigkeit gegenüber Schmerzen auslöste. Ein stabiles Aktionspotential wird von einem Hinterhornneuron in der Regel generiert, wenn die Natriumstromgröße nach einem hypopolarisierenden Vorimpuls größer als 1 nA ist (Safronov *et al.*, 1997).

Die Therapie von chronischen neuropathischen Schmerzen sollte zunächst durch die Behandlung der zu Grunde liegenden Ursache erfolgen, z.B. der Optimierung des Blutzuckerspiegel bei Diabetes Mellitus. Bei in der Regel dadurch nicht befriedigender Schmerzreduktion erfolgt parallel hierzu eine pharmakologische Therapie mit Substanzen aus den Bereichen der Antidepressiva, der Antiepileptika (Ca^{2+} -Kanal- und Na^+ -Kanal-Blocker), der Opioid-Analgetika, der Cannabinoide sowie der topischen Therapeutika (Baron, 2006).

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde die Modulation der Erregbarkeit spinaler Hinterhornneurone durch das Antidepressivum Amitriptylin, den Ca^{2+} -Kanal-Blocker Gabapentin und den Na^+ -Kanal-Blocker Carbamazepin untersucht. Das Augenmerk wurde hier auf die Veränderung der Natrium- und Kaliumkanäle von sensorischen Hinterhornneuronen gelegt und die daraus resultierende Änderung der Generierung von Aktionspotentialen dieser Neuronen, die die erste Schaltstelle für die Erregungsweiterleitung im zentralen Nervensystem darstellen.

5.2 Wirkung von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin in der Therapie chronischer Schmerzen

Die Wirksamkeit von Carbamazepin in der Therapie chronischer neuropathischer Schmerzen wird in der Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen gesehen (Wiffen *et al.*, 2011). Bereits in den 1960er Jahren konnte in mehreren Studien ein Nutzen in der Therapie der Trigeminusneuralgie belegt werden (Kilian und Fromm 1968; Nicol 1969). Ebenfalls nachweisbar ist die positive Wirkung von Carbamazepin in der Therapie der diabetischen Neuropathie (Rull *et al.*, 1969; Wilton 1974). Im Jahr 1989 konnte ebenfalls ein Effekt von Carbamazepin bei zentralen neuropathischen Schmerzen nach Apoplex belegt werden, auch wenn dieser Effekt in der gleichen Studie geringer ausgeprägt war als für Amitriptylin (Leijon und Boivie, 1989).

McQuay *et al.* (1995) konnten die Effekte von Carbamazepin in der Therapie von Trigeminusneuralgien sowie der diabetischen Neuropathie bestätigen, fanden aber, im Gegensatz zu Leijon und Boivie (1989), keinen Effekt in der Therapie bei einer zentralen Neuropathie nach einem Schlaganfall (McQuay *et al.*, 1995). Im Jahr 2001 konnte unsere Arbeitsgruppe eine blockierende Wirkung von Carbamazepin auf Natriumkanäle von Neuronen der Hinterwurzelganglien zeigen (Bräu *et al.*, 2001).

Gabapentin bindet an die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals (Gee *et al.*, 1996) der zentralen Terminalen der ersten afferenten Nozizeptoren und führt dadurch zu einer verminderten Freisetzung der Neurotransmitter Glutamat, Norepinephrin und Substanz P (Baron *et al.*, 2010) und reduziert den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Jensen *et al.*, 2009). Eine Wirkverstärkung von Gabapentin konnte durch die Kombination mit einem Morphinpräparat gezeigt werden (Gilron *et al.*, 2005). In dieser Kombination besteht möglicherweise eine relevante klinische Wirkung in der Behandlung von Patienten mit Schmerzsyndromen, welche durch eine maligne Grunderkrankung hervorgerufen werden. Ebenfalls besteht unter Umständen eine Schmerzreduktion bei Patienten, welche unter einer Mukositis nach Radiatio im Kopf-Hals-Bereich leiden (Bar Ad V, 2010). Eine weitere Wirkverstärkung zeigte sich auch für eine Kombination aus Gabapentin und Nortriptylin (Gilron *et al.*, 2009). Grundsätzlich wird Gabapentin in der Therapie der diabetischen Neuropathie, von

postzosterischen Neuralgien, bei gemischten neuropathischen Syndromen und bei Phantomschmerzen eingesetzt (Finnerup *et al.*, 2005; Dworkin *et al.*, 2007). Keine signifikante Wirksamkeit besitzt Gabapentin hingegen bei der Behandlung von neuropathischen Schmerzsyndromen nach Rückenmarksverletzung (Rintala *et al.*, 2007).

Trizyklische Antidepressiva, wie z.B. Amitriptylin, haben verschiedene Mechanismen, durch welche eine Veränderung der Schmerzintensität und Schmerzwahrnehmung herbeigeführt werden kann, z.B. durch die Blockade der Wiederaufnahme von 5-HT, der Blockade von Noradrenalinrezeptoren, der Blockade von α_1 adrenergen-Rezeptoren, ebenso von nikotinergen und muscarinergen-cholinergen Rezeptoren, der NMDA- als auch der histaminergen- Rezeptoren (Kalso, 2005). Dass Amitriptylin ein potenter Blocker von spannungsabhängigen Natriumkanälen ist, konnte ebenfalls gezeigt werden (Song *et al.*, 2000). Ein weiterer Vorteil von trizyklischen Antidepressiva liegt in dem parallel auftretenden antidepressiven Effekt, da bekannt ist, dass Depression eine relevante Co-Morbidität von Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen darstellt (Baron *et al.*, 2010). Für trizyklische Antidepressiva, wie z.B. Amitriptylin, konnte eine Wirksamkeit in doppelblinden, placebo-kontrollierten Studien nachgewiesen werden für die Behandlung der diabetischen Neuropathie, von neuropathischen Schmerzen nach Nervschädigung, der postzosterischen Neuralgien sowie von zentralen neuropathischen Schmerzen nach Rückenmarksverletzung (Jensen *et al.*, 2009). Allerdings konnte für Amitriptylin kein positiver Effekt in der Behandlung von Patienten mit einer HIV- (Humanes Immundefizienz-Virus) Neuropathie bzw. einer durch eine Chemotherapie induzierten Neuropathie nachgewiesen werden (Attal *et al.*, 2009).

In einer Studie aus dem Jahr 1998 von Abdi *et al.* konnte gezeigt werden, dass es nach intraperitonealer Gabe von Amitriptylin und Gabapentin sowie intravenöser Gabe von Lidocain zu einer Reduzierung der elektrischen Aktivität in afferenten Fasern eines lumbalen Nervs der Ratte in einem Modell für neuropathischen Schmerzen kam. Der Effekt war für Lidocain schneller und stärker ausgeprägt als für Amitriptylin. In dieser Studie wurde die These aufgestellt, dass Gabapentin lediglich im zentralen

Nervensystem eine Wirkung entfalte, hingegen Amitriptylin sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem eine Wirkung hervorrufe (Abdi *et al.*, 1998). Möglicherweise erklären die vielen unterschiedlichen Wirkmechanismen von Amitriptylin seine periphere als auch zentrale Wirkung in der Therapie chronischer neuropathischer Schmerzen (McQuay *et al.*, 1996).

Einen ähnlichen Effekt konnte ebenfalls unsere Arbeitsgruppe um Bräu *et al.*, 2001 nachweisen. In unseren Patch-Clamp-Untersuchungen an Neuronen von Wurzelganglien zeigte sich eine reversible Blockade von TTX-resistenten Natriumströmen. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Carbamazepin nur einen geringen und Gabapentin keinen Einfluss auf die Erregbarkeit von Neuronen der Wurzelganglien hatte (Bräu *et al.*, 2001).

5.3 Die Rolle von Natrium- und K_{Dr} -Kanälen auf die Erregbarkeit von spinalen Hinterhorneuronen

Spannungsabhängige Natriumkanäle wurden das erste Mal vor über 50 Jahren registriert (Hodgkin und Huxley, 1952) und über die vergangenen Jahrzehnte weiterhin intensiv untersucht. Grundsätzlich werden beim Natriumkanal drei Funktionszustände beschrieben. Diese sind: geschlossen aktivierbar, offen aktivierbar und geschlossen inaktiviert. Die Öffnung des Natriumkanals im geschlossen aktivierbaren Zustand erfolgt über eine Repolarisation. Innerhalb von Millisekunden führt dieser Zustand der Öffnung zum inaktivierbaren Zustand. Eine neuerliche Repolarisation bringt den Natriumkanal zurück zum aktivierbaren Zustand.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass es neun verschiedene Isoformen des Natriumkanals ($Na_v1.1$ - $Na_v1.9$) gibt, welche zwar eine ähnliche Struktur besitzen, jedoch aus verschiedenen Aminosäuresequenzen bestehen, was wiederum eine heterogene Kinetik und Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit nach sich zieht (Catterall *et al.*, 2005). Besondere Relevanz im Bereich der Schmerzentstehung und Weiterleitung besitzen hier die Natriumkanäle $Na_v1.3$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ (Hains *et al.*, 2003; Cummins *et al.*, 2007). So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass es sowohl nach peripherer als auch nach zentraler Nervenschädigung zu einer Hochregulierung von verschiedenen Natriumkanälen kommt, z.B. des

Natriumkanals $Na_v1.3$ in dorsalen Hinterhornneuronen nach Rückenmarksverletzung. Durch die Hochregulierung von Natriumkanälen kommt es einer Übererregbarkeit in dorsalen Hinterhornneuronen und somit zu zentralen neuropathischen Schmerzen (Hains *et al.*, 2003).

Neben den Natriumkanälen spielen auch verschiedene Arten von Kaliumkanälen eine entscheidende Rolle in der Generierung von Aktionspotentialen in dorsalen Hinterhornneuronen. Hierdurch erlangen Kaliumkanäle eine weitreichende Bedeutung in der Schmerzweiterleitung und somit auch in der Therapie von chronischen neuropathischen Schmerzen.

Mehrere Arbeitsgruppen (Hodgkin und Huxley, 1952; Connor und Stevens, 1971; Llinas, 1988; Hille, 1992) konnten zeigen, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle sowohl zur Membranrepolarisation während einzelner Aktionspotenziale als auch zur Regulierung der Auslösung von Aktionspotenzialserien in Neuronen des zentralen Nervensystems beitragen.

Die Kaliumleitfähigkeit in Hinterhornneuronen besteht aus einem schnell inaktivierenden A-Typ-Strom, einem verzögert aktivierenden Strom (Wolff *et al.*, 1998) und zwei Typen von einwärtsgerichteten Strömen (Yoshimura und Jessel, 1989). Darüber hinaus finden sich in Hinterhornneuronen auch ein calciumaktivierbarer Kaliumstrom (Huang, 1987) sowie ein ATP-abhängiger Strom (Yamashita *et al.*, 1994). Die Beschreibung der biophysikalischen Eigenschaften der spannungsabhängigen Kaliumkanäle an Hinterhornneuronen erfolgte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an dünn-schichtigen Slice-Präparationen im Jahr 1998 durch Wolff *et al.*.

Ab einem Potenzial von -40 mV wird der verzögert aktivierende oder auch Delayed-Rectifier-Kaliumstrom (K_{DR}) im Gewebeschnitt aktiviert (Wolff *et al.*, 1998). Auch durch stärkste Reize wird dessen Aktivierungskurve nicht gesättigt. Hingegen erreichte die Aktivierungskurve in isolierten Somata ihre Sättigung bei $+20$ bis $+30$ mV.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Reizmuster zeigte der Delayed-Rectifier-Kaliumstrom keine Inaktivierung und hat sich erst nach Rückkehr zum Ruhemembranpotenzial mit einer Zeitkonstanten zwischen 10 und 50 ms geschlossen. Safronov *et al.* konnten aufgrund der Empfindlichkeit für TEA den verzögert

aktivierenden Kaliumkanal in Hinterwurzelganglien und an Axonen der Ratte in weitere Kanalsubtypen aufteilen (Safronov *et al.*, 1993; 1996).

Schnell inaktivierende A-Typ Kaliumkanäle in Hinterhornneuronen aktivieren bei einem Membranpotenzial zwischen -60 und 0 mV (Wolff *et al.*, 1998). Die Zeitkonstante, welche unter adäquater Spannungskontrolle, an Kanälen von isolierten Somata und Soma-Axon-Komplexen gemessen wurden, betrug 15-60 ms (Wolff *et al.*, 1998). Dieser A-Typ-Kaliumkanal scheint verschiedene physiologische Funktionen in Hinterhornneuronen zu besitzen. Unter anderem besteht eine bestimmte Korrelation zwischen der Größe der K_A -Kanalleitfähigkeit in den Substantia-gelatinosa-Neuronen und der Zeitverzögerung der Aktionspotenzialauslösung während der Dauerdepolarisation (Yoshimura und Jessel, 1989). Hieraus könnte geschlussfolgert werden, dass die Leitfähigkeit der schnell inaktivierenden A-Typ Kaliumkanäle an der Determinierung des Musters von Aktionspotenzialenserien in Hinterhornneuronen beteiligt ist. Darüber hinaus könnten die K_A -Kanäle auch zur Membranreparolarisation während eines einzelnen Aktionspotenzials in Hinterhornneuronen beitragen, wie dies im Jahr 1990 durch Takahashi für spinale Motoneurone vorgeschlagen wurde. Durch die Verlangsamung der Abfall-Kinetik des hyperpolarisierenden Nachpotenzials können schnell inaktivierende Kaliumkanäle möglicherweise die repetitive Aktionspotenzialauslösung in Hinterhornneuronen regulieren (Connor und Stevens, 1971).

Hinterhornneurone des Rückenmarks werden durch einen kurzen Stromimpuls stimuliert und lösen dann nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ ein Aktionspotenzial aus (Coombs *et al.*, 1957 a, b; Stuart und Sakmann, 1994). Ein Aktionspotenzial wird am Initialsegment des Axon generiert. Axon, Soma und Dendriten nehmen unterschiedliche Rollen bei der Erregbarkeit der Hinterhornneurone ein. Das Soma und die Dendriten können die rückwärts gerichtete Ausbreitung eines Aktionspotenzials vom Axon zum Dendriten verhindern, leiten allerdings auch passiv oder verstärken die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale auf dem Weg zum Axoninitialsegment. Die Hauptrolle der Erregungsausbreitung wird durch die im Axoninitialsegment generierten „Alles-oder-Nichts“-Aktionspotentiale eingenommen, allerdings sollte darauf

hingewiesen werden, dass die differenzierten Antworten eines Somas eine für die komplexen integrativen Prozesse nötige Modulation der Zellaktivität darstellen.

Die kurze zeitliche Aufeinanderfolge von sogenannten Spitzenentladungen (spikes) ist verantwortlich für die Kommunikation zwischen Neuronen. Durch die Integration verschiedener Synapsenpotentiale wird das zeitliche Muster von Aktionspotenzialen bestimmt, moduliert und gesteuert. Grundsätzlich gilt hier, dass je stärker der Reiz ist, desto mehr Aktionspotenziale werden pro Zeiteinheit generiert. Die zentrale Weiterleitung der Reizstärke erfolgt also durch die Frequenz der Aktionspotenziale und wird auch als Impulscodierung bezeichnet. Obwohl die Frequenz von Aktionspotenzialen sehr häufig im Organismus benutzt wird, bleibt diese nicht die einzige Möglichkeit der Reizkodierung. Weitere Informationen werden über das regelmäßige bzw. unregelmäßige Auftreten von Aktionspotenzialen verschlüsselt (Olschewski, 2001).

5.4 Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin an Natrium- und Kaliumkanälen von spinalen Hinterhornneuronen

Erstmals wurde in dieser Arbeit die Methode der Patch-Clamp-Technik an „Dünnschnittschnitten“ des Rückenmarkes junger Ratten mit den Wirkstoffen Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin durchgeführt. Im Vergleich zu anderen Präparationsmethoden kann diese Methode als weitgehend physiologische Methode angesehen werden, weil die Morphologie der Zellen sowie deren Oberflächenbeschaffenheit nahezu unverändert bleibt. An jedem Experimentiertag erfolgte die Präparation der Zellen neu, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es unter anderem keine Veränderung in der Expression von Ionenkanälen der Zellen gibt, wie z.B. bei kultivierten Zellen. Im Gegensatz zu Neuronen aus der Zellkultur erlaubt diese Methode Untersuchungen an einem genau definierten Teilbereich des zu untersuchenden Gewebes, hier die Laminae I-III, und eignet sich somit für Vergleichsuntersuchungen mit anderen Gewebeabschnitten. Ein Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist, dass die Reversibilität der Effekte aufgrund einer hohen, unspezifischen Gewebefixierung gering ist.

Alle verwendeten Substanzen in dieser Arbeit (Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin) führen zu einer ausgeprägten Reduktion der Feuerrate der „tonically-firing-Neurone“. Diese Effekte legen die Vermutung nahe, dass eine zunehmende Blockade der Natriumkanäle ursächlich hierfür ist. Bereits in niedriger Konzentration (50 μM) verursachte Carbamazepin eine Verzögerung der Repolarisation des Aktionspotenzials, was auf die Blockade der Delayed-Rectifier-Kaliumkanäle hinweist. In einer Konzentration von 300 μM zeigte sich dann eine deutliche Blockade der Ionenströme für Natriumkanäle sowie der Delayed-Rectifier-Kaliumkanäle.

Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei den Untersuchungen für Gabapentin und Amitriptylin in den niedrigeren Konzentrationen von 100 μM Gabapentin und 1 μM Amitriptylin nur geringe Effekte auf die Feuerrate der Neurone. Unter erhöhten Konzentrationen von 1 mM Gabapentin und 5 μM Amitriptylin zeigte sich ein ausgeprägter Effekt auf die Feuerrate der Hinterhornneurone der Laminae I-III.

Ähnliche Ergebnisse konnten 1994 an Zellkulturen von zentralen Neuronen der Maus nach verlängerter Inkubationszeit von 48 Stunden für Gabapentin gezeigt werden. In dieser Untersuchung zeigte sich bei mehr als 50 % der Neuronen eine Einschränkung der Feuerrate. Dieser Effekt zeigte sich bereits bei Konzentrationen, welche sich auch im Plasma bzw. Liquor von Patienten messen lassen, welche mit Gabapentin therapiert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass der spannungsabhängige Natriumkanal durch Gabapentin beeinflusst wird, auch wenn der Mechanismus zum damaligen Zeitpunkt nicht prüfbar war und als indirekter Effekt angesehen wurde (Wamil und McLean, 1994).

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass sowohl Amitriptylin als auch Gabapentin den Natriumstrom reduzieren. Dieser Effekt war für Amitriptylin bereits in niedrigen Konzentrationen ausgeprägter als für Gabapentin. Geht man nun davon aus, dass es nach einer Rückenmarksverletzung zu einer Hochregulierung des Natriumkanals $\text{Na}_v1.3$ in dorsalen Hinterhornneuronen kommt (Hains *et al.*, 2003), so lassen sich die Ergebnisse aus der Arbeit von Rintala *et al.* aus dem Jahr 2007, welche eine bessere Wirkung von Amitriptylin gegenüber Gabapentin bei Patienten mit zentralen neuropathischen Schmerzen nach Rückenmarksverletzung feststellten, elektrophysiologisch gut erklären. Beide Wirkstoffe zeigten hier eine Wirkung, jedoch konnte lediglich für Amitriptylin gegenüber Placebo eine Signifikanz nachgewiesen

werden, hingegen Gabapentin vs. Placebo nicht signifikant war und ebenso wenig Amitriptylin gegenüber Gabapentin eine Signifikanz zeigte, sondern lediglich einen Trend aufwies (Rintala *et al.*, 2007).

Es ist bekannt, dass Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von chronischen, neuropathischen Schmerzen durch die Veränderung des Membranpotentials einnehmen. Dies konnte unter anderem bei der Trigeminusneuralgie an Neuronen des Ganglion trigeminale gezeigt werden (Takeda *et al.*, 2011). Vergleicht man dies mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen, auch wenn diese an unterschiedlichen Neuronen durchgeführt wurden, so zeigt sich, dass Carbamazepin in einer Konzentration von 300 μM einen Einfluss auf den schnell inaktivierenden Kaliumkanal von „single-spike-Neuronen“ besitzt. In einer Konzentration von 50 μM zeigte sich ein geringer Einfluss auf den verzögert aktivierenden Kaliumkanal. Diese Ergebnisse könnten Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus von Carbamazepin in der Behandlung der Trigeminusneuralgie aufzeigen. Allerdings ist die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse eingeschränkt durch die Tatsache, dass Amitriptylin ebenfalls in Konzentrationen von 1 und 5 μM signifikante Einflüsse auf den schnell inaktivierenden Kaliumkanal sowie den verzögert aktivierenden Kaliumkanal von „single- und adapting-spike-Neuronen“ besitzt, jedoch nicht in der Behandlung der Trigeminusneuralgie, bei fehlendem Effekt, eingesetzt wird. Diese Unterschiede in den therapeutischen Effekten der verschiedenen Wirkstoffe könnte mit der Heterogenität der Kaliumkanäle in den zu untersuchenden Geweben erklärt werden (Schnoebel *et al.*, 2005).

Darüber hinaus ist bekannt, dass die Registrierung und Auswertung des schnell inaktivierenden Kaliumkanal in der Whole-Cell-Konfiguration nicht genau erfolgen kann. Aus diesem Grund erfolgte eine weiterführende Registrierung des schnell inaktivierenden Kaliumkanals sowie des verzögert aktivierenden Kaliumkanals in der Soma-Methode mit verschiedenen Aktivierungsmustern. Durch diese Methode war es möglich, sowohl alle Kaliumkanäle als auch nur den verzögert aktivierten Kaliumkanal zu registrieren. Details zur Berechnung der einzelnen Ströme wurden bereits im Kapitel 4.1.2.2 (vgl. Seite 34 f.) beschrieben. Die Registrierungen der einzelnen Wirkstoffe an den Soma-Schnitten zeigte dann wieder eine deutliche Blockade des verzögert

aktivierten Kaliumstroms für Carbamazepin und Amitriptylin im Vergleich zum schnell inaktivierenden Kaliumstrom, so dass die bereits zuvor postulierte These, dass der verzögert aktivierte Kaliumstrom die größte Leitfähigkeit in Hinterhornneuronen der Laminae I-III besitze, durch unsere Untersuchungen unterstützt werden kann (Wolff *et al.*, 1998). Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach Applikation von Carbamazepin an Zellkulturen von Neuronen des Spinalganglions der Ratte kein signifikanter Effekt weder auf Kalium- noch auf Natriumströme (Schirmacher *et al.*, 1995). Die Gründe hierfür liegen möglicherweise wiederum in den unterschiedlichen Gewebearten, welche untersucht wurden als auch im unterschiedlichen Versuchsaufbau, wie zum Beispiel die Verwendung von kultivierten Zellen im Gegensatz zu unserem physiologischen Präparat. Es ist nämlich bekannt, dass die Haltung von Zellen in der Zellkultur *per se* zur Herunterregulierung von Ionenkanalexpression führen kann.

Auch eine Blockade des verzögert aktivierten Kaliumstroms durch Amitriptylin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Dieser Effekt von Amitriptylin konnte bereits an Zellkulturen von humanen embryonalen Nierenzellen als auch an Zellkulturen des Ovar des chinesischen Hamsters für bestimmte Subtypen des Kaliumkanals demonstriert werden. Hier zeigten sich IC_{50} -Werte für die beiden untersuchten Subtypen in der Whole-Cell-Konfiguration von $22 \pm 3 \mu\text{M}$ bzw. $10 \pm 1 \mu\text{M}$ (Punke und Friedrich, 2007). Unsere Ergebnisse zeigten für Amitriptylin einen IC_{50} -Wert von $8,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ zur Blockade von verzögert aktivierten Kaliumströmen. Auch wenn diese beiden Arbeiten nicht exakt vergleichbar sind, so zeigen doch diese Untersuchungsergebnisse einen ähnlichen Effekt von Amitriptylin auf die Erregbarkeit von Neuronen unterschiedlicher Gewebearten.

Huang *et al.* konnten an kultivierten hippocampalen Neuronen der Ratte keinen Einfluss auf den schnell inaktivierenden Kaliumkanal für Gabapentin in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ feststellen. Ähnliche Ergebnisse konnten wir in den hier durchgeführten Experimenten mit Gabapentin aufzeigen. In der Whole-Cell-Konfiguration im Gewebeschnitt konnte keine signifikante Blockade beobachtet werden. Im Rahmen der Soma-Registrierungen konnte durch Gabapentin bei einer maximalen Konzentration von 3 mM lediglich eine geringfügige Blockade des verzögert aktivierten Kaliumstroms gemessen werden. Dieser Effekt war so schwach ausgeprägt, dass es nicht möglich war, IC_{50} -Werte für Gabapentin zur Blockade dieses Kanals zu ermitteln. Unsere Ergebnisse,

welche zwar eine deutliche Reduktion der Feuerrate von dorsalen Hinterhornneuronen der Laminae I-III auf die Applikation von Gabapentin zeigen, jedoch keinerlei Effekte auf die Natrium- und Kaliumströme der betreffenden Zellen, unterstützen die weit verbreitete Vermutung, dass die Wirkung von Gabapentin in der Therapie von chronischen neuropathischen Schmerzen über andere, auch indirekte, Wege erfolgen muss, zum Beispiel über Calciumkanäle, was in der Literatur bereits oft diskutiert wurde (Wamil und McLean, 1994). Möglicherweise hätten wir bei einer längeren Einwirkzeit einen größeren Effekt beobachten können, wie durch Liu *et al.* 2006 beschrieben wurde.

6. Zusammenfassung

Mit der vorgelegten Arbeit wurden erstmals die Wirkungen der Antiepileptika Carbamazepin und Gabapentin sowie des Antidepressivum Amitriptylin auf Ionenkanäle von Hinterhornneuronen der Laminae I-III unter Zuhilfenahme der Patch-Clamp-Technik untersucht. Die untersuchten Neuronen stammten aus einem Dünnschichtpräparat (200 μM Dicke) des Rückenmarks junger (2-8 Tage alter) Ratten. Im Rahmen der Patch-Clamp-Technik wurden sowohl Untersuchungen in der Whole-Cell-Methode als auch am isolierten Soma durchgeführt. Folgende Ergebnisse und Schlussfolgerungen können aus den Untersuchungen gezogen werden:

1. Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin zeigen Wirkungen in der Whole-Cell-Konfiguration an spannungsabhängigen Natriumkanälen sowie an verzögert aktivierenden Kaliumkanälen.
2. Für Carbamazepin sowie für Amitriptylin lassen sich mit Hilfe der Soma-Isolation halbmaximale Blockierungskonzentrationen von $156,4 \pm 16,3 \mu\text{M}$ bzw. $4,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ für die spannungsabhängigen Natriumkanäle errechnen.
3. Für die Blockade der verzögert aktivierenden Kaliumkanäle zeigen sich halbmaximale Blockierungskonzentrationen von $607 \pm 49,3 \mu\text{M}$ für Carbamazepin bzw. $8,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ für Amitriptylin.
4. Für Gabapentin konnten in Dosierungen bis 3 mM keine relevanten Effekte für spannungsabhängige Natriumkanäle bzw. verzögert aktivierende Kaliumkanäle in der Soma-Isolierung ermittelt werden.
5. Alle Wirkstoffe beeinflussen die Generierung von einzelnen Aktionspotenzialen.
6. Alle Wirkstoffe reduzieren ausgeprägt die Feuerrate von tonically-firing-Neuronen.
7. Aufgrund unserer Untersuchungen wird der schmerzlindernde Effekt von Gabapentin bzw. die Reduktion der Feuerrate von tonically-firing-Neuronen nicht durch eine Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen bzw. verzögert aktivierenden Kaliumkanälen an Neuronen der Laminae I-III hervorgerufen.
8. Die im Rahmen unserer Arbeit ermittelten effektiven Konzentrationen von Carbamazepin und Amitriptylin sind zwar höher als die bekannten Liquorkonzentrationen dieser Wirkstoffe, trotzdem ist eine Beteiligung der Hinterhornneurone

in der Schmerzmodulation nicht auszuschließen, weil bereits in niedrigeren Konzentrationen die Feuerrate der tonically-firing-Neurone reduziert wurde.

The current study investigated the effects of carbamazepine, gabapentin and amitriptyline on slices of lumbar spinal cord from young rats using the patch-clamp technique for the very first time. Our investigations revealed the following results:

1. Carbamazepine, gabapentin and amitriptyline affected the conductance of voltage-gated sodium channels and delayed rectifier potassium channels in the whole-cell-configuration.
2. With the use of soma-isolation, we were able to calculate the half-maximal blocking concentrations of carbamazepine and amitriptyline on voltage-gated sodium channels to be $156.4 \pm 16.3 \mu\text{M}$ and $4.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$, respectively.
3. The half-maximal blocking concentrations on delayed rectifier potassium channels were found to be $607 \pm 49.3 \mu\text{M}$ for carbamazepine and $8.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ for amitriptyline, respectively.
4. High concentrations of gabapentin were found to have only a slight influence on voltage-gated sodium or on delayed rectifier potassium channels in the soma-isolation.
5. All drugs tested affected the excitability of neurons to generate a single spike.
6. All drugs tested showed a notable reduction in the excitability of tonically-firing neurons.
7. Based on our study, the antinociceptive effect of gabapentin can not be explained by inhibiting voltage-gated sodium channels or delayed rectifier potassium channels.
8. The effective concentrations for carbamazepine and amitriptyline found in the present study are higher than the values published on the effective cerebrospinal fluid concentrations of these drugs. However, since these drugs already affected the excitability of the tonically-firing neurons at low concentrations, the present findings might have an influence on pain modulation in the dorsal horn neurons.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AFN	Adapting-firing-Neurone
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
EGTA	Ethylenglycol-bis[β-Aminoethylether]
FDA	Food & Drug Administration
GABA	γ-Aminobuttersäure
GΩ	Gigaohm
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N`-[2-Ethansulfonsäure]
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
Hz	Hertz
IC ₅₀	Halbmaximale Blockierungskonzentration
KCL	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz
KOH	Kaliumhydroxid
K _A	Schnell inaktivierender Kaliumkanal bzw. Kaliumstrom
K _{DR}	Verzögert aktivierender bzw. delayed-rectifier Kaliumkanal bzw. Kaliumstrom
M	Mol
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mm	Millimeter

mM	Millimol
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
μg	Mikrogramm
μg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
N	Dimensionssymbol
n	Anzahl
nA	Nanoampere
Na ⁺	Spannungsabhängiger Natriumkanal bzw. Natriumstrom
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
nM	Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRM	Nucleus raphe magnus
O ₂	Molekularer Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pA	Pikoampere
PAG	Periaquäduktales Grau
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SSN	Single-spike-Neurone
TEA	Tetraethylammonium
TFN	Tonically-firing-Neurone
TTX	Tetrodotoxin

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Verlauf der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen und der deszendierenden modulierenden Bahnsysteme.....	2
Abb. 2. Anatomie des Hinterhorns im Rückenmark	3
Abb. 3. Charakterisierung von vier Typen der Hinterhornneurone aufgrund der Muster ihrer Auslösung von Aktionspotentialserien	5
Abb. 4. Strukturformel von Carbamazepin.....	20
Abb. 5. Strukturformel von Gabapentin	22
Abb. 6. Strukturformel von Amitriptylin	25
Abb. 7. Blockade von Natriumströmen im Gewebeschnitt	31
Abb. 8. Blockade des verzögert aktivierenden Kalium-Kanals durch Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin im Gewebeschnitt	32
Abb. 9. IC ₅₀ -Werte für die Blockade der Natriumströme am isolierten Soma.....	34
Abb. 10. Darstellung der Trennung spannungsabhängiger Kaliumströme	35
Abb. 11. IC ₅₀ -Werte für die Blockade der verzögert aktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma	36
Abb. 12. Blockade der spannungsabhängigen schnell inaktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma	37
Abb. 13. Wirkung von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf einzelne Aktionspotenziale.....	42/43
Abb. 14. Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin auf Serien von Aktionspotenzialen.....	46

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Physiochemische Eigenschaften der untersuchten Substanzen.....	25
Tabelle 2. Relative Blockade von Ionenströmen durch Carbamazepin im Gewebe.....	28
Tabelle 3. Relative Blockade von Ionenströmen durch Gabapentin im Gewebe.....	30
Tabelle 4. Relative Blockade von Ionenströmen durch Amitriptylin im Gewebe.....	31
Tabelle 5. IC ₅₀ -Werte zur Blockade der Natriumkanäle am isolierten Soma	33
Tabelle 6. IC ₅₀ -Werte zur Blockade der verzögert aktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma	35
Tabelle 7. Relative Blockade der schnell inaktivierenden Kaliumströme am isolierten Soma	36
Tabelle 8. Effekte von Carbamazepin auf Einzel-Aktionspotenziale	39
Tabelle 9. Effekte von Gabapentin auf Einzel-Aktionspotenziale	40
Tabelle 10. Effekte von Amitriptylin auf Einzel-Aktionspotenziale	41
Tabelle 11. Relative Reduktion der maximalen Feuerrate dorsaler Hinterhorneurone...	45

7.4 Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1	6
Gleichung 2	8
Gleichung 3	33

8. Literaturverzeichnis

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

Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF (1983) A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* Dec 1-7;306(5942):436-41

Askmark H, Wiholm BE (1990) Epidemiology of adverse reactions to carbamazepine as seen in a spontaneous reporting system. *Acta Neurol Scand* Feb;81(2):131-40

Attal N, Cruccu G, Baron R, et al. (2009) EFNS guidelines on the pharmacological treatment on neuropathic pain: 2009 revision. *Eur J Neurol* Aug;17(8):1010-8. Epub 2010 Mar 8. Review.

Backonja M, Beydoun A, Edwards KR, Schwartz SL, Fonseca V, Hes M, LaMoreaux L, Garofalo E. (1998) Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA* Dec 2;280(21):1831-6

Baldessarini RJ (2001) Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and anxiety disorders. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill; p.447-84

Bar Ad V (2010) Gabapentin for the treatment of cancer-related pain syndromes. *Rev Recent Clin Trials* Sep;5(3):174-8

Barber MJ, Starmer CF, Grant AO (1991) Blockade of cardiac sodium channels by amitriptyline and diphenylhydantoin: evidence for two use-dependent binding sites. *Circ Res* 69:677-96

Baron R. (2006) Detection of neuropathic pain syndromes. *Dtsch Arztebl*; 103(41): A 2720–30

Baron R, Binder A, Wasner G. (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. Aug;9(8):807-19. Review

Barsa JA, Saunders JC (1961) Amitriptyline (Elavil), a new antidepressant. *Am J Psychiatry* Feb;117:739-40

Ben-Menachem E, Persson LI, Hedner T (1992) Selected CSF biochemistry and gabapentin concentrations in the CSF and plasma in patients with partial seizures after a single oral dose of gabapentin. *Epilepsy Research*; 11:45-9

Bhattacharya A, Wickenden AD, Chaplan SR (2009) Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics* Oct;6(4):663-78

Blaise FD, Bourgeois MD (1998) New antiepileptic drugs. *Arch Neurol* 55:1181–1183

Blom S (1962) Trigeminal neuralgia: its treatment with a new anticonvulsant drug (G-32883). *Lancet* Apr 21;1(7234):839-40

Bourgeois BF (1998) New antiepileptic drugs. *Arch Neurol*. Sep;55(9):1181-3

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 rat sensory neurons. *Anesthesiology* Jan;94(1):137-44

Browne TR (1993) Efficacy and safety of gabapentin. In: Chadwick D, ed. *New trends in epilepsy management*. London: Royal Society of Medicine Services, 47-57

Catterall WA, Mackie K. (2001) Local anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: Macmillan; p. 367-84

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure–function relationships of voltagegated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57:397–409.

Cervero F, Iggo A (1980) The substantia gelatinosa of the spinal cord: A critical review. *Brain* 103:717-772

Chung WH, Hung SI, Chen YT (2010) Genetic predisposition of lifethreatening antiepileptic-induced skin reactions. *Expert Opinion on Drug Safety*;9:15-21

Connor JA, Stevens CF (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213:31-53

Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC (1957a) The interpretation of spike potentials of motoneurons. *J Physiol* 139:198-231

Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC (1957b) The generation of impulses in motoneurons. *J Physiol* 139:232-249

Contin M, Riva R, Albani F, Perucca E, Lamontanara G, Baruzzi A (1985) Alpha 1-acid glycoprotein concentration and serum protein binding of carbamazepine and carbamazepine-10,11 epoxide in children with epilepsy. *Eur J Clin Pharmacol* 29(2):211-4

Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG (2007) The Roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. *Pain* 131:243-257

Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG. (2009) Voltage-gated sodium channels: Therapeutic targets for pain. *Pain Med.* Oct;10(7):1260-9. Review

Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* Dec 5;132(3):237-51

Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi, T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pfluegers Arch* 414:600-612

Eisenach JC, Gebhart GF (1995) Intrathecal amitriptyline. Antinociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine, and carbamylcholine in rats. *Anesthesiology* Nov;83(5):1036-45

Evans RW, Gualtieri CT (1985) Carbamazepine: a neuropsychological and psychiatric profile. *Clin Neuropharmacol* 8(3):221-41

Faigle JW, Feldmann KF (1989) Carbamazepine Biotransformation In: Levy RH, Dreifuss FE, Mattson RH, Meldrum BS, Penry JK (eds.): *Antiepileptic Drugs*, Raven Press New York, p. 491-504

Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* Dec 5; 118(3): 289-305

Fischer JH, Barr AN, Rogers SL, Fischer PA, Trudeau VL (1994) Lack of serious toxicity following gabapentin overdose. *Neurology* May;44(5):982-3

Freyenhagen R, Baron R, Tölle T, Stemmler E, Gockel U, Stevens M et al. (2006): Screening of neuropathic pain components in patients with chronic back pain associated with nerve root compression: a prospective observational pilot study (MIPORT). *Curr Med Res Opin*; 22(3): 529–37

Gayford JJ, Redpath TH (1969) The side-effects of carbamazepine. *Proc R Soc Med Jun*;62(6):615-6

Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem Mar 8*;271(10):5768-76

Gérardin A, Dubois JP, Moppert J, Geller L (1990) Absolute bioavailability of carbamazepine after oral administration of a 2% syrup. *Epilepsia May-Jun*;31(3):334-8

Gerner P, Mujtaba M, Sinnott CJ, Wang GK (2001) Amitriptyline versus bupivacaine in rat sciatic nerve blockade. *Anesthesiology Apr*;94(4):661-7

Gerner P, Haderer AE, Mujtaba M, Sudoh Y, Narang S, Abdi S, Srinivasa V, Pertl C, Wang GK (2003) Assessment of differential blockade by amitriptyline and its N-methyl derivative in different species by different routes. *Anesthesiology Jun*;98(6):1484-90

Ghose K, Fry DE, Christfides JA. (1983) Effect of dosage frequency of carbamazepine on drug serum levels in epileptic patients. *Eur J Clin Pharmacol 24*(3):375-81

Gilron I, Bailey JM, Tu D, Holden RR, Weaver DF, Houldon RL (2005) Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *N Engl J Med*; 352:1324-34

Gilron I, Bailey JM, Tu D, Holden RR, Jackson AC, Houldon RL (2009) Nortriptyline and gabapentin, alone and in combination for neuropathic pain: a double-blind, randomised controlled crossover trial. *Lancet*; 374:1252-61

Grant G, Arvidsson J, Robertson B, Ygge J (1979) Transganglionic transport of horseradish peroxidase in primary sensory neurons. *Neurosci Lett 12*:23-28

Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG (2003) Upregulation of sodium channel $Na_v1.3$ and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* Oct 1;23(26):8881-92

Hains BC, Waxman SG (2007) Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI. *Prog Brain Res* 161:195-203.

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. *Pfluegers Arch* 391:85-100

Hildebrandt H (1998) *Pschyrembel-Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Berlin New York p. 1099

Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd Edition. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates Inc.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544

Hooper WD, Dubetz DK, Bochner F, Cotter LM, Smith GA, Eadie MJ, Tyrer JH (1975) Plasma protein binding of carbamazepine. *Clin Pharmacol Ther* Apr;17(4):433-40

Huang CW, Huang CC, Liu YC, Wu SN (2004) Inhibitory effect of lamotrigine on A-type potassium current in hippocampal neuron-derived H19-7 cells. *Epilepsia* Jul;45(7):729-36

Huang LY (1987) Electrical properties of acutely isolated, identified rat spinal dorsal horn projection neurons. *Neurosci Lett* 82:267-272

International Association for the Study of Pain; www.iasp-pain.org

Jarvis MF, Boyce-Rustay JM (2009) Neuropathic pain: models and mechanisms *Curr Pharm Des.* ;15(15):1711-6

Jensen TS, Madsen CS, Finneup NB (2009) Pharmacology and treatment of neuropathic pains. *Curr Opin Neurol.* Oct;22(5):467-4. Review

Kalso E (2005) Sodium channel blockers in neuropathic pain. *Curr Pharm Des*;11: 3005-3011

Kasarskis EJ, Kuo CS, Berger R, Nelson KR (1992) Carbamazepine-induced cardiac dysfunction. Characterization of two distinct clinical syndromes. *Arch Intern Med.* Jan;152(1):186-91. Review

Kennebäck G, Bergfeldt L, Vallin H, Tomson T, Edhag O (1991) Electrophysiologic effects and clinical hazards of carbamazepine treatment for neurologic disorders in patients with abnormalities of the cardiac conduction system. *Am Heart J* May;121(5):1421-9

Kilian JM, Fromm GH (1968) Carbamazepine in the treatment of neuralgia. Use and side effects. *Archives of Neurology*;19:129-36

Kumazawa T, Perl ER (1978) Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: Indications of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol* 177:417-434

Kuo CC, Chen RS, Lu L, Chen RC (1997) Carbamazepine inhibition of neuronal Na⁺ currents: quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications. *Mol Pharmacol* Jun;51(6):1077-83

Kuo CC (1998) A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na⁺ channels. *Mol Pharmacol* Oct;54(4):712-21

Lai J, Hunter JC, Porreca F (2003) The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol.* 13:291-7

LaMotte C (1977) Distribution of the tract of Lissauer and the dorsal root fibers in the primate spinal cord. *J Comp Neurol* 172:529-561

Leijon G, Boivie J. (1989) Central post-stroke pain--a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. *Pain* 1989 Jan;36(1):27-36

Levy RH, Lockard JS, Green JR, Friel P, Martis L (1975) Pharmacokinetics of carbamazepine in monkeys following intravenous and oral administration. *J Pharm Sci* Feb;64(2):302-7

Light AR, Perl ER (1977) Differential termination of large-diameter and small-diameter primary afferent fibers in the spinal dorsal gray matter as indicated by labelling with horseradish peroxidase. *Neurosci Lett* 6:59-63

Light AR, Perl ER (1979a) Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp Neurol* 186:117-131

Light AR, Perl ER (1979b) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186:133-150

Light AR, Trevino DL, Perl ER (1979) Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 186:151-171

Liu Y, Qin N, Reitz T, Wang Y, Flores CM (2006) Inhibition of the rat brain sodium channel Nav1.2 after prolonged exposure to gabapentin. *Epilepsy Res.* (Aug;70(2-3):263-8. Epub 2006 Apr 18

Llinas RR (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central nervous system function. *Science* 242:1654-1664

Lopez-Garcia JA, King AE (1994) Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: Correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci* 6:998-1007

Mathew NT (2001) Antiepileptic drugs in migraine prevention. *Headache* Nov-Dec;41 Suppl 1:S18-24

Max MB, Culnane M, Schafer SC, Gracely RH, Walther DJ, Smoller B, Dubner R (1987) Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. *Neurology* Apr;37(4):589-96

McDermott AM, Tölle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Dukes EM (2006) The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain*; 10(2): 127–35

McLean MJ, Morrel MJ, Willmore LJ, *et al.* (1999) Safety and tolerability of Gabapentin as adjunctive therapy in a large, multicenter study. *Epilepsia*; 40:965-72

McQuay H, Carroll D, Jadad AR, Wiffen P, Moore A (1995) Anticonvulsant drugs for management of pain: a systemic review. *Br Med J*; 311: 1047-1052

McQuay HJ, Tramer M, Nye BA, Carroll D, Wiffen PJ, Moore RA (1996) A systematic review of antidepressiva in neuropathic pain. *Pain*;68: 217:227

Monks R, Merskey H (1984) Psychotropic drugs. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of pain*. New York: Churchill Livingstone; p. 526-37

Morselli, PL (1989) Carbamazepine. Absorption, distribution and excretion. In: Levy RH, Dreifuss FE, Mattson RH, Meldrum BS, Penry JK (eds.) Antiepileptic Drugs- Raven Press, New York p. 473-490

Nau C, Seaver M, Wang SY, Wang GK (2000) Block of human heart hH1 sodium channels by amitriptyline. J Pharmacol Exp Ther Mar;292(3):1015-23

Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. Nature 260:799-801

Nicol CF (1969) A four year double blind study of tegretol in facial pain. Headache;9:54-7

Numberger M, Draguhn A.1996 Patch-Clamp-Technik (1. Auflage) Heidelberg Berlin Oxford Spektrum Akademischer Verlag

Olschewski A, Hempelmann G, Vogel W, Safronov B (1998) Blockade of Na⁺ and K⁺ currents by local anesthetics in the dorsal horn neurons of the spinal cord. Anesthesiology 88:172-180

Olschewski A (2001) Lokalanästhetische Wirkung von Ketamin: Untersuchungen zu Grundlagen der rückenmarksnahen Anaesthesie. Habilitationsschrift zur Erlangung der Vena legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Olschewski A, Wolff M, Brau ME, Hempelmann G, Vogel W, Safronov BV (2002) Enhancement of delayed-rectifier potassium conductance by low concentrations of local anaesthetics in spinal sensory neurones. Br J Pharmacol Jun;136(4):540-9

Pancrazio JJ, Kamatachi GL, Roscoe AK, Lynch C. (1998) Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs. J Pharmacol Exp Ther 284:208-14

Petit P, Lonjon R, Cociglio M, Sluzewska A, Blayac JP, Hue B, Alric R, Pouget R. (1991) Carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in acute mania: clinical and pharmacokinetic correlates. *Eur J Clin Pharmacol* 41(6):541-6

Psychrembel (1998) *Klinisches Wörterbuch* (258. Auflage) Berlin New York Walter de Gruyter-Verlag

Punke MA, Friedrich P (2007) Amitriptylin is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3 channels. *Anesth Analg* May;104(5):1256-64

Ralston HJ, Ralston DD (1979) The distribution of dorsal root axons in laminae I, II and III of the macaque spinal cord: A quantitative electron microscope study. *J Comp Neurol* 184:643-684

Ralston HJ, Ralston DD (1982) The distribution of dorsal root axons to laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord: a quantitative electron microscopic study. *J Comp Neurol* 212:435-448

Ramsay RE (1995) Gabapentin toxicity. In: Levy, RH, Mattson, RH, Meldrum, BS eds. *Antiepileptic Drugs*, 4th edn. New York: Raven Press, 1995; 857-60

Rethelyi M (1977) Preterminal and terminal axon arborizations in the substantia gelatinosa of cat's spinal cord. *J Comp Neurol* 172:511-521

Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:415-495

Rexed B (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 100:297-379

Rintala DH, Holmes SA, Courtade D, Fiess RN, Tastard LV, Loubser PG (2007) Comparison of the effectiveness of amitriptyline and Gabapentin on chronic neuropathic pain in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. Dec;88(12):1547-60

Riva R, Contin M, Albani F, Perucca E, Ambrosetto G, Gobbi G, Cortelli P, Procaccianti G, Baruzzi A. (1984) Free and total plasma concentrations of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in epileptic patients: diurnal fluctuations and relationship with side effects. *Ther Drug Monit* 6(4):408-13

Riva R, Contin M, Albani F, Perucca E, Lamontanara G, Baruzzi A. (1985) Free and total serum concentrations of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in infancy and childhood. *Epilepsia* Jul-Aug;26(4):320-2

Rock DM, Kelly KM, Macdonald RL (1993) Gabapentin actions on ligand- and voltage-gated responses in cultured rodent neurons. *Epilepsy Res* Oct;16(2):89-98

Rogawski MA, Löscher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* Jul;10(7):685-92

Rose MA, Kam PC (2002) Gabapentin: pharmacology and its use in pain management. *Anaesthesia* May; 57(5):451-62

Rowbotham M, Harden N, Stacey B, Bernstein P, Magnus-Miller L (1998) Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *JAMA* Dec 2;280(21):1837-42

Rull JA, Quibrera R, González-Millán H, Lozano Castañeda O. (1969) Symptomatic treatment of peripheral diabetic neuropathy with carbamazepine (Tegretol): double blind crossover trial. *Diabetologia*. Aug;5(4):215-8

Safronov BV, Kampe K, Vogel W (1993) Single voltage-dependent potassium channels in rat peripheral nerve membrane. *J Physiol* 460:675-691

Safronov BV, Vogel W (1995) Single voltage-activated Na⁺ and K⁺ channels in the somata of rat motoneurons. *J Physiol* 487:91-106

Safronov BV, Bischoff U, Vogel W (1996) Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J Physiol* 493:393-408

Safronov BV, Wolff M, Vogel W (1997) Functional distribution of three types of Na⁺ channel on soma and processes of dorsal horn neurones of rat spinal cord. *J Physiol* 503:371-385

Safronov BV, Wolff M, Vogel W (1999) Axonal expression of sodium channels in rat spinal neurones during postnatal development. *J Physiol* 514:729-734

Schirmacher K, Mayer A, Walden J, Düsing R, Bingmann D (1995) Effects of carbamazepine on membrane properties of rat sensory spinal ganglion cells in vitro. *Eur Neuropsychopharmacol* Dec;5(4):501-7

Schmidt D, Seldon L (1982) Adverse effects of antiepileptic drugs. Raven Press, New York

Schmidt B (1989) Potential antiepileptic drugs: gabapentin. In: Levy RH, Dreifuss FE, Mattson RH, Meldrum BS, Penry JK, eds. Antiepileptic drugs. 3rd ed. New York: Raven Press, 925-935

Schmidt RE, Thews G, Lang F (2000) Physiologie des Menschen (28. Auflage) Berlin Heidelberg New York. Springer Verlag

Schnoebel R, Wolff M, Peters SC, Bräu ME, Scholz A, Hempelmann G, Olschewski H, Olschewski A (2005) Ketamine impairs excitability in superficial dorsal horn neurones by blocking sodium and voltage-gated potassium currents. *Br J Pharmacol* Nov;146(6):826-33

Segal AZ, Rordorf G (1996) Gabapentin as a novel treatment for postherpetic neuralgia. *Neurology* Apr;46(4):1175-6

Shimoyama N, Shimoyama M, Davis AM, Inturrisi CE, Elliott KJ (1997) Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test. *Neurosci Lett* Jan 24;222(1):65-7

Sommer C (2003) Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* ; 16(5): 623-8

Song JH, Ham SS, Shin YK, Lee CS (2000) Amitriptyline modulation of Na⁺ channels in rat dorsal ganglion neurons. *Eur J Pharmacol*;401: 297-305

Stuart GJ, Sakmann B (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72

Sudoh Y, Cahoon EE, Gerner P, Wang GK (2003) Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics. *Pain* May;103(1-2):49-55

Sugaira Y, Lee CL, Perl ER (1986) Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science* 234:358-361

Takahashi T (1990) Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal cord. *J Physiol* 423:27-46

Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S (2011) Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain* Jan 10;7:5

Tasaki I und Hagiwara S (1957) Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. In: *J Gen Physiol* 40 (1957). S. 859-885

Taylor CP, Gee NS, Su TZ, Kocsis JD, Welty DF, Brown JP, Dooley DJ, Boden P, Singh L (1998) A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res.* Feb;29(3):233-49

Thomson AM, West DC, Headley PM (1989) Membrane characteristics and synaptic responsiveness of superficial dorsal horn neurons in a slice preparation of adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1:479-488

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*;70:1630–5

Vrethem M, Boivie J, Arnqvist H, Holmgren H, Lindström T, Thorell LH (1997) A comparison of amitriptyline and maprotiline in the treatment of painful polyneuropathy in diabetics and nondiabetics. *Clin J Pain Dec*;13(4):313-23

Wamil AW, McLean MJ (1994) Limitation by gabapentin of high frequency action potential firing by mouse central neurons in cell culture. *Epilepsy Res Jan*;17(1):1-11

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 Jul*;110(1-2):166-74

Watson CP, Evans RJ, Reed K, Merskey H, Goldsmith L, Warsh J (1982) Amitriptyline versus placebo in postherpetic neuralgia. *Neurology Jun*;32(6):671-3

Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, McQuay HJ (2011) Carbamazepine for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev. Jan 19*; (1):CD005451. Review

<http://de.wikipedia.org> (Suchbegriffe: Carbamazepin, Gabapentin, Amitriptylin)

Willow M, Gono T, Catterall WA (1985) Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol May*;27(5):549-58

Wilton TD (1974) Tegretol in the treatment of diabetic neuropathy. S-A Mediese Tydskrif;48:869-872

Wolff M, Vogel W, Safronov BV (1998) Uneven distribution of K⁺ channels in soma, axon and dendrites of rat spinal neurones: Functional role of the soma in generation of action potentials. J Physiol 509:767-776

Yamashita S, Park JB, Ryu PD, Inukai H, Tanifuji M, Murase K (1994) Possible presence of the ATP-sensitive K⁺ channel in isolated spinal dorsal horn neurons of the rat. Neurosci Lett 170:208-212

Yang Y-C, Kuo C-C (2002) Inhibition of Na⁺ current by imipramine and related compounds: different binding kinetics as an inactivation stabilizer and as an open channel blocker. Mol Pharmacol; 62:1228-37

Yarov-Yarovoy V, Brown J, Sharp EM, Clare JJ, Scheuer T, Catterall WA (2001) Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment III S6 of the Na(+) channel alpha subunit. J Biol Chem Jan 5;276(1):20-7

Yoshimura M, Jessell TM (1989) Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons in vitro. J Neurophysiol 62:109-118

Publikationen / Abstracts

Ionenkanalblocker in der Therapie chronischer Schmerzen (2006) **P. Czorlich**, R. Schnoebel-Eehalt, M. Wolff, A. Scholz, G. Hempelmann, A. Olschewski
Posterbeitrag auf der 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Mai 2006, Leipzig.

Die Effekte von Carbamazepin, Gabapentin und Amitriptylin in der Therapie neuropathischer Schmerzen durch die Veränderung der Erregbarkeit spinaler Hinterhornneurone (2011) **P. Czorlich**, M. Wolff, A. Olschewski
Vortrag 6. Deutscher Wirbelsäulenkongress, 8. Dezember 2011, Hamburg

Eidesstaatliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Hamburg, 01.11.2011

Unterschrift

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt

meiner Doktormutter, **Frau Univ.-Prof. DDr. Andrea Olschewski**, für die Einarbeitung in die Thematik und Technik der Patch-Clamp-Technik sowie deren unglaubliche Geduld, Hilfe und Motivation über den gesamten Zeitraum,

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen um **PD Dr. med. Matthias Wolff, PD Dr. med. Andreas Scholz** und **PD Dr. med. Michael Bräu** für deren Unterstützung und Hilfestellung bei Fragen und Problemen. Dies gilt insbesondere für **Frau Dr. med. Rose Schnöbel-Eehalt** und **Dr. med. Yingji Li**,

Brigitte Agari, Otto Becker und **Elke Sturfels** für deren hervorragende Unterstützung bei allen technischen und administrativen Problemen,

meiner **Mutter** für die Ermöglichung meines Werdegangs und Unterstützung bei vielen Problemen des Alltags,

sowie meiner Freundin **Sabine** für die Geduld, Motivation und Unterstützung während der Ausarbeitung dieser Dissertation.