

Wirkmechanismen der Stereoisomere von Mepivacain,
Ropivacain und Bupivacain an Tetrodotoxin-resistenten
Natriumkanälen isolierter Spinalwurzelganglienneurone der
erwachsenen Ratte

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

vorgelegt von
Pierre Branitzki
aus Erfurt

Gießen 2000

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Physiologisches Institut
Leiter: Prof. Dr. Baumann
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. med. Michael E. Bräu

Gutachter: PD Dr. med. Michael E. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. Werner Vogel

Tag der Disputation: 13. November 2000

Index

1.	Einleitung	3
1.1	Schmerz.....	3
1.2	Physiologie der Nozizeption	6
1.3	Physiologie der Erregungsleitung	8
1.4	Natriumkanäle.....	10
1.5	Der TTX-resistente Natriumkanal.....	14
1.6	Lokalanästhetika	15
1.6.1	Die Wirkungsweise von Lokalanästhetika und Toxinen.....	16
1.6.2	Strukturelle Elemente, die die Wirksamkeit der Lokalanästhetika beeinflussen	17
1.7	Fragestellung.....	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Die Patch-Clamp-Technik.....	20
2.2	Elektrophysiologische Technik.....	22
2.3	Rechnerunterstützte Datenerfassung und -auswertung	22
2.4	Präparation	23
2.5	Lösungen.....	26
2.5.1	Außenlösungen.....	26
2.5.2	Innenlösung	26
2.5.3	Lösungen für die Präparation	26
2.5.4	Toxine und kanalmodifizierende Substanzen	27
2.6	Lösungswechsel	29
2.7	Pipetten.....	30
3.	Ergebnisse	32
3.1	Zellgröße	32
3.2	Elektrophysiologische Eigenschaften des TTX-resistenten Natriumkanals.....	33
3.2.1	Spannungsabhängigkeit.....	33
3.2.2	Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik	36
3.3	Die Wirkung von Piperidinderivaten auf TTX-resistente Natriumströme	38
3.3.1	Grundlegende Eigenschaften der Blockade durch Piperidinderivate.....	38
3.3.2	Stereoselektivität der Piperidinderivate	42
4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung	52
6.	Bibliographie	54
7.	Lebenslauf	63
8.	Danksagung	65

Liste der Abbildungen:

- Abbildung 1: Verschiedene Typen sensorischer Endigungen aus primären (somatischen) Afferenzen
- Abbildung 2: Sekundärstrukturen der α - und β 1-Untereinheit des Natriumkanals
- Abbildung 3: Schema der Zustände der Natriumkanäle
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der „Patch-Clamp“-Anordnung
- Abbildung 5: Übliche Patchformen der „Patch-Clamp“-Technik
- Abbildung 6: Struktur von Tetraethylammoniumchlorid
- Abbildung 7: Struktur von Tetrodotoxin
- Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der Membrankapazität aller untersuchten Zellen
- Abbildung 9: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve für TTX-resistente Natriumströme
- Abbildung 10: Typische Strom-Spannungskurve für TTX-resistente Natriumströme
- Abbildung 11: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve des TTX-resistenten Natriumstroms in der Kontrollösung
- Abbildung 12: Verteilung der halbmaximalen Aktivierungs- und Inaktivierungspotentiale
- Abbildung 13: Konzentrations-Inhibitionskurven für tonische und phasische Blockade des TTX-resistenten Natriumstromes mit Piperidin-derivaten
- Abbildung 14: Tonische und phasische Blockade des TTX-resistenten Natriumstromes durch Piperidinderivate
- Abbildung 15: IC_{50} -Werte für den tonischen und phasischen Block in Abhängigkeit der Anzahl der C-Atome im Substituenten R

Liste der Tabellen:

- Tabelle 1: Einteilung peripherer Nervenfasern nach Gasser und Erlanger
- Tabelle 2: Struktur, IC_{50} -Werte und physikochemische Eigenschaften der Piperidinderivate

1. Einleitung

1.1 Schmerz

"Der Tod ist eine unveränderliche Größe, aber der Schmerz ist eine veränderliche, die unendlich wachsen kann."

(Georg Christoph Lichtenberg)

Das System der Schmerzempfindungen und Schmerzwahrnehmungen ist so organisiert, daß jedes Gewebe und jedes Organ auf verschiedene Weise schmerzt. Die Gründe sind folgende: die Schmerzsensoren sind dort, wo die Schmerzen ausgelöst werden, nicht einheitlich; sie wirken in der Haut zusammen mit Druck und Temperatursensoren, in der Tiefe, z.B. in den Venen, mit Chemosensoren, in den Eingeweiden, z.B. bei Koliken, mit Druck- und Spannungssensoren. Ihre Dichte unterscheidet sich von Ort zu Ort. Die Schmerzreize werden über verschiedene Nervenbahnen unterschiedlich schnell zum Rückenmark und in diesem über stammesgeschichtlich ältere und jüngere Bahnen dem Zentralnervensystem zugeleitet. Hier können sie moduliert werden und bei starken Schmerzen durch Endorphine, natürliche Opiate die dem Hypothalamus entstammen, gehemmt werden. Im zentralen Nervensystem werden sie auf Hirnstamm, Thalamus, Limbisches System und auf die Körperfühlsphäre der Großhirnrinde verteilt. Es werden also Komplexe und vielgestaltige Schmerzmuster gebildet. Was davon im Bewußtsein auftaucht ist der geringste Teil, vielfach gefiltert, gebahnt, gehemmt und moduliert.

Die Abbildung von Ort und Ursache des Schmerzreizes im Bewußtsein ist nur auf der Hautoberfläche und in Mundhöhle gut ausgeprägt, in den Eingeweiden dagegen schlecht. Schmerzsensoren der Haut erfüllen die Aufgabe der Warnung und der Schmerzmeldung. Der Eingeweideschmerz ist ein quälender Schmerz, der schlecht zu orten ist. Er strahlt weithin aus und erscheint häufig in Körperzonen (Hedsche Zonen), die mit dem erkrankten Organ in keiner Beziehung stehen. Beide Formen verteilen ihre Impulse im Gehirn unterschiedlich: die Eingeweideschmerzen sind vernetzt mit Atem- und Kreislaufregulation in der Medulla oblongata, mit Übelkeit und Schwindel; Tiefenschmerzen bewirken im Thalamus vegetative Reaktionen wie

Schwitzen und Blässe, im Limbischen System und im Stirnhirn Verstimmungen. Quetscht man sich den Finger, so folgt dem akuten hellen und schnellen Schmerz der sich länger hinziehende, quälende Schmerz: dem Schrei folgt der Fluch, der Fluchtreflex das Sich-Krümmen. Es ist die komplexe Organisation des Systems der Schmerzen, das uns die Vielstimmigkeit der Sprachen der Schmerzen verständlich macht. Die vitalen Grundgefühle Niedergeschlagenheit, Angst, Scham und Schmerz sind eng miteinander verflochten. Sie sichern das Überleben und erinnern zugleich an die Zeitlichkeit menschlichen Daseins.

Die folgenden Ebenen der Modulation der primären Schmerzentstehung können unterschieden werden:

1. Ebene des Entstehungsorts: gleichzeitige Reizung von mechano-, thermo- und sensomotorischen Rezeptoren; in der Tiefe auch Baro-, Chemo- und Osmorezeptoren;
2. Ebene der schmerzleitenden Nervenfasern zum Rückenmark;
3. Ebene der Verschaltung im Rückenmark; d.h. Rückkoppelung mit der Peripherie (Ort, Region, Reflexzone) über den N. sympathicus;
4. Ebene der Endorphinmodulationen im Rückenmark;
5. Ebene der efferenten Hemmungen (Formatio reticularis) und Bahnungen (Stimmungen, Ängste, Erwartungen);
6. Ebene der Leitungsbahnen im Rückenmark;
7. Ebene der subkortikalen Projektionen;
8. Ebene der kortikalen Repräsentation;
9. Einflußbereich des biographischen Geschichts- und Erziehungsfelds, der kulturellen Normen des erlernten Bewertens, Benennens, Verhaltens und Benehmens.

Es hängt wohl auch mit der Menschwerdung zusammen, daß unsere Gewebe und Organe so unterschiedlich wertbesetzt sind und deswegen ihren Schmerzen so verschiedene Bedeutungen zugemessen werden, die Bedrohungserlebnisse so ganz anders sein können: Das Herz schmerzt bedrohlicher als der Kopf, der Zahn quälender als der Magen, ein Gelenk unangenehmer als die Harnröhre.

Die Mehrdeutigkeit der Schmerzen hat auch in den Schwankungen der Schmerzschwelle einen Grund. Sie ist nicht erst überschritten, wenn dem Menschen ein Schmerz bewußt wird. Er kann sich vorher als Verstimmung, Reizbarkeit oder Depression äußern. Ablenkung, Erfolge, Lob, Zuwendung und Verständnis können die Schmerzschwelle anheben. Depressionen, Versagen, Enttäuschung, Entmutigung, Vernachlässigung, Vereinsamung, Erfolglosigkeit von Therapie bei chronisch schmerzenden Erkrankungen senken die Schmerzschwelle.

Die klinische Anästhesiologie hat zum Ziel, diese Schmerzzustände zu unterdrücken und für den Patienten nicht wahrnehmbar oder zumindest erträglich zu machen. Die Art des Schmerzes, akut oder chronisch, hat dabei eine entscheidende Bedeutung für die Therapie.

Akute Schmerzen wie sie während eines chirurgischen Eingriffes entstehen, werden durch die Anwendung anästhesiologischer Methoden nicht wahrgenommen. Dabei kommen zwei Hauptverfahren zum Einsatz: Die Allgemeinanästhesie (Vollnarkose), bei der nach intravenöser Verabreichung und/oder Inhalation eines Anästhetikums die Wahrnehmung von-, die Reaktion auf- und die Erinnerung an entstandene Schmerzen im Zentralnervensystem unterdrückt werden und die Lokalanästhesie (örtliche Betäubung), bei der die Weiterleitung der Information „Schmerz“ durch lokale Applikation hoher Lokalanästhetikakonzentrationen am peripheren Nerven reversibel unterbrochen (Leitungsanästhesie) und somit der Schmerz ebenfalls nicht bewußt wird. Die Applikation des Lokalanästhetikums gelingt durch die Anwendung bestimmter Techniken: Spinal- und Epiduralanästhesie, intravenöse Regionalanästhesie, Oberflächenanästhesie und periphere Nervenblockade. Neben den schmerzleitenden Fasern in einem peripheren Nerven (A δ - und C-Fasern) werden bei diesen Verfahren auch andere sensorische (A β) sowie motorische (A α , A γ) Fasern blockiert, eine Wirkung, die für die Durchführung chirurgischer Eingriffe ebenfalls willkommen ist. Bei rückenmarksnahen Leitungsanästhesien kommt es zusätzlich zu einer Blockade sympathisch präganglionärer Efferenzen (B-Fasern). Bei einer Leitungsanästhesie werden alle Modalitäten ausgeschaltet.

1.2 Physiologie der Nozizeption

Der Nozizeptor

Die Haut als Schutzhülle des Organismus ist am ehesten Verletzungen ausgesetzt. Um eine drohende Gewebeschädigung frühzeitig zu erkennen, besitzt der Organismus ein hochentwickeltes Sinnessystem. Die Nozizeptoren der Haut sind ohne Reiz nicht spontanaktiv und registrieren normalerweise nur drohende oder eingetretene Verletzungen. Nach mehrfacher schädigender Reizung oder in entzündetem Gewebe erhöhen sie ihre Empfindlichkeit.

Wird die Haut punktförmig mechanisch verletzt, so tritt sofort ein gut ortbarer, kurzdauernder, spitzer Schmerz auf (erster Schmerz). Ihm folgt ein langsam einsetzender, ausstrahlender und anhaltender Schmerz von brennender Qualität, der erheblich unangenehmer ist (zweiter Schmerz). Ebenso werden andere starke mechanische oder thermische Reize, die die Haut bedrohen oder verletzen, sowie die Folgen einer Verletzung - Entzündungen - als schmerzhaft empfunden. Auch chemische Substanzen wie Insekten- oder Schlangengifte können, in die Haut eingebracht, zu starken Schmerzen führen.

Es gibt allerdings auch Reize, die bei längerer Einwirkung das Gewebe schädigen oder zerstören, die aber selbst nicht wahrgenommen werden können; dazu zählt ultraviolette oder radioaktive Strahlung. Die hohe Schmerzempfindlichkeit der Haut ist auf Epidermis und Dermis beschränkt. So ist das Durchstechen der Haut mit der Injektionskanüle schmerzhaft, nicht dagegen das Vorschieben der Kanüle im subkutanen Fettgewebe.

In menschlichen Hautnerven (Abbildung 1) gehören über 10% der markhaltigen und mehr als 50% der marklosen Axone zu den Nozizeptoren.

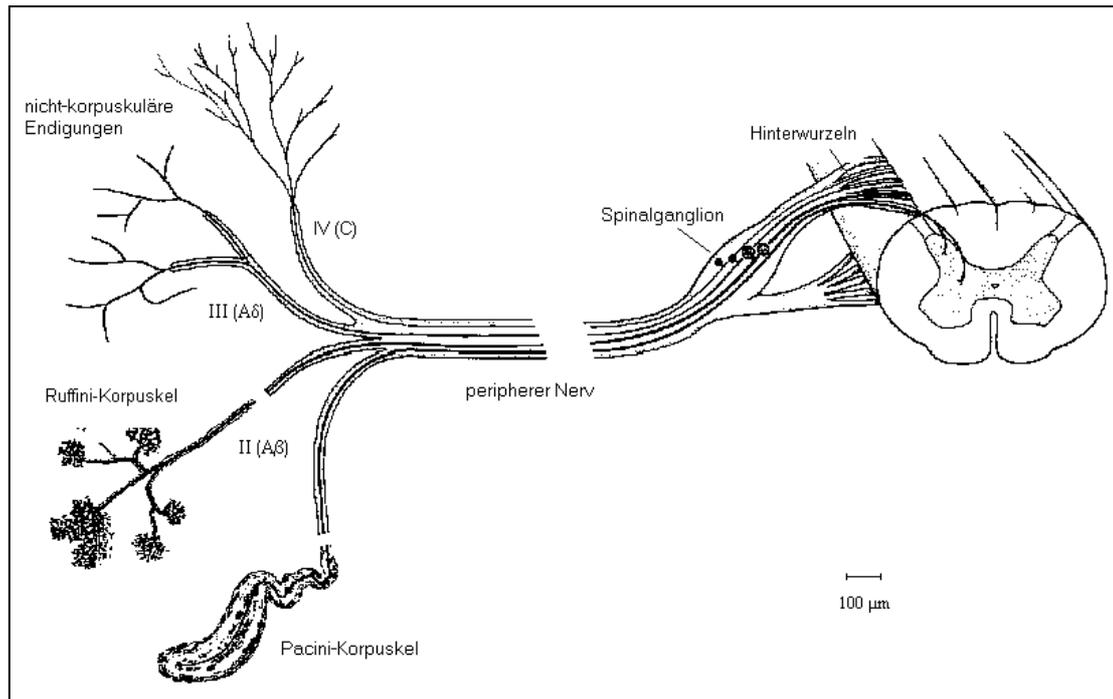


Abbildung 1: Verschiedene Typen sensorischer Endigungen aus primären (somatischen) Afferenzen. Unmyelinisierte Gruppe IV- (C-) Fasern und dünne myelinisierte Gruppe III- (Aδ)-Fasern bilden die sogenannten „freien“ nicht korpuskulären Endigungen, dicke myelinisierte Gruppe II- (Aβ)-Fasern korpuskuläre Nervenendigungen

Aufgrund ihrer Axondurchmesser sowie ihrer spezifischen Empfindlichkeit gegenüber noxischen Reizen lassen sich die unterschiedlichen Nozizeptoren zu drei großen Gruppen zusammenfassen. Nozizeptoren mit markhaltigen Axonen reagieren entweder auf starke, vorzugsweise spitze mechanische Reize (A-Mechanonozizeptoren) oder zusätzlich auch auf Hitzereize und chemische Reize (A-polymodale Nozizeptoren). Morphologisch entsprechen ihnen die Endverzweigungen markhaltiger Axone, die in die basale Epithelschicht eindringen, die aber auch dort ihre Schwann-Zellen-Umhüllung nicht verlieren. Nozizeptoren mit marklosen Axonen reagieren sowohl auf starke mechanische Reize als auch auf starke Hitze und auf verschiedene chemische Substanzen (C-polymodale Nozizeptoren); ihre genaue Struktur ist nicht bekannt. Allen Nozizeptoren ist gemeinsam, daß sie bei überschwelliger, jedoch bei noch nicht schädigender Reizung langsam adaptieren. Nach mehrmaliger noxischer Reizung oder in entzündetem Gewebe erhöht sich aber ihre Empfindlichkeit: dann reagieren sie auch auf nichtnoxische Reize oder werden spontanaktiv; diesen Vorgang nennt man Sensibilisierung. A-Nozizeptoren vermitteln den ersten Schmerz, C-Nozizeptoren den

zweiten Schmerz. Auch Juckempfindungen werden von Nozizeptoren vermittelt; es ist aber nicht bekannt, welche Untergruppe dafür verantwortlich ist.

1.3 Physiologie der Erregungsleitung

In erregbaren Zellen besteht eine Ungleichverteilung von Ionen im Extra- und Intrazellulärraum. Durch die Durchlässigkeit der ruhenden Zellmembran für Kaliumionen ergibt sich in Nervenzellen eine elektrische Potentialdifferenz von -70 bis -90 mV, das Ruhepotential, das dem mit der Nernst-Gleichung bestimmtem Kaliumgleichgewichtspotential naheliegt. Dabei ist das Zellinnere gegenüber der extrazellulären Flüssigkeit negativ geladen. Die Ursache des Ruhemembranpotentials ist die ungleiche Ionenverteilung zwischen der intra- (IZF) und extrazellulären Flüssigkeit (EZF), die durch eine Ionen-Pumpe (Na^+ / K^+ -Pumpe), welche Natriumionen aus der Zelle und K^+ -Ionen in die Zelle transportiert, aufrechterhalten wird. Dadurch bildet sich für Natriumionen ein Konzentrationsgefälle (EZF : IZF) von ca. 28 : 1 und für K^+ -Ionen von ca. 1 : 35. Aufgrund reiner Diffusion würde sich dieser Gradient sofort ausgleichen. Da jedoch mit jedem Ion auch eine Ladung mit verschoben wird, entsteht ein dem elektrochemischen Gradienten entgegengerichtetes Diffusionspotential. Die im Intrazellulärraum vorhandenen Proteine mit ihren überwiegend negativen Ladungen können die Doppellipidmembran ebenfalls nicht passieren, so daß diese Ladungen im Zellinneren fixiert sind. Mit Hilfe der Nernstschen Gleichung (Gleichung 1)

Gleichung 1:

$$E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z_x} * \ln \frac{[\text{Ion}_x]_{\text{außen}}}{[\text{Ion}_x]_{\text{innen}}}$$

- E_x = Gleichgewichtspotential des Ions [mV]
- R = allgemeine Gaskonstante ($8,31451 \text{ J (mol} \cdot \text{K)}^{-1}$)
- F = Faraday-Konstante ($9,6485 \text{ C (kg-Äquivalent)}^{-1}$)
- T = Temperatur in Kelvin
- z_x = Wertigkeit des Ions

ergibt sich dann bei Raumtemperatur ($T = 23^\circ \text{C}$) für Kalium ein Gleichgewichtspotential von $-84,7 \text{ mV}$ und für Natrium von $+67,5 \text{ mV}$, wenn man für das DRG-Neuron folgende Ionenkonzentrationen zugrunde legt (in mmol/l): $[\text{Na}^+]_i$: 10; $[\text{Na}^+]_o$: 141; $[\text{K}^+]_i$: 155; $[\text{K}^+]_o$: 5,6 (Kostyuk *et al.*, 1981).

Daraus resultiert für Natriumionen eine einwärts-, für K^+ -Ionen eine auswärts gerichtete Kraft. Die Ionenungleichverteilung liefert die potentielle Energie für die Impulsweiterleitung. Nervenimpulse sind fortgeleitete Aktionspotentiale. Während eines Aktionspotentials erhöht sich kurzzeitig die Leitfähigkeit der Membran für Natriumionen. Es kommt zur Umkehr der Membranspannung, Depolarisation, mit Näherung an das Natriumgleichgewichtspotential. Die folgende spontane Abnahme der Natriuminaktivierung und die Zunahme der Kaliumleitfähigkeit führt zur Repolarisation der Membran.

Im Zuge eines Aktionspotentials kommt es durch elektrotonische Ausbreitung der Potentialänderung zur Depolarisation benachbarter Membranbezirke und bei Erreichen einer bestimmten Schwelle auch dort zur Ausbildung eines Aktionspotentials und damit zur Fortleitung der Erregung. Die Leitungsgeschwindigkeit einer Nervenfasern (Tabelle 1) ist abhängig von der Amplitude des Natriumeinstroms einerseits und dem Faserdurchmesser, dem Axonwiderstand und der Membrankapazität andererseits. Besonders schnell ist die Erregungsausbreitung im markhaltigen Nerven. Nur an den Ranvierschen Schnürringen bildet sich ein Aktionspotential aus und wird elektrotonisch über die Internodien, bestehend aus Membranschichten der Schwann-Zellen, auf benachbarte Schnürringe übergeleitet (saltatorische Fortleitung).

Die für Ruhe- und Aktionspotential, Natrium- und Kaliumleitfähigkeit notwendigen molekularen Strukturen in erregbaren Membranen sind Ionenkanalproteine, die selektiv für eine Ionenart und in Abhängigkeit des Membranpotentials als Pore wirken. Besonders bedeutend ist der für die Natriumpermeabilität zu Beginn eines Aktionspotentials verantwortliche und daher intensiv untersuchte Natriumkanal. Der einer Depolarisation der Membran folgenden schnellen Zunahme der Natriumleitfähigkeit liegt eine Aktivierung dieser Kanäle in einen offenen, leitenden Zustand zugrunde. Die sich anschließende langsame Abnahme der Natriumleitfähigkeit, deren Verlauf mehrere exponentielle Komponenten erkennen läßt, entspricht einer Inaktivierung der Kanäle. Die Kanäle befinden sich dann in einer oder mehreren Zustandsformen, aus der heraus sie nicht mit einer Aktivierung auf

Depolarisation reagieren können. Wenn die Membran repolarisiert wird, kehren die Kanäle nach und nach in einen nichtleitenden, ruhenden Zustand zurück, in dem sie erneut aktivierbar sind. Die Geschwindigkeiten, mit der Natriumkanäle in die unterschiedlichen Konformationen übergehen, ist vom Membranpotential abhängig (Hodgkin, Huxley, 1952; Hille, 1992).

Fasertyp	Funktion	mittlerer Faserdurchmesser	mittlere Leitungsgeschwindigkeit
A α	Primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch zu Skelettmuskeln	15 μm	100 m/s
A β	Hautafferenzen für Berührung und Druck	8 μm	50 m/s
A γ	Motorisch zu Muskelspindeln	5 μm	20 m/s
A δ	Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption	< 3 μm	15 m/s
B	Sympathisch präganglionär	3 μm	7 m/s
C	Hautafferenzen für Nozizeption, sympathische postganglionäre Efferenzen	1 μm (marklos!)	1 m/s

Tabelle 1: Die Einteilung peripherer Nervenfasern nach Gasser und Erlanger (Gasser und Erlanger, 1929) erfolgt anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit in myelinisierte A α -, A β -, A γ -, A δ - und B- sowie unmyelinisierte C-Fasern. Den unterschiedlichen Fasertypen werden dabei unterschiedliche Größen und Modalitäten zugeschrieben.

1.4 Natriumkanäle

Natriumkanäle sind aufgrund ihrer entscheidenden Bedeutung für die Entstehung und Weiterleitung der Aktionspotentiale sehr gut untersucht: So kennt man genau das spannungsabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten, es wurden eine Reihe von Reaktionsmodellen für das Öffnungs- und Schließungsverhalten des Kanals entwickelt, und es ist eine große Anzahl pharmakologischer Untersuchungen an diesen Kanälen durchgeführt worden. Das Natriumkanalprotein muß schnell einen hohen Natriumionenfluß einschalten können, muß aber den Fluß anderer Ionen, vor allem der Kaliumionen, weitgehend verhindern. Die Natriumkanäle müssen also selektiv sein. Diese Selektion geschieht durch den sogenannten „Selektivitätsfilter“. Dieser bildet

den engsten Teil des Kanals und lässt zunächst nur Ionen mit der gleichen Ladung passieren. Anionen werden deshalb durch ihre negative Ladungen am Filter ausgeschlossen. Um Kalium- oder Natriumionen von ihrer Hydratationshülle zu befreien, sind in der Kanalpore negativ geladene Aminosäuren angeordnet, die eine bestimmte Geometrie aufweisen müssen. Diese Geometrie ist unterschiedlich ausgeprägt, je nachdem ob es sich um Natrium- oder Kaliumkanäle handelt. So passieren als kleine Kationen Lithiumionen recht gut den Natriumkanal; Kaliumionen dagegen werden fast vollkommen selektiert.

Auch der molekulare Aufbau des Natriumkanals ist bekannt (Zur Übersicht siehe Marban *et al.*, 1998): Eine sogenannte Domäne des eigentlichen Kanal-moleküls besteht aus sechs die Membran durchquerenden α -Helices, Segmente genannt, die durch abwechselnd extra- und intrazelluläre Aminosäureketten verbunden sind. Bei Natrium- und Calciumkanälen lagern sich 4 ähnliche und miteinander verbundene Domänen zusammen und bilden den Kanal (Abbildung 2). In jeder Domäne enthält Segment 4 eine α -Helix, in der sich wiederholt eine positiv geladene und zwei hydrophile Aminosäuren abwechseln. Änderungen der Membranspannung üben auf diese geordnete, geladene Struktur Kräfte aus, die offenbar den räumlichen Aufbau des Moleküls so ändern, daß sich der Kanal öffnet oder schließt. Man kann beim Öffnen der Kanäle den sogenannten Torstrom messen, der der Ladungsverschiebung im Molekül entspricht. Werden die geladenen α -Helices in Segment 4 durch Mutagenese verändert, so beeinflusst dies stark die Spannungsabhängigkeit des Kanals.

Die Inaktivierung des offenen Kanals geschieht durch eine intrazelluläre Kette von Aminosäuren (IFM-Motiv: Isoleuzin, Phenylalanin, Methionin – in der Abb. 2 durch ein „h in einem Kreis“ gekennzeichnet) zwischen Motiv III und IV. Diese Kette legt sich nach Aktivierung des Kanals in die geöffnete Pore und verschließt sie von innen (Eaholtz *et al.*, 1994). Die Inaktivierung kann durch intrazellulär applizierte proteolytische Enzyme aufgehoben werden, und ganz spezifisch kann sie durch Antikörper, die an das IFM-Motiv der Kette binden, blockiert werden. Die Spannungsabhängigkeit wie die Inaktivierung der Natriumkanäle können somit genau definierten Molekülanteilen zugeordnet werden.

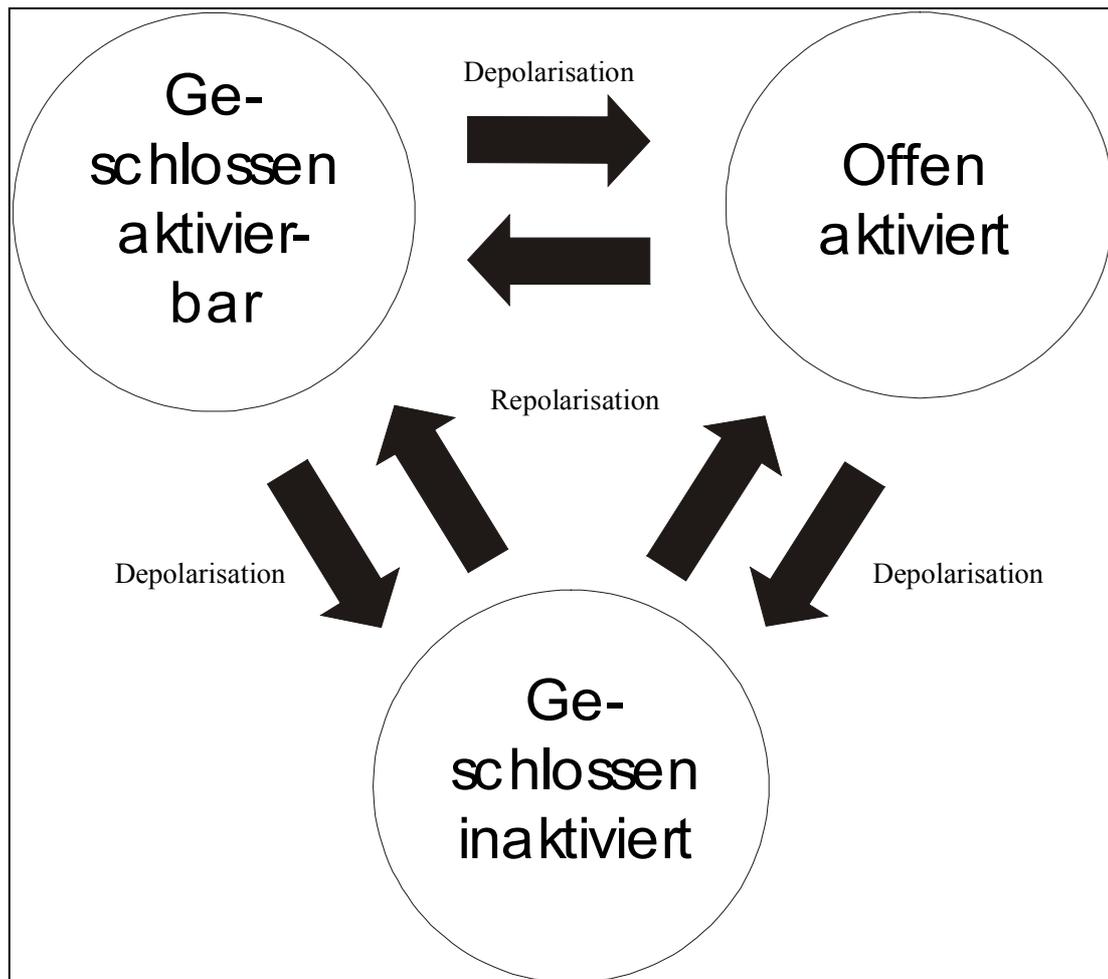


Abbildung 3: Schema der Zustände der Natriumkanäle. Der Zustand „geschlossen aktivierbar“ kann bei Depolarisation in die Zustände „offen aktiviert“ oder „geschlossen inaktiviert“ übergehen. Auch aus dem „offen aktivierten“ Zustand fördert anhaltende Depolarisation den Übergang in den „geschlossen inaktivierten“ Zustand. Nur durch Repolarisation kann der Kanal schließlich in den „geschlossen aktivierbaren“ Zustand zurückkehren.

Vom aktivierbar-geschlossenem Zustand geht der Kanal durch Depolarisation in den Offenzustand über. Von dort aus erreicht der Kanal spontan den inaktiviert-geschlossenen Zustand und kann zum aktivierbar-geschlossenen Zustand nur durch eine Repolarisation der Membran zurückgeführt werden.

1.5 Der TTX-resistente Natriumkanal

Nachdem neuronale TTX-resistente Aktionspotentiale in sensorischen Ganglien der Maus von Yoshida und Matsuda (1979) zum ersten Mal beschrieben wurden, sind die Eigenschaften der dieser Aktionspotentiale unterliegenden TTX-resistenten Natriumströme von zahlreichen Arbeitsgruppen genauer untersucht worden.

Dabei stellte sich heraus, daß TTX-resistente Natriumströme eine deutlich höhere Aktivierungsschwelle haben. Die Potentialabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung TTX-resistenter Natriumströme liegt etwa 20 - 30 mV höher als für TTX-sensitive Natriumströme der gleichen Präparation. Die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung ist deutlich langsamer. Die Erholung von der Inaktivierung ist bei TTX-resistenten Strömen um den Faktor 10 schneller als bei TTX-sensitiven (Elliott und Elliott, 1993).

Auf Einzelkanalebene zeigte sich in diversen Untersuchungen (Roy *et al.*, 1994; Bräu *et al.*, 1995; Motomura *et al.*, 1995), daß der TTX-resistente Natriumkanal stets eine kleinere Einzelkanalleitfähigkeit aufwies als der TTX-sensitive.

Inzwischen ist auch die Aminosäuresequenz des neuronalen TTX-resistenten Natriumkanals bekannt. Dieser Kanal wurde unabhängig voneinander in den zwei Arbeitsgruppen um Wood und Akopian sowie Hunter und Sangameswaran kloniert. Die Natriumkanäle, die beide Gruppen sequenzierten, kommen an kleinen Spinalganglienzellen von neugeborenen sowie erwachsenen Ratten vor (Akopian *et al.*, 1996; Sangameswaran *et al.*, 1996). Naylor und Mitarbeiter klonierten 1997 den humanen TTX-resistenten Natriumkanal und bewiesen hiermit dessen Vorkommen im menschlichen peripheren Nervensystem (Naylor *et al.*, 1997).

Obwohl die elektrophysiologischen Eigenschaften dieses Kanals bereits gut untersucht sind, ist über seine Funktion im peripheren sensorischen Nervensystem wenig bekannt. Allerdings deuten zahlreiche Hinweise auf die Rolle des TTX-resistenten Natriumkanals bei der Impulststehung und Weiterleitung im peripheren Schmerzsystem hin.

So kommen TTX-resistente Natriumströme an kleinen Spinalganglienzellen vor. Diese Zellen sind mit A δ - und C-Fasern verbunden (Harper und Lawson, 1985) und können langsame, gegenüber TTX resistente Aktionspotentiale ausbilden (Yoshida und Matsuda, 1979; Villière und McLachlan, 1996).

Desweiteren hat der TTX-resistente Natriumstrom eine langsame Kinetik (Elliott und Elliott, 1993; Ogata und Tatebayashi 1993). Die Kinetik dieser Ströme wäre für schnell fortgeleitete Aktionspotentiale dicker myelinisierter Nerven zu langsam, für langsame Aktionspotentiale in nozizeptiven C-Fasern ist sie jedoch völlig ausreichend (siehe Tabelle 1).

Die physiologischen Eigenschaften zeigen, daß dieser Kanal zur Impuls- und somit Schmerzentstehung in pathologisch veränderten Nerven beitragen kann. Gerade an Nervenfasern, deren Membranpotential durch eine Schädigung weniger negativ ist, kann der TTX-resistente Natriumkanal noch zur Impulsentstehung beitragen, da sein Aktivierungs- und Inaktivierungspotential deutlich höher liegen als das TTX-sensitiver Natriumkanäle. Zusätzlich unterstützt die schnellere Erholung nach der Inaktivierung die repetitive Erregbarkeit (Elliott und Elliott, 1993).

1.6 Lokalanästhetika

Seit langer Zeit sind den Menschen Kräuter und Gifte bekannt, die das Zentralnervensystem beeinflussen. Von den Ureinwohnern Perus weiß man seit dem 19. Jahrhundert, daß sie die Blätter der Coca-Pflanze kauten, um sich in einen tranceähnlichen Zustand zu versetzen, der sie keine Schmerzen mehr verspüren ließ. Versuche von Gaedcke (1855), die wirksame Substanz aus der Coca-Pflanze zu isolieren, endeten mit der Extraktion des Alkaloids Erythroxyton, und durch Niemann (1860) schließlich mit der Isolierung von Cocain. Die ersten überlieferten Anwendungen erfolgten durch einen peruanischen Armeelieutenant. Die Möglichkeit Cocain als Lokalanästhetikum in der Klinik zu verwenden, wurde erstmals von Koller (1884) erwähnt, nachdem er es in einen Bindehautsack injiziert hatte. Die vielfältigen Verwendungen des Cocains brachten auch die Erkenntnis mit sich, daß es neben Suchterscheinungen auch allergische Reaktionen im Körper herbeiführen kann.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde nach neuen chemischen Substanzen gesucht, die die Wirkungsweise eines Lokalanästhetikums hatten, jedoch nicht die von Cocain bereits bekannten Nebenwirkungen. Nach der chemischen Identifikation des Cocain als ein Benzoessäureester wurden Derivate desselben synthetisiert und am Menschen getestet. Doch auch die Benzoessäureester-Derivate hatten unerwünschte Nebenwirkungen, die sich in Form von allergischen Reaktionen zeigten. So wurde die Suche nach einem

idealen Lokalanästhetikum weitergeführt. Der große Durchbruch gelang Löfgren, der 1943 ein Lokalanästhetikum namens Lidocain (2-Diethylaminoacet-2,6-Xylidid) präsentierte, das statt eines Esterderivates ein Amidderivat der Diethylaminoacetsäure darstellte und relativ selten allergische Reaktionen zeigte. Weitere synthetisierte Aminoamidderivate sind Mepivacain (1-Methyl-2,6-Hexahydropicolinylxylid), Bupivacain (1-Butyl-2,6-Hexahydropicolinylxylid), Etidocain (2-N-Ethylpropylamino-2,6-Butyroxyid) und Prilocain (2-Propylamino-2-Propionotoluid).

1.6.1 Die Wirkungsweise von Lokalanästhetika und Toxinen

Lokalanästhetika werden dazu benutzt, die Erregung und ihre Fortleitung in Nerven zu unterbrechen und damit die Weiterleitung von Aktionspotentialen aus „Schmerzrezeptoren“ zu unterdrücken. Heutzutage weiß man, daß viele der bekannten Gifte und Lokalanästhetika ihre Wirkung auf Nerven dadurch entfalten, daß sie Ströme durch Ionenkanäle blockieren. Auch mit Hilfe pharmakologischer Experimente können Kanäle anhand ihres Blockierungsverhaltens, d.h. Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Lokalanästhetikum, voneinander differenziert werden. Für viele Kanäle existieren spezifisch blockierende Substanzen; die wohl bekanntesten sind Tetrodotoxin (TTX) für Natriumkanäle und Tetraethylammonium (TEA) für Kalium-Kanäle. Eine mögliche Erklärung der Wirkungsweise dieser Substanzen basiert auf der Rezeptor-Theorie, welche besagt, daß für jede Substanz ein spezifischer Rezeptor vorhanden ist. Über die Toxine TTX und TEA war bereits sehr früh bekannt, daß sich von der extrazellulären Seite Blockierungseffekte in Form einer Abnahme der Stromamplitude nachweisen ließen. Dies deutet auf einen Rezeptor am Kanaleingang hin, wodurch das Toxin den Kanal entweder wie ein Stopfen blockiert oder zu konformativen, bzw. je nach Art der Bindung auch zu einer chemischen Änderung des Kanalproteins führt, die wiederum eine energetische Begünstigung des geschlossenen Zustands bedingt. Die Aminosäuren, die die Bindungsstelle in der α -Untereinheit bilden, konnten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden identifiziert werden (Ragsdale *et al.*, 1994). Die Annahme, daß der Rezeptor innerhalb des Kanals oder innerhalb der Membran zu finden ist, wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Geschwindigkeit der Blockierung mit zunehmender Lipidlöslichkeit steigt.

Untersuchungen mit verschiedenen Lokalanästhetika führten zu der erweiterten Hypothese, daß sowohl hydrophile wie auch hydrophobe Wege zu einem Pharmakon-Rezeptor-Komplex führen (Hille, 1977; Hondeghem und Katzung, 1977; Schwarz *et al.*, 1977). Der hydrophile Weg führt durch offene Kanäle und wird von protonierten bzw. geladenen Molekülen genauso genutzt wie von neutralen Aminen. Der hydrophobe Weg wird von lipidlöslichen Molekülen genutzt, die in der Lage sind auch an einen geschlossenen Kanal zu binden, indem sie über die Lipidmembran zum Rezeptor diffundieren.

1.6.2 Strukturelle Elemente, die die Wirksamkeit der Lokalanästhetika beeinflussen

Von vielen strukturell unterschiedlichen Substanzklassen wie Alkoholen, Antidepressiva, Antikonvulsiva und Anitarrhythmika ist eine lokalanästhetische Wirkung bekannt. Klinisch gebräuchliche Lokalanästhetika aber bestehen typischerweise aus einem aromatischen Ring, der über eine kurze Alkylkette und eine Amid- oder Esterbrücke mit einer Aminogruppe verbunden ist (Tabelle 2). Damit besitzen Lokalanästhetika sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften. Die Aminogruppe ist protonierbar und macht Lokalanästhetika zu schwachen Basen.

Drei physiko-chemische Eigenschaften werden häufig im Zusammenhang mit lokalanästhetischer Potenz diskutiert: das Molekulargewicht, der pK_a -Wert und die Lipidlöslichkeit.

Das Molekulargewicht ist ein für die Pharmakonwirksamkeit unspezifisches Kriterium. Es kann direkt aus der chemischen Formel einer Substanz berechnet werden, bestimmt die Geschwindigkeit, mit der das Molekül durch eine Lösung diffundiert und gibt zusammen mit anderen strukturellen Elementen Informationen über den Raum, den es einnimmt.

Da Lokalanästhetika mit in Membranen eingebetteten Ionenkanalproteinen interagieren und bei klinischer Anwendung ihren Wirkort erst nach Passage anatomischer Strukturen, wie dem Epi- und Perineurium, erreichen, bestimmen Membranpermeations- und Adsorptionsprozesse die effektive Konzentration am Wirkort. Von einer per se gut lipidlöslichen, nicht protonierten und somit elektrisch neutralen Basenform eines tertiären Amins ist potentiell eine bessere

Membrangängigkeit zu erwarten. Auch wenn das diesbezügliche Verhalten eines Lokalanästhetikums in experimentellen, simplen Systemen nicht direkt auf das Verhalten gegenüber neuronalen Membranen im lebenden Organismus übertragen werden kann, gewinnen der pK_a -Wert und die Lipidlöslichkeit als orientierende Parameter an Bedeutung.

Der pK_a -Wert einer schwachen Base gibt denjenigen pH-Wert an, bei dem das Molekül zur Hälfte in nicht protoniertem Zustand vorliegt und damit lipidlöslich ist. Allerdings ist der in wäßriger Lösung bestimmte pK_a -Wert nicht ohne weiteres auf mit Membranen assoziierte Lokalanästhetika zu übertragen. An der Membran existieren fixe, mit polaren Gruppen der Phospholipide, Aminosäureresten von Proteinen und sauren Kohlenwasserstoff-Substituenten assoziierte elektrostatische Ladungen. Zudem tragen bis zu 15% der Phospholipide in neuronalen Membranen negative Ladungen, die sowohl protonierte Lokalanästhetika wie auch Protonen akkumulieren können. Diese zwei Faktoren beeinflussen und verändern effektiv den in wäßriger Lösung bestimmten pK_a -Wert von an Membranen adsorbierten Lokalanästhetika.

Ich beziehe mich hier auf die von Strichartz *et al.* (1990) veröffentlichten spektrophotometrisch bestimmten Daten für die pK_a -Werte, sowie die daraus berechneten Partitionskoeffizienten P gebräuchlicher Lokalanästhetika (Tabelle 2). Diese zwei Parameter dienen uns als Maß für die Lipidlöslichkeit.

Tatsächlich haben Struktur-Wirkungs-Studien systematische Beziehungen zwischen Potenz und Lipidlöslichkeit gezeigt (Courtney & Etter, 1983; Wildsmith *et al.*, 1989) und geben Anlaß zur Vermutung, daß eine Interaktion mit hydrophoben Domänen an Membranen eine Voraussetzung für die Entfaltung pharmakologischer Aktivität sein muß. Allerdings wird auch der Beitrag anderer struktureller Elemente zur lokalanästhetischen Potenz immer wieder deutlich: Amide, Ester und Ether zeigen jeweils unabhängige Beziehungen zwischen lokalanästhetischer Potenz und Lipidlöslichkeit. So sind einige Antikonvulsiva, z.B. das zyklische Amid Phenytoin, weniger potent, andere Substanzen wie die Ether Mexiletin, Propranolol, Alprenolol und der Ester Procain dagegen wesentlich potenter an neuronalen Membranen als lineare Amide vergleichbarer Lipidlöslichkeit (Courtney, Etter, 1983; Wildsmith *et al.*, 1989).

Der aromatische Ring eines Lokalanästhetikums ist ein entscheidendes hydrophobes Element des Moleküls. Die ortho-Methylgruppen der Xylidin-Derivate (Bupivacain,

Ropivacain, Mepivacain, Etidocain, Lidocain) steigern die Hydrophobizität zusätzlich, verhindern aber auch eine senkrechte Ausrichtung des Carbonyl-Sauerstoffs der Amidbrücke zum aromatischen Ring und können so dessen Apposition an eine lipophile Bindungsstelle sterisch behindern. Bei Stereoisomeren mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom in der Mitte zweier konjugierter Ringe an der üblicherweise vom aromatische Ring besetzten Region konnte eine größere Stereospezifität für den phasischen Block gefunden werden bei gleicher Hydrophobizität und Penetrationsfähigkeit ins neuronale Gewebe (Akermann *et al.*, 1969; Akermann 1973; Roth *et al.*, 1972).

1.7 Fragestellung

Über die Bedeutung der Pharmakologie TTX-resistenter Natriumkanäle kann bislang nur spekuliert werden, da ihre physiologische und auch pathophysiologische Funktion im peripheren Nervensystem nicht ausreichend geklärt ist.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, grundlegende Interaktionen der in der Klinik anwendbaren Piperidinderivate Mepivacain, Ropivacain, Bupivacain, als auch der experimentellen Substanzen 1-Pentyl-2,6-Hexahdropicolinylxylyd (RAD-393) und 1-Oktyl-2,6-Hexahdropicolinylxylyd am TTX-resistenten Natriumkanal aufzuzeigen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Wirkung der jeweiligen Stereoisomere dieser Substanzen gelegt.

TTX-resistente Ströme wurden dabei an kleinen, enzymatisch dissoziierten Spinalganglienzellen erwachsener Ratten mittels der „Patch-Clamp“-Methode untersucht, wobei die „Whole-cell“-Konfiguration zum Einsatz kam.

2. Material und Methoden

2.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die „Patch-Clamp“-Methode wurde erstmals von Neher und Sakmann (1976) und später in ihrer hochauflösenden Form von Hamill *et al.* (1981) beschrieben. Das Prinzip dieser Methode ist es, Ladungsträger, die die Membran einer Zelle durchqueren, zu messen. Hierzu wird über einen Unterdruck ein dichter, mechanisch stabiler und elektrisch hochohmiger Kontakt zwischen einer Glaspipette und der Zellmembran geschaffen („Cell-attached“-Konfiguration), der einen elektrischen Widerstand im Giga-Ohm Bereich („gigaseal“) hat. Nur so ist ein sehr geringes elektrisches Rauschen und somit eine Auflösung sogar einzelner Ionenkanäle möglich. In der Grundkonfiguration wird die Pipette an einen Klemmverstärker angeschlossen. Über eine Regelschaltung wird das Potential der Membran auf einem bestimmten Sollwert gehalten. Der hierfür benötigten Strom (Klemmstrom) entspricht dem

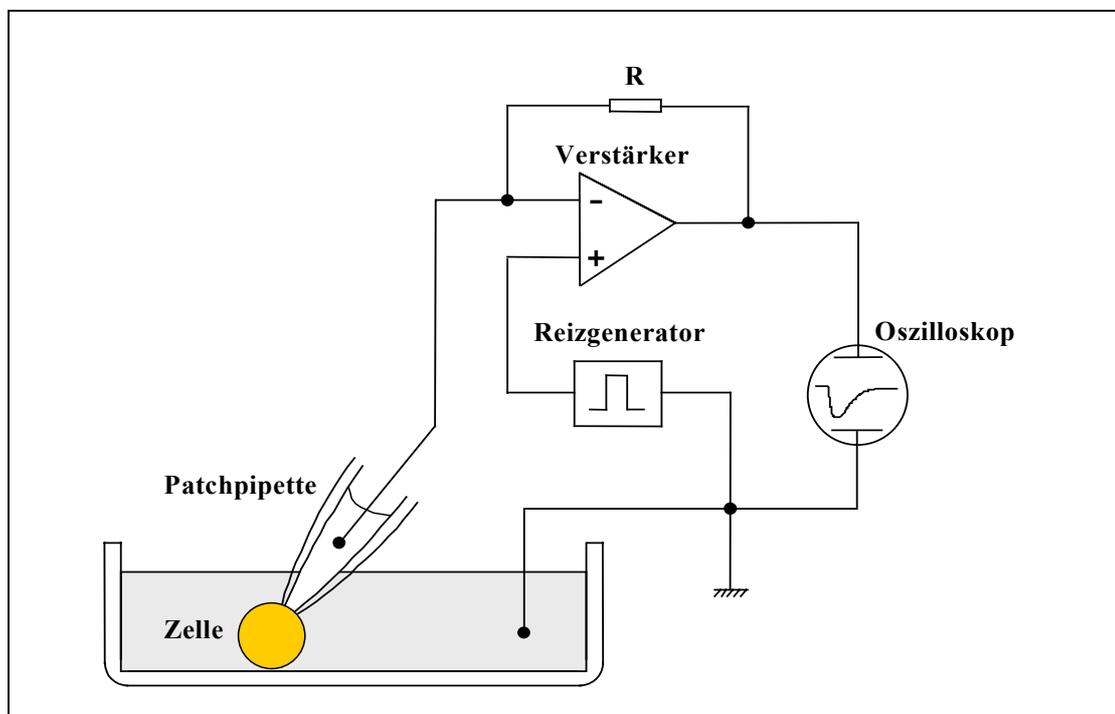


Abbildung 4: Schematische Darstellung der „Patch-Clamp“-Anordnung (modifiziert nach Bräu *et al.*, 1992)

Strom, der bei Leitfähigkeitsänderungen der Membran durch sich öffnende Ionenkanäle fließt und damit dem Ionenstrom selbst.

Bei der „Patch-Clamp“-Technik sind verschiedene Patchformen möglich: Die wichtigsten sind „Whole-cell“ und die bereits oben beschriebene „Cell-attached“ sowie die zellfreien („cell-free“) Patchformen „Inside-out“ und „Outside-out“. Ausgehend von der „Cell-attached“-Konfiguration kann man entweder durch Zurückziehen der Pipette einen kleinen Membranfleck („patch“) herausreißen und erhält somit den „Inside-out-Patch“. Oder man saugt durch stärkeren Unterdruck ein Loch in die Membran, so erhält man den „Whole-cell-Patch“. und gegebenenfalls anschließend durch langsames Zurückziehen der Pipette den „Outside-out-Patch“.

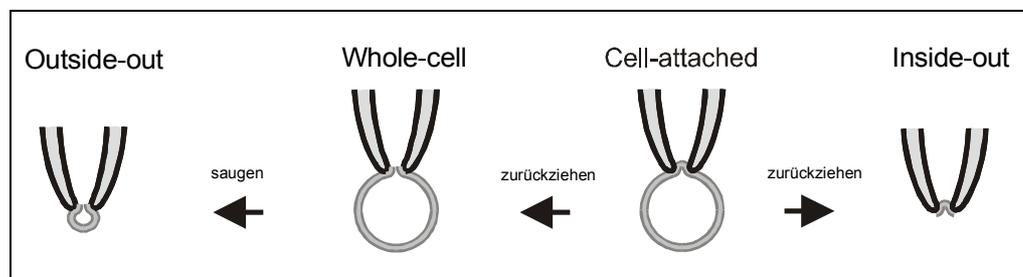


Abbildung 5: Übliche Patchformen der „Patch-Clamp“-Technik

Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit der „Whole-cell-Patch“-Methode ausgeführt. Mit dieser Konfiguration hat man einen elektrischen Zugang zur Intrazellulärseite der gesamten Zelle. Man kann nun entweder das Membranpotential der Zelle messen oder bei Vorgabe eines festen Potentials („voltage clamp“) den bei diesem Potential fließenden Gesamtionenstrom durch die Zellmembran. Durch Applikation von diversen Pharmaka oder Toxinen kann man nun deren Wirkung auf die verschiedenen Ionenströme der Zelle untersuchen. Doch die so gemessenen Ionenströme fließen durch alle Ionenkanäle in der Zelle und können somit nicht auf Einzelkanalebene untersucht werden.

2.2 Elektrophysiologische Technik

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde der „Patch-Clamp“-Verstärker Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) verwendet. Dessen Eingang war über einen chlorierten Silberdraht mit der „Patch“-Pipette verbunden. Um ein hochfrequentes Rauschen zu unterdrücken, wurden die ermittelten Ströme durch einen 2 bis 10 kHz-Tiefpassfilter geleitet, mit einem AD-Wandler (Labmaster TM-40 AD/DA board, Scientific Solutions, Solon, OH, USA) digitalisiert und zur weiteren softwaregestützten Verarbeitung auf der Festplatte eines Personal Computer (386DX-40MHz, VGA, WIN95) gespeichert.

Ein inverses Mikroskop (Modell IM, Zeiss, Oberkochen, Bundesrepublik Deutschland) mit 63-, 160- und 400-facher Vergrößerung wurde zum Durchmustern der Präparateschalen, Annähern und Aufsetzen der Pipetten auf die Membranen verwendet.

Der Pipettenhalter, der in einem 45°-Winkel justiert wurde, kann über eine Fernsteuerung in einem 3-achsigen Mikromanipulator (HS6/2, Maerzhäuser, Wetzlar, Deutschland) mit zwei über eine Steuereinheit (MAC 4000, Firma Maerzhäuser) motorbetriebenen Achsen positioniert werden. Zur Vermeidung von Erschütterungen und Driftbewegungen zwischen dem Pipettenhalter und der Präparat-Schalen-Halterung, die manuell zur Suche nach Hinterwurzelganglienzellen in der Horizontalebene über dem Objektiv verschoben werden kann, wurden beide auf einem schwingungsdämpfenden Tisch (*IsoStation Vibration Isolated Workstation*, Newport, Irvine, CA, USA) mit druckluftgefüllten Dämpfungselementen plaziert.

Alle Registrierungen wurden bei einer Temperatur von 24 ± 2 °C gemacht. Bei allen Experimenten wurde eine Serienwiderstands- und Kapazitätenkompensation durchgeführt.

2.3 Rechnerunterstützte Datenerfassung und -auswertung

Zur eingehenden Analyse des Datenbestandes wurden unterschiedliche Methoden herangezogen. Mit Hilfe des spezifischen, zum „Patch-Clamp“-Verstärker voll kompatiblen Computerprogramms pCLAMP Version 6.0 (Axon Instruments, Foster

City, CA, USA) wurden die Daten registriert und auf einer Festplatte aufgezeichnet. Hierbei empfiehlt sich aufgrund der großen Datenmenge ein Speicherplatz von mindestens 500 Megabyte zu wählen. Mit diesem Programm ließen sich auch diverse Impulsprotokolle vorgeben (siehe Ergebnisteil), die an die jeweiligen Experimentierbedingungen angepaßt wurden.

Zur weiteren Datenanalyse diente das Programm ClampFit 6.0 (Axon Instruments, s.o.), das zur Bestimmung der jeweiligen Spitzenströme herangezogen wurde. Eingehende graphische Darstellungen, Kurvenanpassungen und statistische Analysen wurden mit FigP für Windows 2.7 (Biosoft, Cambridge, England), sowie mit Origin 4.1 und 5.0 (Microcal™ Software, Northampton, USA) durchgeführt. Das Datenverwaltungsprogramm Access 7.0 (Microsoft GmbH, München, Deutschland) diente zum Anlegen einer Datenbank. Hiermit konnten auf eine einfache und effiziente Art die Versuchsergebnisse nach bestimmten Ereignissen durchforscht und gefiltert werden. Ebenso ließen sich so die Datenbestände zur weiteren Auswertung besser koordinieren. Für die tabellarischen und stochastischen Darstellungen wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 7.0 (Microsoft) verwendet.

Numerische Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean/ Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Sofern sich der SEM größer als die Symbolgröße der Datenpunkte darstellen ließ, wurde er durch einen Fehlerbalken abgebildet. Diese Fehlerdarstellung wurde gewählt, da es sich bei den angegebenen Werten um physikalische Meßgrößen handelt, und der Standardfehler des Mittelwertes ein Maß für die Güte einer Messung ist. Eine nicht-lineare Anpassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven und Strom-Spannungs-Kurven erfolgte mittels einer Funktion der Summe der kleinsten Abweichungsquadrate (nonlinear least-squares fit). Die entsprechenden Funktionen sind im Ergebnisteil dargestellt.

Die in der Arbeit angegebenen Spannungen beziehen sich auf die Innenseite in Differenz zur Außenseite der Zellmembran. Einwärtsströme in die Zelle sind mit negativem Vorzeichen versehen und in Abbildungen nach unten dargestellt.

2.4 Präparation

Zur Gewinnung der für die Messungen benötigten Spinalganglienzellen wurden ausschließlich zwischen 6 und 8 Wochen alte Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts und

aus eigener Zucht verwendet. Die Ratten wurden mit einer Kommtion sowie durch eine anschließende rasche zervikale Dislokation getötet. Der Rattentorso wurde eröffnet, die Spinalganglienzellen herauspräpariert, und in eine externe calcium- und magnesiumfreie Tyrode-Lösung (wie in Kapitel 2.5 beschrieben) gelegt. Danach wurden die Spinalganglienzellen unter einem Mikroskop von den Nervenfasern gesäubert und durch einen Schnitt eingekerbt. Jetzt konnten sie in der Enzymlösung I (Kollagenase + Trypsin) für 45 min inkubiert werden. Das Trypsin dient zur Spaltung der Peptidbindungen und säubert außerdem die Membranoberfläche. Die Kollagenase dagegen löst das Bindegewebe auf, damit sich die Zellen aus dem Gewebeverband herauslösen können. Deshalb sind für die Präparation beide Enzyme notwendig. Während der Enzymeinwirkung wurde die Präparatschale in einer motorgetriebenen, sich in der Horizontalebene mit einer Frequenz von etwa 110/min vor- und rückwärts bewegenden Aluminiumkammer aufbewahrt. Die Kammertemperatur wurde über ein Kühlsystem (Colora WK3, Colora Meßtechnik, Lorch, Deutschland) konstant auf $37,0 \pm 0,4$ °C gehalten. Anschließend wurden die Ganglien dreimal mit calcium- und magnesiumfreier externer Tyrode-Lösung gespült, um ein sorgfältiges Auswaschen des Trypsins sowie der Kollagenase zu erreichen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen der Enzymlösung II (DNAse + Trypsin-Inhibitor) für 5 Minuten ausgesetzt. Danach wurden die Zellen mit calcium- und magnesiumhaltiger externer Tyrode-Lösung gespült, in eine Schale mit einem speziellen Nährmedium gelegt. Um aus den enzymatisch behandelten Spinalganglien nun die Hinterwurzelganglienzellen zu erhalten, wurden diese dissoziiert, indem sie durch drei feine Glaspipetten mit kleiner werdendem Durchmesser nacheinander angesaugt und wieder ausgestoßen wurden. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in 4-6 Kulturschalen (TC, 35,0/10 mm, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland), die mit dem Nährmedium versehen wurden, bei 95% O₂, 5% CO₂ und einer Temperatur von 24 °C aufbewahrt. Der Innenraum des Inkubators wurde bewußt einer Carbogengasatmosphäre ausgesetzt, um den pH-Wert der Nährlösung bei $7,4 \pm 0,1$ konstant zu halten. Die Zellen sollten außerdem für mindestens 2 Stunden erschütterungsfrei liegen, damit sie sich auf den Schalenboden absetzen konnten. Die notwendige Bodenhaftung ist eine entscheidende Grundvoraussetzung für die oben beschriebene „Whole-cell-patch-clamp“-Technik.

Die Zellen wurden vom ersten bis zum dritten Tag nach der Präparation für die Experimente verwendet. Die Eigenschaften der Natriumströme, z.B. die Stromamplitude oder der Zeitverlauf, wiesen in dieser Phase keine Veränderungen auf.

2.5 Lösungen

2.5.1 Außenlösungen

- **externe Tyrode-Lösung mit TEA** (Tetraethylammoniumchlorid) **und TTX** (Tetrodotoxin) (mit Tris[hydroxymethylaminomethan]-Puffer auf pH 7.4 eingestellt):
110 mmol/l CholinCl, 35 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 6 mmol/l Glucose, 10 mmol/l HEPES (4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazin-ethansulfonsäure), 10 mmol/l TEA, 100 nmol/l TTX
- **externe Tyrode-Lösung** (mit Tris-Puffer auf pH 7.4 eingestellt):
145 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 6 mmol/l Glucose, 10 mmol/l HEPES
- **Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-freie externe Tyrode-Lösung** (mit Tris-Puffer auf pH 7.4 eingestellt):
145 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 6 mmol/l Glucose, 10 mmol/l HEPES

2.5.2 Innenlösung

- **interne CsF-Lösung** (mit CsOH-Puffer auf pH 7.2 eingestellt):
10 mmol/l NaCl, 140 mmol/l CsF, 3 mmol/l EGTA (Ethylenglycol-Bis[β -Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat), 10 mmol/l HEPES

2.5.3 Lösungen für die Präparation

Nährmedium

Die Zusammensetzung entspricht 13,05 ml MEM (*minimum essential medium eagle with Earle's salts and NaHCO₃*, M-7647, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 0,3 ml L-Glutamin (G-7513, Sigma), 0,15 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung (P-0781, Sigma) sowie 1,5 ml FCS (*fetal bovine serum*, F-2442, Sigma). Das Nährmedium dient zum Aufbewahren der Hinterwurzelganglienzellen bis zum Experiment, als auch zur

Herstellung der Stammlösungen für die Enzymlösung II (DNase und Trypsininhibitor).

Enzymlösung I

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

Enzymlösung II

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

Stammlösung DNase II: 13 mg DNase II (Typ IV, D-4138, Sigma) werden in 16,25 ml Nährmedium gelöst.

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

2.5.4 Toxine und kanalmodifizierende Substanzen

Tetraethylammonium (TEA)

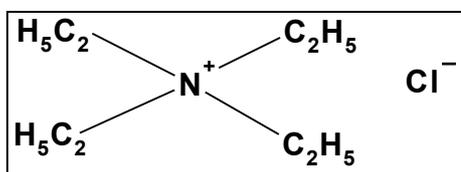


Abbildung 6: Struktur von Tetraethylammoniumchlorid

Tetraethylammonium, ein quarternäres Ammoniumatom, gilt als der klassische Blocker potentialabhängiger Kaliumströme an Nervenmembranen. Er dient somit im wesentlichen zur Isolierung des Natriumstroms. Erstmals wurde dieser Effekt von Tasaki und Hagiwara (1957) am Tintenschneckenriesenaxon beschrieben. TEA zeigt

in einem Konzentrationsbereich von wenigen Millimol pro Liter diese spezifische Wirkung sowohl an der Außen- wie auch an der Innenseite der Zellmembran. Für die Experimente dieser Arbeit ist Tetraethylammoniumchlorid nur von der Außenseite appliziert worden.

Tetrodotoxin (TTX)

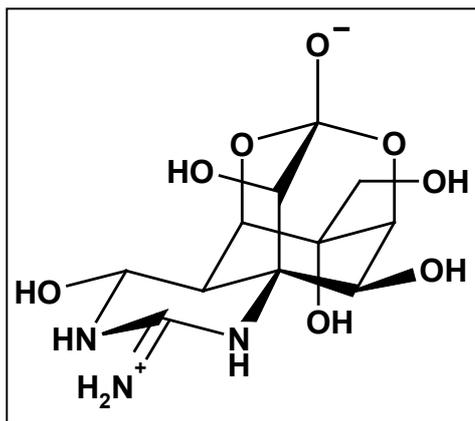


Abbildung 7: Struktur von Tetrodotoxin

TTX ist ein hochtoxisches, paralytisch wirkendes Alkaloid, das aus der Leber und den Ovarien des Kugelfisches (Kao, 1966; Halstead, 1967) und anderer Spezies aus der Familie der Tetraodontidae gewonnen wird. Es ist ein sehr potentes Gift, denn schon die Dosis von 1 mg tötet mehr als 7000 Mäuse. So ist es 160.000 mal potenter als Cocain (Kao, 1966); es führt bereits bei 100 nmol/l zu einem selektiven und reversiblen Block von sensitiven Natriumkanälen (Kao & Fuhrman, 1963; Narahashi *et al.*, 1964).

Der Gegenstand dieser Arbeit war jedoch die Untersuchung des TTX-resistenten Natriumkanals. Dieser Kanal ist bei einer entsprechend hohen Konzentration von 115 $\mu\text{mol/l}$ ebenfalls blockierbar. Deshalb mußte eine Toxin-Dosis gewählt werden, die zwar die TTX-sensitiven Natriumströme unterband, aber eine Darstellung der TTX-resistenten Natriumströme zuließ. Da eingehende Untersuchungen gezeigt haben, daß TTX lediglich von der Membranaußenseite wirksam ist (Koppenhöfer & Vogel, 1969), wurde es der externen Lösung beigelegt. Es wurde deshalb in einer 100 nanomolaren Lösung verwendet.

Cäsium (Cs)

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

Wirkstoffe

Für die Versuche wurden folgende Lokalanästhetika der Piperidinderivate verwendet:

- die stereoisomeren Formen von Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain, sowie
- das Razemat von RAD-393 (1-Pentyl-2,6-Hexahdropicolinylxylylid) und 1-Oktyl-2,6-Hexahdropicolinylxylylid.

Die Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Sandberg (Astra Pain Control, Södertälje, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die Stammlösungen wurden, bis auf 1-Oktyl-2,6-Hexahdropicolinylxylylid (10 mmol/l), mit *Aqua bidestillata* jeweils in einer Konzentration von 100 mmol/l hergestellt. 1-Oktyl-2,6-Hexahdropicolinylxylylid wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in einer 50%igen Ethanollösung gelöst.

2.6 Lösungswechsel

Die Applikation der Testlösungen mit den darin enthaltenen kanalblockierenden Substanzen erfolgte in allen Experimenten durch ein modifiziertes Lösungswechselsystem (Multibarrel-Perfusions-System). Dieses Prinzip wurde erstmals von Yellen (1982) angewandt. Das hier verwendete System setzt sich aus einem Dauerinfusionsgerät Perfusor IV (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), sowie einem Spritzensystem (Hersteller: Feinmechanische Werkstatt des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland) zusammen, das aus einer kliniksübliche Perfusorspritze und einem Plastikdruckschlauch besteht.

Das hier verwendete Applikationssystem besteht aus einem Plexiglas-Fußstück, in das bis zu sechs handelsübliche Einwegspritzen (2-5 ml) gesteckt werden können. Dies geschieht über sechs Bohrkanäle an der Oberseite, die durch Bohrungen an der Vorderseite des Plexiglaskörpers wieder austreten. Hier führen rostfreie Stahlröhrchen, mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm, das Applikat über jeweils parallel angeordnete, zweimal in einem Winkel von 90° gebogene filamentfreie Glaskapillaren (GB 150, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, England) zur Zelle. Eine wasserdichte Verbindung zwischen den 6 Stahlröhren und den gebogenen Glaskapillaren gewährleisten flexible Tefloninterponate.

Nach dem Herstellen eines „Whole-cell“-Patches (s. Kap. 2.1) in der Badlösung wird das Applikationssystem magnetisch auf dem Objektisch fixiert, die Glaskapillaren vorsichtig in die Badlösung eingetaucht und unmittelbar vor der Patchpipette positioniert. Dadurch ist gewährleistet, daß sich der Patch vollständig im Lösungsstrom befindet. Die Membranpatches tolerierten hierbei eine konstante Flußgeschwindigkeit von 5 ml/h gut. Durch das Verschieben des Objektisches und somit des Applikationssystems gegenüber der Pipette, kann ein sekundenschneller Lösungswechsel erfolgen.

Die Messung von Ionenströmen unter verschiedenen Lokalanästhetikakonzentrationen erfolgten frühestens 45 s nach dem Lösungswechsel. Bei unterschiedlichen Lokalanästhetikakonzentrationen in einem Experiment, wurde nach der Kontrollmessung (immer in externer TTX-TEA-haltiger Tyrode-Lösung) mit der niedrigsten Konzentration begonnen.

2.7 Pipetten

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

Eine mit Methanol gereinigte Glaskapillare wird in mindestens vier Schritten unter Zug im Lumen einer mit definierten elektrischen Strömen durchflossenen Wendel in zwei Patchpipetten getrennt. Die Temperatur der Glühwendel, die Zuggeschwindigkeit

sowie die Zeit zum Ziehen und Trennen der Kapillaren sind variabel und entscheiden über die Form und den Spitzendurchmesser der hergestellten Pipetten.

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

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

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

3. Ergebnisse

3.1 Zellgröße

Die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden hauptsächlich an kleinen Hinterwurzelganglienzellen durchgeführt, von denen bekannt ist, daß sie zu Nervenfasern mit langsamer Leitungsgeschwindigkeit führen, wie A δ - oder C-Fasern (Harper & Lawson, 1985).

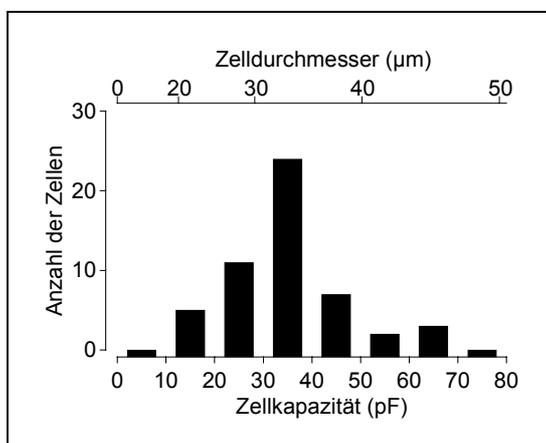
Diese Zellen beinhalten eine höhere Dichte von TTX-resistenten Natriumkanälen in ihren Zellmembranen (Elliott & Elliott, 1993). Um die Zellgröße abzuschätzen, wurde die Membrankapazität jeder Zelle über die Funktion der „Whole-cell“-Kapazitätskompensation des Axopatch 200B ermittelt. Die Häufigkeitsverteilung der Kapazitäten (Abbildung 8) zeigt, daß hauptsächlich Zellen mit einer Kapazität von 10 bis 40 pF für die Experimente benutzt wurden. Da Spinalganglien-Zellen annähernd kugelförmige Zellen sind, kann deren Durchmesser, und damit ihre Größe, mittels der Membrankapazität errechnet werden (Gleichung 2). Zellmembranen haben durch ihre Doppellipidschicht die Funktion von Plattenkondensatoren, deren spezifische Membrankapazität bei 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Hille, 1992) liegt.

Gleichung 2:

$$A_{\text{Kugel}} = \pi * d^2$$

A = Fläche
d = Durchmesser

Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der Zellkapazität aller untersuchten Zellen. Die



elektrische Kapazität kommt hauptsächlich durch die Zellmembran zustande und ist direkt proportional zu ihrer Oberfläche. Die obere Abszisse zeigt den errechneten Durchmesser bei einer vorausgesetzten spezifischen Membrankapazität von 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ sowie unter der Annahme einer sphärischen Zellform. Die Anzahl der insgesamt untersuchten Zellen betrug $n = 51$. Die mittlere Kapazität betrug $34,10 \pm 10,90$ pF (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Dies entspricht einem ungefähren Zelldurchmesser von 20 bis 40 μm bei den untersuchten Zellen. Die Größe der Zelle ist ausschlaggebend für die Expression von TTX-resistenten Natriumkanälen in ihrer Zellmembran. Große Zellen produzieren ausschließlich TTX-sensitiven Strom, während kleine Zellen ein Gemisch aus beiden Natriumströmen besitzen. In unseren Experimenten wird der TTX-sensitive Strom zur isolierten Darstellung des TTX-resistenten Natriumstroms durch 100 nmol/l TTX blockiert.

3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften des TTX-resistenten Natriumkanals

3.2.1 Spannungsabhängigkeit

Um Natriumströme an Spinalganglien zu messen, wurde nach erfolgtem „Whole-cell-Patch“ einer Zelle im „Voltage-Clamp“-Modus des „Patch-Clamp“-Verstärkers ein negatives Membranpotential von -90 mV vorgegeben. Nach einem 50 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls¹ nach -110 mV wurden Natriumströme mit Testimpulsen in 10 mV-Schritten von -80 mV bis +60 mV ausgelöst, um so die Abhängigkeit des Stromes von der Membranspannung zu untersuchen. Die durch diese Reize ausgelösten Natriumströme sind in Abbildung 9 dargestellt, wobei hier die unterschiedlichen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken der Ströme deutlich werden.

Mißt man nun die Amplitude des Natriumspitzenstromes (I_{Na}) während jedem der Reize und trägt sie gegen die Spannung des Testimpulses (E) auf, so erhält man Strom-Spannungskurven, an denen man die Potentialabhängigkeit des Natriumstromes sehen kann.

¹ Der hyperpolarisierende Vorimpuls dient zur Unterbindung der schnellen Inaktivierung des TTX-resistenten Natriumkanals. Weiterhin kann man durch den Vorimpuls den Leckstrom bestimmen und so die Qualität des „Patches“ überprüfen.

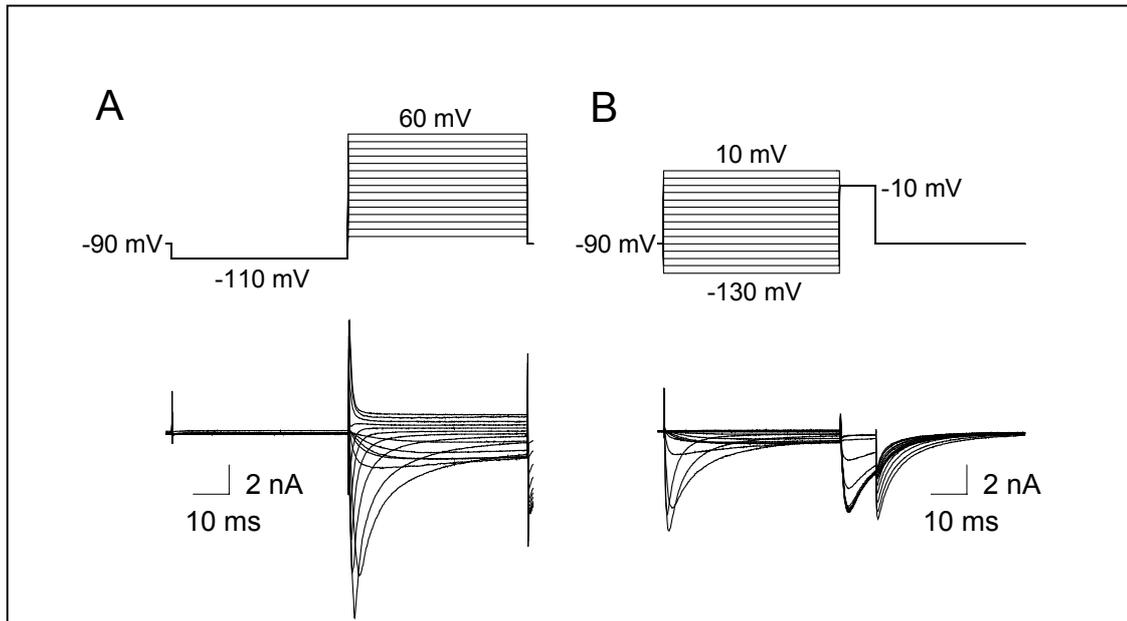


Abbildung 9: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve für TTX-resistente Natriumströme in Kontrolle mit dem jeweiligen Impulsprotokoll

Die Strom-Spannungskurve resultiert zum einen aus der Natriumleitfähigkeit (G_{Na}) der Membran, deren Potentialabhängigkeit durch eine Boltzmann-Funktion beschrieben wird und die in Abhängigkeit des Potentials (E) zwischen null und einer maximalen Leitfähigkeit (G_{Na1max}) liegt.

Gleichung 3:

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

Der Parameter $E_{h,a}$ beschreibt das halbmaximale Aktivierungspotential, d.h. das Potential, bei dem die maximale Leitfähigkeit zur Hälfte aktiviert ist. Der Steilheitsfaktor k_a beschreibt, wie stark sich die Leitfähigkeit in Abhängigkeit des Potentials um $E_{h,a}$ herum ändert.

Zum anderen resultiert sie aus dem bei dem jeweiligen Testpotential fließenden Ionenstrom, der sich mittels des Ohmschen Gesetzes aus E und G_{Na} unter Berücksichtigung des Natriumgleichgewichtspotentials (E_{Na}) berechnen läßt.

Gleichung 4:

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

Setzt man nun Gleichung 3 in Gleichung 4 ein, erhält man eine mathematische Beschreibung der Strom-Spannungskurve,

Gleichung 5:

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

deren Parameter man durch nicht-lineare Kurvenanpassung an die Datenpunkte der Strom-Spannungskurve gewinnen kann. Eine solche Anpassung wird mit den in Abbildung 9A dargestellten Strom-Spannungskurven durchgeführt. Es wurden dazu die jeweiligen Stromamplituden ermittelt und als Datenpunkte in einer Kurve aufgetragen (Abbildung 10).

Dabei zeigte sich, neben dem erwarteten Natriumstrom, der in einem hohen Potentialbereich aktivierte, ein weiterer Stromanteil, der wahrscheinlich einem weiteren TTX-resistenten-Strom² besteht. Dieser früh-aktivierende Kanal zeigte sich schon bei einem niedrigen Potential. Deshalb wurde eine 2-fache Anpassung der Kurve über die Gleichung 6 vorgenommen, um die beiden Anteile voneinander zu isolieren und getrennt auszuwerten. Als Umkehrpotential wurde, für die bei niedrigen Potentialen aktivierbare Stromkomponente, 30 mV angenommen.

Gleichung 6:

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

$G_{Na1, \max}, G_{Na2, \max}$	= maximale Natrium-Leitfähigkeit [pS]
k_{a1}, k_{a2}	= Steilheitsfaktor [mV]
E	= Membranpotential [mV]
$E_{h,a1}, E_{h,a2}$	= halbmaximales Aktivierungspotential [mV]
E_{Na}	= Umkehrpotential [mV]

² Dies ist sehr wahrscheinlich auf das Vorkommen mindestens zweier TTX-resistenter Na⁺-Kanäle zurückzuführen. Nach Tate *et al.* (Tate, 1998) werden dies Kanäle in einen SNS/PN3- sowie den SNS2-Typ eingeteilt. Beide Typen wurden auch von Scholz *et al.* beschrieben (Scholz, 1998a; Rush *et al.*, 1990).

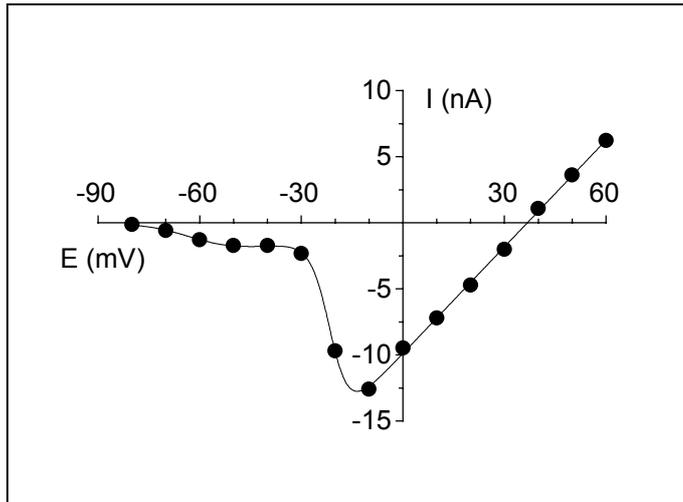


Abbildung 10: Typische Strom-Spannungskurve für TTX-resistente Natriumströme. Strom-Spannungskurve in externer Tyrode-Lösung mit TEA & TTX; Nach einem 50 ms dauernden hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV wurden Natriumströme mit Testimpulsen in 10 mV-Schritten von -80 mV bis $+60$ mV ausgelöst bei einem Haltepotential von $E = -90$ mV (siehe Impulsprotokoll in Abb.

4A).

Die hierbei gewonnenen Parameter wurden gemittelt (Mittelwerte \pm SEM). Es ergaben sich in der externen Tyrode-Lösung mit TEA und TTX (Kontrolle, $n=52$) ein halbmaximales Aktivierungspotential ($E_h =$ Potential, bei dem 50% der Kanäle aktiviert sind) für die Natriumkanäle von $-17,9$ mV und ein Umkehrpotential (E_{Na}) von $30,18$ mV. Für den zweiten Kanaltyp ließ sich ein halbmaximales Aktivierungspotential von $-57,92$ mV bei einem angenommenen Umkehrpotential von 30 mV ermitteln.

3.2.2 Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik

Bevor pharmakologische Untersuchungen durchgeführt wurden, sind zunächst weitere Eigenschaften des TTX-resistenten Natriumstromes bestimmt worden: Dies beinhaltete die Potentialabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung, das Gleichgewichtspotential des Stromes und die Inaktivierungskinetik.

Dazu wurde von jeder Zelle eine Strom-Spannungskurve des TTX-resistenten Natriumstromes angefertigt und mittels nicht-linearer Anpassung das halbmaximale Aktivierungspotential und das Umkehrpotential des Stromes bestimmt (siehe auch Abb. 4B). Die Potentialabhängigkeit der schnellen Inaktivierung wurde anhand von Inaktivierungskurven ermittelt. Ausgehend von einem voreingestellten Haltepotential von -90 mV wurden für 50 ms Impulse zu verschiedenen Potentialen (-130 , -120 , -110

usw. bis +10 mV) appliziert und anschließend der Natriumstrom durch einen 5 ms dauernden Testimpuls nach -10 mV ausgelöst. Der während des Testimpulses gemessene Natriumspitzenstrom (I_{Na}) wurde dann gegen das Potential des Vorimpulses (E) aufgetragen (Abbildung 11).

Durch Anpassung von

Gleichung 7:

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

- $E_{h,i}$ = halbmaximales Inaktivierungspotential [mV]
- E = Membranpotential [mV]
- k = Steilheitsfaktor [mV]
- $I_{Na,max}$ = 1 (normalisiert = 100%)

an die so gewonnenen Datenpunkte erhält man das halbmaximale Inaktivierungspotential ($E_{h,i}$), das Potential, bei dem die Hälfte aller Ionenkanäle in den Inaktivierungszustand übergegangen sind. Der Steilheitsfaktor k beschreibt, wie stark sich die Inaktivierung in Abhängigkeit des Potentials ändert.

Aus allen Strom-Spannungskurven und Inaktivierungskurven wurden folgende Parameter ermittelt: $E_{h,a1} = -16,4 \pm 8,2$ mV (n=50), $E_{h,a2} = -57,9 \pm 6,2$ mV (n=46), $E_{Na} = 31,2 \pm 4,7$ mV (n=43), $E_{h,i} = -29,2 \pm 3,8$ mV (n=50); Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = Anzahl der Experimente.

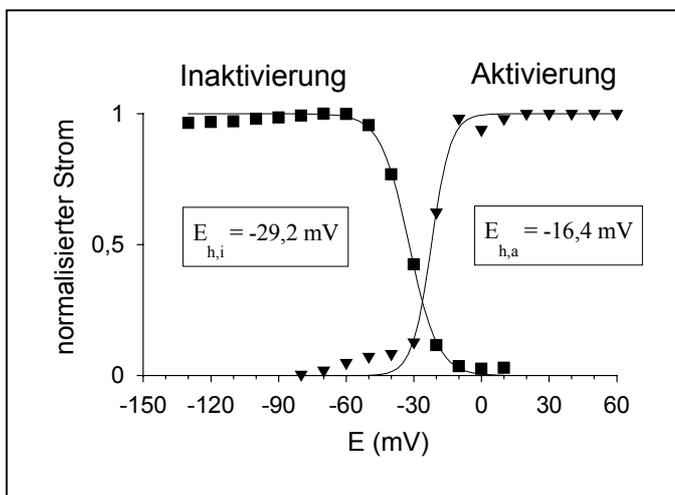


Abbildung 11: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve des TTX-resistenten Natriumstroms in der Kontrollösung. Bei der Darstellung der Aktivierungskurve wurde der bei niedrigen Spannungen aktivierbare Strom vernachlässigt und nicht angepasst.

Um die Verteilung der halbmaximalen Inaktivierungs- und Aktivierungspotentiale zu verdeutlichen, wurden die ermittelten Werte in ein Histogramm (Abbildung 12) eingetragen.

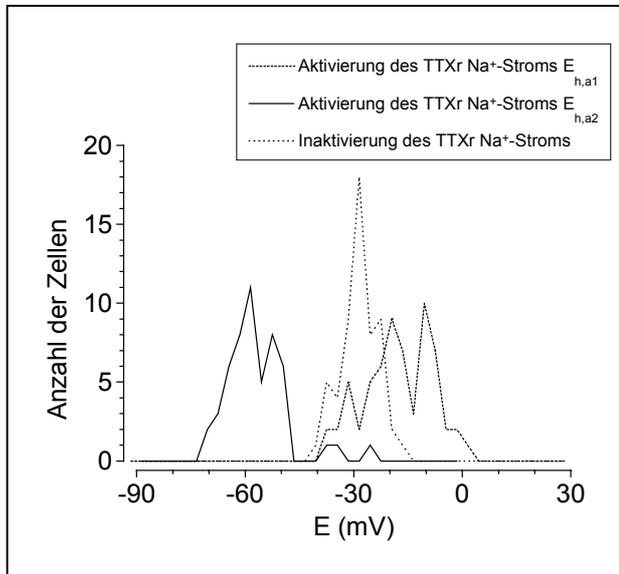


Abbildung 12: Verteilung der halbmaximalen Aktivierungs- und Inaktivierungspotentiale

3.3 Die Wirkung von Piperidinderivaten auf TTX-resistente Natriumströme

3.3.1 Grundlegende Eigenschaften der Blockade durch Piperidinderivate

Um die Determinanten für die Blockierungspotenz des jeweiligen Piperidinderivats am TTX-resistenten Natriumkanal zu finden, wurden Konzentrations-Inhibitionskurven (Abbildung 13) mit den Stereoisomeren von Mepivacain, Ropivacain, Bupivacain und den Razematen von 1-Pentyl-2,6-Methyl-Pipecoloxylid (RAD-393) sowie 1-Oktyl-2,6-Hexahydro-picolinylxylylid für den tonischen und phasischen Block angefertigt. Hierzu wurde in der „Whole-cell“-Konfiguration ein Haltepotential von -90 mV im „Voltage-Clamp“-Modus am Verstärker eingestellt, um das Ruhemembranpotential der Zelle vorzugeben. TTX-resistente Natriumströme wurden dann nach einem 50 ms langen hyperpolarisierenden Vorimpuls durch einen 50 ms dauernden depolarisierenden Spannungssprung nach -10 mV ausgelöst. Eine Folge von zehn dieser Impulse wurden

im Abstand von 0.5 s (2 Hz) appliziert und der Strom während jedes Impulses registriert. Der durch dieses Impulsmuster ausgelöste Natriumstrom wurde in Kontrollösung sowie in 3, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{mol/l}$ der Stereoisomere von Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain gemessen. Bei den experimentellen Substanzen der Razemate von 1-Pentyl-2,6-Methyl-Pipecoloxylid (RAD-393) und 1-Oktyl-2,6-Hexahydropicolinylxylid wurden aufgrund der außerordentlichen Blockierungspotenz zusätzlich die Konzentrationen von 0.1, 0.3 und 1 $\mu\text{mol/l}$ gewählt. Zwischen den einzelnen Konzentrationsschritten wurde eine Äquilibrationszeit von mindestens einer Minute abgewartet. Die extrazellulär applizierten Piperidinderivate verminderten konzentrationsabhängig und reversibel den TTX-resistenten Natriumspitzenstrom (Abbildung 13). Die während des jeweils ersten Impulses in der Impulsfolge gemessene Abnahme des Natriumstromes wird als tonische Blockade bezeichnet. Durch die kurz aufeinander folgenden Impulse wurde der Strom noch weiter reduziert (Abbildung 14B). Diese Blockade wird als phasisch (use-dependent) bezeichnet und ist eine von der Blockade TTX-sensitiver Ströme bekannte und gut untersuchte Eigenschaft der Lokalanästhetika (zur Übersicht siehe Covino und Vassallo, 1976; Butterworth und Strichartz, 1990).

Desweiteren wurden dann die Konzentrationen für eine halbmaximale Blockade (IC_{50} -Werte) durch Anpassung der Gleichung 8 an die Daten bestimmt (Tabelle 2).

Gleichung 8:

$$f(c) = \frac{1}{1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{c}\right)^h}$$

c = Konzentration (mol/l)
 IC_{50} = halbmaximal-inhibierende Konzentration (mol/l)
h = Hill-Koeffizient

Eine die Potenz eines Lokalanästhetikums bestimmende Determinante ist seine Lipidlöslichkeit. So weiß man von der Blockade TTX-sensitiver Natriumströmen an peripheren Nerven durch Lokalanästhetika,

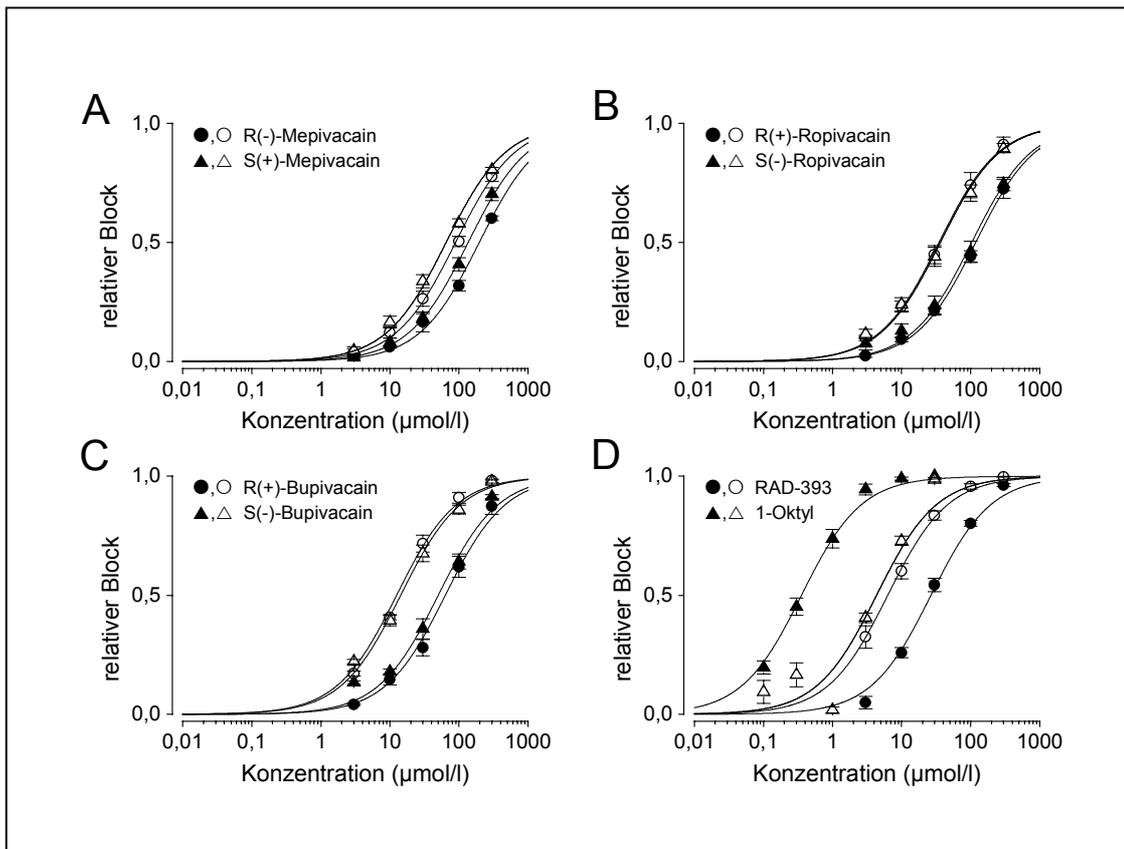


Abbildung 13: Konzentrations-Inhibitionskurven für tonische und phasische Blockade des TTX-resistenten Natriumstromes mit Piperidinderivaten. Der relative Block des Spitzenstromes vom ersten (tonisch, geschlossene Symbole) und vom zehnten (phasisch, offene Symbole) Impuls mit einer Frequenz von 2 Hz wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Die Kurven wurden mit Gleichung 7 angepaßt, mit einem festen Hill-Koeffizienten⁴ von 1. Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen in μM sind in Tabelle 1 aufgeführt. 1-Oktyl-2,6-Hexahydro-picolinylxylid wurde aus Platzgründen zu 1-Oktyl abgekürzt.

daß die lokalanästhetische Potenz einer Substanz um so höher ist, je stärker ihre Lipidlöslichkeit ist (Courtney, 1980), wobei nicht nur die bessere Penetration der den peripheren Nerven umgebenden bindegewebigen Strukturen durch lipophile Lokalanästhetika eine Rolle spielen (Bräu *et al.*, 1998), sondern auch lipophile Interaktionen mit der Bindungsstelle. Es wurden die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen anhand extrazellulärer Lokalanästhetikakonzentrationen bestimmt. Da die Bindungsstelle aber nur von der intrazellulären Seite erreichbar ist, sind so die intrazellulären Konzentrationen für die Blockade ausschlaggebend. Die

³ Ein Hill-Koeffizient von eins ist Ausdruck dafür, daß für die Blockade eines Kanals ein Blockermolekül benötigt wird.

intrazelluläre Konzentration ist aber abhängig vom pKa-Wert der Substanz aufgrund des „Ionenfallen-Prinzips“ leicht höher als die extrazelluläre.

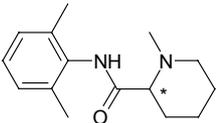
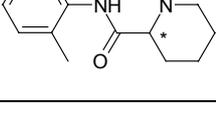
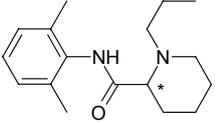
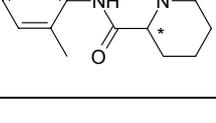
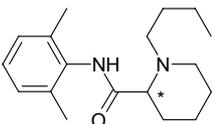
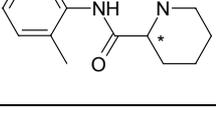
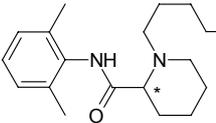
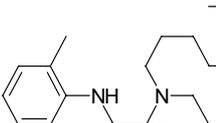
Substanzname	Struktur	IC ₅₀ tonisch (μmol/l)	IC ₅₀ phasisch (μmol/l)	Log(P)	MolGew. (g/mol)	pKa
R(-)-Mepivacain		196,9 ± 12,2 (5)	89,3 ± 5,4 (5)	1,95	246	7,9
S(+)-Mepivacain		136,0 ± 7,3 (5)	65,1 ± 3,6 (5)	1,95	246	7,9
R(+)-Ropivacain		118,1 ± 6,8 (5)	34,7 ± 3,0 (5)	2,90	274	8,2
S(-)-Ropivacain		104,0 ± 10,0 (5)	36,3 ± 2,8 (5)	2,90	274	8,2
R(+)-Bupivacain		63,3 ± 6,0 (5)	12,5 ± 0,9 (5)	3,41	288	8,2
S(-)-Bupivacain		50,1 ± 4,4 (5)	14,3 ± 1,0 (5)	3,41	288	8,2
1-Pentyl-2,6-Hexahydropicolinylxylylid (RAD-393)		26,6 ± 1,7 (5)	6,3 ± 0,4 (5)	3,93	302	8,2
1-Oktyl-2,6-Hexahydropicolinylxylylid		4,3 ± 0,6 (5)	0,32 ± 0,02 (5)	5,40	345	8,2

Tabelle 2: Struktur, IC₅₀-Werte und physikochemische Eigenschaften der Piperidinderivate. In der Strukturformel ist die lipophile Gruppe auf der linken Seite, das tertiäre Amin auf der rechten Seite dargestellt. Die IC₅₀ Werte sind angepaßte Werte ± Standardfehler der Anpassung. Anzahl der Experimente in Klammern. Das Sternchen markiert das chirale C-Atom des Moleküls.

3.3.2 Stereoselektivität der Piperidinderivate

Die Konzentrations-Inhibitionsbeziehungen der Enantiomere von Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain weisen weder für die tonische noch für die phasische Blockade eine signifikante Stereoselektivität auf. Die Substanzen zeigen jedoch eine deutliche Zunahme der Blockierungspotenz (tonisch und phasisch) mit zunehmender Länge der Alkylkette.

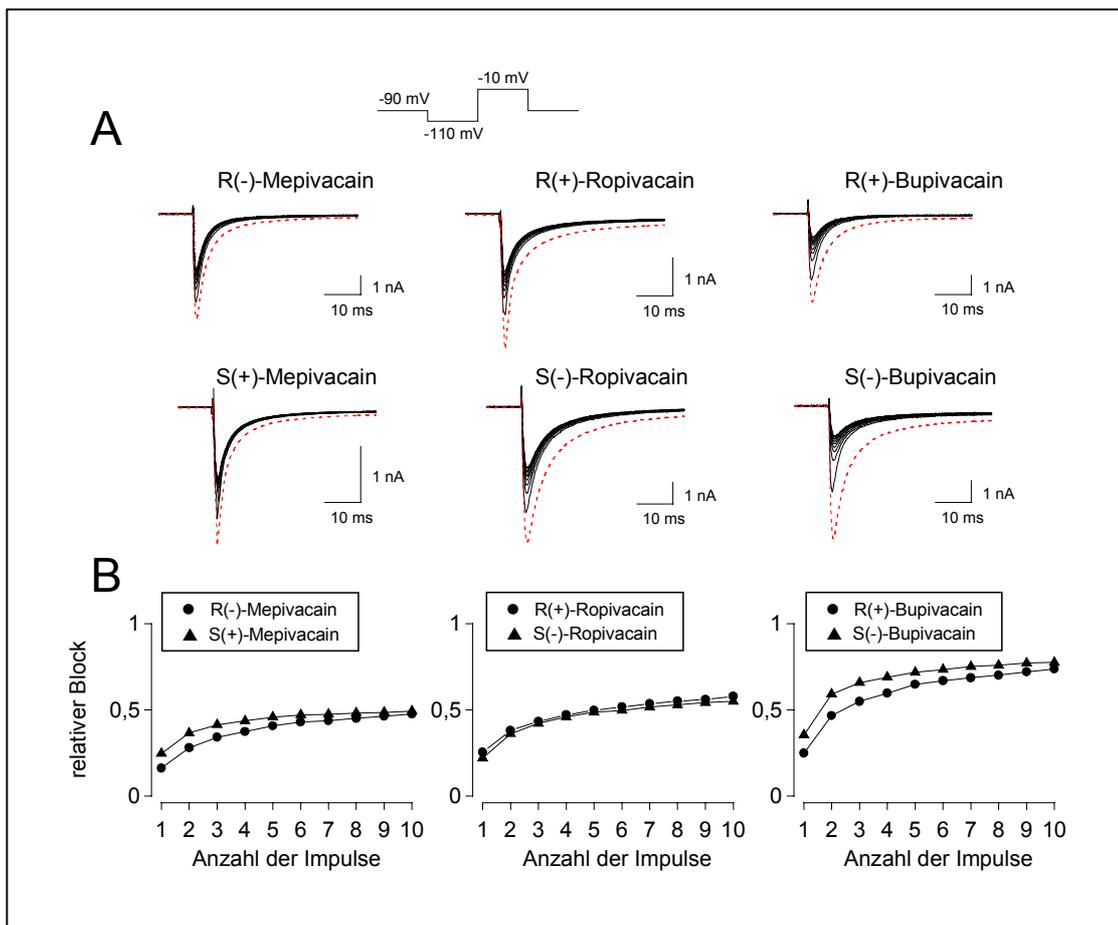


Abbildung 14: Tonische und phasische Blockade des TTX-resistenten Natriumstromes durch Piperidinderivate. A: Originalregistrierungen in Kontrolllösung und in jeweils 30 µM der Stereoisomere von Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain. Die gestrichelten Registrierungen wurden in der Kontrolllösung aufgenommen. Die Ströme wurden mit Hilfe des in der Abbildung dargestellten Impulsmusters zehnmal hintereinander im Abstand von 0,5 s (2 Hz) ausgelöst und für jedes Stereoisomer übereinandergestellt; Haltepotential -90 mV. B: Das Ausmaß der Blockade ist für die jeweiligen Stereoisomere gegen die jeweilige Impulsnummer aufgetragen. Die Reizfrequenz betrug wie in A 2 Hz. Die in Abhängigkeit der Konzentration gemessenen Blockade des ersten Impulses wurde als tonische, die des zehnten Impulses als phasische Blockade für die Erstellung von Konzentrations-Inhibitionskurven verwendet.

Verlängert man die Kette auf C_5H_{11} (RAD-393) und C_8H_{17} (1-Oktyl-2,6-Hexahdropicolinylxylyd), so setzt sich dieser Trend fort. Die Abbildung 14 zeigt Originalregistrierungen TTX-resistenter Natriumströme in Kontrolle und in jeweils 30 μ M-Konzentrationen der Stereoisomere von Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain, wobei die unterschiedliche Potenz der Substanzen deutlich wird. In Abbildung 15 sind die aus Konzentrations-Inhibitionskurven gewonnenen und in Tabelle 2 aufgeführten IC_{50} -Werte gegen die Kettenlänge aufgetragen.

Die Ursache dieser enormen Wirkungszunahme liegt wahrscheinlich in der extremen Zunahme der Lipophilie des Moleküls durch Verlängerung seiner aliphatischen Kette. Während eine Verlängerung der Kette von CH_3 auf C_8H_{17} nur eine Zunahme des Molekulargewichtes um 30% bewirkt, wird die Lipidlöslichkeit um das 3000fache erhöht.

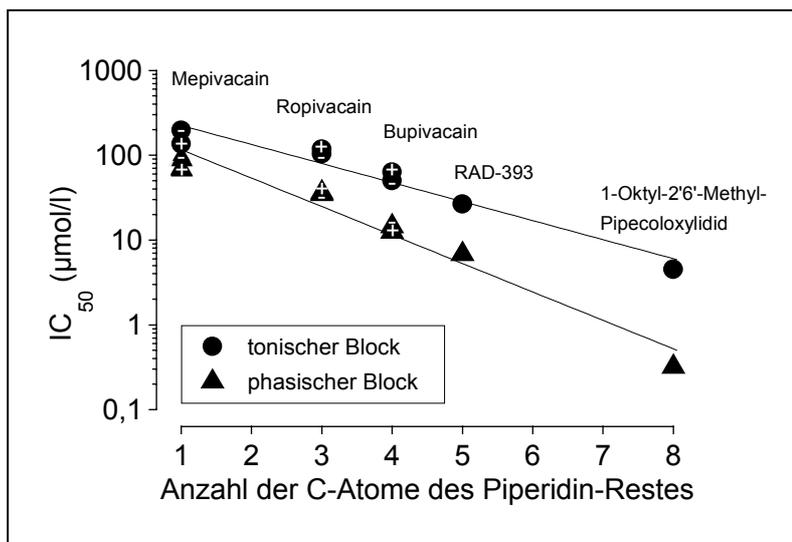


Abbildung 15: IC_{50} -Werte für den tonischen (●) und phasischen (▲) Block in Abhängigkeit der Anzahl der C-Atome im Substituenten R. Die Stereoisomere von Mepi-, Ropi- und Bupivacain sind durch + und - in den Symbolen gekennzeichnet. Für RAD-393 und 1-Oktyl-2,6-Hexahdropicolinylxylyd waren nur die Razemate verfügbar. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, da der Standardfehler der Anpassung kleiner als die Symbolgröße ist. Die Korrelationskoeffizienten betragen -0.97 ($m = -0,22$) für den tonischen und -0.98 ($m = -0,34$) für den phasischen Block.

4. Diskussion

Der periphere Nerv ist der Hauptangriffspunkt für Lokalanästhetika. Die Blockade der Erregbarkeit des Nerven durch Lokalanästhetika ist das Resultat der Blockierung des Stromes durch Natriumkanäle. Aufgrund dieser Schlüsselrolle in der Lokalanästhesie wurde das Phänomen in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht (Butterworth & Strichartz, 1990). Neben diesen gründlichen Untersuchungen, meist an neuronalen TTX-sensitiven Natriumströmen oder an TTX-insensitiven Natriumströmen von Kardiomyozyten durchgeführt, wurde kürzlich an neuronalen TTX-resistenten Strömen gezeigt, daß diese eine ähnliche Empfindlichkeit für üblich in der Klinik verwendete Lokalanästhetika haben wie TTX-sensitive Natriumströme (Bräu & Elliott, 1998).

In dieser Arbeit untersuchten wir die Effekte diverser Lokalanästhetika auf Piperidinbasis an TTX-resistenten Natriumströmen kleiner Hinterwurzelganglien-Neurone bei erwachsenen Wistar-Ratten. Besonderes Augenmerk legten wir dabei auf die Lipidlöslichkeit und die Stereospezifität der verwendeten Substanzen. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in 3 Leitsätzen zusammenfassen, die in den folgenden Abschnitten ausgeführt werden:

- a) Piperidin-Lokalanästhetika erzeugen einen vom jeweiligen Kanalzustand abhängigen Block.

Es existieren mindestens 3 Konformationszustände des Natriumkanals (inaktiviert, aktiviert, ruhend). Nach einer schnellen Depolarisation geht der Kanal vom Ruhezustand in den aktivierten Zustand über, um dann anschließend innerhalb weniger Millisekunden in den inaktivierten Zustand zu wechseln. Eine verlängerte Depolarisation führt den Natriumkanal zusätzlich in einen langsam inaktivierenden Zustand, dessen Erholung im Sekundenbereich liegt.

Durch schnelles wiederholtes Auslösen des Natriumstromes kann eine durch Lokalanästhetika hervorgerufene partielle Natriumstromblockade reversibel verstärkt werden. Diese Verstärkung, die von Reizfrequenz, Reizdauer, Membranpotential und Art des Lokalanästhetikums abhängig ist, wird als phasische Blockade (use-dependent Block) bezeichnet (Butterworth und Strichartz, 1990). Diese spezielle Blockadeform

konnten wir in unseren Experimenten ebenfalls beobachten. Die „modulated receptor hypothesis“ (Hille, 1977; Hondeghem & Katzung, 1977) versucht das Phänomen der phasischen Blockade zu erklären. Hierfür spielen die verschiedenen schon oben erwähnten Konformationszustände des Natriumkanals eine Rolle. Es wird postuliert, daß der Natriumkanal im aktivierten und besonders im inaktivierten Zustand eine deutlich höhere Affinität zu Lokalanästhetika hat als im Ruhezustand. Wird der Natriumstrom beispielsweise durch einen 50 ms dauernden, depolarisierenden Impuls ausgelöst, so kommt es nach wenigen Millisekunden bereits zu einer vollständigen Inaktivierung des Natriumstromes, die für die restliche Dauer der Depolarisation anhält. In dieser Zeit bindet das Lokalanästhetikum sehr stark an den Kanal, löst sich aber in der Zeit zwischen den Reizen, in der der Ruhezustand des Kanals wieder erreicht ist, nur langsam, so daß bei einem kurz darauffolgenden Reiz der Strom noch stärker blockiert ist als beim Vorhergehenden. Dies setzt sich bei den darauffolgenden Reizen fort, bis ein scheinbarer Gleichgewichtszustand erreicht wird. Eine andere, ähnliche, jedoch weniger populäre Erklärung ist die „guarded receptor hypothesis“ (Starmer, Grant & Strauss, 1984). Hierbei ist im Ruhezustand der Zugangsweg des Lokalanästhetikums zu dem Rezeptor behindert. Erst durch die Aktivierung und anschließende Inaktivierung des Kanals wird der Weg freigegeben, so daß es zu einer stärkeren Blockade kommt. Das Lokalanästhetikum selbst hat nach dieser Theorie in jedem Kanalzustand immer die gleiche Affinität zur Bindungsstelle.

Speziell die Linksverschiebung der Inaktivierungskurve hin zu hyperpolarisierenden Potentialen wurde unter verschiedenen Lokalanästhetika beobachtet und resultierte aus einer erhöhten Affinität zum schnell-inaktivierten Zustand (Hille, 1977).

Der in unseren Experimenten mit TTX-resistenten Natriumströmen ebenfalls festgestellte phasische Block, sowie die von Hille beobachtete Linksverschiebung der Inaktivierungskurve, unterstützen das Modell des konformationsabhängigen Blocks für TTX-resistente Natriumströme. Es ist allerdings sehr schwierig herauszufinden, welcher Kanalzustand eine gesteigerte Affinität zum jeweiligen Wirkstoff aufweist, da sowohl im Ruhezustand, im schnell- und langsam-inaktivierten Zustand als auch im Wirkstoff-gebundenen Zustand der Kanal nicht leitet, d.h. keine Natriumionen passieren läßt.

- b) Die Lipidlöslichkeit des Piperidinderivats bestimmt die Potenz des tonischen und phasischen Blocks.

Ragsdale und seine Mitarbeiter (Ragsdale, McPhee, Scheuer & Catterall, 1994) identifizierten am Natriumkanal eine mögliche Bindungsstelle für Lokalanästhetika. Werden in klonierten α -Untereinheiten von Rattenhirn-IIa-Natriumkanälen die auf dem Segment S6 liegenden Aminosäuren Phenylalanin an Position 1764 oder Tyrosin an Position 1771 durch Punktmutationen gegen Alanin ausgetauscht, reduziert sich die Empfindlichkeit des Kanals für das Lokalanästhetikum Etidocain drastisch. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß diese beiden Aminosäuren für die Bindung des Lokalanästhetikums eine große Rolle spielen. Sie liegen auf dem die Membran durchspannenden und aus einer α -Helix bestehenden Segment IV-S6, sind hydrophob und ragen in die Pore des Kanals hinein. Ihr Abstand voneinander beträgt das Doppelte einer Helixwindung (1,1 nm) und ist damit ideal für 1 - 1,5 nm lange Lokalanästhetikamoleküle, die wie z.B. Etidocain über hydrophobe Wechselwirkungen an die Aminosäuren binden.

Klonierte neuronale TTX-resistente Natriumkanäle (SNS/PN3, α -SNS) wiesen identische Aminosäuren an den korrespondierenden Positionen (Dib-Hajj *et al.*, 1998; Rabert *et al.*, 1998) auf, wie sie Ragsdale und Mitarbeiter am TTX-sensitiven Natriumkanal fanden. Eine Bindung an diesen spezifischen Rezeptor ist ebenso wahrscheinlich für TTX-resistente Natriumkanäle. Setzt man voraus, daß Lokalanästhetika an diese hydrophoben Aminosäuren in der Kanalpore binden, wird die Steigerung der Hydrophobozität über eine Verlängerung der Alkyl-Kette des Lokalanästhetikums zu einer festeren Bindung an den Rezeptor führen. Aufgrund der konformitätsabhängigen höheren Affinität zum Rezeptor sind Substanzen mit einer längeren Kohlenstoffkette länger an diesen Rezeptor auch während der Impulse gebunden (Clarkson & Hondeghem, 1985). Dies könnte das ausgeprägte Phänomen der phasischen Blockade erklären, wie wir sie auch in unseren Experimenten mit Lokalanästhetika auf Piperidinbasis gesehen haben (Abbildung 15).

Die Ursache dieser enormen Wirkungszunahme liegt wahrscheinlich in der extremen Zunahme der Lipophilie des Moleküls, die aus der Verlängerung seiner aliphatischen Kette resultiert. Während eine Verlängerung der Kette von CH₃ auf C₈H₁₇ nur eine Zunahme des Molekulargewichtes um 30% bewirkt, wird die Lipidlöslichkeit um das

3000fache erhöht. In anderen Präparationen wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. So hatte die Lipidlöslichkeit der Wirkstoffe einen entscheidenden Einfluß auf die tonische und phasische Blockierung von Summenaktionspotentialen der A-, B- und C-Fasern am Vagusnerv von Kaninchen (Wildsmith *et al.*, 1987). Gleichfalls wird die tonische und phasische Blockade von TTX-sensitiven Natriumkanälen durch Lokalanästhetika vom Amid-Typ maßgeblich von deren Lipidlöslichkeit bestimmt, wie an Präparaten des peripheren Nervs (Courtney *et al.*, 1978; Courtney, 1980; Bräu *et al.*, 1998) als auch an Batrachotoxin (BTX)-modifizierten Natriumkanälen, die in Lipid-Doppelmembranen eingebracht waren (Wang, 1990), gezeigt wurde.

Zwei Gründe können somit für einen Anstieg der Blockierungspotenz durch Zunahme der Lipophile von Bedeutung sein: Zum einen dringen lipophile Moleküle besser in die Membran ein und gelangen so leichter an die Bindungsstelle am Natriumkanal. Zum anderen kann die Wechselwirkung mit der Bindungsstelle selbst lipophiler Natur sein. Wäre nur die Anreicherung in der Membran der Grund für die stärkere Wirkung lipophiler Moleküle, so würde man zwar eine stärkere Blockierungspotenz lipophiler Substanzen erwarten, das Ausmaß der phasischen Blockade wäre jedoch bei niedrigeren Konzentrationen gleich. Auch die schwache Zunahme der Blockierungspotenz im Vergleich zur Konzentrationserhöhung in der Membran spricht gegen diese Annahme. Während die Membrankonzentration von 1-Oktyl-2,6-Hexahydronicolinylylid gegenüber Mepivacain rechnerisch um den Faktor 3000 höher ist, ist die Blockierungspotenz für die tonische Blockade um den Faktor 37 und für die phasische Blockade um den Faktor 245 größer. Eine hydrophobe Wechselwirkung des Lokalanästhetikumoleküls mit der Bindungsstelle am Natriumkanal ist daher die sehr viel wahrscheinlichere Erklärung für die höhere Potenz lipophiler Lokalanästhetika.

- c) Eine niedrige bis gar nicht vorhandene Stereoselektivität ist charakteristisch für die Blockade des TTX-resistenten Natriumkanals durch Piperidin-Lokalanästhetika.

Der höchste Stereoselektivitätsfaktor war 1,4 für S(+)-Mepivacain im Vergleich zur R(-)-Form beim tonischen Block. Auch TTX-sensitive Natriumkanäle weisen eine niedrige Stereoselektivität für diese Substanzen auf. Summenaktionspotentiale an peripheren Nervenfasern zeigen keine Stereoselektivität für den tonischen Bupivacainblock (Lee-Son *et al.*, 1992). In GH₃ Zellen zeigt R(+) zu S(-)-Bupivacain einen Stereoselektivitätsfaktor von 1,6 bei einem Haltepotential von -70 mV, der jedoch auf 0,8 zurückging, wenn die Membran auf -100 mV hyperpolarisiert wurde (Wang und Wang, 1992). Kardiale Natriumströme zeigten keine signifikante Stereospezifität im Ruhezustand, wohl aber eine 1,7-fache für R(+)- zu S(-)-Bupivacain im inaktivierten Zustand (Valenzuela *et al.*, 1995). Dies dürfte erklären, warum die Kardiotoxizität des S(-)-Enantiomers von Bupivacain geringer ist als die der R(+)-Form. Die Kardiotoxizität kommt zustande, weil sich Bupivacain bevorzugt im inaktivierten Zustand an den Rezeptor bindet und von diesem nur schwer abdissoziiert. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der verschiedenen Zustände ist potentialabhängig. Dies erklärt, warum sich das Ausmaß der kardiodepressiven Wirkung von Bupivacain, aber auch von Ropivacain bei Änderungen des Membranpotentials (z.B. durch Änderung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration) ändert (Wulf, Petry & Gödicke, 1993). Das Bindungsverhalten wird für Lidocain als „fast in - fast out“ gekennzeichnet, für Bupivacain als „fast in - slow out“. Bezüglich dieser Eigenschaften scheint Ropivacain eine Zwischenstellung einzunehmen („fast in - intermediate out“). Dies mag insbesondere die Interpretation experimenteller Resultate erleichtern, wonach eine mit Ropivacain oder Lidocain induzierte kardiale Intoxikation leichter zu reversieren (bzw. zu therapieren) ist als bei Bupivacain (Feldman *et al.*, 1991).

Wie sich durch Untersuchungen am Vagusnerv des Kaninchens zeigte, ist die Unterdrückung von Summenaktionspotentialen durch Bupivacain-Enantiomere auch nicht signifikant stereoselektiv (Åberg, 1972). In *in vivo*-Studien wurde beobachtet, daß die lokalanästhetische Potenz für beide Bupivacain-Enantiomere annähernd gleich ist (Åberg, 1972; Luduena, 1972). Die geringe bis gar nicht vorhandene

Stereoselektivität aus unseren Experimenten spiegelt sich am Beispiel des Nervenblocks mit Bupivacain auch in der klinischen Praxis wieder. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der lokalanästhetischen Potenz vom Razemat sowie den Enantiomeren des Bupivacains, als auch hinsichtlich der Nervenblockade in der Epiduralanästhesie oder bei der Plexus brachialis-Blockade festgestellt werden (Cox *et al.*, 1998a,b; Lyons, 1998).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß die größere therapeutische Breite der S(-)-Formen von Ropivacain und Bupivacain durch die hohe Stereoselektivität der kardiovaskulären und zentralnervösen Nebenwirkungen für die R(+)-Formen dieser Substanzen zustande kommen und nicht Ausdruck einer besseren Blockierungspotenz der S(-)-Formen am peripheren Nerven ist.

Weiterhin wurde gezeigt, daß C-Faser Summenaktionspotentiale TTX-resistente Komponenten enthalten. An peripheren Frosch- (Kobayashi *et al.*, 1993; Buchanan *et al.*, 1996), Ratten-, Kaninchen- (Gaumann *et al.*, 1992) und menschlichen (Quasthoff *et al.*, 1995) Nerven wurden Summenaktionspotentiale gemessen, die gegenüber TTX resistent waren, und die anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit langsam leitenden C-Fasern zugeordnet werden können. Diese Ergebnisse festigen die Rolle der TTX-resistenten Natriumkanäle in der Weiterleitung von Schmerzimpulsen und unterstützen die Notwendigkeit, diese Kanäle in der klinischen Anwendung durch Lokalanästhetika zu blockieren. Einige Autoren sind jedoch der Auffassung, daß die Dichte der TTX-resistenten Natriumkanäle entlang des Axons nicht ausreichend ist, um zur Ausbreitung des Aktionspotentials beizutragen (Yoshida & Matsuda, 1979; Caffrey *et al.*, 1992; Villiere & McLachlan, 1996). Desweiteren wurde berichtet, daß die Impulsweiterleitung an cornealen Nozizeptoren für 1 µM TTX sensibel war, hingegen spontane Impulsentladungen an deren distalen Endigungen aber davon nicht betroffen waren (Brock *et al.*, 1998). Ferner zeigten *in vivo*-Studien eine ausreichende Blockierung der Nozizeption mit TTX (Kohane *et al.*, 1998) - allerdings mit sehr hohen TTX-Konzentrationen (>1 µM). Eine Erklärung dieser widersprüchlichen Resultate dürften vermutlich damit zu finden sein, daß nur eine, aber nicht alle nozizeptiven Fasern in der Lage sind, TTX-resistente Aktionspotentiale zu übertragen. Eine weitere interessante Eigenschaft der TTX-resistenten Natriumkanäle ist, daß sie von Nozizeptor sensibilisierenden Substanzen aktiviert werden können. England und Mitarbeiter (England *et al.*, 1996) zeigten, daß Prostaglandin E₂ (PGE₂), ein

Schmerzmediator, der die Empfindlichkeit von Nozizeptoren heraufsetzt, die Erregbarkeit kleiner Spinalganglienzellen steigern kann. Diese gesteigerte Erregbarkeit war gegenüber 500 nmol/l TTX resistent und wird von den Autoren auf eine cAMP-Protein-Kinase vermittelte Modulation TTX-resistenter Natriumströme zurückgeführt. Gold und Mitarbeiter (Gold *et al.*, 1996) fanden, daß neben Prostaglandin E auch Adenosin und Serotonin, Substanzen, die ebenfalls Nozizeptoren sensibilisieren können, den TTX-resistenten Natriumstrom in kleinen Spinalganglienzellen verstärken und dessen Aktivierungskurve nach links, d.h. in Richtung Hyperpolarisation verschieben, was zu einer gesteigerten Erregbarkeit führen kann.

In pathologisch veränderten Nerven kann so der TTX-resistente Natriumkanal aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften zur Impuls- und somit Schmerzentstehung beitragen. Gerade an Nervenfasern, deren Membranpotential durch eine Schädigung weniger negativ ist, kann der TTX-resistente Natriumkanal noch zur Impulsenstehung beitragen, da sein Aktivierungs- und Inaktivierungspotential deutlich höher liegen als das TTX-sensitiver Natriumkanäle. Zusätzlich unterstützt die schnellere Erholung nach der Inaktivierung repetitive Erregbarkeit (Elliott und Elliott, 1993).

Nach Schädigung der Nervenfasern durch Verletzungen, entzündlicher Prozesse oder Malnutrition kann es zur Ausbildung ektooper Aktivitätszentren an der geschädigten Stelle des Nerven kommen, wobei die von diesen Zentren ausgehenden Impulse nach zentral weitergeleitet und, wenn in Nozizeptoren entstanden, als Schmerz wahrgenommen werden (Devor, 1994). In verschiedenen Studien wurden die Auswirkungen peripherer Nervenverletzungen auf die Expression von Ionenkanälen in den zugehörigen Spinalganglienzellen untersucht. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte dabei ein Ansteigen TTX-sensitiver (Waxmann *et al.*, 1994) und ein Abfall TTX-resistenter Natriumkanäle proximal der Schädigung gezeigt werden (Dib-Hajj *et al.*, 1998). Elektrophysiologisch fanden sich keine Unterschiede von TTX-sensitiven und TTX-resistenten Natriumströmen zwischen gesunden und geschädigten Nerven, und auch der Gehalt an mRNA für TTX-resistente Natriumkanäle (PN3) im geschädigten Nerven ist nicht verändert (Novakovic *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse sprechen zunächst gegen die Beteiligung TTX-resistenter Natriumkanäle an der neuropathischen Schmerzentstehung. Durch immunhistochemische Färbemethoden konnte jedoch neben einer Abnahme des intrazellulären Kanalpools, eine deutliche

Zunahme TTX-resistenter Kanalproteine an der geschädigten Stelle des Nerven nachgewiesen werden (Novakovic *et al.*, 1998), wodurch eine Beteiligung TTX-resistenter Natriumkanäle an der neuropathischen Schmerzentstehung wieder plausibel wird.

In der Tat können Lokalanästhetika in niedrigen Konzentrationen Aktionspotentiale beeinflussen. Wie Scholz und Mitarbeiter (Scholz *et al.*, 1998b) zeigten, vermindern 30 µmol/l Lidocain und Bupivacain die Frequenz der durch Dauerdepolarisation an kleinen Spinalganglien der Ratte ausgelöste Salven TTX-resistenter Aktionspotentiale deutlich. Da die Stärke eines Reizes durch die Aktionspotentialfrequenz kodiert wird, kommt es deshalb durch die Frequenzabnahme zu einer Schmerzreduktion.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung von Wirkmechanismen der Stereoisomere Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain sowie zweier experimenteller Abkömmlinge an Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanälen isolierter Hinterwurzelganglienneurone der erwachsenen Ratte. Diese sogenannten Piperidinderivate sind wie andere Lokalanästhetika auch die wichtigste Waffe im Kampf um die Schmerzausschaltung am peripheren Nerv. Die daraus resultierende Blockade der Erregbarkeit des Nerven ist das Resultat der Blockierung des Stromes durch Natriumkanäle. Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit der „Whole-cell-Patch“-Methode ausgeführt.

Besonderes Augenmerk legten wir dabei auf die Lipidlöslichkeit und die Stereospezifität der verwendeten Substanzen. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich zu 3 Leitsätzen zusammenfassen:

- a) Piperidin-Lokalanästhetika erzeugen einen vom jeweiligen Kanalzustand abhängigen Block.
- b) Die Lipidlöslichkeit des Piperidinderivats bestimmt die Potenz des tonischen und phasischen Blocks.
- c) Eine niedrige bis gar nicht vorhandene Stereoselektivität ist charakteristisch für die Blockade des TTX-resistenten Natriumkanals durch Piperidin-Lokalanästhetika.

Die Stereoisomere von Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain zeigen eine niedrige bis gar nicht vorhandene signifikante Stereoselektivität am TTX-resistenten Natriumkanal bei annähernd gleicher Blockierungspotenz. So lassen sich isomerspezifische Nebenwirkungen durch die Anwendung des jeweils nebenwirkungsärmeren Stereoisomers reduzieren. Das R(+)-Enantiomer von Bupivacain zeigt zum Beispiel eine im Vergleich zum S(-)-Enantiomer deutlich erhöhte Kardiotoxizität. Die Applikation des S(-)-Enantiomers von Bupivacain in der Anästhesie hätte den entscheidenden Vorteil der Nutzung eines größeren therapeutischen Spielraums. Bisher werden jedoch in vielen Kliniken nach wie vor die Razemate der obengenannten Substanzen verwendet.

In der Diskussion steht ebenfalls die Beteiligung des TTX-resistenten Natriumkanals an der neuropathischen Schmerzentstehung. Die Blockade des TTX-resistenten Natriumkanals mittels einer spezifischen Substanz ist deshalb zu einem Wettlauf unter den Pharmakonzernen geworden.

6. Bibliographie

- Åberg G: Toxicological and local anaesthetic effects of optically active isomers of two local anaesthetic compounds. *Acta Pharmacol Toxicol* 1972; 31: 273-286.
- Akermann B: Uptake and retention of the enantiomers of a local anesthetic in isolated nerve in relation to different degrees of blocking nervous conduction. *Acta Pharmacol Toxicol* 1973; 32: 225-236.
- Akermann B, Camougis G, Sandberg RV: Stereoisomerism and differential activity in excitation block by local anesthetics. *Eur J Pharmacol* 1969; 8: 337-347.
- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN: tetrodotoxin-resistant voltage gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 1996; 379: 257-262.
- Bräu ME, Elliott JR: Local anaesthetic effects on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurones. *Eur J Anaesthesiol* 1998; 15: 80-88.
- Bräu ME, Rush AM, Elliott JR: Single channel analysis of two types of tetrodotoxin-resistant sodium channels in small cells isolated from adult rat (200-350g) dorsal root ganglia (DRG). *J Physiol (Lond)* 1995; 487: 184P (*Abstract*).
- Bräu ME, Vogel W, Hempelmann G: Fundamental properties of local anesthetics: Half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na⁺ and K⁺ channels in peripheral nerve. *Anesth Analg* 1998; 87: 885-889.
- Bräu ME, Vogel W, Hempelmann G: Wie blockieren Lokalanästhetika den Schmerz? Molekulare Mechanismen neuraler Blockade. *Spiegel der Forschung, Wissenschaftsmagazin der Justus-Liebig-Universität Gießen* 1992; 1: 33-36.
- Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C: Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol (Lond)* 1998; 512: 211-217.

-
- Buchanan S, Harper AA, Elliott JR: Differential effects of tetrodotoxin (TTX) and high external K^+ on A and C fibre compound action potential peaks in isolated frog sciatic nerve. *Neurosci Lett* 1996; 219: 131-134.
- Butterworth JF, Strichartz GR: Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* 1990; 72: 711-734.
- Caffrey JM, Eng DL, Black JA, Waxman SG, Kocsis JD: Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1992; 592: 283-297.
- Catterall WA (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61
- Clarkson CW, Hondeghem LM: Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology* 1985; 62: 396-405.
- Courtney KR: Structure-activity relations for frequency-dependent sodium channel block in nerve by local anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213: 114-119.
- Courtney KR, Etter EF: Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. *Eur J Pharmacol* 1983; 88: 1-9.
- Courtney KR, Kendig JJ, Cohen EN: The rates of interaction of local anesthetics with sodium channels in nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 207: 594-604.
- Courtney KR: Structure-activity relations for frequency-dependent sodium channel block in nerve by local anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213: 114-119.
- Cox CR, Checketts MR, Mackenzie N, Scott NB, Bannister J: Comparison of S(-)-bupivacaine with racemic (RS)-bupivacaine in supraclavicular brachial plexus block. *Br J Anaesth* 1998a; 80: 594-598.

-
- Cox CR, Faccenda KA, Gilhooly C, Bannister J, Scott NB, Morrison LMM: Extradural S(-)-bupivacaine: comparison with racemic RS-bupivacaine. *Br J Anaesth* 1998b; 80: 289-293.
- Devor M, Jänig W, Michaelis M: Modulation of activity in dorsal root ganglion neurones by sympathetic activation in nerve injured rats. *J Neurophysiol* 1994; 71: 38-47.
- Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG: Na_vN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8963-8968.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA: Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994; 12: 1041-1048.
- Elliott AA, Elliott JR: Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol (Lond)* 1993; 463: 39-56.
- England S, Bevan S, Docherty RJ: PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol (Lond)* 1996; 495: 422-440.
- Feldman HS, Arthur GR, Pitkanen M, Hurley R, Doucette AM, Covino BG: Treatment of acute systemic toxicity after the rapid intravenous injection of ropivacaine and bupivacaine in the conscious dog. *Anesth Analg* 1991; 73: 373-384.
- Gasser HS, Erlanger J: The role of fiber size in the establishment of a nerve block by pressure or cocaine. *Am J Physiol* 1929; 88: 581-591.
- Gaumann DM, Brunet PC, Jirounek P: Clonidine enhances the effects of lidocaine on C-fiber action potential. *Anesth Analg* 1992; 74: 719-725.

-
- Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD: Hyperalgesic agents increase tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1108-1112.
- Halstead BW (1967) Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. In: U.S. Government Printing Office, Washington, DC, Vol I, pp 83-87, Vol II, pp 679-844.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100.
- Harper AA, Lawson SN: Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol (Lond)* 1985; 359: 31-46.
- Hille B: Ionic channels of excitable membranes. 2nd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA 1992.
- Hille B, Schwarz W: Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* 1978; 72: 409-442.
- Hille B: Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol* 1977; 69: 497-515.
- Hodgkin AL, Huxley AE: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952; 117: 500-544.
- Hondeghem LM, Katzung BG: Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977; 472: 373-398.
- Kao CY: Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol Rev* 1966; 18: 997-1049.

-
- Kao CY, Fuhrman FA: Pharmacological studies on tarichatoxin, a potent neurotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 1963; 140: 31-40.
- Kobayashi J, Ohta M, Terada Y: C fiber generates a slow Na⁺ spike in the frog sciatic nerve. *Neurosci Lett* 1993; 162: 93-96.
- Koh DS, Jonas P, Bräu ME, Vogel W: A TEA-insensitive flickering potassium channel active around the resting potential in myelinated nerve. *J Membrane Biol* 1992; 130: 149-162.
- Kohane DS, Yieh J, Lu NT, Langer R, Strichartz GR, Berde CB: A re-examination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia. *Anesthesiology* 1998; 89: 119-131
- Koppenhöfer E, Vogel W: Wirkung von Tetrodotoxin und Tetraethylammoniumchlorid an der Innenseite der Schnürringmembran von *Xenopus laevis*. *Pflügers Arch* 1969; 313: 361-380.
- Kostyuk PG, Veselovsky NS, Tsyndrenko AY: Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons - I. Sodium currents. *Neuroscience* 1981; 6: 2423-2430.
- Lee-Son S, Wang GK, Concus A, Crill E, Strichartz GR: Stereoselective inhibition of neuronal sodium channels by local anesthetics. Evidence for two sites of action? *Anesthesiology* 1992; 77: 324-335.
- Luduenä FP, Bogado EF, Tullar BF: Optical isomers of mepivacaine and bupivacaine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972; 200: 359-369.
- Lyons G, Columb M, Wilson RC, Johnson RV: Epidural pain relief in labour: potencies of levobupivacaine and racemic bupivacaine. *Br J Anaesth* 1998; 81: 899-901.

-
- Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF: Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol (Lond)* 1998; 508: 647-657.
- Motomura H, Fujikawa S, Tashiro N, Ito Y, Ogata N: Single-channel analysis of two types of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglia. *Pflügers Arch* 1995; 431: 221-229.
- Narahashi T, Moore JW, Scott WR: Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J Gen Physiol* 1964; 47: 965-974.
- Naylor SL, Hunter JC, Sangameswaran L: A novel voltage-gated sodium channel in human dorsal root ganglia. *Abstracts Society for Neuroscience* 1997; 23: 908.
- Neher E, Sakmann B: Single channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. *Nature* 1976; 260: 799-802.
- Novakovic SD, Tzoumaka E, McGivern JG, Haraguchi M, Sangameswaran L, Gogas KR, Eglen RM, Hunter JC: Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. *J Neurosci* 1998; 18: 2174-2187.
- Ogata N, Tatebayashi H: Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. *J Physiol (Lond)* 1993; 466: 9-37.
- Quasthoff S, Großkreutz J, Schröder JM, Schneider U, Grafe P: Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. *Neuroscience* 1995; 69: 955-965.
- Quayle JM, Standen NB, Stanfield PR: The voltage-dependent block of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle by caesium and barium ions. *J Physiol (Lond)* 1988; 405: 677-697.

-
- Rabert DK, Koch BD, Ilnicka M, Obernolte RA, Naylor SL, Herman RC, Eglén RM, Hunter JC, Sangameswaran L: A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. *Pain* 1998; 78: 107-114.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA: Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 1994; 265: 1724-1728.
- Roth S, Seemann P, Akermann SBA, Chan-Wong M: The action and adsorption of local anesthetic enantiomers on erythrocyte and synaptosome membranes. *Biochem Biophys Acta* 1972; 255: 199-206.
- Roy ML, Reuveny E, Narahashi T: Single channel analysis of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1994; 650: 341-346.
- Rush AM, Bräu ME, Elliott AA, Elliott JR: Characterization of multiple sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol (Lond)* 1998; 511: 771-789.
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglén RM, Herman RC: Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 1996; 271: 5953-5956.
- Scholz A, Appel N, Vogel W: Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *Eur J Neurosci* 1998a; 10: 2547-2556.
- Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W: Complex blockade of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *J Physiol* 1998b; 79: 1746-1754.

-
- Schwarz W, Palade PT, Hille B: Local anesthetics: Effect of pH on use-dependent block of sodium channels in frog muscle. *Biophys J* 1977; 20: 343-368.
- Starmer CF, Grant AO, Strauss HC: Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. *Biophys J* 1984; 46: 15-27.
- Strichartz GR, Sanchez V, Arthur GR, Chafetz R, Martin D: Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pK_a values of clinically used drugs. *Anesth Analg* 1990; 71: 158-170.
- Tasaki I, Hagiwara S: Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol* 1957; 40: 859-885.
- Tate S, Benn S, Hick C, Trezise D, John V, Mannion RJ, Costigan M, Plumpton C, Grose D, Gladwell Z, Kendall G, Dale K, Bountra C und Woolf CJ: Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nature neuroscience* 1998; 1(8): 653-655.
- Valenzuela C, Snyders DJ, Bennett PB, Tamargo J, Hondeghem LM: Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation* 1995; 92: 3014-3024.
- Villiere V, McLachlan EM: Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *J Neurophysiol* 1996; 76: 1924-1941.
- Wang GK, Wang SY: Altered stereoselectivity of cocaine and bupivacaine isomers in normal and batrachotoxin-modified Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 1992; 100: 1003-1020.
- Wang GK: Binding affinity and stereoselectivity of local anesthetics in single batrachotoxin-activated Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 1990; 96: 1105-1127.

-
- Waxman SG, Kocsis JD, Black JA: Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 1994; 72: 466-470.
- Wildsmith JAW, Brown DT, Paul D, Johnson S: Structure-activity relationships in differential nerve block at high and low frequency stimulation. *Br J Anaesth* 1989; 63: 444-452.
- Wildsmith JAW, Gissen AJ, Takman B, Covino BG: Differential nerve blockade: Esters v. amides and the influence of pKa. *Br J Anaesth* 1987; 59: 379-384.
- Wulf H, Petry A, Gödicke J: Die Potentialabhängigkeit der Wirkung von Bupivacain und Ropivacain am Herzen. In vitro-Untersuchungen zur Wirkung der Lokalanästhetika auf die Kontraktionskraft und das Aktionspotential. *Anaesthesist* 1993; 42: 516-520.
- Yellen G: Single Ca^{2+} -activated nonselective cation channels in neuroblastoma. *Nature* 1982; 296: 357-359.
- Yoshida S, Matsuda Y: Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques. *J Neurophysiol* 1979; 42: 1134-1145.

7. Lebenslauf

- Persönliche Daten

Name: Pierre Branitzki
Geburtsdatum: 21. April 1967
Geburtsort: Erfurt
Familienstatus: seit 1990 verheiratet mit Simone Branitzki, geborene Bublies, Intensivfachschwester

- Schulbildung

1973-1975 3. Polytechnische Oberschule in Erfurt
1975-1976 Grundschule in Mainz-Mombach
1976-1977 Präsident-Mohr-Schule in Ingelheim
1977 staatliches Sebastian-Münster-Gymnasium in Ingelheim
1977-1978 Förderstufe der Alexander von Humboldt Schule in Rüsselsheim
1978-1979 Förderstufe der Goetheschule in Rüsselsheim
1979-1981 Max-Planck-Gymnasium in Rüsselsheim

- Berufsausbildung 1

1981-1984 Rüsselsheimer Modell 1:
Erwerb der Fachschulreife und des IHK-geprüften
Elektroanlageninstallateurs
1984-1987 Rüsselsheimer Modell 2:
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife sowie des staatlich
geprüften Assistenten für Elektronik (Steuerungs- und
Regelungstechnik)

- Wehrdienstzeit

1987-1988 Ableistung des Grundwehrdienstes im Sanitätsdienst der
Bundeswehr

- Berufsausbildung 2

1988-1992 Studium der medizinischen Vorklinik an der Universität Mainz
SS 1991 Beginn theologischer Studien in Mainz (Griechisch und
Hebräisch)
1992-1994 Theologiestudium an der Freien Theologischen Akademie in
Gießen mit Absolvierung des Zwischenexamens
seit 1994 Wiederaufnahme des Medizinstudiums an der Universität
Gießen
1995 Physikum

1996	Beginn der Doktorarbeit in der Anästhesie/ Physiologie
1997	1. Staatsexamen
1998	2. Staatsexamen
1999	3. Staatsexamen
seit Nov. 1999	Arzt im Praktikum am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg in der Kooperationseinheit der Strahlentherapie des Universitätsklinikums Heidelberg

8. Danksagung

Sie ist folgenden Personen gewidmet:

GOTT meinem Herrn und Schöpfer,

ohne den mein Sein nicht vorstellbar wäre und der mir die Augen für seine herrliche und großartige Schöpfung geöffnet hat.

PD Dr. med. Michael E. Bräu,

für die exzellente wissenschaftliche Grundausbildung, die Betreuung, sowie seine Fähigkeit, komplexe Zusammenhänge in anschaulicher und verständlicher Weise zu vermitteln.

Prof. Dr. Werner Vogel und seinen Mitarbeitern,

für fruchtbare Diskussionen im Dienstagskreis und die zur Verfügungstellung eines elektrophysiologischen Arbeitsplatzes

meinen Eltern und Schwiegereltern,

für die moralische und finanzielle Unterstützung in nicht ganz einfachen Situationen.

meiner Frau Simone,

für ihr segensreiches Gebet und ihre selbstlose Liebe, die mich durch die Zeit meines Studiums stets spürbar begleitet haben.